

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. T. Lüdde

Zelluläre und virale Determinanten bei der Entstehung der AIDS-Pandemie:

Untersuchung früher Replikationsschritte simianer
Immundefizienzviren des Schimpansen (SIVcpz)

Dissertation

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

vorgelegt von

Rachel Scheck

2021

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Carsten Münk

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schaal

Für meine Brüder Moritz und Felix

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Twizerimana, A. P., R. Scheck, D. Becker, Z. Zhang, M. Wammers, L. Avelar, M. Pflieger, D. Häussinger, T. Kurz, H. Gohlke and C. Münk (2020). "Cell type-dependent escape of capsid inhibitors by simian immunodeficiency virus SIVcpz." *Journal of Virology* 94(23)

Twizerimana, A. P., R. Scheck, D. Häussinger and C. Münk (2018). "Post-entry restriction factors of SIVcpz." *Future Virology* 13(10): 727-745.

Zusammenfassung

Das 2019 entdeckte SARS-Coronavirus 2 und die darauf folgende COVID19-Pandemie verdeutlichten erneut die Relevanz des Verständnisses über die zoonotische Übertragung von Viren. Zwar ist bekannt, dass das für die AIDS-Pandemie verantwortliche humane Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) vom simianen Immundefizienzvirus des Schimpansen (SIVcpz) abstammt, jedoch ist bisher nicht abschließend geklärt, welche Faktoren dies bedingen. Nur zwei der vier Unterarten des gemeinen Schimpansen werden in freier Wildbahn durch SIVcpz infiziert: Der zentralafrikanische *Pan troglodytes troglodytes* durch SIVcpzPtt und der ostafrikanische *P. t. schweinfurthii* durch SIVcpzPts. Lediglich SIVcpzPtt konnte im frühen 20. Jahrhundert zu HIV-1 werden, wohingegen SIVcpzPts nie im Menschen nachgewiesen wurde. Auch, wenn epidemiologische Ursachen hierfür nicht völlig auszuschließen sind, geht man von einer unterschiedlichen Adaptation an den Menschen aus. In dieser Arbeit wurden HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts hinsichtlich ihrer Interaktion mit zellulären Faktoren untersucht, die bei der frühen Phase des retroviralen Replikationszyklus relevant sind. Obwohl mit der cART (*Combined Antiretroviral Therapy*) eine effektive Therapie zur Virussuppression bei einer HIV-Infektion verfügbar ist, drängt die zunehmende Resistenzentwicklung auf die Entwicklung neuer Medikamente. In dieser Arbeit wurde daher zusätzlich die Wirkung kleiner antiretroviraler Moleküle, der Capsidinhibitoren PF74 (PF-3450074) und PF57 (PF-3759857), auf eine Infektion der drei Viren in unterschiedlichen Zellsystemen untersucht. Diese beeinflussen in hohen Konzentrationen das *Uncoating* und die reverse Transkription, und in niedrigen den nukleären *Entry*, sowie die Integration. Es wurden pseudotypisierte Reporterviren in *Single-Cycle* Infektionsassays verwendet, die die Replikationsschritte nach dem viralen Eintritt in die Zelle bis zur Proteinexpression beleuchten, was im Folgenden als Infektion bezeichnet wird. Während HIV-1 zwei verwendete humane Zelllinien gleich stark infizierte, offenbarte sich für beide SIVcpz eine Zelltypabhängigkeit, die sich auch in der Sensibilität gegen Capsidinhibitoren und deren Interaktion mit zellulären Faktoren wie Cyclophilin A (Cyp A) widerspiegelte. Während Cyp A SIVcpz vor hohen Konzentrationen der Inhibitoren eher schützte, verstärkte es die Wirkung geringer Dosen. Hinsichtlich ihrer Fähigkeit Restriktionsfaktoren zu antagonisieren und zelluläre Faktoren für ihre Replikation zu nutzen, unterschied sich sowohl HIV-1 von beiden SIVcpz, als auch SIVcpzPtt von SIVcpzPts, wobei vor allem verschiedene Wege des nukleären *Entry* und der Integration bedeutend zu sein scheinen.

Abstract

The COVID19 pandemic caused by SARS-coronavirus 2 pointed out the importance of knowledge about zoonotic transmissions of viruses. Although it is well established that the precursor of the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), which resulted in the AIDS pandemic, is the simian immunodeficiency virus of the chimpanzee (SIVcpz), it still remains unclear under which circumstances the virus could cross the species barrier. Just two of the four subspecies of the chimpanzees are naturally infected by SIVcpz: the central African chimpanzee (*Pan troglodytes troglodytes*) is infected by SIVcpzPtt and the eastern African chimpanzee (*P. t. schweinfurthii*) by SIVcpzPts. Only SIVcpzPtt evolved to HIV-1 in the early 20th century, while SIVcpzPts was never found in humans. Epidemiological reasons for this difference cannot be fully excluded, but it seems likely that both viruses are differently adapted to humans. In this thesis, HIV-1, SIVcpzPtt and SIVcpzPts were examined for their interaction with cellular factors involved in early steps of the retroviral replication cycle.

Even though cART (combined antiretroviral therapy) is an effective treatment for viral suppression during HIV-1 infections, increasing drug resistances call for the development of new therapies. Additionally, small-molecule capsid inhibitors PF74 (PF-3450074) and PF57 (PF-3759857) were tested in different cell systems. High concentrations of these inhibitors influence the uncoating and reverse transcription and lower concentrations influence nuclear entry and integration. Here, pseudotyped reporter viruses were used in single-cycle infection assays, which reveal viral infection after entry until protein expression. While HIV-1 equally infected two human cell lines, both SIVcpz showed a cell type specificity affecting their sensibility to capsid inhibitors and their interaction with cellular factors as Cyclophilin A (Cyp A). While Cyp A had a protective role for SIVcpz against high concentrations of the inhibitors, it enhanced the antiviral activity of low concentrations. Concerning the antagonization of restriction factors and the use of dependency factors HIV-1 is not only distinct from SIVcpz, but SIVcpzPtt also differed from SIVcpzPts. It seems that the pathways most affected by these differences are nuclear entry and integration.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	CsA	Ciclosporin A
α	anti	CV-1	<i>Green Monkey Kidney</i> -Zellen
μl	Mikroliter	CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
μM	Mikromolar	Cyp A	Cyclophilin A
Abb	Abbildung	ddH₂O	Doppelt destilliertes Wasser
Agm	<i>African Green Monkey</i> / Äthiopische Grünmeerkatze/ <i>Chlorocebus aethiops</i>	DMEM	<i>Dulbecco's High-Glucose Modified Eagle's Medium</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
AP-1	Adapter Protein 1	DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
APOBEC3	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, Catalytic Polypeptide-like 3</i>	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
APS	Ammoniumperoxodisulfat	DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-buffered Saline</i>
bzw.	beziehungsweise	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ca.	circa	ECL	<i>Enhanced luminol-based Chemoluminescent</i>
cART	<i>Combined Antiretroviral Therapy</i>	EDTA	Ethylendiamintetraazetat
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5	env	<i>Envelope</i> Glykoprotein
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>	ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> / Komplementäre DNA	FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> / Durchflusszytometrie
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> -Zellen	FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> / Fetales Kälberserum
CO₂	Kohlenstoffdioxid	FRhL-2	<i>Fetal Rhesus Monkey Lung</i> -Zellen/ Rhesusaffe/ <i>Macaca mulatta</i>
COVID19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>	g	Erdbeschleunigung
cps	<i>Counts Per Second</i>	g	Gramm
CPSF6	<i>Cleavage And Polyadenylation Specificity Factor Subunit 6</i> / <i>Cleavage and Polyadenylation Specificity-Faktor Untereinheit 6</i>	gag	<i>Group Specific Antigen</i>
cpz	<i>Chimpanzee</i> / Gemeiner Schimpanse/ <i>Pan troglodytes</i>	GFP	Grün fluoreszierendes Protein
CRFK	<i>Crandell-Rees Feline Kidney</i> -Zellen	ggf.	gegebenenfalls
		gor	Gorilla/ <i>Gorilla gorilla gorilla</i>
		gp	Glykoprotein

gsn	<i>Greater Spot-Nosed Monkey/</i> <i>Große Weißnasenmeerkatze/</i> <i>Cercopithecus nictitans</i>	MxB	<i>Myxovirus Resistance Protein B</i>
GST	Glutathion S-Transferase	NaCl	Natriumchlorid
h	Stunde	NaOH	Natriumhydroxid
HA	<i>Human Influenza Hemagglutinin/</i> Humanes Influenzahämagglutinin	Nef	<i>Negative Regulatory Factor</i>
HCl	Chlorwasserstoff	NFκB	<i>Nuclear Factor κ-Light-Chain-Enhancer of Activated B cells</i>
HEK293T	<i>Human Embryonic Kidney-Zellen</i>	ng	Nanogramm
HeLa	Henrietta Lacks-Zellen	nm	Nanometer
HIV	Humanes Immundefizienzvirus	NP-40	NonidetP-40
HOS	<i>Human Osteosarcoma-Zellen</i>	ns	nicht signifikant
HRP	<i>Horseradish Peroxidase/</i> Meerrettichperoxidase	NUP	Nucleoporin
Hu	Human	OH	Hydroxidion
IgG	Immunglobulin G	OM	<i>Owl Monkey/ Östlicher Graukehl-Nachtaffe/ Aotus trivirgatus</i>
kB	Kilobasen	OMK	<i>Owl Monkey Kidney-Zellen/ Östlicher Graukehl-Nachtaffe/ Aotus trivirgatus</i>
kDa	Kilodalton	P. t.	Pan troglodytes
KO	<i>Knockout</i>	PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell/ Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts</i>
l	Liter	PF57	PF-3759857
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>	PF74	PF-3450074
Lys	Lysin	pg	Pikogramm
M	Molar	PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
mg	Milligramm	pol	Polymerase
ml	Milliliter	PPIA	Peptidylprolylisomerase A
MLV	Murines Leukämievirus	PPT	Polypurintrakt
mM	Millimolar	Prof	Professor:in
mnd	Mandrill/ <i>Mandrillus sphinx</i>	Pts	<i>Pan troglodytes schweinfurthii</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection/</i> Multiplizität der Infektion	Ptt	<i>Pan troglodytes troglodytes</i>
mon	<i>Mona Monkey/ Monameerkatze/</i> <i>Cercopithecus mona</i>	PVDF	Polyvinylidenfluorid
mRNA	Messenger RNA	RanBP2	<i>RAN Binding Protein/ NUP358</i>
mus	<i>Mustached Monkey/</i> Blaumaulmeerkatze/ <i>Cercopithecus cephus</i>	rcm	<i>Red Capped Mangabeys/ Halsbandmangabe/ Cercocebus torquatus</i>

Rev	<i>Regulator of Virion Expression</i>	smm	<i>Sooty Mangabey/ Rußmangabe/ Cercocebus atys</i>
Rh	<i>Rhesusaffe/ Macaca mulatta</i>	SPRY	<i>SPLa and the RYanodine Rezeptor</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>	TAE	<i>Tris-Azetat-EDTA-Puffer</i>
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay/ Radioimmunpräzipitationsassay</i>	TAR	<i>Transactivation Responsive Region</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid/ Ribonukleinsäure</i>	Tat	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
rpm	<i>Rounds Per Minute</i>	TBST	<i>Tris-Buffered Saline with Tween 20</i>
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>	TEMED	<i>Tetramethylethylendiamin</i>
RRE	<i>Rev Response Element</i>	THP-1	<i>Human Acute Monocytic Leukemia-Zellen</i>
SAM	<i>Sterile Alpha Motif</i>	TNPO3	<i>Transportin 3</i>
SAMHD-1	<i>SAM Domain and HD Domain-containing-Protein 1/ SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltendes Protein 1</i>	TRIM	<i>Tripartite Motif</i>
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>	TRIMCyp	<i>Fusionsprotein aus TRIM5 und Cyclophilin A</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate/ Natriumdodecylsulfat</i>	TRIS	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis/ Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	tRNA	<i>Transfer RNA</i>
SERINC3/5	<i>Serine Incorporator Protein 3/5</i>	U	<i>Units</i>
SIV	<i>Simianes Immundefizienzvirus</i>	u.a.	<i>unter anderem</i>
SIVcpz	<i>Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen</i>	UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/ AIDS</i>
SIVcpzPts	<i>Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen Pan troglodytes schweinfurthii</i>	USA	<i>United States of America</i>
SIVcpzPtt	<i>Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen Pan troglodytes troglodytes</i>	UV	<i>Ultraviolett</i>
		V	<i>Volt</i>
		v.a.	<i>vor allem</i>
		vgl.	<i>vergleiche</i>
		Vif	<i>Viral Infectivity Factor</i>
		Vpr	<i>Virales Protein r</i>
		Vpu	<i>Virales Protein u</i>
		Vpx	<i>Virales Protein x</i>
		vs.	<i>versus</i>
		VSV-G	<i>Glykoprotein des Vesicular-Stomatitis-Virus</i>
		WT	<i>Wildtyp</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Humanes Immundefizienzvirus (HIV) und das <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (AIDS)	1
1.2	Evolutionsgeschichte simianer und humaner Immundefizienzviren	2
1.3	Das simiane Immundefizienzvirus des Schimpansen (SIVcpz)	3
1.4	Aufbau des HI- und SI-Virions	4
1.5	Genetischer Aufbau von HIV und SIV	6
1.6	Replikationszyklus von Lentiviren	7
1.6.1	Viraler <i>Entry</i>	7
1.6.2	<i>Uncoating</i> und reverse Transkription	8
1.6.3	Nukleärer Import	9
1.6.4	Integration	9
1.6.5	Transkription und Spleißen	9
1.6.6	Translation, <i>Assembly</i> und Knospung	10
1.7	Beeinflussung der retroviralen Replikation durch Wirtsfaktoren	13
1.7.1	Cyclophilin A	13
1.7.2	<i>Tripartite Motif</i> (TRIM) Protein 5 α und TRIM-Cyclophilin A-Fusionsproteine	14
1.7.3	<i>Cleavage and Polyadenylation Specificity</i> -Faktor Untereinheit 6 (CPSF6) ..	15
1.7.4	SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltendes Protein 1 (SAMHD-1)	16
1.8	Capsidinhibitoren	17
1.9	Ziele der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Elektronisches Equipment	19
2.1.2	Chemikalien	20
2.1.3	Puffer und Lösungen	21
2.1.4	Nährmedien und Chemikalien für die Zellkultur	22
2.1.5	Antikörper	23
2.1.6	Plasmide	24
2.1.7	Molekularbiologische Kits	25
2.2	Methoden der Zellkultur	25
2.2.1	Auftauen und Einfrieren der Zellen	28
2.2.2	Herstellung CPSF6-358 exprimierender HeLa-Zellen	28
2.2.3	Herstellung Rhesus TRIM5 α und TRIM-Cyclophilin A exprimierender CRFK-Zellen	29

2.2.4	Herstellung der Viruspartikel	30
2.2.5	<i>Single-Cycle</i> Infektionsassay	32
2.2.6	Untersuchung der Verpackung von Cyclophilin A in HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts	34
2.2.7	Infektion von CRFK-, OMK-, CV-1, HeLa- und HOS-Zellen mit wildtypischen SIVcpz.....	35
2.2.8	Analyse der Degradierung von SAMHD-1 durch HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts	35
2.3	Molekularbiologische und proteinchemische Methoden	35
2.3.1	Vervielfältigung von Plasmid-DNA.....	35
2.3.2	Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese von DNA.....	37
2.3.3	Herstellung eines Proteinlysates aus eukaryotischen Zellen	38
2.3.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.3.5	Immunoblot	40
2.3.6	Immunodetektion von Proteinen	40
2.4	Software und statistische Auswertung	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Infektion von Zelllinien humaner, simianer und feliner Spezies durch HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts	42
3.2	Expression zytoplasmatischer Proteine in HOS- und HeLa-Zellen.....	45
3.3	Restriktion durch <i>Tripartite Motif 5</i> (TRIM5)-Proteine verschiedener simianer und humaner Spezies	46
3.4	Restriktion von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts durch Capsidinhibitoren	48
3.4.1	Antivirale Aktivität der Capsidinhibitoren PF-3450074 (PF74) und PF-3759857 (PF57) in HOS-, HeLa- und FRhl-2-Zellen.....	48
3.4.2	Abhängigkeit der antiviralen Aktivität von PF74 und PF57 von TRIM5-Proteinen.....	51
3.4.3	Antivirale Aktivität von PF74 und PF57 gegen die Virusmutante SIVcpzPtt(Pts-Capsid).....	54
3.5	Einfluss von zellulärem Cyclophilin A auf HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts....	56
3.5.1	Wirkung von Ciclosporin A auf HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts in HOS-, HeLa- und FRhl-2-Zellen	56
3.5.2	Verpacken von Cyclophilin A in neu entstehende Virionen von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts.....	57
3.5.3	Einfluss von Ciclosporin A auf die Infektion durch HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts	58
3.5.4	Infektion mit HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts in Cyclophilin A- <i>Knockout</i> -Zellen	59
3.5.5	Einfluss von Cyclophilin A auf die inhibitorische Wirkung von PF74 und PF57.....	62

3.6	Einfluss des <i>Cleavage and Polyadenylation Specificity</i> -Faktors Untereinheit 6 (CPSF6) auf eine Infektion mit HIV-1	69
3.7	Einfluss des SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltenden Proteins 1 (SAMHD-1) auf eine Infektion durch SIVcpzPtt und SIVcpzPts.....	70
4	Diskussion.....	73
4.1	Die Infektionsfähigkeit von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts in simianen Zelllinien wird wesentlich, aber nicht ausschließlich, durch TRIM5-Proteine bestimmt	74
4.2	HIV-1 und SIVcpz unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit humane Zelllinien zu infizieren.....	77
4.3	HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts zeigen unterschiedliche Zelltypabhängigkeiten hinsichtlich ihrer Sensibilität für Capsidinhibitoren.....	79
4.3.1	Die Wirkung von PF74 und PF57 ist weitestgehend TRIM5-unabhängig....	80
4.3.2	Das Capsid ist nicht die einzige Determinante für eine Resistenz gegen Capsidinhibitoren	80
4.4	Die Abhängigkeit einer Infektion mit HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts von Cyclophilin A ist virus- und zelltypspezifisch	81
4.4.1	Cyclophilin A wird ähnlich in neu entstehende Virionen von HIV-1 und SIVcpz verpackt	81
4.4.2	Ciclosporin A hat Cyclophilin A-abhängige und -unabhängige Wirkungen auf HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts	81
4.4.3	Ist TRIM5 α der zelluläre Faktor, der die zelltypspezifische Wirkung von Cyclophilin A auf eine lentivirale Infektion erklärt?	83
4.4.4	Die Interaktion zwischen Cyclophilin A und den Capsidinhibitoren ist komplex und sowohl virus-, als auch zelltypabhängig.....	84
4.4.5	Ciclosporin A beeinflusst die Wirkung der Capsidinhibitoren Cyclophilin A-abhängig und -unabhängig	84
4.4.6	Cyclophilin A hat einen zelltypspezifisch schützenden Effekt auf SIVcpzPtt und SIVcpzPts gegen hohe Konzentrationen der Capsidinhibitoren	85
4.4.7	Die Wirkung niedriger Capsidinhibitoren-Konzentrationen zeigt für HIV-1 und SIVcpz eine unterschiedliche Abhängigkeit von Cyclophilin A.....	86
4.5	SAMHD-1 stellt kein Hindernis für die Durchbrechung der Speziesbarriere zwischen Schimpansen und Menschen dar	89
4.6	Schlussfolgerungen und Ausblick	90
5	Literaturverzeichnis.....	95

1 Einleitung

1.1 Humanes Immundefizienzvirus (HIV) und das *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS)

Mit 38 Millionen mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) lebenden Menschen, 1,7 Millionen Neuinfektionen und 690 000 AIDS-assoziierten Todesfällen im Jahr 2019 ist die AIDS-Pandemie nach wie vor eines der wichtigsten Gesundheitsthemen weltweit (UNAIDS 2020). In den 1980er Jahren wurde in den USA eine Häufung von bis dahin seltenen, mit Immunsuppression assoziierten Erkrankungen wie das Kaposi Sarkom oder die *Pneumocystis jirovecii* Pneumonie bei v.a. jungen Männern, die Sex mit Männern hatten, festgestellt. Die spezielle Konstellation aus erniedrigter CD4+ T-Zellzahl und das Auftreten bestimmter Erkrankungen führte zur Beschreibung des *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) und 1983 wurde das humane Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) Gruppe M als auslösender Erreger identifiziert (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983, Rockstroh 2020). Später entdeckte man das ähnliche HIV-2 und die HIV-1 Gruppen O, N und P, die v.a. auf Westafrika konzentriert sind und weit weniger Menschen infiziert haben (Sharp and Hahn 2011).

HIV wird hauptsächlich vertikal bei der Geburt oder durch Stillen, parenteral und sexuell übertragen. Unbehandelt verläuft eine HIV-Infektion in drei Stadien und endet meist mit dem Versterben der Betroffenen. Die akute, wenige Tage bis Wochen dauernde HIV-Infektion kann sich mit grippeähnlichen Symptomen oder auch symptomlos äußern. Die darauf folgende Latenzphase kann über mehrere Jahre symptomarm verlaufen, wird jedoch teilweise durch kurze Episoden der Immunschwäche unterbrochen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Depletion von CD4+ T-Zellen, was eine Immunsuppression zur Folge hat. Das letzte Stadium wird durch das Auftreten einer AIDS-definierenden Erkrankung bestimmt (Rockstroh 2020).

Zwar stellt die cART (*Combined Antiretroviral Therapy*) eine effektive Behandlungsmethode zur Unterdrückung der HI-Virusreplikation dar, allerdings ist ihre Wirkung stark von der regelmäßigen Einnahme der Medikamente abhängig. Da HIV sein Genom auch in langlebige Zellen wie Gedächtniszellen integriert, kommt es nach Absetzen der Therapie zu einem *Rebound* und einem erneuten Anstieg der Viruslast (Hoffmann and Rockstroh 2020). Für eine Beendigung der AIDS-Pandemie sind daher die in den UNAIDS 90-90-90 Zielen definierten Punkte essentiell. Diese beinhalten, dass 90% der HIV-

Infizierten von ihrer Infektion wissen, davon 90% Zugang zur antiretroviralen Medikation und davon 90% eine Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze haben. 2019 kannten weltweit 81% der HIV-Infizierten ihren Status, 82% davon wurden antiretroviral behandelt und davon hatten wiederum 88% eine supprimierte Virusreplikation. Daraus ergibt sich, dass 2019 von allen HIV-Infizierten 67% eine Therapie erhielten und 59% eine Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze hatten (UNAIDS 2020).

1.2 Evolutionsgeschichte simianer und humaner

Immundefizienzviren

Humane Immundefizienzviren (HIV) sind durch zoonotische Übertragung von simianen Immundefizienzviren (SIV) auf den Menschen entstanden. SIV gibt es in über 40 nicht-humanen Primatenspezies in Subsahara-Afrika. Es gibt mehrere dokumentierte Übertragungen von SIVs von einer Spezies auf die nächste, wovon sich einige im neuen Wirt nicht weiter verbreiten konnten und andere zu neuen SIV-Stämmen führten (Sharp and Hahn 2011, Bell and Bedford 2017, Sauter and Kirchhoff 2019). Von diesen 40 Primatenspezies haben gemeine Schimpansen (*Pan troglodytes*), Rußmangaben (*Sooty Mangabeys*, *Cercocebus atys*) und Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) ihr SIV auf den Menschen übertragen. Schimpansen haben ihr SIVcpz auf Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) und den Menschen übertragen, was zur Entstehung von SIVgor und HIV-1 Gruppe M und N führte (Huet, Cheynier et al. 1990, Keele, Van Heuverswyn et al. 2006, Van Heuverswyn, Li et al. 2006, Sharp and Hahn 2011). SIVgor wurde bei zwei Übertragungen auf den Menschen zu den HIV-1 Gruppen O und P (Plantier, Leoz et al. 2009, Vallari, Holzmayer et al. 2011, D'Arc, Ayouba et al. 2015). Das verwandte HIV-2 stammt aus Übertragungen von SIVsmm durch Rußmangaben (*Sooty Mangabeys*, *Cercocebus atys*) auf den Menschen (Sharp and Hahn 2011, Ayouba, Akoua-Koffi et al. 2013, Sauter and Kirchhoff 2019). Eine Übersicht über die genetische Herkunft von HIV findet sich in Abbildung 1. Während HIV-1 Gruppe M weltweit verbreitet ist und ca. 75,7 Millionen Menschen infiziert hat (UNAIDS 2020), sind die anderen Gruppen hauptsächlich auf Westafrika beschränkt und es gab bisher lediglich etwa 20 (Gruppe N), 100 000 (Gruppe O) bzw. 2 (Gruppe P) dokumentierte Fälle (Plantier, Leoz et al. 2009, Vallari, Holzmayer et al. 2011, D'Arc, Ayouba et al. 2015, Sauter and Kirchhoff 2019). HIV-2 ist vor allem in Westafrika verbreitet und hat bisher ca. 2 Millionen Menschen infiziert (Sauter and Kirchhoff 2019).

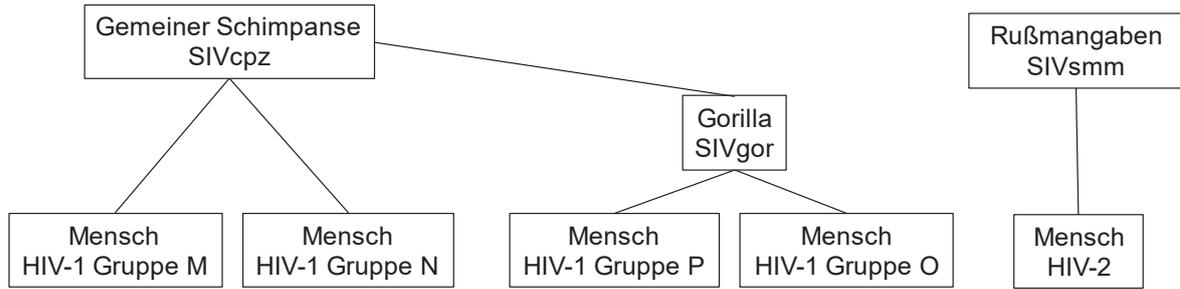


Abb. 1: Übersicht über die evolutionäre Herkunft des humanen Immundefizienzvirus (HIV)

Das pandemisch verbreitete HIV-1 Gruppe M stammt aus der Übertragung des simianen Immundefizienzvirus des Schimpansen (SIVcpz), von dem ebenfalls die seltene, auf Westafrika beschränkte Gruppe N und das simiane Immundefizienzvirus des Gorilla (SIVgor) abstammen. SIVgor wurde bei zwei Gelegenheiten auf den Menschen übertragen, woraus die HIV-1 Gruppen O und P entstanden. Mit HIV-1 Gruppe O wurden ca. 100 000 Menschen infiziert, wohingegen es nur zwei dokumentierte Fälle mit Infektionen durch Gruppe P gibt. HIV-2 hat einen anderen genetischen Ursprung und ist durch mehrere Übertragungen von SIVsmm (*Sooty Mangabeys*, *Cercocebus atys*) durch Rußmangaben auf den Menschen entstanden.

1.3 Das simiane Immundefizienzvirus des Schimpansen (SIVcpz)

Zur Gattung der Schimpansen gehören gemeine Schimpansen, *Pan troglodytes*, und Bonobos, *Pan paniscus*. Erstere werden in vier geographisch getrennte Unterarten, *Pan troglodytes verus* (westafrikanischer Schimpanse), *Pan troglodytes ellioti* (nigerianisch-kamerunischer Schimpanse), *P. t. troglodytes* (zentralafrikanischer Schimpanse) und *P. t. schweinfurthii* (ostafrikanischer Schimpanse) unterteilt (Hey 2010), von denen in freier Wildbahn lediglich die letzten beiden mit zwei verschiedenen simianen Immundefizienzviren des Schimpansen, SIVcpzPtt und SIVcpzPts, infiziert werden (Santiago, Rodenburg et al. 2002, Sharp and Hahn 2011, Locatelli, Harrigan et al. 2016, Sauter and Kirchhoff 2019). In Schimpansen ist eine Infektion mit SIVcpz mit einer erniedrigten CD4+ T-Zellzahl und einer Immunaktivierung im Lymphknoten assoziiert, die zu strukturellen Veränderungen sekundär lymphatischer Organe führt (Greenwood, Schmidt et al. 2015). In freier Wildbahn sind einige Fälle von Schimpansen mit AIDS-ähnlichen Erkrankungen beobachtet worden (Keele, Jones et al. 2009, Etienne, Nerrienet et al. 2011). Jedoch ist die Pathogenität einer SIVcpz-Infektion nicht abschließend geklärt.

Anfang des 20. Jahrhunderts ist SIVcpzPtt in Südostkamerun vom zentralafrikanischen Schimpansen (*P. t. troglodytes*) auf den Menschen übergegangen und hat für die Entstehung des für die AIDS-Pandemie verantwortlichen HIV-1 Gruppe M gesorgt (Gao, Bailes et al. 1999, Santiago, Rodenburg et al. 2002, Keele, Van Heuverswyn et al. 2006, Van Heuverswyn, Li et al. 2007, Worobey, Gemmel et al. 2008, de Sousa, Muller et al.

2010). Obwohl auch SIVcpzPts aus ostafrikanischen Schimpansen (*P. t. schweinfurthii*) *in vitro* in der Lage ist humane CD4⁺ T-Zellen zu infizieren und den selben Tropismus wie HIV-1 aufweist, ist es nie im Menschen nachgewiesen worden und kein HIV stammt von ihm ab (Santiago, Rodenburg et al. 2002, Santiago, Lukasik et al. 2003, Takehisa, Kraus et al. 2007). SIVcpz selbst ist vermutlich Resultat einer Rekombination aus einem evolutionären Vorgänger von SIVgsn/mon/mus (SIV *greater spot-nosed monkey/ mona monkey/ mustached monkey*), welches *Cercopithecus*-Affen infiziert, einem Vorgänger von SIVrcm und SIVmnd-2, welche Halsbandmangaben (*Red Capped Mangabeys, Cercocebus torquatus*) und Mandrillen (*Mandrillus sphinx*) infizieren, und einem unbekanntem SIV (Bailes, Gao et al. 2003, Bell and Bedford 2017).

1.4 Aufbau des HI- und SI-Virions

HIV und SIV gehören zur Gattung *Lentivirus* der Familie *Retroviridae*. Sie sind behüllt. Und ihr virales Genom besteht aus zwei positivsträngigen RNA Molekülen, die 5'-gecapped und 3'-polyadenyliert sind. Die beiden (+)-RNA-Stränge sind mit dem Nucleocapsidprotein (p7) assoziiert, welches zusammen mit den für die Virusreplikation wichtigen Enzymen reverse Transkriptase und Integrase im viralen Capsid enthalten ist. Zusätzlich enthält das Virion die für die Prozessierung der viralen Vorläuferproteine essentiell gewesene Protease (Vogt 1997). HIV-1 und SIVcpz verpacken in ihre Capside außerdem zelluläre Proteine wie Cyclophilin A (Braaten, Franke et al. 1996, Sokolskaja, Sayah et al. 2004, Twizerimana, Scheck et al. 2020). Die Virionen von HIV und SIV besitzen eine aus einer Lipiddoppelschicht bestehenden Hülle, die von der Plasmamembran der produzierenden Wirtszelle abstammt. An ihrer inneren Oberfläche befindet sich als schützendes Polypeptid die Matrix (Fiorentini, Marini et al. 2006). Außen tragen die Virionen ein Glykoprotein, das aus dem oberflächlichen gp120 und dem transmembranären gp41 besteht (Vogt 1997). Eine schematische Darstellung des Aufbaus eines HI- oder SI-Virions findet sich in Abbildung 2.

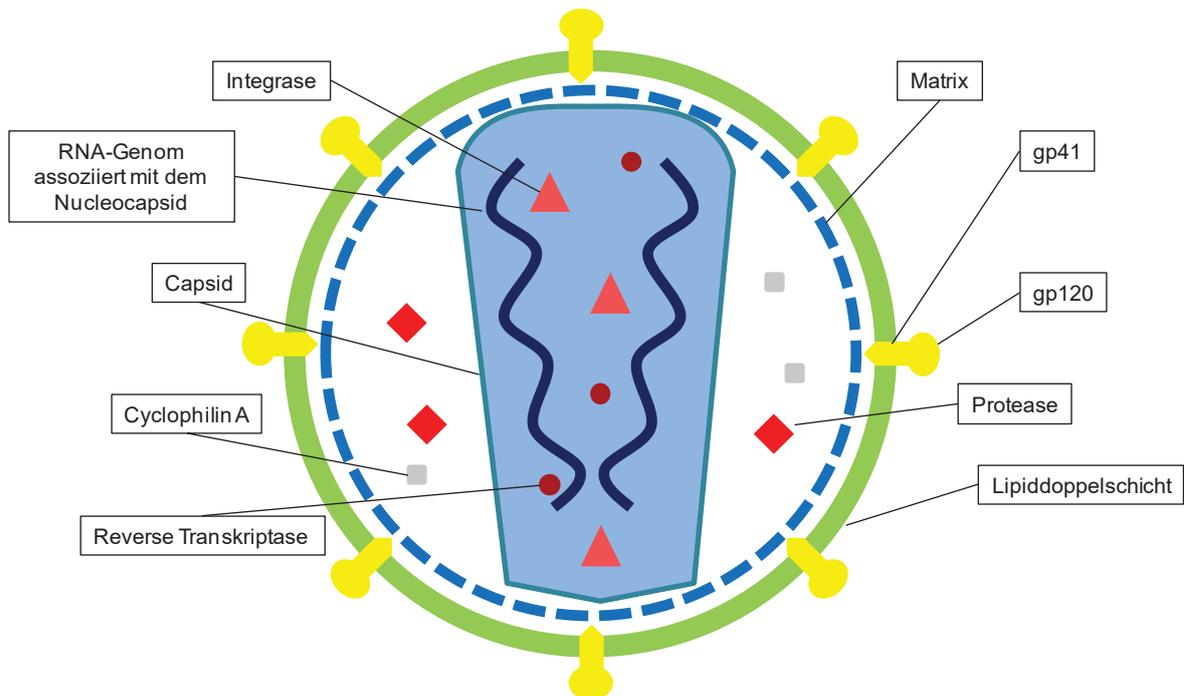


Abb. 2: Schematische, nicht-maßstabsgetreue Darstellung eines HI- oder SI-Virions

In der Abbildung sieht man den Aufbau eines Virions von HIV oder SIV. Außen befindet sich eine Lipiddoppelschicht (grün), welche mit der Matrix (p17) und den durch das *env*-Gen kodierten Glykoproteinen gp41 und p120 (gelb) assoziiert ist. Darin befindet sich das konische Core (oder Capsid) das aus dem Capsidprotein (p24) gebildet wird und die für die Replikation wichtigen Enzyme Protease, Integrase und reverse Transkriptase, welche durch das Gen *pol* (rot) kodiert werden. Das Capsid (Core) enthält zusätzlich das virale Genom, welches mit dem Nucleocapsidprotein (p7) assoziiert ist. Nucleocapsid, Matrix und Capsid werden durch *gag* kodiert (blau). In die Virionen werden zusätzlich zelluläre Proteine wie Cyclophilin A (grau) verpackt.

Gp: Glykoprotein, RNA: Ribonukleinsäure

1.4.1 Struktur des viralen Capsids

Das Capsid von HIV/SIV besteht aus dem Capsidprotein p24, welches aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne besteht, die über eine flexible Linkerregion miteinander verbunden sind. Sechs bzw. fünf p24-Monomere formen jeweils durch N-Terminus-N-Terminus- und N-Terminus-C-Terminus-Bindungen viele Hexamer- und 12 Pentamerringe, die untereinander durch C-Terminus-C-Terminus-Bindungen verknüpft sind. Dadurch entsteht die meist konische Form des HIV/SIV-Capsids (Abbildung 3) (Pornillos, Ganser-Pornillos et al. 2009, Zhao, Perilla et al. 2013, Carnes, Sheehan et al. 2018).

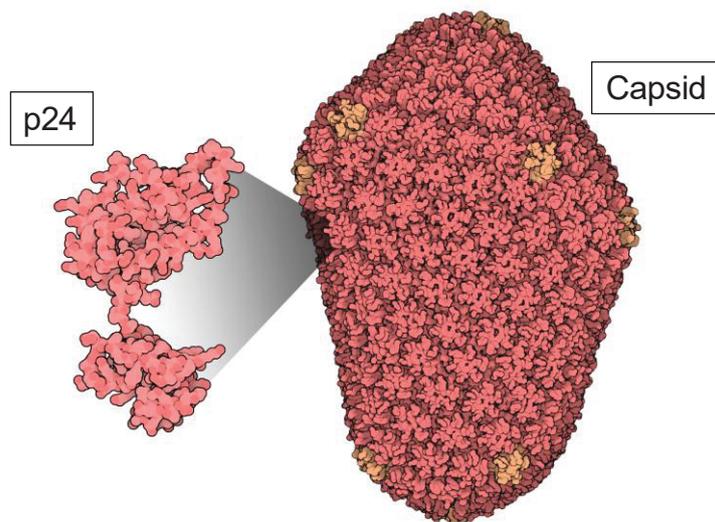


Abb. 3: Struktur des Capsid von HIV/SIV

Dargestellt ist das Capsidprotein p24 mit seinen beiden Domänen und der verbindenden Linkerregion (links) und die konische Struktur des HIV/SIV-Capsids (rechts), die durch seine Zusammensetzung aus p24-Hexameren (rot) und wenigen Pentameren (orange) entsteht.

Die Abbildung wurde von RCSB PDB *Molecule of the Month* von David S. Goodsell bezogen und beschriftet (Goodsell, Dutta et al. 2015).

1.5 Genetischer Aufbau von HIV und SIV

Das provirale Genom aller Retroviren besteht aus *gag* (*Group Specific Antigen*), *pol* (*Polymerase*), *env* (*Envelope*), sowie den *Long Terminal Repeats (LTR)* an beiden Genomenden, die für die virale Transkription und Integration essentiell sind. *Gag* kodiert für das Vorläuferpolyprotein p55Gag, aus dem die Matrix (p17), das Capsidprotein (p24), das Nucleocapsid (p7), das für die Knospung wichtige Peptid p6 und zwei *Spacerpeptide* (p1 und p2) hervorgehen. Durch einen *Frameshift* während der Translation entsteht zusätzlich das Vorläuferprotein p160Gag-Pol (Huet, Cheynier et al. 1990, Swanstrom and Wills 1997, Karn and Stoltzfus 2012). Die darin enthaltenen, für die Replikation wichtigen Enzyme reverse Transkriptase, Integrase und Protease werden durch *pol* kodiert (Vogt 1997, Fiorentini, Marini et al. 2006). *Env* kodiert für gp160, ein Vorläuferglykoprotein, das im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat zum oberflächlichen Glykoprotein gp120 und zum transmembranären gp41 prozessiert wird (Klasse 2012).

Lentiviren tragen zusätzlich Gene für akzessorische und regulatorische Proteine. Im Falle von HIV-1 und SIVcpz sind dies *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* und *nef* (Huet, Cheynier et al. 1990, Santiago, Bibollet-Ruche et al. 2003). Als regulatorisches Protein erhöht Tat (*Trans-Activator of Transcription*) die Effizienz der viralen Transkription und Rev (*Regulator of Expression of Virion Proteins*) eskortiert ungespleißte oder intronhaltige mRNA aus dem Nucleus in das Zytosol und ist so für die Translation viraler Proteine essentiell (Marciniak,

Calnan et al. 1990, Pollard and Malim 1998, Karn and Stoltzfus 2012). Das virale Protein r (Vpr) ist am nukleären Import des Präintegrationskomplexes beteiligt, sorgt für einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase, fördert die Aktivität der *Long Terminal Repeats* und soll das Spleißen zellulärer prä-mRNA inhibieren (Kuramitsu, Hashizume et al. 2005). Die akzessorischen Proteine Vif (*Viral Infectivity Factor*), Vpu (Virales Protein u) und Nef (*Negative Regulatory Factor*) dienen vor allem dazu dem Immunsystem des Wirts zu entkommen und Restriktionsfaktoren entgegenzuwirken. Zusätzlich regulieren Vpu und Nef die Expression des zellulären CD4-Rezeptor herunter (Bieniasz 2012, Doyle, Goujon et al. 2015, Hotter, Krabbe et al. 2017, Twizerimana, Scheck et al. 2018, Sauter and Kirchhoff 2019). Struktur-, regulatorische und akzessorische Proteine werden sowohl durch Vollängen- als auch gespleißte RNA exprimiert. Das Genom von HIV-1/SIVcpz ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

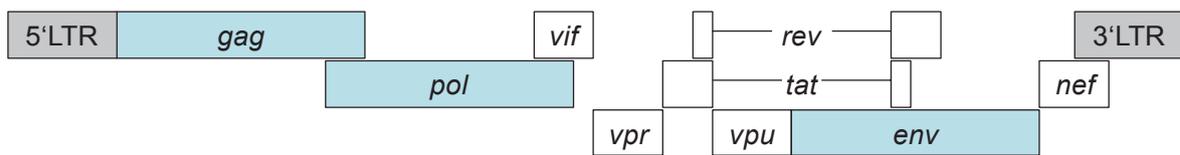


Abb. 4: Schematische Darstellung des Genoms von HIV-1 und SIVcpz

Das provirale Genom des humanen Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) sowie des simianen Immundefizienzvirus des Schimpansen (SIVcpz) besteht aus den in allen Retroviren vorkommenden Genen *gag*, *pol*, *env* und den *Long Terminal Repeats (LTR)* an beiden Enden des Genoms. *Gag* kodiert für die virale Matrix, das Capsid und das Nucleocapsid, *pol* für die viralen Enzyme Protease, Integrase und reverse Transkriptase und *env* für die Oberflächenproteine gp120 und gp41. Zusätzlich kodieren die Lentiviren HIV-1 und SIVcpz für die regulatorischen und akzessorischen Proteine Rev (*Regulator of Virion Expression*), Tat (*Trans-Activator of Transcription*), Vif (*Viral Infectivity Factor*), Vpr (Virales Protein r), Vpu (Virales Protein u) und Nef (*Negative Regulatory Factor*).

1.6 Replikationszyklus von Lentiviren

1.6.1 Viraler Entry

Der Replikationszyklus von Lentiviren beginnt mit der Bindung viraler Oberflächen-glykoproteine an Rezeptoren der Zielzelle. Im Fall von HIV-1 und SIVcpz ist das gp120, welches an CD4-Rezeptoren bindet (Takehisa, Kraus et al. 2007, Klasse 2012). CD4⁺ Zellen sind im Menschen vor allem T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen, aber auch in geringerem Maß dendritische Zellen (Zeitlmann, Sirim et al. 2001). Die Bindung sorgt für eine Konformationsänderung im Hüllprotein Env, welche eine Interaktion mit den zellulären Corezeptoren CCR5 oder CXCR4 ermöglicht. Daraus folgt eine Lockerung der nicht-kovalenten Bindung zwischen gp120 und gp41, was zur

Freilegung letzteren führt. Die virale Hülle und die zelluläre Membran werden in unmittelbare Nähe gebracht und sie können unter Porenbildung fusionieren (Klasse 2012).

1.6.2 *Uncoating* und reverse Transkription

Nach Eintritt in die Zielzelle erfolgt eine Konformationsänderung des Capsids, die der Freilegung des viralen Genoms und der Formung des Reversen-Transkriptions-Komplex dient und die als *Uncoating* bezeichnet wird. Wahrscheinlich findet dieser Prozess teilweise im Zytoplasma, teilweise in Nucleosporen und im Nucleus selbst statt. Das *Uncoating* und die reverse Transkription beeinflussen sich gegenseitig und es ist umstritten in welcher zeitlichen Abfolge und an welchem Ort innerhalb der Zelle diese Prozesse stattfinden (Arhel 2010, Hulme, Perez et al. 2011, Bhattacharya, Alam et al. 2014, Yamashita and Engelman 2017, Dharan, Bachmann et al. 2020, Francis, Marin et al. 2020). Die Stabilität des Capsids und das rechtzeitige *Uncoating* sind dabei für eine erfolgreiche Replikation essentiell (De Iaco, Santoni et al. 2013, Campbell and Hope 2015). Bei der reversen Transkription wird die virale positivsträngige RNA durch das virale Enzym reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Die reverse Transkriptase erfüllt hierbei mehrere Funktionen. Zum einen weist sie eine RNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität auf, mit der sie die den (-)-DNA-Strang schreibt, dann verfügt sie über eine Ribonuklease H Aktivität, die die RNA des neu entstandenen RNA/DNA-Duplex degradiert und durch ihre DNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität synthetisiert sie den (+)-DNA-Strang (Telesnitsky and Goff 1997). Zur Initiierung des (-)-DNA-Strangs in der Nähe des 5'-Endes nutzt HIV dabei zelluläre Lys3-tRNA als *Primer* (Hu and Hughes 2012). Der begonnene (-)-DNA-Strang bindet dann meist intermolekular an das 3'-Ende des zweiten RNA-Strangs und wird dort elongiert. Die Ribonuklease H baut kontinuierlich ca. 18 Nukleotide hinter dem jeweils neu eingefügten Nukleotid die RNA des RNA/DNA-Duplex bis auf zwei Polypurintrakte (PPT) ab, die als *Primer* für die Synthese des (+)-DNA-Strangs dienen. Die daraus resultierende doppelsträngige provirale DNA enthält an ihren Enden jeweils Teile beider Enden der viralen RNA, die identischen *Long Terminal Repeats* (LTR), und ist somit länger als die genomische RNA. Mit fortschreitender DNA-Synthetisierung wird aus dem Reverse-Transkriptions-Komplex der Präintegrationskomplex (Hu and Hughes 2012). Der Präintegrationskomplex besteht aus der viralen cDNA, den Enzymen Integrase und reverse Transkriptase, dem Matrixprotein, Vpr, dem Nucleocapsid und einigen zellulären Faktoren (Miller, Farnet et al. 1997, Nermut and Fassati 2003, Delelis, Carayon et al. 2008).

1.6.3 Nukleärer Import

Für den Transport in Richtung Nucleus nutzen HIV-1 und SIVcpz das Zytoskelett (Campbell and Hope 2015, Yamashita and Engelman 2017). Lentiviren wie HIV-1 und SIVcpz sind in der Lage vollständig differenzierte Zellen wie Makrophagen zu infizieren. Dafür ist es notwendig, dass Teile des Virus als Präintegrationskomplex einen nukleären Porenkomplex überwinden. Dieser besteht aus verschiedenen Nucleoporinen wie beispielsweise NUP153 und NUP358 (auch RanBP2 genannt), die beide direkt das virale Capsidprotein binden, den nukleären *Entry* des Präintegrationskomplexes fördern und die Integrationsstelle in das Wirtsgenom beeinflussen (Yamashita and Engelman 2017). NUP358 ist 358 kDa groß und an der Zellzykluskontrolle, sowie am nukleären Ex- und Import beteiligt. Es besitzt eine C-terminale Cyclophilindomäne, die direkt an das Capsid von HIV-1 bzw. SIVcpz bindet. Eine Depletion von NUP358 führt zu einer Capsid-abhängigen Reduktion der Infektiosität (Lee, Ambrose et al. 2010, Schaller, Ocowieja et al. 2011, Bieniasz 2012, Campbell and Hope 2015, Yamashita and Engelman 2017, Meyerson, Warren et al. 2018). NUP153 ist Teil des *Nuclear Baskets* und am Proteinimport und RNA-Export beteiligt (Yamashita and Engelman 2017). Auch seine Depletion senkt die Infektiosität von HIV-1 (Lee, Ambrose et al. 2010).

1.6.4 Integration

Von beiden Enden der nun doppelsträngigen proviralen DNA, den *Long Terminal Repeats*, werden durch die Integrase je zwei Nukleotide am 3'-Ende des jeweiligen Stranges abgespalten, wodurch eine freie 3'-OH-Gruppe entsteht. Die zweite enzymatische Aktivität der Integrase ist der Strangtransfer, bei dem die freigewordenen OH-Gruppen mit 5'-Phosphatgruppen der Wirts-DNA verestert werden und so die provirale DNA in das Wirtsgenom inseriert wird. Dieser Schritt wird durch virale und zelluläre Proteine als Cofaktoren beeinflusst. Die Integration kann an vielen Stellen des Wirtsgenoms geschehen, jedoch werden bestimmte transkriptionsaktive Regionen präferiert (Lewinski, Yamashita et al. 2006, Bieniasz 2012). Das nach der Bindung überhängende virale 5'-Ende und entstehende Lücken im DNA-Strang werden durch zelluläre Ligasen repariert (Delelis, Carayon et al. 2008, Sakurai, Komatsu et al. 2009, Craigie and Bushman 2012).

1.6.5 Transkription und Spleißen

Das neu entstandene Provirus bleibt in der Wirtszelle erhalten und dient als *Template* für die Transkription der viralen Gene, die von den zwei *Long Terminal Repeats* am Ende des

proviralen Genoms initiiert wird. Beide enthalten jeweils eine *Promotorsequenz*, wobei die des 5'-LTRs eine höhere Transkriptionsaktivität besitzt (Karn and Stoltzfus 2012). Zunächst werden für die Regulation der Genexpression mRNAs für die Proteine Tat und Rev transkribiert. Die Transkription wird durch die wirtseigene RNA-Polymerase II katalysiert. Diese synthetisiert die regulatorische *Transactivation Responsive Region* (TAR), an die Tat bindet. Tat kann ebenfalls an die LTR binden und zelluläre Faktoren rekrutieren, die die Elongation fördern (Coffin, Hughes et al. 1997, Bieniasz 2012). Der entstandenen prä-mRNA wird an ihrem 5'-Ende eine 7-Methylguanosin Kappe angefügt, sie wird am 3'-Ende polyadenyliert und alternativ gespleißt. Die Regulation des Spleißens beruht dabei vor allem auf spleißregulatorischen Sequenzen, an die spleißregulatorische Proteine binden und dadurch die Nutzung der unterschiedlichen Spleißdonoren und -akzeptoren der prä-mRNA beeinflussen. Es entstehen hierbei die ungespleißten Vollängen-RNAs, die als genomische RNA und für das Gag- und Gag-Pol-Vorläuferprotein dienen, intronlose RNAs, die für die regulatorischen und akzessorischen Proteine von HIV bzw. SIV kodieren, sowie intronhaltige mRNAs, die für das Env-Vorläuferprotein gp160 kodieren (Purcell and Martin 1993, Coffin, Hughes et al. 1997, Sertznig, Hillebrand et al. 2018). Physiologisch wird nur intronlose RNA aus dem Nucleus exportiert. Um intronhaltige RNA in das Zytoplasma zu transportieren, bindet das retrovirale Rev an seine RNA-Zielsequenz, das *Rev Response Element* (RRE), und eskortiert die RNA in Abhängigkeit von zellulären Faktoren aus dem Nucleus (Coffin, Hughes et al. 1997, Bohne, Wodrich et al. 2005, Bieniasz 2012, Karn and Stoltzfus 2012).

1.6.6 Translation, Assembly und Knospung

Der Transport der viralen mRNA zur zellulären Translationsmaschinerie geschieht unter Zuhilfenahme des Zytoskeletts. Als Hauptstrukturprotein wird eine große Menge des Vorläuferproteins Pr55Gag synthetisiert. In kleinerem Ausmaß wird das Pr160Gag-Pol-Polyprotein translatiert, welches die Enzyme Protease, Integrase und reverse Transkriptase enthält. Dies geschieht durch eine Leserasterverschiebung aufgrund einer *Slippery*-Sequenz in der Vollängen-RNA zwischen den Genen *gag* und *pol*. So wird gelegentlich ein Gag-Pol-Polyprotein synthetisiert (Swanstrom and Wills 1997, Karn and Stoltzfus 2012). Die Vorläuferproteine oligomerisieren und die genomische RNA bindet an die Nucleocapsid-Domäne des Pr55Gag. Das Vorläuferpolypeptid Env, gp160, wird im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran transportiert und dabei durch zelluläre Proteasen in das transmembranäre

Glykoprotein gp41 und das oberflächliche gp120 gespalten (Swanstrom and Wills 1997, Sundquist and Krausslich 2012). Der Transport des Komplexes aus genomischer RNA und Vorläuferproteinen kann entweder entlang des Zytoskeletts oder durch eine Interaktion von Gag mit Env über Endosomen erfolgen. Anschließend bindet Gag mit seiner Matrixdomäne an die Plasmamembran und rekrutiert Env (Fiorentini, Marini et al. 2006). Beim *Assembly* sammeln sich zwei Kopien der genomischen RNA, der tRNA-Primer für die cDNA-Synthese, das Gag- und das Gag-Pol-Polyprotein, Env, die akzessorischen Proteine Vif, Nef und Vpr, sowie einige zelluläre Bestandteile. Es formen sich unreife kugelförmige Partikel, bei dem die membrangebundenen Gag-Moleküle mit ihrer p6-Domäne ins Innere zeigen (Jouvenet, Simon et al. 2011, Sundquist and Krausslich 2012). Für die Knospung rekrutiert p6 die zelluläre ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) Maschinerie, die physiologisch Endosomen abschnürt oder das Abspalten von Tochterzellen bei der Zytokinese vermittelt (Jouvenet, Simon et al. 2011). Die virale Hülle der knospenden Partikel stammt von der Plasmamembran der Wirtszelle ab. Für die Reifung und zur Generierung infektiöser Virionen wird die Protease als Teil des Gag-Pol-Polypeptids aktiviert. Diese spaltet das Gag-Polyprotein in Matrix, Capsid, Nucleocapsid und das Peptid p6 und setzt die beiden Spacerpeptide frei (Sundquist and Krausslich 2012). Eine schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV-1 bzw. SIVcpz findet sich in Abbildung 5.

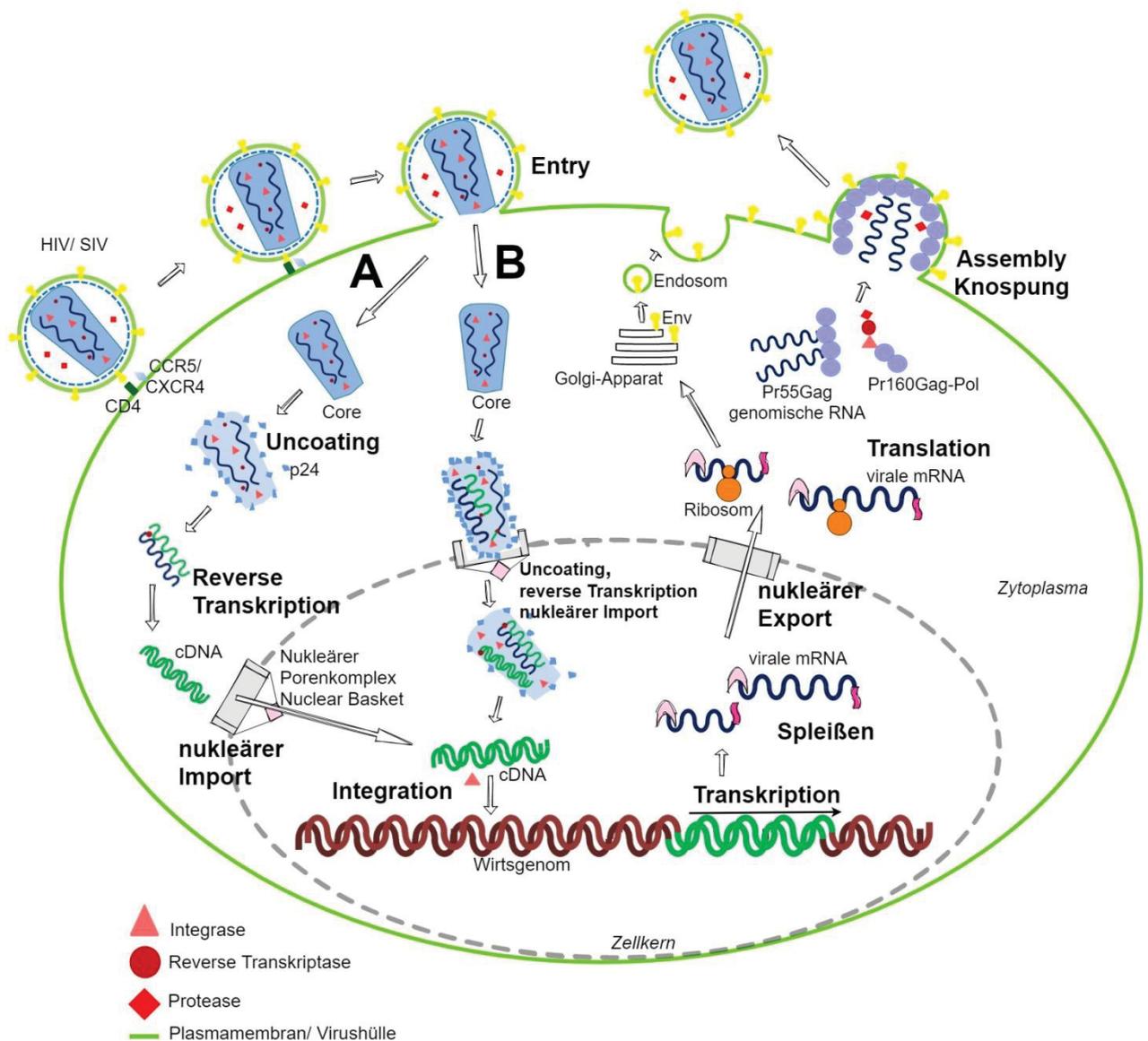


Abb. 5: Schematische, nicht-maßstabsgetreue Darstellung des retroviralen Replikationszyklus

Dargestellt ist eine Übersicht des Replikationszyklus von HIV-1 bzw. SIVcpz. Nach CD4- und Corezeptorenbindung durch das Oberflächenprotein Env fusioniert die Virushülle mit der Plasmamembran. (A) Zum besseren Verständnis sind hier die frühen Schritte des retroviralen Replikationszyklus nacheinander abgebildet. Das Capsid unterläuft dem *Uncoating*, beim dem das virale Genom freigelegt und die virale RNA in cDNA revers transkribiert wird. (B) Neuere Forschung zeigt, dass sich die reverse Transkription und das *Uncoating* wechselseitig beeinflussen und zumindest teilweise in den Nucleosporen und im Nucleus selbst stattfinden. Die genaue zeitliche Abfolge ist hierbei umstritten. Katalysiert durch das Enzym Integrase wird die provirale DNA in das Wirtsgenom integriert und dient als Matrize für die anschließende Transkription. Nach Prozessierung werden intronlose und intronhaltige mRNAs aus dem Nucleus exportiert und durch die Proteinsynthesemaschinerie der Zelle translatiert. Env wird am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und gelangt nach Prozessierung im Golgi-Apparat über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran. Die Vorläuferpeptide Pr55Gag und Pr160Gag-Pol, sowie zwei Kopien der genomischen RNA sammeln sich beim *Assembly* an der Plasmamembran und das neu entstehende Virion kann abgeschnürt werden. Die extrazelluläre Reifung der Partikel erfolgt durch proteolytische Spaltung der Vorläuferpeptide durch das Enzym Protease.

CCR5: C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5, CD4: *Cluster of Differentiation 4*, cDNA: *Complementary DNA*, CXCR4: CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, DNA: *Desoxyribonukleinsäure*, HIV: *Humanes Immundefizienzvirus*, mRNA: *Messenger RNA*, p24: *Capsidprotein*, RNA: *Ribonukleinsäure*, SIV: *Simianes Immundefizienzvirus*

1.7 Beeinflussung der retroviralen Replikation durch Wirtsfaktoren

Der Replikationszyklus von HIV-1 und SIVcpz wird an verschiedenen Stellen durch zelluläre Faktoren beeinflusst. Im Laufe der Evolution haben sich Lentiviren einige Wirtsfaktoren zu Nutze gemacht, während Wirte als Antwort auf die unvorteilhafte Infektion durch Viren Restriktionsfaktoren zu deren Abwehr entwickelt haben. Restriktionsfaktoren sind Teil der natürlichen Immunität und werden konstitutiv exprimiert oder meist durch Interferone induziert. Einige wirken dabei in der virusproduzierenden und andere in der neu infizierten Zelle. Beispiele für Restriktionsfaktoren sind APOBEC3 (*Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, Catalytic Polypeptide-like 3*), eine Cytidin-Desaminase, die Hypermutationen in der viralen cDNA erzeugt und in neue entstehende Virionen verpackt wird, MxB (*Myxovirus Resistance Protein B*), das den nukleären Import und die Integration inhibiert, Tetherin, welches das Ablösen neuer Virionen von der Wirtszelle hemmt, oder SERINC3/5 (*Serine Incorporator Protein 3/5*), welches Env-abhängig den viralen Eintritt in die Zielzelle stört (Bieniasz 2012, Doyle, Goujon et al. 2015, Zhang, Gu et al. 2017, Meier, Jaguva Vasudevan et al. 2018, Twizerimana, Scheck et al. 2018). Lentiviren haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, um der Inhibition durch Restriktionsfaktoren zu entgehen und sie teilweise für ihre Replikation zu nutzen. Deshalb bilden Restriktionsfaktoren zwar eine potenzielle Barriere für die Spezies übergreifende Transmission, haben aber geringen Einfluss auf die Replikation von Lentiviren in ihrem natürlichen Wirt. Durch ihre *Gatekeeper*-Funktion stehen Restriktionsfaktoren unter evolutionärem Druck, und es herrscht ein ständiges Wettrüsten zwischen Wirt und Virus (Doyle, Goujon et al. 2015).

1.7.1 Cyclophilin A

Cyclophilin A (Cyp A) ist eine Peptidylprolylisomerase A (PPIA), die in allen humanen Zellen vorkommt und an der Proteinfaltung beteiligt ist (Fischer and Schmid 1990). Es greift an mehreren Punkten in die Replikation von HIV-1 und SIVcpz ein und wird in neu entstehende Virionen verpackt (Braaten, Franke et al. 1996). Entscheidend für eine erfolgreiche Infektion ist hingegen das Cyclophilin A in der Zielzelle (Sokolskaja, Sayah et al. 2004, Hatzioannou, Perez-Caballero et al. 2005, Campbell and Hope 2015). Es bindet das Capsidprotein an einer am N-Terminus liegenden Prolin-reichen Schleife an den Aminosäureresten 85-93, von denen die Reste G89 und P90 von besonderer Bedeutung

sind (Braaten, Franke et al. 1996, Gamble, Vajdos et al. 1996, Sokolskaja and Luban 2006, Yamashita and Engelman 2017). Wahrscheinlich beeinflusst Cyclophilin A die Stabilität des Capsids, die Effizienz der reversen Transkription und den nukleären Import direkt oder über die Interaktion mit anderen Wirtsfaktoren (Campbell and Hope 2015, Burse, Shi et al. 2017, Yamashita and Engelman 2017). So hemmt oder verstärkt Cyclophilin A abhängig vom Zelltyp eine Infektion durch HIV-1 (Sokolskaja, Sayah et al. 2004, Li, Kar et al. 2009, De Iaco and Luban 2014, Campbell and Hope 2015, Burse, Shi et al. 2017). In humanen T-Zellen fördert es durch Capsidstabilisierung und Verhinderung der Bindung von Restriktionsfaktoren frühe Schritte im Replikationszyklus von HIV-1 (Sokolskaja and Luban 2006, Li, Kar et al. 2009, Kuang, Liu et al. 2015). Das Immunsuppressivum Ciclosporin A (CsA) bindet Cyclophilin A. Es blockiert unvollständig und zelltypabhängig seine Isomeraseaktivität, verhindert die Cyclophilin A-Capsid-Interaktion und stört das Verpacken von Cyclophilin A in neu knospende Virionen (Braaten, Franke et al. 1996, Schaller, Ocwieja et al. 2011, Campbell and Hope 2015).

1.7.2 *Tripartite Motif* (TRIM) Protein 5 α und TRIM-Cyclophilin A-Fusionsproteine

Mitglieder der Familie der *Tripartite Motif* (TRIM)-Proteine bestehen N-terminal aus einer RING-Finger-Domäne, einer B-Box 2-Zinkfinger-Domäne und einer *Coiled Coil* Region. Der Restriktionsfaktor TRIM5 α ist eine E3 Ubiquitinligase und erhält seine antiretrovirale Aktivität v.a. durch die *SPRY*-Domäne am C-Terminus. Diese bindet an das virale Capsid und TRIM5 α bildet um jenes herum ein Gerüst, welches für ein verfrühtes und irreguläres *Uncoating* sorgt und die reverse Transkription inhibiert. Die *SPRY*-Domäne ist außerdem für die speziesspezifische Restriktion durch TRIM5 α verantwortlich und daher einem starken evolutionären Selektionsdruck ausgesetzt (Nakayama and Shioda 2015, Twizerimana, Scheck et al. 2018). Als Teil der natürlichen Immunantwort dient TRIM5 α als Rezeptor und Regulator für die Autophagie-abhängige Degradation des viralen Capsids (Mandell, Kimura et al. 2014, Sparrer and Gack 2018) und stimuliert die Transkription von AP-1 und NF κ B (Kuang, Liu et al. 2015). Durch Retrotransposition ist in einigen Spezies die genetische Information der *SPRY*-Domäne durch Cyclophilin A-cDNA ersetzt, woraus ein TRIM-Cyclophilin A-Fusionsprotein entstand. Östliche Graukehl-Nachtaffen (*Owl Monkey, Aotus trivirgatus*) exprimieren ein TRIM-Cyclophilin A, das mit Hilfe seiner Cyclophilin A-Domäne an das HIV-1-Capsid bindet und es ähnlich wie TRIM5 α destabilisiert und die reverse Transkription inhibiert. Es ist aktiv gegen Retroviren, die

Cyclophilin A zu ihrem Capsid rekrutieren. Außerdem blockiert es den nukleären Import des Präintegrationskomplexes auf eine bisher unbekannte Art und Weise (Sokolskaja and Luban 2006, Kuang, Liu et al. 2015, Twizerimana, Scheck et al. 2018). Unabhängig von dem des östlichen Graukehl-Nachtaffen ist bei Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) ebenfalls ein TRIM-Cyclophilin A entstanden. Dabei ist das Gen für Cyclophilin am 3'-Ende des TRIM5-Gens eingefügt (Wilson, Webb et al. 2008, Nakayama and Shioda 2015). Das resultierende Fusionsprotein ist ineffektiv gegen HIV-1, inhibiert aber HIV-2, indem es in einem Replikationsschritt vor der reversen Transkription agiert. Diese Hemmung kann durch Blockade der Bindung der Cyclophilin A-Domäne an das Capsid aufgehoben werden (Wilson, Webb et al. 2008, Kuang, Liu et al. 2015). Im Gegensatz zu östlichen Graukehl-Nachtaffen tragen Rhesusaffen zusätzlich zu dem TRIM5-Allel für das Fusionsprotein mehrere Allele für TRIM5 α (Wilson, Webb et al. 2008).

In einigen nicht-humanen Primatenspezies erhöht die Interaktion zwischen Cyclophilin A und dem Capsid die antivirale Aktivität von TRIM5 α . Obwohl man lange davon ausging, dass humanes TRIM5 α HIV-1 unabhängig von Cyclophilin A inhibiert und diese Inhibition nur gering ausgeprägt ist, zeigen neuere Daten, dass die Interaktion zwischen Cyclophilin A und dem Capsid HIV-1 in primären humanen Immunzellen vor einer Restriktion durch humanes TRIM5 α schützt (Keckesova, Ylinen et al. 2006, Sokolskaja and Luban 2006, Lin and Emerman 2008, Li, Kar et al. 2009, Burse, Shi et al. 2017, Kim, Dauphin et al. 2019). Generell ist die antivirale Potenz von TRIM5-Proteinen zwar groß, allerdings entziehen sich Lentiviren ihrer Restriktion durch das Bilden von Capsiden, die nicht von TRIM5-Proteinen der eigenen Spezies erkannt werden (Kirmaier, Wu et al. 2010, Twizerimana, Scheck et al. 2018). So stellen diese zwar eine Barriere für die Interspeziesübertragung dar, verhindern aber eher keine Infektion durch auf die Spezies angepasste Immundefizienzviren (Bieniasz 2012).

1.7.3 *Cleavage and Polyadenylation Specificity*-Faktor Untereinheit 6 (CPSF6)

CPSF6 ist Teil des *Cleavage and Polyadenylation Specificity*-Faktors, der für die Prozessierung von RNA am 3'-Ende erforderlich ist. Die Untereinheit 6 (CPSF6) fördert gemeinsam mit dem Karyopherin Transportin 3 (TNPO3) und den Nucleoporinen 153 und 358 (NUP153, NUP358) den nukleären *Entry* und die Integration des Genoms von HIV-1 bzw. SIVcpz. Dabei sorgt die Interaktion zwischen CPSF6 und dem viralen Capsidprotein p24 für den Transport von HIV-1 zu nukleären *Speckles*, Teilen des Zellkerns, die reich an

Spleißfaktoren sind, und beeinflusst so die Integrationsstelle (Saito, Henning et al. 2016, Yamashita and Engelman 2017, Bejarano, Peng et al. 2019, Francis, Marin et al. 2020). Seine hauptsächlich nukleäre Lokalisation wird durch eine C-terminale Arginin/Serin (R/S)-reiche Domäne bestimmt. TNPO3 importiert Proteine mit einer Arginin/Serin (R/S)-Lokalisationssequenz in den Zellkern und verhindert so eine CPSF6-Akkumulation im Zytoplasma. Als Restriktionsfaktor kann CPSF6 aber nur dort an das Capsid von HIV-1 binden, es stabilisieren und das Virus inhibieren (De Iaco, Santoni et al. 2013). Wie der Capsidinhibitor PF74 und auch das Nucleoporin 153 bindet CPSF6 mit deutlich höherer Affinität an das intakte Capsid als an einzelne p24-Proteine, wobei die Bindung durch CPSF6 insgesamt stärker ist als die durch NUP153 (Bhattacharya, Alam et al. 2014, Bejarano, Peng et al. 2019). Eine am C-Terminus trunkeierte Version ohne R/S-Domäne, CPSF6-358, sorgt für eine Lokalisation von CPSF6-358 im Zytoplasma und verleiht ihm dadurch eine antivirale Aktivität (Lee, Ambrose et al. 2010, Lee, Mulky et al. 2012, De Iaco, Santoni et al. 2013). Es oligomerisiert und zerreißt nach Bindung das virale Capsid (Ning, Zhong et al. 2018). Außerdem verhindert es den nukleären *Entry* des Printegrationkomplexes (Lee, Ambrose et al. 2010, Matreyek, Yucel et al. 2013).

1.7.4 SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltendes Protein 1

(SAMHD-1)

Das SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltende Protein 1 (SAMHD-1) ist ein Restriktionsfaktor, der auf Ebene der reversen Transkription eingreift. Es handelt sich um eine durch Interferon γ -induzierbare Desoxynukleosidtriphosphat-Hydrolase, die die Konzentration zellulärer Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) reduziert. So stehen der reversen Transkriptase weniger Substrate zur Verfügung, und die Entstehung viraler cDNA wird quantitativ gestört. Dadurch wird HIV-1 vor allem in ruhenden Zellen, wie beispielsweise inaktiven T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen inhibiert. Bestimmte Lentiviren wie HIV-2 und SIV_{smm} kodieren für das virale Protein x (Vpx), das zu einer proteasomalen Degradation von SAMHD-1 führt (Laguette, Sobhian et al. 2011, Bieniasz 2012, Twizerimana, Scheck et al. 2018). Die Degradation ist häufig speziesspezifisch und SAMHD-1 stellt daher eine potentielle Barriere der Interspeziesübertragung von Lentiviren dar. HIV-1 und SIV_{cpz} besitzen kein Vpx und kodieren stattdessen für das paraloge virale Protein r (Vpr) (Zhang, de Silva et al. 2012). Da dieses nicht in der Lage ist SAMHD-1 zu degradieren, stellt die Restriktion durch

SAMHD-1 vermutlich kein Hindernis für die Verbreitung von HIV-1 im Menschen dar (Doyle, Goujon et al. 2015, Twizerimana, Scheck et al. 2018).

1.8 Capsidinhhibitoren

Capsidinhhibitoren, wie PF-345074 (PF74) und PF-3759857 (PF57), sind kleine Moleküle mit ähnlicher Struktur (Abbildung 6), die ihre antivirale Wirkung durch eine direkte Bindung an das Capsid entfalten (Blair, Pickford et al. 2010, Shi, Zhou et al. 2011). Bei einem intakten Capsid gibt es eine intermolekulare Schnittstelle zwischen dem N-Terminus und dem C-Terminus zweier benachbarter p24-Monomere innerhalb eines Hexamerrings. PF74 bindet an diese Schnittstelle, die sich mit der Capsidbindestelle von CPSF6 und der des Nucleoporin 153 überlappt und sich in der Nähe der Schleife befindet, die Cyclophilin A bindet (Bhattacharya, Alam et al. 2014, Twizerimana, Scheck et al. 2020). Die Affinität der Bindung zum viralen Capsid ist stark von dessen Intaktheit abhängig (Bhattacharya, Alam et al. 2014). Capsidinhhibitoren wie PF74 und PF57 haben primär Einfluss auf die Capsidstabilität. PF74 stabilisiert die Hexamere, die durch p24-Proteine gebildet werden, destabilisiert aber die Gesamtheit des Capsids (Bhattacharya, Alam et al. 2014). Seine Wirkung und sein Wirkungsmechanismus sind konzentrationsabhängig. Hohe Konzentrationen von mehr als 5 μM PF74 haben einen destabilisierenden Effekt auf das virale Capsid (Campbell and Hope 2015). Sie beschleunigen das *Uncoating* und beeinträchtigen die reverse Transkription. So entsteht weniger cDNA und der Replikationszyklus bricht vor der Integration ab (Saito, Ferhadian et al. 2016, Balasubramaniam, Zhou et al. 2019). Niedrige Konzentration bis ca. 2 μM PF74 haben kaum Einfluss auf die synthetisierte Menge an cDNA. Sie haben einen stabilisierenden Effekt auf das Capsid und inhibieren den nukleären *Entry* und die Integration. Die Wirkung geringer Konzentrationen ist von den zellulären Faktoren CPSF6, NUP153 und NUP358 abhängig (Matreyek, Yucel et al. 2013, Saito, Ferhadian et al. 2016, Balasubramaniam, Zhou et al. 2019, Francis, Marin et al. 2020).

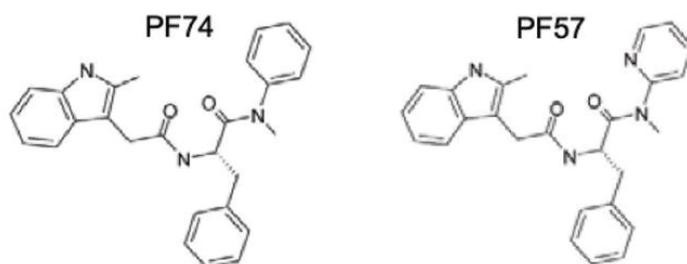


Abb. 6: Chemische Strukturformel der Capsidinhhibitoren PF74 und PF57
Diese Abbildung wurde veröffentlicht (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

1.9 Ziele der Arbeit

Die 2019 ausgebrochene COVID19-Pandemie zeigt die Relevanz der Kenntnis über Faktoren, die eine Transmission von Viren von einer Spezies auf die nächste ermöglichen. Beide simiane Immundefizienzviren des Schimpansen, SIVcpzPtt und SIVcpzPts, sind *in vitro* in der Lage humane Lymphozyten zu infizieren und trotzdem hat sich nur SIVcpzPtt im Menschen verbreitet und die AIDS-Pandemie verursacht (Takehisa, Kraus et al. 2007, Sharp and Hahn 2011). Ein möglicher Erklärungsversuch hierfür ist die unterschiedliche Anpassung der Viren an intrazelluläre Proteine, die während der frühen Phase des Replikationszyklus eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung dieser Wirtsfaktoren auf die Infektion durch die beiden SIVcpz im Vergleich zu HIV-1 untersucht. Ziel war es Unterschiede in ihrer Anfälligkeit für die Inhibition durch Restriktionsfaktoren und in ihrer Fähigkeit Wirtsfaktoren zu nutzen festzustellen und damit zur Erklärung der Entstehung von HIV-1 beizutragen.

Trotz der Möglichkeit der antiretroviralen Therapie, die die Virusproduktion im infizierten Menschen fast vollständig unterdrücken kann, gibt es nach wie vor keine breit anwendbare „sterile Heilung“ im Sinne einer kompletten Eradikation des Virus aus dem Körper. Als schnell mutierendes Virus entwickelt HIV-1 zunehmend Resistenzen gegen etablierte Therapien, was die Notwendigkeit für neue antiretrovirale Medikamente verdeutlicht. Mutationen im viralen Capsid gehen häufig mit einem Fitnessnachteil für HIV-1 einher, weswegen es einen attraktiven Angriffspunkt für pharmakologische Therapien darstellt (Zhou, Price et al. 2015, Carnes, Sheehan et al. 2018). Hier wurden die Capsidinhibitoren PF74 und PF57 auf ihre Wirkung gegen HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts getestet, um das Zusammenspiel aus antiviralem Molekül, Wirtsfaktoren und Virus zu verstehen und Wissen für die Entwicklung neuer Medikamente zu generieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Elektronisches Equipment

Gerät	Hersteller
Centro XS3 LB 960 MicroLumat Plus Luminometer	Berthold Technologies, Pforzheim, Deutschland
CO ₂ Inkubator	IBS, Fernwald, Deutschland
Filmentwicklungsmaschine, Curix 60	AGFA Healthcare, Mortsel, Belgien
Geldokumentationssystem/ UV-Transilluminator	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Heizblock	Fisher Biobloc Scientific, Illkirch Cedex, Frankreich
Inkubationsschüttler Thriller	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Inkubator, KS 4000 I Control	IKA, Staufen, Deutschland
Mikroskop AE29	Motic, Barcelona, Spanien
Nano-Drop NP-1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PowerPac Basic Power Supply	BioRad, München, Deutschland
PowerPac HC	BioRad, München, Deutschland
Schüttelapparat Typ 3006	GFL, Burgwedel, Deutschland
ThermoMixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transblot SD Semi-Dry Transferzelle	BioRad, München, Deutschland
Vortex 2	IKA, Staufen, Deutschland
Zentrifuge 4K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 21 (Zellkultur, Lysate)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus Pico 21 (Zellkultur, Lysate)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 1: Elektronisches Equipment

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid (30%)/ Bisacrylamid (0,8%)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Agar	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Caseinpepton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraazetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Marker PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Methanol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Natriumdesoxycholat/Desoxycholsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
NonidetP-40 (NP-40)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Proteaseinhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

RotiLoad Ladepuffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien Lagerung und Verwendung der Chemikalien erfolgte nach Herstellerangaben.	

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Blottingpuffer	10% Methanol 1x Natriumdodecylsulfat (SDS)
DNA Ladepuffer (6x)	100 µl 6x Ladepuffer 150 µl Glycerol 1250 µl destilliertes H ₂ O
Natriumdodecylsulfat (SDS) (10x)	250 mM Tris 1,9 M Glycin 1% Natriumdodecylsulfat (SDS)
RIPA (Radioimmunpräzipitationsassay) Puffer	25 mM Tris 137 mM Natriumchlorid 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS) 1% Glycerol 0,5% Natriumdesoxycholat 1,0% NonidetP-40 (NP-40) 2 mM Ethylendiamintetraazetat (EDTA) pH 8,0
Tris-Azetat-EDTA-Puffer (TAE, 20x)	0,8 M Tris 0,8 M Essigsäure 20 mM EDTA Titriert mit NaOH auf pH 8,0
Tris-buffered Saline mit Tween 20 (TBST, 10x)	0,1 M Tris-Chlorwasserstoff (Tris-HCl) 1,5 M Natriumchlorid (NaCl) 0,5% Tween 20
Tris-Chlorwasserstoff (Tris-HCl), pH 6,8	1 M Tris-Chlorwasserstoff (Tris-HCl) pH 6,8
Tris-Chlorwasserstoff (Tris-HCl), pH 8,0	1,5 M Tris-Chlorwasserstoff (Tris-HCl) pH 8,0
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen µl: Mikroliter, M: Molar, mM: Millimolar	

2.1.4 Nährmedien und Chemikalien für die Zellkultur

Medium/ Chemikalie	Hersteller
Blasticidin S Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ciclosporin A (CsA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's High-Glucose Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (DPBS)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Geneticin/ G418-Sulfat	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Lipofectamine LTX Reagenz	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Opti-MEM Medium	Gibco by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
PF57 (PF-3759857)	Hergestellt durch Prof. Thomas Kurz (Blair, Pickford et al. 2010, Twizerimana, Scheck et al. 2020)
PF74 (PF-3450074)	AOBIOUS, Biotrend, Köln, Deutschland
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Puromycin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Tabelle 4: Nährmedien und Chemikalien für die Zellkultur	

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Detektion von	Bezogen von	Herkunft und Klonalität	Verwendete Konzentration
Anti-CPSF6	<i>Cleavage and Polyadenylation Specificity</i> -Faktor Untereinheit 6	15489-1 AP, Proteintech, Manchester, Großbritannien	Hase, polyklonal	1:500
Anti-Cyp A	Cyclophilin A	Sc-134310, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	Maus, monoklonal	1:500
Anti-HA	Humanes Influenzahämagglutinin (HA)-tag	MMS-101P, Covance, Münster, Deutschland	Maus, monoklonal	1:7500
Anti-NUP153	Nucleoporin 153	Sc-515373, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	Maus, monoklonal	1:500
Anti-NUP358	Nucleoporin 358	Abcam, Cambridge, Großbritannien	Maus, monoklonal	1:500
Anti-p24/p27 MAb AG3.0	Capsidprotein p24	Zur Verfügung gestellt von Jonathan Allan (Simm, Shahabuddin et al. 1995)	Maus, monoklonal	1:250
Anti-SAMHD-1	SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltendes Protein 1	12586-1-AP; Proteintech, Manchester, Großbritannien	Hase, polyklonal	1: 1000
Anti-TRIM5	<i>Tripartite Motif 5</i>	sc-373864, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	Maus, monoklonal	1:500
Anti-Tubulin	Tubulin, Ladekontrolle	DM1A, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Maus, monoklonal	1:20 000

Tabelle 5: Primäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller	Verdünnung
Anti-Mouse-IgG-HRP	Vom Schaf stammender, gegen Maus gerichteter Antikörper, der an das Reporterenzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist	NA931V, GE Healthcare, Life Sciences, Freiburg, Deutschland	1:10 000
Anti-Rabbit-IgG-HRP	Vom Esel stammender, gegen Hase gerichteter Antikörper, der an das Reporterenzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist	NA934-1ML, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland	1:10 000

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper
HRP: *Horseradish Peroxidase*/Meerrettichperoxidase, IgG: Immunglobulin G

2.1.6 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Bezogen von
Mamu 1	Rh-TRIM5 α tragendes Plasmid mit HA-tag	Prof. Greg Towers, University College, London (Wilson, Webb et al. 2008)
Mamu 7	Rh-TRIMCyp tragendes Plasmid mit HA-tag	Prof. Greg Towers, University College, London (Wilson, Webb et al. 2008)
pHIT60	Trägt <i>gag, pol</i> des murinen Leukämievirus	Prof. Jonathan Stoye (Bock, Bishop et al. 2000)
pLPCX.CPSF6-358.HA	CPSF6-358 tragendes Plasmid mit HA-tag	Prof. Thomas Gramberg (Lee, Ambrose et al. 2010)
pMD.G	VSV-G Verpackungsprotein, welches zur Pseudotypisierung verwendet wurde	(Dull, Zufferey et al. 1998)
pSIN.PPT.CMV.Luc.IRES.GFP	Luciferase- und GFP-Reporter gen für die Produktion von HIV-1	(Bahr, Singer et al. 2016)
psPAX2	Zweite Generation eines lentiviralen Verpackungsplasmids, trägt HIV-1 Gruppe M <i>gag, pol, rev, tat, RRE</i>	Addgene #12260 NIH AIDS Reagent Program (Cat# 11348)
SIVcpzPtsTAN1.910	Trägt <i>gag, pol, rev, nef, vpr</i> von SIVcpzPts, wurde zur Herstellung wildtypischer Viren verwendet	GenBank AF447763, NIH AIDS Reagent Program (Germantown, USA) (Takehisa, Kraus et al. 2007)
SIVcpzPtsTAN1-NLuc	Trägt <i>gag, pol, rev, vpr</i> von SIVcpzPts, sowie das Reporter gen für die Nanoluciferase	Hergestellt durch Zeli Zhang (Zhang, Gu et al. 2017)
SIVcpzPttMB897	Trägt <i>gag, pol, rev, nef, vpr</i> von SIVcpzPtt, wurde zur Herstellung wildtypischer Viren verwendet	GenBank JN835461, Prof. Frank Kirchhoff (Bibollet-Ruche, Heigle et al. 2012)

SIVcpzPttMB897-NLuc	Trägt <i>gag, pol, rev, vpr</i> von SIVcpzPtt, sowie das Reportergen für die Nanoluciferase	Hergestellt durch Zeli Zhang (Zhang, Gu et al. 2017)
SIVcpzPttMB897(TAN1-Capsid)-NLuc	Trägt <i>gag, pol, rev, vpr</i> von SIVcpzPttMB897, wobei der für das Capsid kodierende Teil von <i>gag</i> von SIVcpzPtsTAN1 stammt. Trägt das Reportergen für die Nanoluciferase	Hergestellt durch Augustin Twizerimana

Tabelle 7: Plasmide
CPSF6: *Cleavage and Polyadenylation Specificity*-Faktor Untereinheit 6, GFP: Grün fluoreszierendes Protein, HA: Humanes Influenzahämagglutinin, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, Rh: Rhesus, RRE: *Rev Response Element*, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*, TRIM5: *Tripartite Motif 5*, TRIMCyp: Fusionsprotein aus TRIM5 und Cyclophilin A, VSV-G: Glykoprotein des *Vesicular-Stomatitis*-Virus

2.1.7 Molekularbiologische Kits

Kit	Verwendung	Bezogen von
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection	Detektion des Signals des Immunoblot	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Cavidi HS lenti RT-Kits	Bestimmung der Aktivität der reversen Transkriptase (durchgeführt von Zeli Zhang)	Cavidi Tech, Uppsala, Schweden
Nano-Glo Luciferase Assay System	Bestimmung der Luciferaseaktivität von SIVcpz-Reporterviren	Promega, Mannheim, Deutschland
Pure Yield Plasmid MaxiPrep	Extrahierung von DNA-haltigen Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
Steady-Glo Luciferase Assay System	Bestimmung der Luciferaseaktivität von HIV-1-Reporterviren	Promega, Mannheim, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Kits
Lagerung und Verwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.
DNA: Desoxyribonukleinsäure, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, SIVcpz: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen

2.2 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden an einer Sicherheitswerkbank in einem Labor der Sicherheitsstufe S2 durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden in *Dulbecco's High-Glucose Modified Eagle's Medium* (DMEM, PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) mit Vollzusatz (Tabelle 9) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Ausnahmen hiervon sind in Tabelle 10 beschrieben. Auf die Kultivierung und Differenzierung von THP-1-Zellen wird später noch genauer eingegangen.

Zusatz	Anteil
Fetales Kälberserum (FBS)	10%
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	50 mg/ml

Tabelle 9: Zusammensetzung des Vollzusatzes für Medien der Zellkultur
mg: Milligramm, ml: Milliliter, mM: Millimolar, U: Units

Die Zellen wurden alle 2 bis 7 Tage gesplittet. Hierfür wurde bei adhärennten Zelllinien das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml *Dulbecco's Phosphate-buffered Saline* (DPBS, PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurden sie mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) behandelt um sie vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 8 ml DMEM mit Vollzusatz hinzugegeben und die Zellen wurden durch Aspiration mit einer Pipettierhilfe vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen 1:5 mit DMEM mit Vollzusatz verdünnt und zurück in die Zellkulturflasche gegeben. Alternativ wurden sie ausgezählt und in Platten ausgesät oder eingefroren. Eine Übersicht der verwendeten Zellen findet sich in Tabelle 10.

Name	Beschreibung und Herkunft	Bezogen von	Verwendetes Medium
CRFK	Adhärennte, feline Zellen aus der Niere, <i>Crandell-Rees Feline Kidney</i>	ATCC CCL-94, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland	DMEM mit Vollzusatz
CRFK mit Agm-, humanem TRIM5 α oder OM-TRIM-Cyclophilin A	CRFK-Zellen, die stabil TRIM5 α von äthiopischen Grünmeerkatzen (<i>Chlorocebus aethiops</i>) oder Menschen oder TRIM-Cyclophilin A des östlichen Graukehl-Nachtaffens (<i>Aotus trivirgatus</i>) exprimieren	Hergestellt durch Augustin Twizerimana	DMEM mit Vollzusatz und 300 μ g/ml Geneticin
CRFK mit Rh-TRIM5 α und Rh-TRIM-Cyclophilin A	CRFK-Zellen, die stabil TRIM5 α oder TRIM-Cyclophilin A des Rhesusaffen (<i>Macaca mulatta</i>) exprimieren	In dieser Arbeit hergestellt	DMEM mit Vollzusatz und 300 μ g/ml Geneticin
CV-1	Adhärennte, simiane Zellen der Niere der äthiopischen Grünmeerkatze (<i>Chlorocebus aethiops</i>), <i>Green Monkey Kidney</i>	ATCC CCL-70, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland	DMEM mit Vollzusatz

FRh1-2	Adhärenzte, simiane Zellen der Lunge des Rhesusaffen (<i>Macaca mulatta</i>), <i>Fetal Rhesus Monkey Lung</i>	ATCCR CL-160, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland	DMEM mit Vollzusatz
HEK293T	Adhärenzte, humane Zellen der Niere, <i>Human Embryonic Kidney</i>	ATCC CRL-3216, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland	DMEM mit Vollzusatz
HeLa	Adhärenzte, humane Zellen eines Zervixkarzinoms, Henrietta Lacks	ATCC CRL-1543, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland	DMEM mit Vollzusatz
HeLa-CPSF6-358	HeLa-Zellen, die stabil CPSF6-358 exprimieren	In dieser Arbeit hergestellt	DMEM mit Vollzusatz und 1 µg/ml Puromycin
HOS	Adhärenzte, humane Zellen eines Osteosarkoms, <i>Human Osteosarcoma</i>	ATCC CRL-1543, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland	DMEM mit Vollzusatz
HOS-Cyclophilin A-Knockout	HOS-Zellen, die kein Cyclophilin A exprimieren und aus Einzelklonen hergestellt wurden	Hergestellt durch Augustin Twizerimana (Twizerimana, Scheck et al. 2020)	DMEM mit Vollzusatz und 2 µg/ml Puromycin
HOS-Leervektor	HOS-Zellen, die als Kontrolle mit einem Leervektor transduziert wurden	Hergestellt durch Augustin Twizerimana (Twizerimana, Scheck et al. 2020)	DMEM mit Vollzusatz und 2 µg/ml Puromycin
OMK	Adhärenzte, simiane Zellen der Niere des östlichen Graukehl-Nachtaffens (<i>Aotus trivirgatus</i>), <i>Owl Monkey Kidney</i>	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	DMEM mit Vollzusatz
THP-1	Humane Suspensionszellen einer Monozytenleukämie, <i>Human Acute Monocytic Leukemia</i>	ATCC TIB-202, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland	RPMI 1640 mit Vollzusatz
THP-1 SAMHD-1-Knockout	THP-1 Zellen, die kein SAMHD-1 exprimieren	Hergestellt durch Edmund Osei Kuffour (Osei Kuffour, Schott et al. 2018)	RPMI 1640 mit Vollzusatz und 2 µg/ml Blasticidin S Hydrochlorid

Tabelle 10: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

µg: Mikrogramm, Agm: *African Green Monkey*, CPSF6: *Cleavage and Polyadenylation Specificity*-Faktor Untereinheit 6, DMEM: *Dulbecco's High-Glucose Modified Eagle's Medium*, ml: Milliliter, Rh: Rhesus, RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*, SAMHD-1: SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltendes Protein 1, TRIM: *Tripartite Motif*

2.2.1 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Wenn sie nicht in Kultur gehalten wurden, wurden die verwendeten eukaryotischen Zellen bei -152°C in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Sie wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und Tropfen für Tropfen in 10 ml vorgewärmtes DMEM-Medium gegeben. Um das für das Einfrieren hinzugegebene Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen, wurden die Zellen bei 2000 rpm und 30°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

Um Zellen längerfristig aufzubewahren, wurden sie teilweise eingefroren. Pro Aliquot wurden mindestens 2×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei 2000 rpm über 5 Minuten pelletiert und anschließend in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Dieses bestand zu 50% aus fetalem Kälberserum, 40% DMEM und 10% DMSO. Die Aliquots wurden in spezielle Gefriergefäße gegeben, die in Isopropanol enthaltenden Gefriercontainern bei -80°C gelagert wurden. Durch die Verwendung von Isopropanol wurde die Temperatur der Zellen langsam um ca. 10°C pro Stunde gesenkt und so der Schaden durch den Einfrierprozess minimiert. Nach 24 h konnten die Gefriergefäße dann in flüssigem Stickstoff bei -152°C gelagert werden.

2.2.2 Herstellung CPSF6-358 exprimierender HeLa-Zellen

Für die Herstellung von CPSF6-358 exprimierenden HeLa-Zellen wurde ein auf dem murinen Leukämievirus (MLV) basierender Transfervektor verwendet. Dafür wurde eine Transfektion mit den in Tabelle 11 aufgelisteten Plasmiden in HEK293T-Zellen durchgeführt. Der dabei geerntete Virusüberstand wurde zur Transduktion von wildtypischen HeLa-Zellen verwendet. Unter dem Begriff Transduktion versteht man das Einbringen von Genmaterial mittels viraler Vektoren. Hierfür wurden 10^6 HeLa-Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten ausgesät und mit 500 μl Transfervektorüberstand transduziert. Nach 24-48 h Lagerung bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen in Zellkulturflaschen transferiert. Das CPSF6-358 tragende Plasmid enthielt zusätzlich ein Resistenzgen für Puromycin, weshalb die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin haltigem Medium selektiert wurden. Um die benötigte Puromycindosis für die Selektion zu ermitteln, wurden CPSF6-358-HeLa-Zellen und wildtypische HeLa-Zellen in DMEM mit verschiedenen Konzentrationen Puromycin kultiviert. Die kleinste Konzentration, die die wildtypischen Zellen vollständig eliminierte, wurde zur Kultivierung der CPSF6-358 haltigen Zellen verwendet. Anschließend wurden die CPSF6-358-HeLa-Zellen mittels Immunoblot auf die

Expression von CPSF6-358 anhand des auf dem Plasmid kodierten HA-tags analysiert, als Negativkontrolle dienten wildtypische HeLa-Zellen.

Plasmid	Enthaltene Gene	Menge
pHIT60	MLV <i>gag, pol</i>	900 ng
pLPCX.CPSF6-358.HA	CPSF6-358, HA-tag, Puromycinresistenz	900 ng
pMD.G	VSV-G	200 ng

Tabelle 11: Plasmide für die Herstellung des CPSF6-358 tragenden MLV-basierten Vektor
 CPSF6: *Cleavage and Polyadenylation Specificity*-Faktor Untereinheit 6, HA: Humanes Influenzähämagglutinin, MLV: Murines Leukämievirus, ng: Nanogramm, VSV-G: Glykoprotein des *Vesicular-Stomatitis*-Virus

2.2.3 Herstellung Rhesus TRIM5 α und TRIM-Cyclophilin A exprimierender CRFK-Zellen

In dieser Arbeit wurden CRFK-Zelllinien hergestellt, die stabil das TRIM5 α und das TRIM-Cyclophilin A-Fusionsprotein des Rhesusaffen exprimieren. Für die Transduktion der CRFK-Zellen wurde analog zur Herstellung CPSF6-358 exprimierender HeLa-Zellen ein MLV-basierter Transfervektor verwendet. Für die Herstellung dieses Vektors wurden die Plasmide wie in Tabelle 12 angegeben in HEK293T-Zellen transfiziert.

Plasmid	Enthaltene Gene	Menge
<i>Rhesus TRIM5α tragender Vektor</i>		
pHIT60	MLV <i>gag, pol</i>	900 ng
Mamu 1	Rh-TRIM5 α , HA-tag, Geneticinresistenz	900 ng
pMD.G	VSV-G	200 ng
<i>Rhesus TRIM-Cyclophilin A tragender Vektor</i>		
pHIT60	MLV <i>gag, pol</i>	900 ng
Mamu 7	Rh-TRIM-Cyclophilin A, HA-tag, Geneticinresistenz	900 ng
pMD.G	VSV-G	200 ng

Tabelle 12: Plasmide für die Herstellung der Rhesus TRIM5 α und TRIM-Cyclophilin A tragenden MLV-basierten Vektoren
 HA: Humanes Influenzähämagglutinin, MLV: Murines Leukämievirus, ng: Nanogramm, Rh: Rhesus, TRIM: *Tripartite Motif*, VSV-G: Glykoprotein des *Vesicular-Stomatitis*-Virus

Die Transduktion der CRFK-Zellen erfolgte ebenfalls analog zur Transduktion der CPSF6-358 exprimierenden HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit 300 µg/ml Geneticin selektiert und mittels Immunoblot auf die Expression des in den TRIM-tragenden Plasmiden kodierten HA-tags analysiert (Abbildung 7).

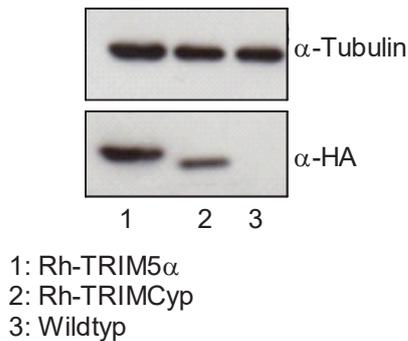


Abb. 7: Etablierung stabil Rhesus TRIM5 α - und TRIM-Cyclophilin A exprimierender CRFK-Zellen
 Wildtypische CRFK-Zellen wurden mit einem MLV-basiertem Vektor, der Gene für Rhesus TRIM5 α oder Rh-TRIM-Cyclophilin A trägt, transduziert und anschließend mit Geneticin selektiert. Um zu überprüfen, ob die Zellen stabil die gewünschten TRIM5-Proteine exprimieren, wurde ein Immunoblot zur Detektion des an TRIM5 gekoppelten HA-tags durchgeführt. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.
 α : anti, HA: Humanes Influenzähämagglutinin, Rh: Rhesus, TRIM: *Tripartite Motif*, TRIMCyp: TRIM-Cyclophilin A

2.2.4 Herstellung der Viruspartikel

2.2.4.1 Transfektion

Eine Transfektion bezeichnet das Einbringen von fremdem Genmaterial in eukaryotische Zellen. In dieser Arbeit wurde sie zur Produktion viraler Partikel durchgeführt. HEK293T-Zellen wurden hierfür in DMEM mit Vollzusatz in 6-Loch-Platten ausgesät. Pro Loch wurden 10^6 Zellen benutzt. Die Transfektion wurde 24 h später durchgeführt, wenn die Zellen dem Boden angehaftet waren. Es wurden pro Loch 200 µl Serum-reduziertes Opti-MEM Medium (Gibco by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit maximal 2000 ng Plasmid und 4 µl *Lipofectamine LTX Reagent* (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gemischt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die hergestellte Mischung Tropfen für Tropfen auf die HEK293T-Zellen gegeben. Lipofectamine LTX enthält kationische Liposome, welche mit der negativ geladenen DNA und der zellulären Membran interagieren können. Der virale Überstand wurde nach 48 h geerntet und bei 12 000 g für 5 Minuten zentrifugiert um Zellbestandteile zu entfernen. Im Falle von SIVcpzPtt und SIVcpzPts wurde der virale Überstand 1:10 mit

DMEM verdünnt. Überstände mit SIVcpzPtt(Pts-Capsid) wurden 10-fach aufkonzentriert. Hierfür wurden sie bei 14 800 rpm durch ein 20%iges Sucrosekissen über 4 h bei 4°C zentrifugiert und anschließend in DMEM resuspendiert. Die viralen Überstände wurden bei -80°C gelagert. Die Aktivität der reversen Transkriptase wurde mit Hilfe des *Cavidi HS lenti RT-Kits* (Cavidi Tech, Uppsala, Schweden) durch Zeli Zhang nach Herstelleranleitung bestimmt. Eine Übersicht der verwendeten Plasmide für die Herstellung der unterschiedlichen Virusüberstände findet sich in Tabelle 13. Die Reporterviren SIVcpzPtt und SIVcpzPts enthalten statt des viralen Gens *nef* ein Gen für das Reporterenzym Nanoluciferase (Zhang, Gu et al. 2017). Für die Herstellung der HIV-1 Gruppe M-Partikel wurde zur Erhöhung der Biosicherheit auf ein System mit mehreren Plasmiden zurückgegriffen, wobei ein Plasmid für die Proteine Gag, Pol, Rev und Tat, eins für das Oberflächenprotein VSV-G und ein drittes u.a. für die Reporterproteine Fireflyluciferase und das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierte (Bahr, Singer et al. 2016).

Virus	Plasmide	Enthaltene Gene	Verwendete Menge
HIV-1 Gruppe M pseudotypisiertes Reportervirus	psPAX2	<i>gag, pol, rev, tat, RRE</i>	900 ng
	pSIN.PPT.CMV.Luc.IRES.GFP	Luciferase, GFP	900 ng
	pMD.G	VSV-G	200 ng
SIVcpzPtt pseudotypisiertes Reportervirus	SIVcpzPttMB897-NLuc	<i>gag, pol, rev, vpr, Luciferase</i>	1200 ng
	pMD.G	VSV-G	120 ng
SIVcpzPtt pseudotypisiertes Wildtypvirus	SIVcpzPttMB897	<i>gag, pol, rev, nef, vpr</i>	1200 ng
	pMD.G	VSV-G	120 ng
SIVcpzPts pseudotypisiertes Reportervirus	SIVcpzPtsTAN1-NLuc	<i>gag, pol, rev, vpr, Luciferase</i>	1200 ng
	pMD.G	VSV-G	120 ng
SIVcpzPts pseudotypisiertes Wildtypvirus	SIVcpzTAN1.910	<i>gag, pol, rev, nef, vpr</i>	1200 ng
	pMD.G	VSV-G	120 ng
SIVcpzPtt(Pts-Capsid) pseudotypisiertes Reportervirus	SIVcpzPttMB897(TAN1-Capsid)-NLuc	<i>gag, pol, rev, vpr, Luciferase</i>	1800 ng
	pMD.G	VSV-G	120 ng

Tabelle 13: Übersicht über die für die Produktion der Viruspartikel verwendeten Plasmide
GFP: Grün fluoreszierendes Protein, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, ng: Nanogramm, RRE: *Rev Response Element*, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*, VSV-G: Glykoprotein des *Vesicular-Stomatitis-Virus*

2.2.5 Single-Cycle Infektionsassay

Single-Cycle Infektionsassays sind eine Methode um die frühen Schritte der retroviralen Infektion bis zur Integration und Expression viraler Proteine zu beurteilen. Hierfür wurden wie oben beschrieben pseudotypisierte Reporterviren mittels Transfektion hergestellt. Diese integrierten ihr Genom, sowie das Gen für das Reporterenzym Luciferase in das Wirtszellgenom. Bei erfolgreicher Infektion wurden anschließend in gleichem Maß Virusproteine und Luciferase exprimiert. Unter Hinzugabe des Substrates der Luciferase entstand dann ein detektierbares Lichtsignal, das Rückschlüsse auf die Infektiosität der Viren erlaubte. Die Pseudotypisierung unter Verwendung des Glykoproteins des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) diente dazu die Rezeptor- und Corezeptor-

abhängigkeit von HIV-1 und SIVcpz aufzuheben und einen viralen *Entry* in die Zielzelle zu ermöglichen (Aiken 1997).

Um die Infektiosität der verwendeten Lentiviren zu bestimmen, wurden 3×10^3 Zellen pro Loch in 96-Loch-Platten mit DMEM plus Vollzusatz ausgesät und in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Einen Tag später, wenn die Zellen dem Boden der Platte adhärent waren, wurden sie mit VSV-G-pseudotypisierten Reporterviren infiziert. Im Falle von SIVcpz wurde das Medium 24 h nach Infektion gewechselt. Wurden die Capsidinhibitoren PF74 und PF57 oder Ciclosporin A verwendet, wurde die jeweilige Substanz zwei Stunden vor Infektion auf die zu infizierenden Zellen gegeben. Da alle drei Substanzen in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst waren, wurden die Kontrollen zwei Stunden vor Infektion mit DMSO behandelt. Bei Infektionen von THP-1-Zellen wurden 3×10^4 Zellen pro Loch mit RPMI 1640 Medium mit Vollzusatz in 96-Loch-Platten ausgesät. Um die Zellen zu differenzieren, wurde einen Tag später Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) in einer Konzentration von 25 ng/ml hinzugefügt. Weitere 24 h Stunden später, wenn die Zellen adhärent waren, wurde das Medium durch RPMI 1640 plus Vollzusatz ausgetauscht. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Infektion mit viralen Partikeln mittels Spinokulation. Hierfür wurde die 96-Loch-Platte nach Hinzugabe des viralen Überstandes bei 1200 g für 2 h bei 30°C zentrifugiert.

2.2.5.1 Bestimmung der Luciferaseaktivität

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfolgte für SIVcpz 48 h und HIV-1 72 h nach Infektion. Benutzt wurde für SIVcpzPtt und SIVcpzPts das *Nano-Glo Luciferase Assay System* (Promega, Mannheim, Deutschland) und für HIV-1 das *Steady-Glo Luciferase Assay System* (Promega, Mannheim, Deutschland). Vor der Messung wurden die Zellen im Falle einer Transduktion mit SIVcpz dreimal mit DPBS gewaschen, um Luciferasereste im Überstand zu entfernen. Im Falle einer Infektion mit HIV-1 wurde lediglich das Medium abgenommen. Der *Nano-Glo-* oder *Steady-Glo Luciferase Assay* Puffer wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Pro Volumen *Nano-Glo Luciferase Assay* Substrat wurden 50 Volumina Puffer verwendet. Das Reagenz aus *Nano-Glo* Substrat und Puffer oder der *Steady-Glo* Puffer wurden im Verhältnis 1:1 mit DMEM mit Vollzusatz gemischt. Es wurden je 100 µl Reagenz pro Loch verwendet und durch Pipettieren gemischt. Die Zellen wurden 7 Minuten für SIVcpz, bzw. 20 Minuten für HIV-1 bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, und 75 µl der lysierten Zellen wurden in eine schwarze 96-Loch-Platte transferiert. Anschließend wurde für je 10 Sekunden pro Loch die Luciferaseaktivität in

Counts Per Second (cps) mit dem MicroLumat Plus Luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland) gemessen. Bei der hierfür verwendeten Software handelte es sich um MikroWin200 von Berthold Technologies.

2.2.6 Untersuchung der Verpackung von Cyclophilin A in HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts

Zur Testung der Verpackung von Cyclophilin A in neu entstehende Virionen wurden 10^6 HEK293T-Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen 2 h vor Transfektion mit 2,5 μ M Ciclosporin A oder einer äquivalenten Menge DMSO als Kontrolle behandelt. Die für die Transfektion verwendeten Plasmide sind in Tabelle 14 angegeben. Nach 48 h wurde der Überstand gesammelt und über 4 h bei 4°C und 14 800 rpm durch ein 20%iges Sucrosekissen zentrifugiert. Das entstandene Pellet und die Zellen in der 6-Loch-Platte wurden analog zur Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen mittels RIPA-Puffer plus Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) lysiert und durch einen Immunoblot analysiert.

Virus	Plasmide	Verwendete Menge
HIV-1 Gruppe M Reportervirus	psPAX2	900 ng
	pSIN.PPT.CMV.Luc.IRES.GFP	900 ng
SIVcpzPtt Reportervirus	SIVcpzPttMB897-NLuc	2000 ng
SIVcpzPtt Wildtypvirus	SIVcpzPttMB897	2000 ng
SIVcpzPts Reportervirus	SIVcpzPtsTAN1-NLuc	2000 ng
SIVcpzPts Wildtypvirus	SIVcpzTAN1.910	2000 ng
Tabelle 14: Übersicht über die für die Transfektion zur Bestimmung der Cyclophilin A-Verpackung verwendeten Plasmide HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, ng: Nanogramm, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen <i>Pan troglodytes schweinfurthii</i> , SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen <i>Pan troglodytes troglodytes</i>		

2.2.7 Infektion von CRFK-, OMK-, CV-1, HeLa- und HOS-Zellen mit wildtypischen SIVcpz

Um die Infektion durch wildtypische, VSV-G-pseudotypisierte SIVcpz zu testen, wurden 5×10^5 Zellen pro Loch in 24-Loch-Platten ausgesät und am darauffolgenden Tag mit gleichen Mengen Viruspartikeln von SIVcpzPtt oder SIVcpzPts infiziert. Die Virusmenge wurde durch Messung der Aktivität der reversen Transkriptase mit dem *Cavidi HS lenti RT-Kit* durch Zeli Zhang bestimmt. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen lysiert und es wurde ein Immunoblot mit Antikörpern gegen das Viruscapsidprotein p24 als Maß für die erfolgte Infektion und gegen Tubulin als Ladekontrolle durchgeführt.

2.2.8 Analyse der Degradierung von SAMHD-1 durch HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts

Um zu untersuchen, ob HIV-1 und SIVcpz in der Lage sind SAMHD-1 zu degradieren, wurden 5×10^6 THP-1 Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten in RPMI 1640 Medium plus Vollzusatz ausgesät und mit 25 ng/ml PMA differenziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, und die nun adhärennten Zellen wurden mit HIV-1, SIVcpzPtt, SIVcpzPts oder einem HIV-2-Vpx-tragendem HIV-1 (hergestellt durch Edmund Osei Kuffour) mit einer Multiplizität der Infektion (*Multiplicity of Infection*, MOI) von 2 oder 5 infiziert (Osei Kuffour, Schott et al. 2018). Das bedeutet, dass 2- bzw. 5-mal so viele Viruspartikel wie Zellen für die Infektion verwendet wurden. Die Infektion erfolgte mittels Spinokulation bei 30°C und 1200 g über 2 h. Nach 48 h Stunden wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend für einen Immunoblot lysiert. Als Negativkontrolle wurde die Degradierung durch Vpx des Vpx-tragenden HIV-1 und SAMHD-1-*Knockout*-THP1-Zellen verwendet.

2.3 Molekularbiologische und proteinchemische Methoden

2.3.1 Vervielfältigung von Plasmid-DNA

2.3.1.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien mit den jeweiligen Plasmiden transformiert. Unter Transformation versteht man das nicht-virale Einbringen von freier DNA in kompetente Bakterien. Es wurden Bakterien der Stämme *Top10* und *Stabl2* (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet, die durch Wioletta Hörschken nach einer modifizierten Methode von Hanahan chemisch kompetent

gemacht worden waren (Hanahan 1983). Die Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert. Die in Tabelle 15 aufgelisteten Bestandteile wurden mit Ausnahme des Ampicillins vermengt, der pH-Wert mittels Natriumhydroxid auf 7 eingestellt und das Medium anschließend für 20 Minuten autoklaviert. Das Selektionsantibiotikum Ampicillin wurde nach Abkühlung auf unter 50°C hinzugegeben.

Bestandteile	Festmedium	Flüssigmedium
ddH ₂ O	1 l	1 l
Caseinpepton	10 g	10 g
Hefeextrakt	5 g	5 g
Natriumchlorid	10 g	10 g
Agar	15 g	0 g
Ampicillin	50 mg	50 mg
Tabelle 15: Zusammensetzung LB-Medium g: Gramm, l: Liter, mg: Milligramm		

Die bei -80°C gelagerten *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 20-50 ng Plasmid auf 100 µl Bakteriensuspension versehen. Nach einer Inkubationszeit von 10-30 Minuten auf Eis wurde die Suspension für 45 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und die Suspension bei 30°C und 550 rpm für 60-90 Minuten auf einer Schüttelplatte inkubiert und anschließend auf einer mit Ampicillin versehenen Agarplatte verteilt. Nach 24-48 h Lagerung bei 30°C wurde eine Bakterienkolonie der Platte steril entnommen und in 400-500 ml LB-Flüssigmedium gegeben und unter Bewegung weitere 24-48h bei 30°C inkubiert.

2.3.1.2 Präparation der DNA aus kompetenten *E. coli*

Für die DNA-Präparation aus kompetenten Bakterien wurde das *Pure Yield Plasmid Maxiprep Kit* (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Bakteriensuspension wurde dabei für 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde mit 15 ml Resuspensionslösung durch Auf- und Abpipettieren suspendiert, und es wurden 15 ml der Zellyselösung addiert. Die Behältnisse wurden so lange hin und her bewegt bis der Inhalt

eine klumpige Konsistenz bekam. Nach einer 3-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 15 ml Neutralisationslösung hinzugefügt und die Behältnisse 10-15 mal geschwenkt bis die Suspension eine homogenere Konsistenz annahm. Es erfolgte eine Zentrifugation über 30 Minuten bei 7000 g. Der Überstand wurde anschließend mittels Vakuum durch eine filternde Säule auf eine Säule mit einer DNA-bindenden Membran gezogen. Die Membran wurde anschließend mit 5 ml Endotoxin-entfernender und danach mit 20 ml ethanolhaltiger Lösung gewaschen. Die DNA wurde anschließend mit nukleasefreiem Wasser aus der Membran gelöst und in Mikroreaktionsgefäßen aufgefangen. Die Konzentration der DNA wurde unter Zuhilfenahme der Software NanoDrop 200 1.6 (Thermo Fisher, Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Es handelt sich hierbei um eine photometrische Bestimmung des Absorptionsgrades von Licht der Wellenlänge 260 nm, für die das Gerät NanoDrop NP-1000 (Peqlab Erlangen, Deutschland) verwendet wurde.

2.3.2 Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur Überprüfung, ob die durch Transformation vervielfältigte DNA dem gewünschten Plasmid entsprach, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Im Falle der beiden Plasmide Mamu 1 und Mamu 7 wurde zunächst ein EcoRI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) Kontrollverdau durchgeführt. Dabei wurden 0,5 µl EcoRI [10 U/µl] mit 2 µl *Buffer O* und 500 ng Plasmid vermengt und das Volumen mit bidestilliertem H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 1-2 h bei 37°C.

Restriktionsenzym	Schnittstelle (5' → 3')	Verwendeter Puffer
EcoRI	G ν AATTC	<i>Buffer O</i> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Tabelle 16: Verwendetes Restriktionsenzym
Das Restriktionsenzym EcoRI verwendet die mit ν gekennzeichnete Schnittstelle.

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA je nach Größe des jeweiligen Stranges. DNA ist negativ geladen und wandert im elektrischen Feld von der Kathode in Richtung Anode, wobei die Gelmatrix als Filter dient. Die Nukleinsäurestränge durchdringen je nach Größe das Agarosegel unterschiedlich schnell und werden so aufgetrennt. Als Größenstandard diente dabei die *GeneRuler* 1 kB Plus DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). In dieser Arbeit wurden Gele mit 1% Agarose

verwendet. Für ihre Herstellung wurde Agarose in Tris-Azetat-EDTA (TAE) unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung wurde Ethidiumbromidlösung hinzugefügt. Dieses interkaliert mit der DNA und fluoresziert unter ultraviolettem Licht. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gegeben und mit den mit DNA-Ladepuffer versehenen Nukleinsäurestrangproben und der DNA-Leiter beladen. Die Elektrophorese wurde bei einer elektrischen Spannung von 150 V über 20-30 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Banden durch einen UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

2.3.3 Herstellung eines Proteinlysates aus eukaryotischen Zellen

Um die Expression von Proteinen in Zellen zu analysieren, wurden Immunoblots durchgeführt, für die zunächst die Herstellung eines Proteinlysates erforderlich war. Wenn nicht anders angegeben, wurden hierfür 10^6 Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten ausgesät und 2-3 Tage später vom Medium befreit und mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde mit Protease Inhibitor Cocktail Set III versehener RIPA-Puffer auf die Zellen gegeben und diese über 30 Minuten auf Eis auf einer Rüttelplatte inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Pipettieren von der Platte gelöst und bei 12 000 g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Das Lysat wurde in frische Behältnisse umgefüllt und entweder sofort weiterverwertet oder bei -20°C gelagert.

2.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

(SDS-PAGE)

Ziel der SDS-Gelelektrophorese ist es Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufzutrennen und so Rückschlüsse auf die Expression verschiedener Proteine in Zellen oder viralen Partikeln ziehen zu können. Hierfür wurden Zellen oder Viruspartikel zunächst wie oben beschrieben lysiert und die darin enthaltenen Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS)-haltigem Ladepuffer *RotiLoad* (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) behandelt, der durch seinen enthaltenen β -Mercaptoethanol kovalente Bindungen in der Sekundärstruktur der Proteine auftrennen kann. Natriumdodecylsulfat ist anionisch und sorgt für eine gleiche negative Ladung der zu analysierenden Proteine, damit deren Auftrennung in der Gelelektrophorese alleine von ihrem Molekulargewicht abhängt. Auf 50 μ l Lysat wurden 10 μ l *RotiLoad* verwendet. Die Proteine wurden anschließend bei 95°C über 5 Minuten denaturiert.

Die Auflösung der Auftrennung der Proteine ist von der Porengröße des Trenngels abhängig, die durch seine Acrylamidkonzentration bestimmt wird. In dieser Arbeit wurden Sammelgele mit 5% und Trenngele mit 12% Acrylamid verwendet. Das Sammelgel hat die Aufgabe die Proteine zunächst zu konzentrieren, bevor sie das Trenngel anhand ihres Molekulargewichts durchwandern.

Zunächst wurde das Trenngel, wie in Tabelle 17 beschrieben, hergestellt und zwischen zwei gereinigte und in eine Haltevorrichtung eingespannte Glasplatten pipettiert. Die enthaltenen Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) sorgten für eine Polymerisation des Gels. Das Gel wurde mit einer dünnen Schicht Isopropanol überzogen. Nach dem Festwerden wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel hergestellt. In das Sammelgel wurde ein Kamm eingebracht, um Kammern für das Laden der Proben zu schaffen.

Trenngel - 12% Acrylamid	
30% Acrylamid 0.8% Bisacrylamid	9 ml
1,5 M Trisbase, pH 8,8	5,7 ml
10% SDS	230 µl
ddH ₂ O	7,61 ml
20% APS	113 µl
TEMED	23 µl
Sammelgel - 5% Acrylamid	
30% Acrylamid 0.8% Bisacrylamid	1,26 ml
1 M Trisbase, pH 6,8	945 µl
10% SDS	75 µl
ddH ₂ O	5,3 ml
20% APS	37,5 µl
TEMED	7,5 µl
Tabelle 17: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Gelelektrophorese	
µl: Mikroliter, APS: Ammoniumperoxodisulfat, ddH ₂ O: doppelt destilliertes Wasser, M: Molar, ml: Milliliter, SDS: Natriumdodecylsulfat, TEMED: Tetramethylethylendiamin, Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	

Nach dem Laden der Proben und des Markers *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) als Skala wurde eine elektrische Spannung von 85 V angelegt, bis die Proben sich am Ende des Sammelgels konzentriert hatten. Anschließend wurde sie auf 110 V erhöht und beibehalten, bis die Proben sich aufgetrennt hatten. Nach Entfernen der Spannung wurde das Gel aus den Glasplatten entfernt und das Sammelgel verworfen. Das Trenngel wurde in Transferpuffer gewaschen.

2.3.5 Immunoblot

Mittels Immunoblot wurden die in der Gelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) transferiert, um sie anschließend unter Zuhilfenahme von Antikörpern zu detektieren. Hierfür wurde die Membran zunächst in Methanol aktiviert. In dieser Arbeit wurde ein *Semi-Dry*-Verfahren genutzt für das dicke Filterpapier in *Blottingpuffer* eingelegt wurde. Dieses wurde auf der Anode der Transferzelle platziert, darauf wurde die aktivierte und mit *Blottingpuffer* gespülte PVDF-Membran gelegt und die Luftblasen dazwischen entfernt. Als nächste Schicht wurde das Trenngel auf der Membran und darüber ein weiteres in *Blottingpuffer* getränktes, dickes Filterpapier platziert. Nach jedem Schritt wurden Luftblasen entfernt. Die Transferzelle wurde mit dem Kathode-tragenden Deckel verschlossen und es wurde eine elektrische Spannung von 25 V über 45 Minuten appliziert, damit die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in die Membran wandern.

2.3.6 Immunodetektion von Proteinen

Die auf der PVDF-Membran gebundenen Proteine wurden durch Detektion mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht und semiquantitativ ausgewertet. Hierfür wurde die PVDF-Membran nach dem *Blotting* für 1 h in *Tris-buffered Saline* mit *Tween 20* (TBST) mit 5% Milchpulver eingelegt. Dabei blockierten Milchproteine und das *Tween 20* die freien Stellen in der PVDF-Membran und verhinderten so das Detektieren von unerwünscht gebundenen Proteinen durch Antikörper. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit einem primären Antikörper bei 4°C über Nacht. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 gelistet. Die Antikörper wurden mit TBST mit 5% Milchpulver in der jeweils angegebenen Konzentration verdünnt. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal über 10-20 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend für 1 h mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 6) inkubiert, welcher an den F_c-Teil des primären Antikörpers band. Der sekundäre Antikörper war dabei an eine

Meerrettichperoxidase gekoppelt. Diese katalysierte bei Hinzugabe des ECL-Substrates (*Enhanced luminol-based Chemiluminescent*, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland) die Umsetzung des enthaltenen Luminols, und ein Lichtsignal wurde detektierbar. In dieser Arbeit wurde die Chemolumineszenz mittels Fotofilmen aufgenommen und unter Zuhilfenahme eines Filmentwicklungsapparates (AGFA Healthcare, Mortsel, Belgien) sichtbar gemacht. Wenn weitere Proteine auf der bereits mit Antikörpern beladenen PVDF-Membran detektiert werden sollten, wurde diese über 1 h in *Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution* (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eingelegt, um die gebundenen Antikörper zu lösen. Anschließend wurde die Membran wieder mit 5% Milchpulver in TBST geblockt und erneut mit einem primären Antikörper behandelt.

2.4 Software und statistische Auswertung

Zur Erstellung von Graphen, sowie zur statistischen Auswertung wurde die Software *GraphPad Prism* Version 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung. Das Signifikanzniveau wurde mit einem p-Wert von 0,05 festgelegt. Da in den hier gezeigten Experimenten $n < 100$ war, wurde von nicht-normalverteilten Stichproben ausgegangen. Es handelte sich stets um unverbundene Stichproben, weswegen bei Vergleichen von zwei Gruppen ein Mann Whitney Test und bei mehr als zwei ein Kruskal-Wallis Test mit anschließenden *posthoc* Mann Whitney Test und Adjustierung des p-Wertes angewandt wurden. Für die Abbildungen 15 und 17 wurde die Software *Vector NTI Advance 10* von LifeTechnologies verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Infektion von Zelllinien humaner, simianer und felineer

Spezies durch HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts

Als Hypothese wurde von einer unterschiedlichen Anpassung von HIV-1 und SIVcpz an zelluläre, zytoplasmatische und nukleäre Wirtsfaktoren ausgegangen und deshalb Infektionsassays mit VSV-G-pseudotypisierten Luciferasereporterviren durchgeführt. Unter dem Begriff der Infektion wurde in dieser Arbeit der Viruseintritt in die Zielzelle verstanden, und die quantitative Bewertung der Infektion erfolgte anhand der Luciferaseaktivität, die die Replikationsschritte nach dem *Entry* bis hin zur Expression viraler Proteine abbildete. Um ein geeignetes Zellsystem für die Experimente zu finden und um einen generellen Überblick über die Infektionsfähigkeit von HIV-1 und SIVcpzPtt bzw. SIVcpzPts in Zellen verschiedener Spezies zu gewinnen, wurden Virustitrationsexperimente in humanen und nicht-humanen Zelllinien durchgeführt. Als humanes Modell wurden die Zellsysteme HOS und HeLa verwendet, zusätzlich wurden die Infektionen in simianen CV-1-Zellen der äthiopischen Grünmeerkatze (Agm, *African Green Monkey*, *Chlorocebus aethiops*) und OMK (*Owl Monkey Kidney*)-Zellen des östlichen Graukehl-Nachtaffens (*Aotus trivirgatus*), sowie in felineen CRFK (*Crandell-Rees Feline Kidney*)-Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zu den simianen und humanen Zelllinien wird in CRFK-Zellen kein antivirales TRIM5 α - oder TRIM-Cyclophilin A-Protein exprimiert, das die Replikation von HIV-1 hemmt (McEwan, Schaller et al. 2009). Die Infektiosität der Luciferasereporterviren wurde durch Messung der Luciferaseaktivität zwei oder drei Tage nach Infektion bestimmt. Da die Reporterviren ein Gen für das Enzym Luciferase enthalten, wurde dieses bei einer erfolgreichen Infektion und Integration exprimiert. Bei Hinzugabe des Luciferase-Substrates entstand dann abhängig von der Virusmenge und Infektiosität ein messbares Lichtsignal.

Der Vergleich der Infektiosität von HIV-1 in den verschiedenen Zelllinien zeigte, dass HIV-1 CRFK-Zellen 10-fach stärker infizierte als die beiden humanen Zelllinien HOS und HeLa. In den simianen Zelllinien CV-1 und OMK wurde HIV-1 stark gehemmt und die Infektiosität war 100- bis 1000-fach geringer als in den humanen Zelllinien. Diese Hemmung war in OMK-Zellen etwas größer als in CV-1-Zellen (Abbildung 8, A).

Humane HOS-Zellen wurden durch SIVcpzPtt 33-fach und SIVcpzPts 20-fach stärker infiziert als HeLa-Zellen. CRFK-Zellen ließen sich durch beide SIVcpz ähnlich gut wie

HOS-Zellen infizieren. Die Infektiosität in den beiden simianen Zelllinien CV-1 und OMK war für SIVcpzPtt 1000-fach und für SIVcpzPts 100-fach geringer als in HOS-Zellen, jedoch stieg die Effizienz der Infektion durch SIVcpzPts bei höheren Virusmengen (Abbildung 8, B, C).

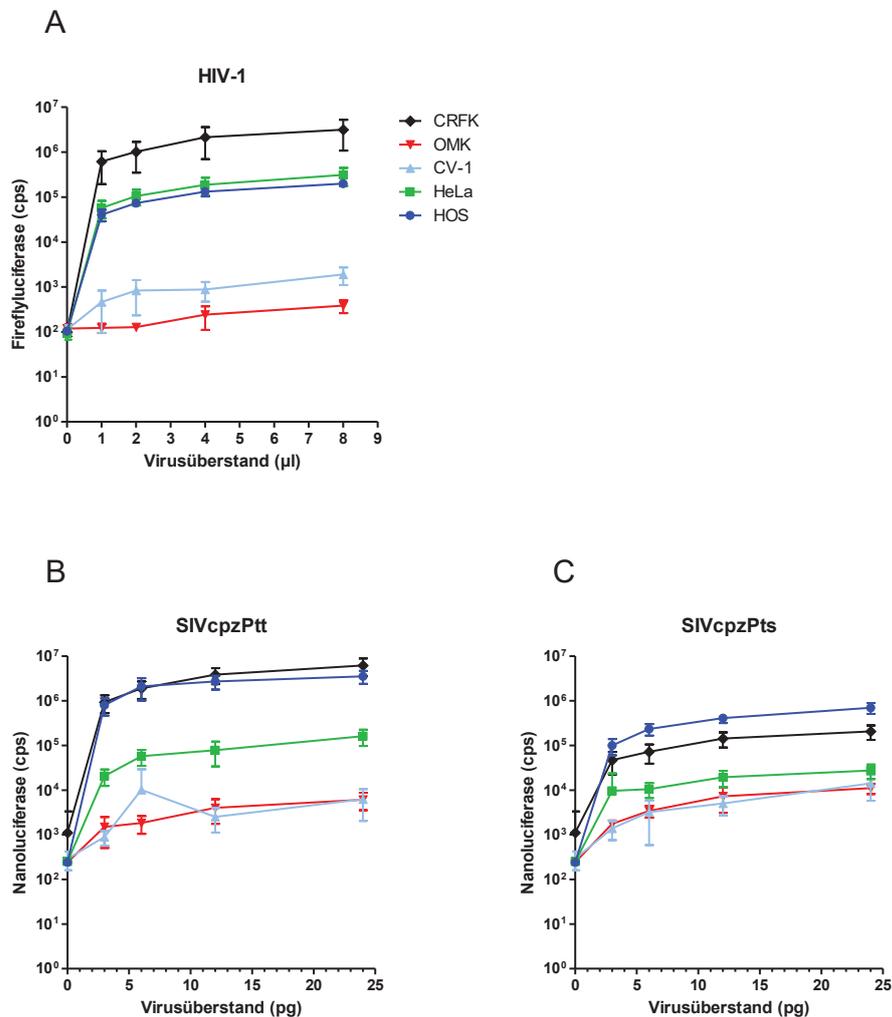


Abb. 8: Infektion humaner und nicht-humaner Zelllinien mit dem humanen Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) und den simianen Immundefizienzviren des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes* (SIVcpzPtt) und *Pan troglodytes schweinfurthii* (SIVcpzPts)

Dargestellt ist die Infektion von HIV-1 (A), SIVcpzPtt (B) und SIVcpzPts (C) in den humanen Zelllinien HOS (blau) und HeLa (grün), sowie in den nicht-humanen Zelllinien CRFK (schwarz), OMK (rot) und CV-1 (hellblau), welche mittels Fireflyluciferase- (A) oder Nanoluciferaseaktivität (B,C) bestimmt wurde. (A) HIV-1 infizierte feline CRFK-Zellen ca. 10-fach stärker als humane HOS- und HeLa-Zellen. In den simianen OMK- und CV-1-Zellen wurde kaum bis keine Luciferaseaktivität gemessen. (B, C) Im Gegensatz zu HIV-1 infizierten SIVcpzPtt und SIVcpzPts HOS-Zellen ähnlich stark wie CRFK-Zellen und deutlich stärker als HeLa-Zellen. In den simianen Zelllinien wurde eine geringe Infektiosität festgestellt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal in dreifacher Ausführung durchgeführt. Diese Abbildung wurde modifiziert veröffentlicht (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

µl: Mikroliter, cps: *Counts Per Second*, CRFK: *Crandell-Rees Feline Kidney*-Zellen, CV-1: *Green Monkey Kidney*-Zellen, HeLa: *Henrietta Lacks*-Zellen, HIV-1: *Humanes Immundefizienzvirus 1*, HOS: *Human Osteosarcoma*-Zellen, OMK: *Owl Monkey Kidney*-Zellen, pg: *Pikogramm*, SIVcpzPts: *Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: *Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen Pan troglodytes troglodytes*

Um zu überprüfen, ob der bei den SIVcpz-Reporterviren beobachtete Effekt der unterschiedlichen Infektion von Zellen feliner, simianer und humaner Spezies auch auf wildtypische SIVcpz übertragbar ist, wurden CRFK-, OMK-, CV-1, HeLa- und HOS-Zellen mit gleichen Mengen VSV-G-pseudotypisierten, wildtypischen SIVcpzPtt bzw. SIVcpzPts infiziert und nach zwei Tagen lysiert. Die Proteinlysate der infizierten Zellen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und es erfolgte eine Untersuchung hinsichtlich ihrer Expression des viralen Capsidproteins p24. Hierbei zeigte sich für SIVcpzPtt ein relativ stärkeres Signal für die Expression von p24 als für SIVcpzPts. Für SIVcpzPtt sah man eine stärkere Expression von p24 in vor allem CRFK- und HOS- und eine schwächere in HeLa-Zellen. Kaum Signal erhielt man in OMK- und CV-1-Zellen. Die Infektion durch SIVcpzPts konnte nur in CRFK- und HOS-Zellen durch Detektion von p24 sichtbar gemacht werden (Abbildung 9).

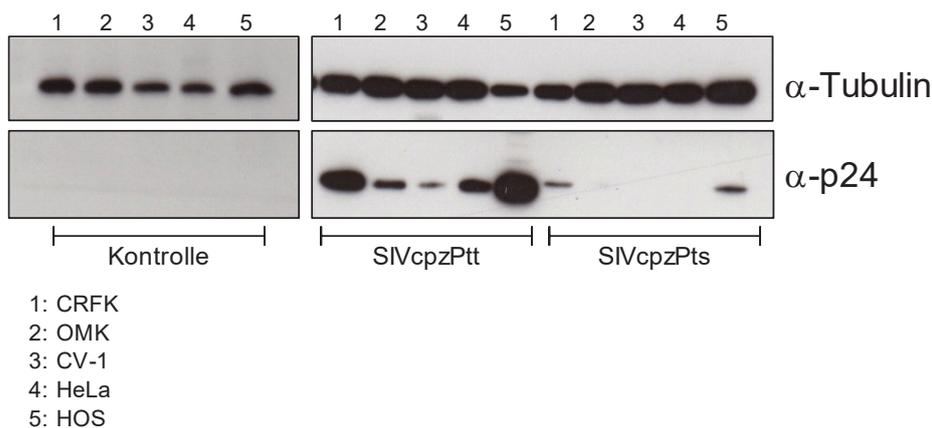


Abb. 9: Infektion durch wildtypische SIVcpzPtt und SIVcpzPts in Zellen feliner, simianer und humaner Spezies

Dargestellt ist ein Immunoblot, der die Expression des Capsidproteins p24 als Maß für die Infektion mit gleichen Mengen an Viruspartikeln von wildtypischen, VSV-G-pseudotypisierten SIVcpzPtt und SIVcpzPts in felinen CRFK (1)-, simianen OMK (2)- und CV-1 (3)-, sowie humanen HeLa (4)- und HOS (5)-Zellen zeigt. Verwendet wurden Antikörper gegen das Viruscapsidprotein (p24) und Tubulin als Ladekontrolle. Die Infektion durch SIVcpzPts war im Vergleich zu SIVcpzPtt in allen Zelllinien schwächer. SIVcpzPtt infizierte am stärksten CRFK- und HOS-, gefolgt von HeLa-Zellen. Die geringste Infektion wurde in CV-1- gefolgt von OMK-Zellen gefunden. Bei SIVcpzPts war die Infektion nur in CRFK- und HOS-Zellen stark genug um ein Signal zu detektieren.

α: anti, CRFK: *Crandell-Rees Feline Kidney*-Zellen, CV-1: *Green Monkey Kidney*-Zellen, HeLa: Henrietta Lacks-Zellen, HOS: *Human Osteosarcoma*-Zellen, OMK: *Owl Monkey Kidney*-Zellen, p24: Capsidprotein p24, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*

3.2 Expression zytoplasmatischer Proteine in HOS- und HeLa-Zellen

Um die Unterschiede der Infektion durch SIVcpzPtt und SIVcpzPts in HOS- und HeLa-Zellen zu erklären, wurden Zelllysate der beiden Zelllinien hergestellt und diese mittels Immunoblot auf die Expression verschiedener mit dem HIV-1-Capsid interagierender Proteine getestet. Hierbei zeigte sich eine gleiche Expression der Nucleoporine 358 und 153, CPSF6, des Restriktionsfaktors TRIM5 α , sowie Cyclophilin A. Die exprimierte Menge und Verteilung von TRIM5-Proteinisoformen, die von alternativ gespleißten Transkripten kodiert werden, unterschied sich (Abbildung 10).

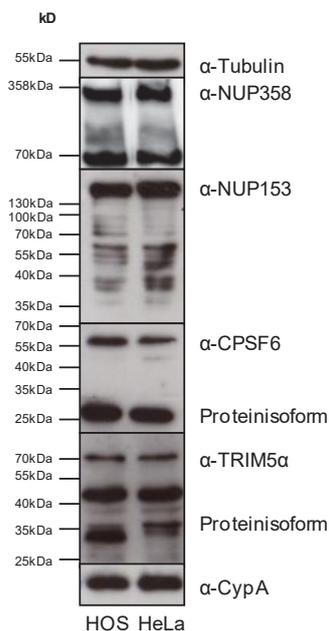


Abb. 10: Expression intrazellulärer Proteine in HOS- und HeLa- Zellen

Dargestellt ist ein Immunoblot, der die Expression einiger für die Replikation von HIV-1 relevanter Wirtsproteine in den humanen Zelllinien HOS und HeLa zeigt. Beide Zelllinien exprimierten in gleichem Maße die Nucleoporine 153 und 358, CPSF6, das Restriktionsprotein TRIM5 α , sowie Cyclophilin A. Lediglich die Expression von TRIM5-Proteinisoformen aus alternativ gespleißten Transkripten unterschied sich. Die Detektion von Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Diese Abbildung wurde modifiziert veröffentlicht (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

α : anti, CPSF6: *Cleavage and Polyadenylation Specificity*-Faktor Untereinheit 6, Cyp A: Cyclophilin A, HeLa: Henrietta Lacks-Zellen, HOS: *Human Osteosarcoma*-Zellen, kDa: Kilodalton, NUP153: Nucleoporin 153, NUP358: Nucleoporin 358, TRIM: *Tripartite Motif*

Zusammenfassend waren CRFK-Zellen sehr permissiv für HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts, während die getesteten simianen Zelllinien kaum bis gar nicht infiziert wurden. Die Fähigkeit von HIV-1 und SIVcpz humane HOS- und HeLa-Zellen zu infizieren unterschied sich. Während sich beide Zelllinien für HIV-1 gleich permissiv zeigten, war die Infektiosität von SIVcpzPtt und SIVcpzPts in HOS-Zellen größer als in HeLa-Zellen.

Beide humanen Zelllinien exprimierten in etwa gleich großen Mengen Wirtsproteine, die die frühen Schritte der Replikation von HIV-1 beeinflussen. Alleine TRIM5-Proteinisoformen aus alternativ gespleißten Transkripten unterschieden sich in ihrer Expression.

3.3 Restriktion durch *Tripartite Motif 5* (TRIM5)-Proteine verschiedener simianer und humaner Spezies

Um die unterschiedliche Infektionsfähigkeit von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts in simianen, humanen und felineen Zellen zu erklären, wurden CRFK-Zelllinien hergestellt, die TRIM5 α -Proteine des Rhesusaffen (Rh, *Macaca mulatta*), der äthiopischen Grünmeerkatze (Agm, *African Green Monkey*, *Chlorocebus aethiops*) und des Menschen, sowie TRIM-Cyclophilin A-Fusionsproteine (TRIMCyp) des Rhesusaffen und des östlichen Graukehl-Nachtaffen (OM, *Owl Monkey*, *Aotus trivirgatus*) stabil exprimierten (Abbildung 11, D). Es wurden CRFK-Zellen ausgewählt, da diese von Natur aus ein nicht-antivirales, trunkiertes TRIM5-Protein exprimieren (McEwan, Schaller et al. 2009).

HIV-1 wurde am stärksten durch das TRIM5 α -Protein der Rhesusaffen gehemmt, die Infektiosität sank um 91% im Vergleich zum Kontrollwert in wildtypischen CRFK-Zellen. Gegen das ebenfalls vom Rhesusaffen stammende TRIMCyp war HIV-1 resistent. Das TRIM5 α -Protein der äthiopischen Grünmeerkatze (Agm) reduzierte die Infektiosität von HIV-1 um 74%. Die Infektion von HIV-1 sank durch humanes TRIM5 α und TRIMCyp des östlichen Graukehl-Nachtaffens (OM) um 50%, bzw. 57% (Abbildung 11, A).

SIVcpzPtt verhielt sich ähnlich zu den getesteten TRIM5-Proteinen wie HIV-1, es wurde um ca. 95% durch Rh-TRIM5 α , aber nicht signifikant durch das TRIM-Cyclophilin A-Fusionsprotein des Rhesusaffen gehemmt. Agm-TRIM5 α inhibierte SIVcpzPtt um 93% und damit stärker als HIV-1. Humanes TRIM5 α und OM-TRIMCyp inhibierten um 50%, respektive 66% (Abbildung 11, B).

Bei SIVcpzPts war die Restriktion durch TRIM5-Proteine insgesamt schwächer ausgeprägt als bei HIV-1 und SIVcpzPtt, mit der Ausnahme des vom Rhesusaffen stammenden TRIM-Cyclophilin A-Fusionsproteins, das nur SIVcpzPts signifikant um 27% inhibierte. Das TRIM5 α des Rhesusaffen inhibierte SIVcpzPts um 40%, das der äthiopischen Grünmeerkatze um 50%. SIVcpzPts war als einziges der getesteten Viren gegen humanes TRIM5 α resistent, ließ sich aber durch das Fusionsprotein des östlichen Graukehl-Nachtaffens um 63% inhibieren (Abbildung 11, C).

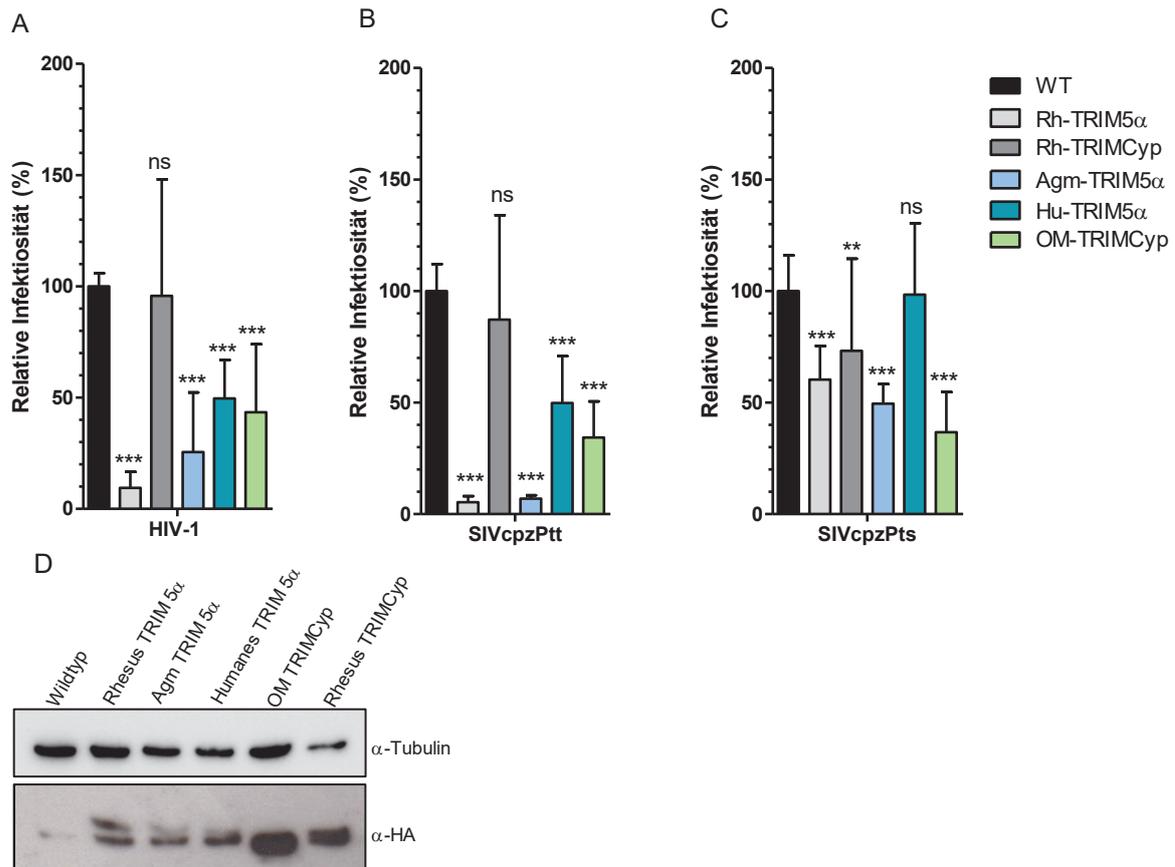


Abb. 11: Antivirale Aktivität von TRIM5-Proteinen verschiedener simianer und humaner Spezies

Es wurden CRFK-Zelllinien hergestellt, die TRIM5 α -Proteine von Rhesusaffen (Rh, hellgrau), äthiopischen Grünmeerkatzen (Agm, hellblau) oder Menschen (Hu, dunkelblau), oder TRIM-Cyclophilin A-Fusionsproteine (TRIMCyp) von Rhesusaffen (Rh, dunkelgrau) oder östlichen Graukehl-Nachtaffen (OM, türkis) stabil exprimierten. Die verschiedenen TRIM5-Proteine waren mit einem HA-tag versehen worden. Drei Tage nach Infektion mit HIV-1, bzw. zwei Tage nach Infektion mit SIVcpz erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. (A) TRIM5 α -Proteine von Rhesusaffen, äthiopischen Grünmeerkatzen und Menschen, sowie TRIMCyp von östlichen Graukehl-Nachtaffen inhibierten das humane Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) um bis zu 90%. Allerdings wurde HIV-1 nicht durch das Fusionsprotein von Rhesusaffen gehemmt. (B) Wie HIV-1 wurde das simiane Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes* (SIVcpzPtt) durch TRIM5 α -Proteine aller getesteten Spezies, sowie durch das Fusionsprotein der östlicher Graukehl-Nachtaffen inhibiert, war aber gegen das Fusionsprotein von Rhesusaffen resistent. (C) Das simiane Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii* (SIVcpzPts) war resistent gegen humanes TRIM5 α , ließ sich aber durch alle simianen TRIM5 α - sowie TRIM-Cyclophilin A-Fusionsproteine inhibieren. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Verhältnis zur Infektion in CRFK-Wildtypzellen. Die Signifikanz wurde mittels Mann Withney Test bestimmt. ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal in je dreifacher Ausführung durchgeführt, Infektionen in den Rh-TRIM-Cyclophilin A-Fusionsprotein positiven Zellen wurden achtmal in je dreifacher Ausführung durchgeführt. (D) Um zu überprüfen, ob die CRFK-Zellen die verwendeten TRIM5-Proteine exprimieren, wurde ein Immunoblot durchgeführt und die TRIM-Expression mit einem Antikörper gegen den an die TRIM5-Proteine gekoppelten HA-tag detektiert. Zur Kontrolle diente wildtypische CRFK-Zellen.

α : anti, Agm: *African Green Monkey*, HA: Humanes Influenzahämagglutinin, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, Hu: Human, OM: *Owl Monkey*, Rh: Rhesus, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*, TRIM: *Tripartite Motif*, TRIMCyp: TRIM-Cyclophilin A, WT: Wildtyp

HIV-1 und SIVcpzPtt ähnelten sich hinsichtlich ihres Restriktionsmusters durch TRIM5-Proteine, sie wurden beide leicht durch humanes und stark durch simianes TRIM5 α inhibiert, wohingegen SIVcpzPts gegen humanes TRIM5 α resistent war. Insgesamt wurde SIVcpzPts durch simianes TRIM5 α etwas schwächer gehemmt als die anderen beiden Viren.

3.4 Restriktion von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts durch Capsidinhhibitoren

3.4.1 Antivirale Aktivität der Capsidinhhibitoren PF-3450074 (PF74) und PF-3759857 (PF57) in HOS-, HeLa- und FRhl-2-Zellen

Um die antivirale Aktivität der Capsidinhhibitoren PF-3450074 (PF74) und PF-3759857 (PF57) und ihre Abhängigkeit von zellulären Faktoren genauer zu untersuchen, wurden Infektionsassays mit ansteigender PF74- bzw. PF57-Konzentration in humanen HOS- und HeLa-, sowie in vom Rhesusaffen stammenden FRhl-2-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen zwei Stunden vor Infektion mit PF74 bzw. PF57 oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kontrolle behandelt. Zwei bzw. drei Tage nach Infektion wurde die Infektiosität mittels Messung der Luciferaseaktivität bestimmt.

PF74 und PF57 waren in der Lage HIV-1 dosisabhängig in allen drei verwendeten Zelllinien zu inhibieren. Am stärksten war die Hemmung beider Inhibitoren in FRhl-2-Zellen, dort reduzierte PF74 die Infektiosität auf bis zu 0,4% und PF57 auf bis zu 5,8%. In HeLa-Zellen hemmte PF74 auf bis zu 2,3% und PF57 auf 8% Restinfektiosität. In HOS-Zellen war die Inhibition durch PF74 in niedrigen Konzentrationen (0,5 μ M und 1 μ M) geringer und in höheren Konzentrationen (4 μ M und 8 μ M) stärker als in HeLa-Zellen, in denen die Infektiosität von HIV-1 auf bis zu minimal 0,7% sank. PF57 inhibierte HIV-1 in HOS-Zellen auf bis zu 6,6% Restinfektiosität (Abbildung 12, A und D).

Die Infektiosität von SIVcpzPtt wurde in HOS-Zellen durch die beiden Capsidinhhibitoren in einer ähnlichen Weise dosisabhängig reduziert wie jene von HIV-1. Sie sank auf bis zu 1,1% durch PF74 und 2% durch PF57. In HeLa-Zellen erreichte PF74 bereits in der niedrigsten Konzentration (0,5 μ M) das Inhibitionsmaximum und die Infektiosität wurde auf bis zu 5,9% gesenkt. In der höchsten Konzentration von 8 μ M inhibierte PF57 SIVcpzPtt in HeLa-Zellen auf 3,4% der ursprünglichen Infektiosität, also in einer ähnlichen Stärke wie in HOS-Zellen. Allerdings verlief die Dosis-Wirk-Kurve in HOS-

zunächst flacher als in HeLa-Zellen. SIVcpzPtt war im Gegensatz zu HIV-1 in FRhl-2-Zellen gegen beide Capsidinhibitoren resistent (Abbildung 12, B und E).

Die Inhibitoren hemmten SIVcpzPts in HOS-Zellen ähnlich wie die anderen beiden getesteten Lentiviren. Die Infektiosität wurde auf bis zu 3,2% durch PF74 und 10,6% durch PF57 reduziert. Sowohl in HeLa- als auch in FRhl-2-Zellen gab es keine Restriktion durch die Capsidinhibitoren (Abbildung 12, C und F).

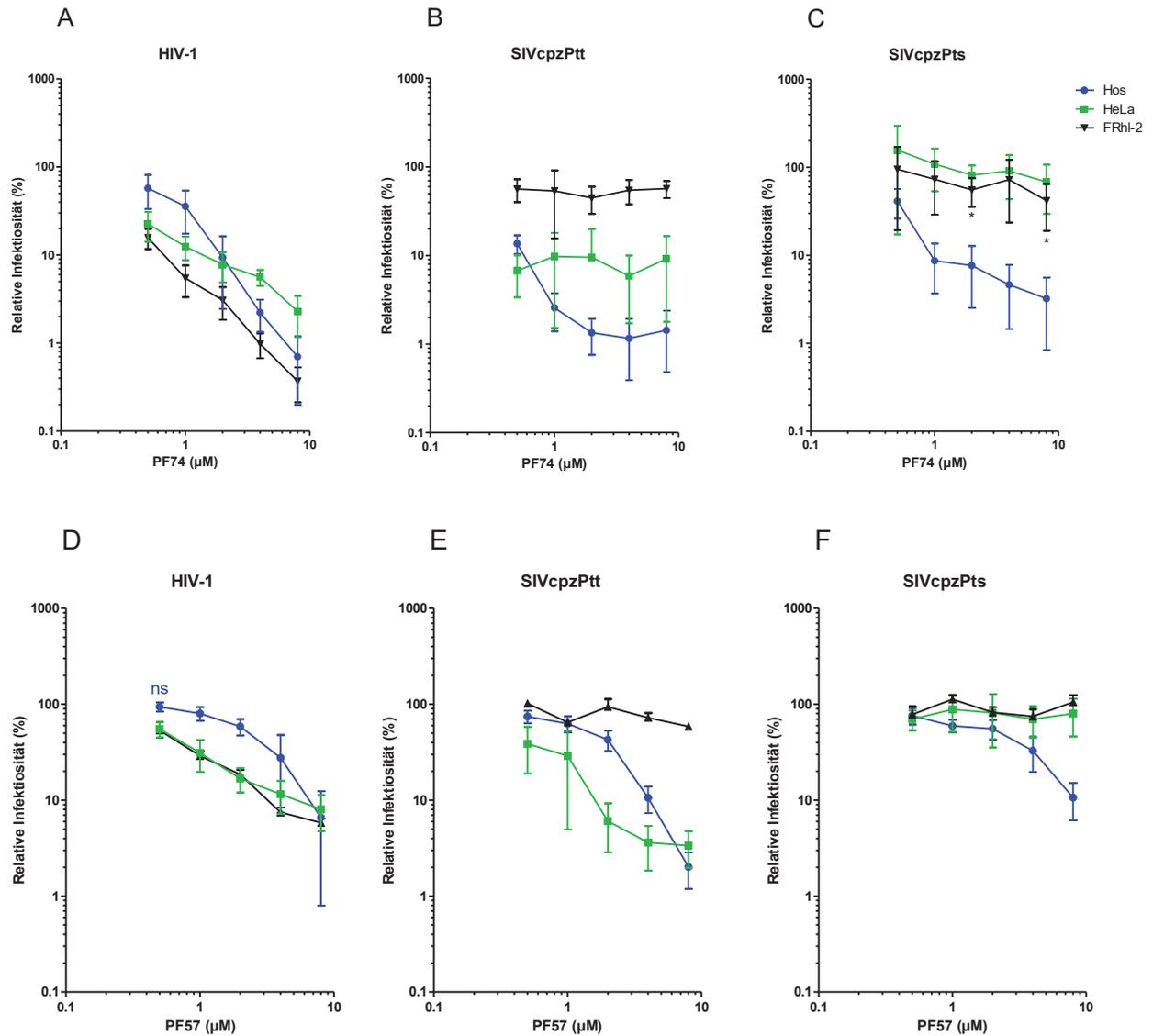


Abb. 12: Hemmung durch die Capsidinhibitoren PF74 und PF57 in HOS-, HeLa- und FRh1-2-Zellen

Dargestellt ist die Infektiosität von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts unter Einfluss verschiedener Konzentrationen der Capsidinhibitoren PF74 und PF57. HOS-, HeLa- und FRh1-2-Zellen wurden zwei Stunden vor Infektion mit PF74, PF57 oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kontrolle behandelt. Zwei bzw. drei Tage nach Infektion wurde die Luciferaseaktivität gemessen. (A, D) PF74 und PF57 reduzierten die Infektiosität von HIV-1 in allen drei verwendeten Zelllinien signifikant. Ausnahmen sind mit ns für nicht signifikant gekennzeichnet. (B, E) Für SIVcpzPtt zeigten PF74 und PF57 lediglich in HOS- (blau) und HeLa- (grün), nicht aber in FRh1-2-Zellen (schwarz) eine signifikante Restriktion. (C, F) Die Infektiosität von SIVcpzPts wurde durch die Inhibitoren nur in HOS-, nicht aber in HeLa- oder FRh1-2-Zellen signifikant gesenkt, Ausnahmen sind mit * für Signifikanz versehen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle ohne PF74 oder PF57, die mit DMSO versehen wurde. Die Signifikanz wurde mittels Mann Withney Test bestimmt. ns: nicht signifikant, *: signifikant ($p < 0,05$). Jedes Experiment wurde mindestens dreimal in je dreifacher Ausführung durchgeführt. Diese Abbildung wurde modifiziert veröffentlicht (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

µM: Mikromolar, FRh1-2: *Fetal Rhesus Monkey Lung*-Zellen, HeLa: Henrietta Lacks-Zellen, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, HOS: *Human Osteosarcoma*-Zellen, PF57: PF-3759857, PF74: PF-3450074, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*

3.4.2 Abhängigkeit der antiviralen Aktivität von PF74 und PF57 von TRIM5-Proteinen

Um die Interaktion der beiden Capsidinhibitoren PF74 und PF57 mit TRIM5-Proteinen zu testen, wurde ihre hemmende Aktivität in CRFK-Zellen, die kein antivirales TRIM5-Protein exprimierten, untersucht. Hierbei zeigte sich eine Inhibition von HIV-1 auf 0,4% durch PF74, und 3,1% durch PF57, und von SIVcpzPtt auf 2,8% durch PF74, und 3,6% Restinfektiosität durch PF57. Die geringste Wirkung hatten die Inhibitoren auf SIVcpzPts mit einer verbleibenden Infektiosität von 14% durch PF74, und 40,2% durch PF57 (Abbildung 13).

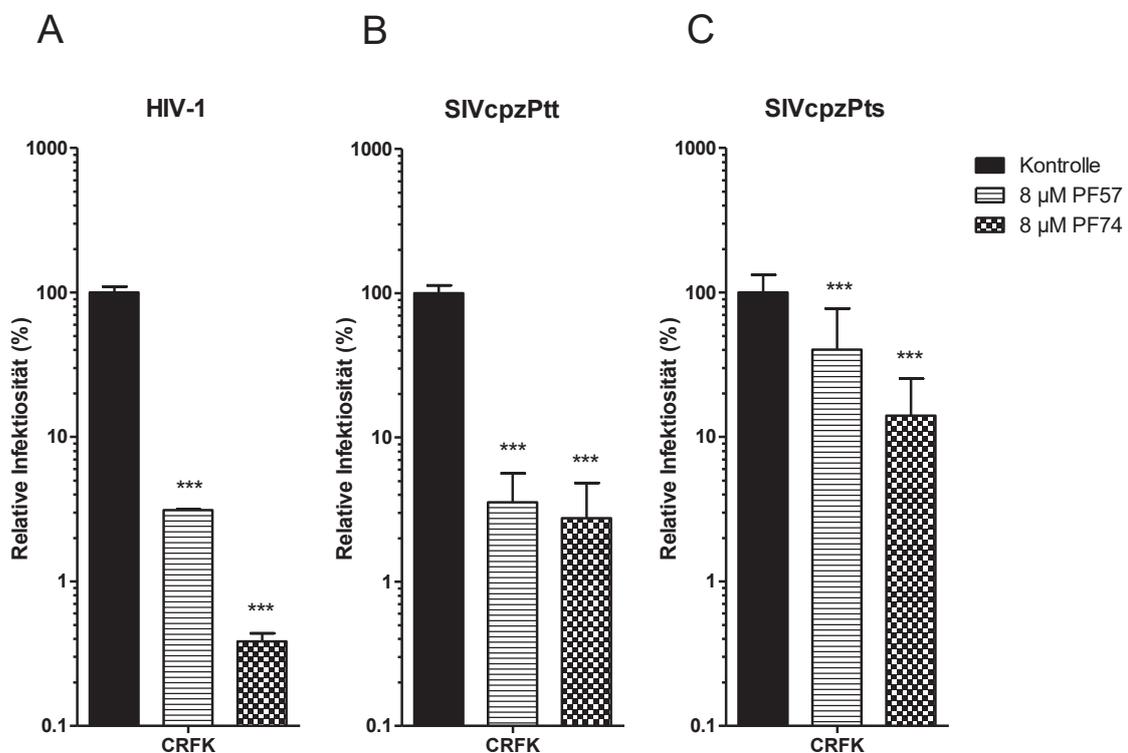


Abb. 13: Inhibition durch PF74 und PF57 in CRFK-Zellen

Die CRFK-Zellen wurden zwei Stunden vor Infektion mit PF74 (Schachbrettmuster), PF57 (gestreift) oder Dimethylsulfoxid (DMSO, schwarz) als Kontrolle behandelt. Zwei bzw. drei Tage nach Infektion wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Es zeigte sich eine signifikante Inhibition durch beide Capsidinhibitoren von HIV-1 (A), SIVcpzPtt (B) und SIVcpzPts (C). Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle ohne PF74 oder PF57, die mit DMSO versehen wurde. Die Signifikanz wurde mittels Mann Withney Test bestimmt. ***: $p < 0,001$. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal in je dreifacher Ausführung durchgeführt. Diese Abbildung wurde modifiziert veröffentlicht (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

μM: Mikromolar, CRFK: *Crandell-Rees Feline Kidney*-Zellen, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, PF57: PF-3759857, PF74: PF-3450074, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*

Als zweiten Schritt wurden stabil TRIM5 exprimierende Zelllinien hinsichtlich ihrer Interaktion mit PF74 und PF57 getestet. Hierfür wurden CRFK-Zellen, die TRIM5 α von Rhesusaffen (Rh, *Macaca mulatta*), Menschen (Hu, human) oder äthiopischen Grünmeerkatzen (Agm, *African Green Monkey, Chlorocebus aethiops*), oder ein TRIM-Cyclophilin A-Fusionsprotein von Rhesusaffen oder östlichen Graukehl-Nachtaffen (OM, *Owl Monkey, Aotus trivirgatus*) exprimierten, und wildtypische CRFK-Zellen als Kontrolle verwendet. In allen getesteten Zelllinien konnten PF74 und PF57 die drei verwendeten Reporterviren inhibieren, wobei die Inhibition am schwächsten bei SIVcpzPts ausfiel (Abbildung 14).

PF74 inhibierte HIV-1 in einem Bereich von ca. 99,5%, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen den verwendeten Zelllinien gab (Abbildung 14, A). Die Inhibition durch PF57 lag bei ca. 97%. Eine stärkere Hemmung von 98,8% entstand durch die Kombination von PF57 mit humanem TRIM5 α (Abbildung 14, B).

SIVcpzPtt wurde durch PF74 um 97,2% und durch PF57 um 96,5% in wildtypischen CRFK-Zellen inhibiert. In Rhesus TRIM5 α -Zellen war die Hemmung durch PF74 mit 93,8% signifikant geringer als in wildtypischen Zellen. SIVcpzPtt wurde geringfügig stärker durch PF74 und PF57 in Zellen gehemmt, die Rh-TRIM-Cyclophilin A, Agm- oder humanes TRIM5 α exprimierten. Am stärksten war die Inhibition mit einer Reduktion von 99,1% durch PF74 und 99,3% durch PF57 in Zellen mit humanem TRIM5 α (Abbildung 14, C und D).

Die Reduktion der Infektiosität von SIVcpzPts durch PF74 bewegte sich in einem Bereich um 82% und die durch PF57 um 57%. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten TRIM5-Proteinen (Abbildung 14, E und F).

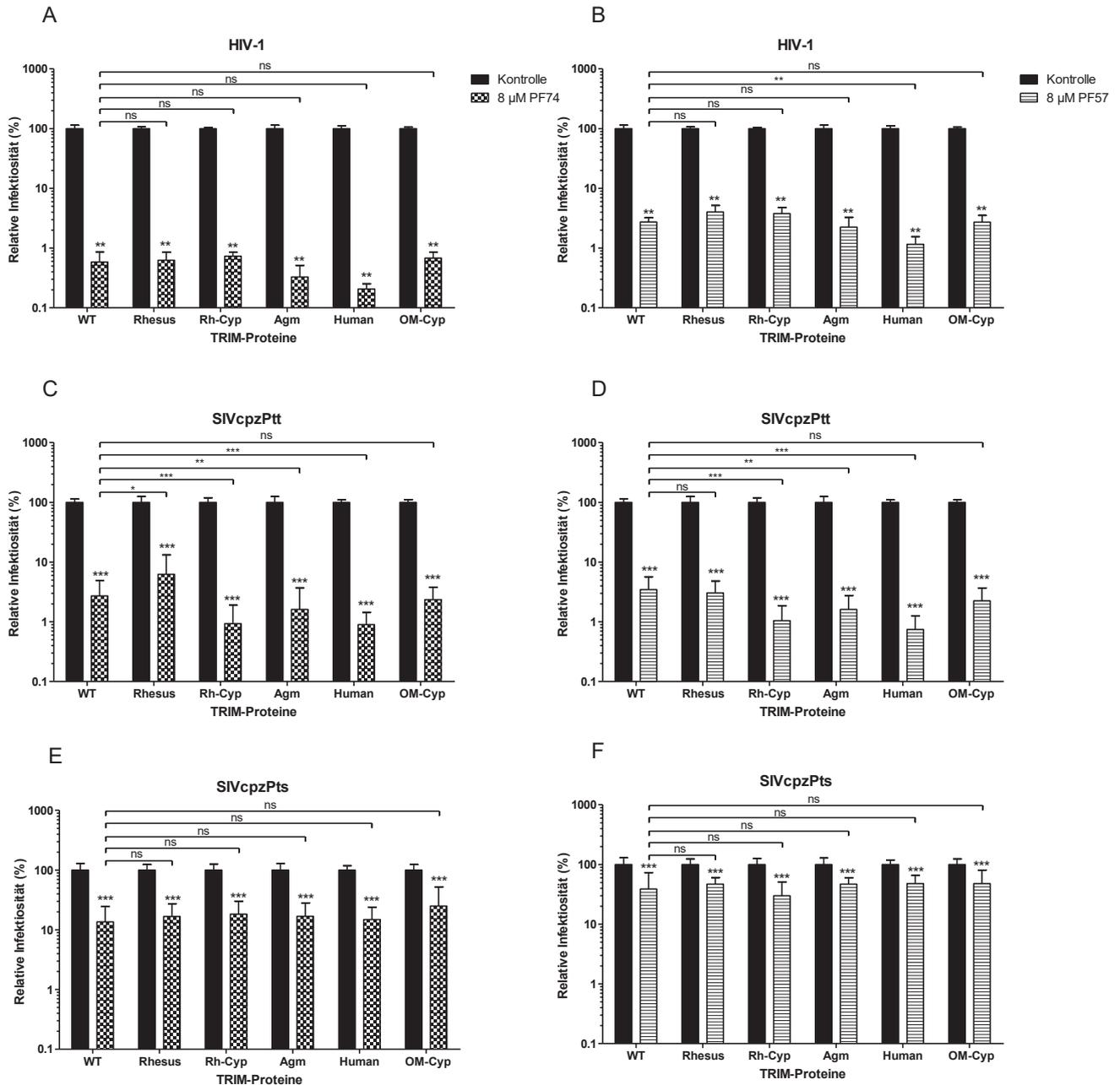


Abb. 14: Abhängigkeit der antiviralen Aktivität von PF74 und PF57 von TRIM5-Proteinen

CRFK-Wildtyp- und TRIM5-Protein exprimierende Zellen wurden mit PF74 (Schachbrettmuster), PF57 (gestreift) oder Dimethylsulfoxid (DMSO, schwarz) als Kontrolle behandelt. Hierfür wurden Zelllinien verwendet, die stabil TRIM5 α -Proteine von Rhesusaffen (Rh), Menschen (Hu) oder äthiopischen Grünmeerkatzen (Agm), oder TRIM-Cyclophilin A-Fusionsproteine von Rhesusaffen oder östlichen Graukehl-Nachtaffen (OM) exprimierten. Zwei Stunden später erfolgte eine Infektion mit HIV-1 (A, B), SIVcpzPtt (C, D) oder SIVcpzPts (E, F). Zwei oder drei Tage nach Infektion wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Beide Capsidinhibitoren inhibierten alle drei Reporterviren in allen getesteten Zelllinien. Am schwächsten fiel die Inhibition bei SIVcpzPts aus (E, F). Für HIV-1 zeigte sich eine verstärkte Inhibition von PF57 in Zellen mit humanem TRIM5 α (B). SIVcpzPtt wurde in humanem und Agm-TRIM5 α , sowie Rh-TRIMCyp exprimierenden Zellen stärker durch PF74 und PF57 inhibiert (C, D). In Rh-TRIM5 α exprimierenden Zellen hatte PF74 einen geringeren inhibitorischen Effekt als in Wildtypzellen (C). Die Inhibition von SIVcpzPts wurde nicht signifikant durch die verwendeten TRIM5-Proteine verändert (E, F). Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels Mann Withney Test bestimmt. ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Jedes Experiment mit HIV-1 wurde mindestens doppelt, jedes mit SIVcpzPtt oder SIVcpzPts mindestens fünfmal in je dreifacher Ausführung durchgeführt.

Abb. 14: Abhängigkeit der antiviralen Aktivität von PF74 und PF57 von TRIM5-Proteinen

μM : Mikromolar, Agm: *African Green Monkey*, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, Hu: Human, OM: *Owl Monkey*, OM-Cyp: OM-TRIM-Cyclophilin A, PF57: PF-3759857, PF74: PF-3450074, Rh: Rhesus, Rh-Cyp: Rhesus TRIM-Cyclophilin A, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*, TRIM: *Tripartite Motif*, WT: Wildtyp

3.4.3 Antivirale Aktivität von PF74 und PF57 gegen die Virusmutante SIVcpzPtt(Pts-Capsid)

Um die Hypothese einer unterschiedlichen Capsid-Inhibitor-Interaktion zu untersuchen, wurden SIVcpzPtt(Pts-Capsid)-Viren hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit gegen die Inhibition durch PF74 und PF57 in HOS-, HeLa- und FRhl-2-Zellen getestet. Diese Reporterviren basieren auf SIVcpzPtt, tragen jedoch das Capsid von SIVcpzPts und waren in ihrer Infektiosität insgesamt schwächer als die Reporterviren von SIVcpzPtt und SIVcpzPts, weshalb der bei der Transfektion geerntete Überstand 10-fach aufkonzentriert wurde. Die Capside von SIVcpzPtt und SIVcpzPts sind zu 78,63% gleich und zu 87,18% ähnlich. Die mit PF74 interagierenden Aminosäurereste unterscheiden sich nur an einer Position, SIVcpzPtt kodiert für Leucin, wohingegen sich an dieser Stelle im Capsid von SIVcpzPts Isoleucin befindet (Abbildung 15) (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

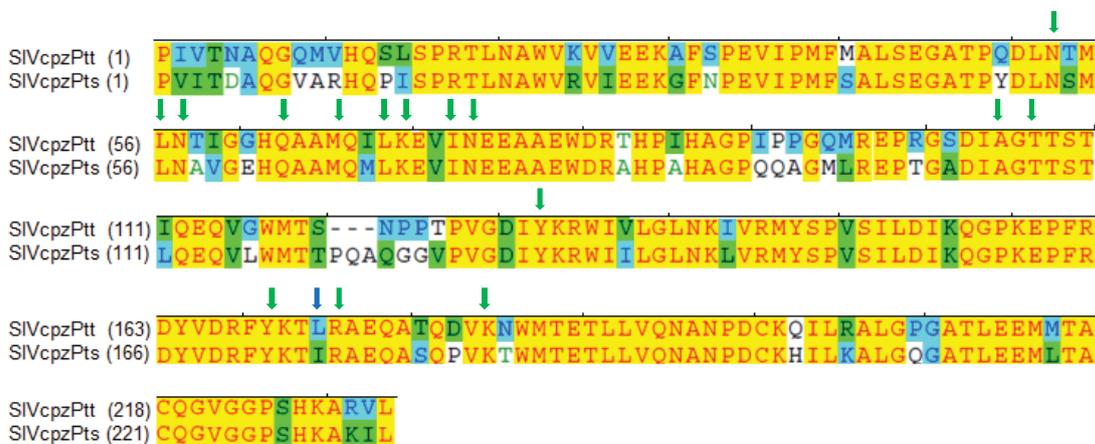


Abb. 15: Alignment der Capside von SIVcpzPtt und SIVcpzPts

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Capside von SIVcpzPtt und SIVcpzPts. Die Pfeile markieren die mit dem Capsidinhibitor PF74 interagierenden Aminosäurereste, die sich nur an einer Stelle unterscheiden (blauer Pfeil) (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Die Sequenzen entstammen der Los Alamos HIV und SIV Sequenzdatenbank. Für die Erstellung der Grafik wurde die Software *Vector NTI* verwendet. SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*

Für PF74 zeigte sich in HOS-Zellen eine dosisabhängige Inhibition von SIVcpzPtt(Pts-Capsid) mit einer maximalen Inhibition auf 1% Restinfektiosität. Auch in HeLa-Zellen sah man eine dosisabhängige inhibitorische Wirkung, die bei niedrigeren Konzentrationen (0,5 μM und 1 μM) ähnlich stark und in höheren Konzentrationen

schwächer als in HOS-Zellen ausgeprägt war. In FRhl-2-Zellen zeigte PF74 nur in der höchsten verwendeten Konzentration eine signifikante Reduktion der Infektiosität auf 26,6% (Abbildung 16, A). Die Dosis-Wirk-Beziehungen ähnelten dabei denen der Inhibition von SIVcpzPtt durch PF74 (vgl. Abbildung 12, B).

Für PF57 zeigte sich in HOS-Zellen erst ab einer Konzentration von 2 μM eine signifikante Inhibition von SIVcpzPtt(Pts-Capsid), die ein Maximum bei 8 μM mit einer Restinfektiosität von 3,9% hatte. In HeLa-Zellen wurde SIVcpzPtt(Pts-Capsid) ab der geringsten Konzentration (0,5 μM) signifikant gehemmt, ab einer Konzentration von 4 μM war diese Inhibition jedoch schwächer als in HOS-Zellen und erreichte ihr Maximum bei einer Restinfektiosität von 16,7%. In FRhl-2 Zellen wurde SIVcpzPtt(Pts-Capsid) durch PF57 nicht gehemmt (Abbildung 16, B).

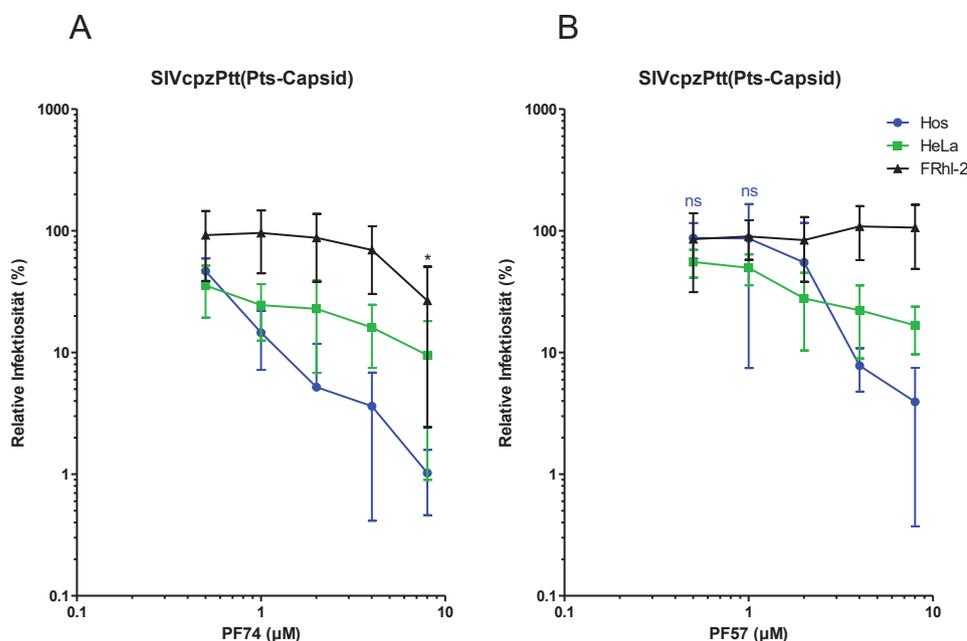


Abb. 16: Antivirale Aktivität von PF74 und PF57 gegen SIVcpzPtt(Pts-Capsid)

HOS- (blau), HeLa- (grün) und FRhl-2-Zellen (schwarz) wurden zwei Stunden vor Infektion mit PF74, PF57 oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kontrolle behandelt. Sie wurden mit 10-fach aufkonzentriertem Virusüberstand infiziert, welcher SIVcpzPtt(Pts-Capsid) enthielt. Hierbei handelte es sich um SIVcpzPtt, welches das SIVcpzPts-Capsid trägt. Die Luciferaseaktivität wurde zwei Tage später detektiert. (A) SIVcpzPtt(Pts-Capsid) wurde in HOS- und HeLa-Zellen ab der geringsten verwendeten Konzentration signifikant durch PF74 inhibiert. In FRhl-2-Zellen gab es keine signifikante Hemmung, außer in der höchsten verwendeten Konzentration. (B) In HOS-Zellen wurde SIVcpzPtt(Pts-Capsid) ab einer Konzentration von 2 μM PF57 signifikant inhibiert. In HeLa-Zellen wurde es ab der geringsten verwendeten Konzentration gehemmt. SIVcpz(Pts-Capsid) war in FRhl-2-Zellen resistent gegen PF57. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle ohne PF74 oder PF57, die mit DMSO versehen wurde. Die Signifikanz wurde mittels Mann Withney Test bestimmt. ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$. Jedes Experiment wurde mindestens viermal in je dreifacher Ausführung durchgeführt.

μM : Mikromolar, FRhl-2: *Fetal Rhesus Monkey Lung*-Zellen, HeLa: Henrietta Lacks-Zellen, HOS: *Human Osteosarcoma*-Zellen, PF57: PF-3759857, PF74: PF-3450074, SIVcpzPtt(Pts-Capsid): Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*, welches das Capsid des SIV des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii* trägt

Die Restriktion von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts durch die Capsidinhibitoren PF74 und PF57 zeigte eine unterschiedliche Zelltypspezifität. Während HIV-1 in HOS-, HeLa- und FRhl-2-Zellen durch PF74 und PF57 gehemmt wurde, waren SIVcpzPtt nur in HOS- und HeLa-, und SIVcpzPts lediglich in HOS-Zellen sensibel. Versuche mit Capsidinhibitoren in wildtypischen und TRIM5 exprimierenden CRFK-Zellen zeigten einen geringen Einfluss von TRIM5-Proteinen auf die antivirale Aktivität von PF74 und PF57. Humanes TRIM5 α erhöhte die PF57-vermittelte Restriktion von HIV-1 und verstärkte die Inhibition von SIVcpzPtt durch PF74 und PF57 leicht. Eine ähnliche Steigerung der Hemmung von SIVcpzPtt wurde in Agm-TRIM5 α und Rh-TRIM-Cyclophilin A exprimierenden Zellen festgestellt. In Rh-TRIM5 α -Zellen war seine Sensibilität für PF74 leicht reduziert. Die Inhibition von SIVcpzPts durch PF74 und PF57 blieb durch TRIM5-Proteine unbeeinflusst. In Experimenten mit der Virusmutante SIVcpzPtt(Pts-Capsid), die das Capsid von SIVcpzPts trägt, wurde ein ähnliches Restriktionsmuster durch die Capsidinhibitoren wie für SIVcpzPtt festgestellt.

3.5 Einfluss von zellulärem Cyclophilin A auf HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts

3.5.1 Wirkung von Ciclosporin A auf HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts in HOS-, HeLa- und FRhl-2-Zellen

Cyclophilin A ist ein zelluläres Protein, das mit dem HIV-1- und SIVcpz-Capsid interagiert und in neu entstehende Virionen verpackt wird (Braaten, Franke et al. 1996, Sokolskaja, Sayah et al. 2004). Ciclosporin A ist eine Substanz, die einen Komplex mit zellulären Cyclophilinen wie Cyclophilin A bildet und so Calcineurin inhibiert. Zusätzlich verhindert es das Verpacken von Cyclophilin A in neu entstehende Virionen (Braaten, Franke et al. 1996).

Für HIV-1 ist bekannt, dass seine Replikation in manchen Zelllinien, wie beispielsweise HOS- oder CD4⁺ T-Zellen, Cyclophilin A-abhängig und in anderen Zelllinien, wie HeLa-Zellen, Cyclophilin A-unabhängig ist (Sokolskaja, Sayah et al. 2004, De Iaco and Luban 2014, Campbell and Hope 2015). Die wichtigsten mit Cyclophilin A interagierenden Aminosäurereste des HIV-1-Capsids sind G89 und P90 (Gamble, Vajdos et al. 1996). Diese beiden Reste sind in SIVcpzPtt und SIVcpzPts konserviert. Insgesamt findet man jedoch eine Sequenzvariabilität in der Cyclophilin A-Bindungsschleife an den Aminosäureresten 91-93, die durch Bindungsmodelle von Daniel Becker bestätigt wurden

(Twizerimana, Scheck et al. 2020). Es gibt einen Unterschied zwischen HIV-1 und SIVcpzPtt an Position 92. Dort findet sich Alanin bei HIV-1 und Prolin bei SIVcpzPtt. Zwischen HIV-1 und SIVcpzPts sind drei Reste unterschiedlich: ILE91 vs. GLN91; ALA92 vs. GLN92 und PRO93 vs. ALA93. SIVcpzPtt und SIVcpzPts unterscheiden sich ebenfalls an drei Stellen: ILE91 vs. GLN91; PRO92 vs. GLN92 und PRO93 vs. ALA9 (Abbildung 17) (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

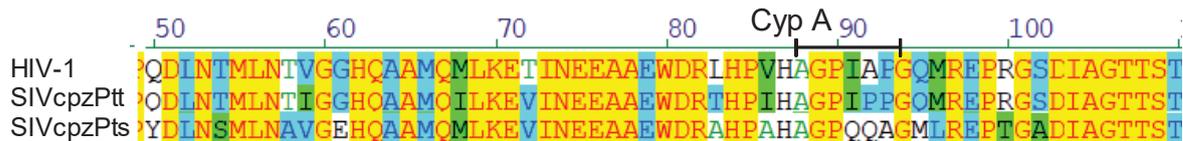


Abb. 17: Aminosäuresequenzen der Cyclophilin A-Bindungsstelle des Capsids von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts

Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen des viralen Capsids der Lentiviren HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts an der Cyclophilin A-Bindungsstelle (mit Strich markiert). Die für die Cyclophilin A-Bindung wichtigen Reste G89 und P90 sind in allen drei Viren konserviert (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Die HIV-1 Capsidsequenz stammt aus dem pMDLg/pRRE Plasmid, die Sequenzen der beiden SIVcpz entstammen der Los Alamos HIV und SIV Sequenzdatenbank. Für die Erstellung der Grafik wurde die Software *Vector NTI* verwendet.

Cyp A: Cyclophilin A, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*

3.5.2 Verpacken von Cyclophilin A in neu entstehende Virionen von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts

Um das Verpacken von Cyclophilin A in neue entstehende Virionen genauer zu untersuchen, wurden Transfektionen in HEK293T-Zellen in An- oder Abwesenheit von Ciclosporin A durchgeführt. Ciclosporin A unterbindet das Inkorporieren von Cyclophilin A in neu entstehende Virionen von HIV-1 (Braaten, Franke et al. 1996). Der durch die Transfektion geerntete Virusüberstand, sowie die hierfür verwendeten Zellen, wurden anschließend lysiert und mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von Cyclophilin A untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Cyclophilin A ähnlich in HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts verpackt wird und die Hinzugabe von 2,5 µM Ciclosporin dies verhindert (Abbildung 18).

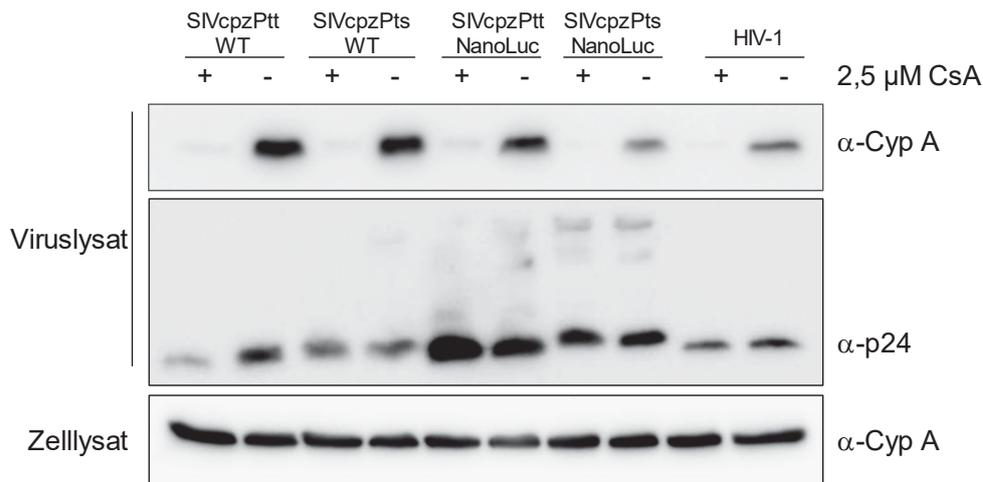


Abb. 18: Verpackung von Cyclophilin A in HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts

Die Abbildung zeigt die Verpackung von Cyclophilin A in die Lentiviren HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts, wobei die letzten beiden als Wildtyp- und Luciferasereporterviren untersucht wurden. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit Ciclosporin A oder Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Zwei Stunden später wurde eine Transfektion mit Plasmiden der oben genannten Viren durchgeführt. Der daraus entstandene Virusüberstand wurde lysiert und mittels Immunoblot analysiert. Es zeigte sich eine ähnliche Verpackung von Cyclophilin A in alle getesteten Viren, die durch Ciclosporin A gehemmt wurde. Das Capsidprotein p24 diente als Ladekontrolle und die Analyse des Zellysates als Kontrolle der Cyclophilin A-Expression in den transfizierten Zellen. Diese Abbildung wurde modifiziert veröffentlicht (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

α: anti, µM: Mikromolar, CsA: Ciclosporin A, Cyp A: Cyclophilin A, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, NanoLuc: Nanoluciferase, p24: Capsidprotein p24, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*, WT: Wildtyp

3.5.3 Einfluss von Ciclosporin A auf die Infektion durch HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts

Die Replikation von HIV-1 wird durch Cyclophilin A der Zielzelle reguliert (Sokolskaja, Sayah et al. 2004, Hatzioannou, Perez-Caballero et al. 2005, Campbell and Hope 2015), weshalb Infektionsassays mit Ciclosporin A in HOS-, HeLa- und FRhl-2-Zellen durchgeführt wurden. Hierfür wurden die Zellen zwei Stunden vor Infektion mit Ciclosporin A in Konzentrationen zwischen 1 µM und 10 µM behandelt.

Für HIV-1 zeigte sich in HOS-Zellen ab der geringsten verwendeten Konzentration eine Inhibition durch Ciclosporin A, die die Infektiosität um bis zu 81% reduzierte. In HeLa- und FRhl-2-Zellen steigerte Ciclosporin A die Infektiosität auf bis zu 255% bzw. 712%. Dabei sah man keine eindeutige Dosis-Wirk-Beziehung (Abbildung 19, A).

Bei beiden SIVcpz hatte Ciclosporin A keine inhibitorische Wirkung. Es steigerte die Infektiosität von SIVcpzPtt in HeLa-Zellen auf maximal 728% und in FRhl-2-Zellen auf maximal 4541%. In HeLa- und FRhl-2-Zellen gab es eine sichtbare Dosis-Wirk-Beziehung, während sich die SIVcpzPtt-Infektion in HOS-Zellen kaum beeinflussen ließ (Abbildung

19, B). Die Infektiosität von SIVcpzPts wurde in allen drei verwendeten Zelllinien gesteigert, in HOS-Zellen auf bis zu 297%, in HeLa-Zellen auf bis zu 1094% und in FRhl-2-Zellen auf bis zu 2007% (Abbildung 19, C).

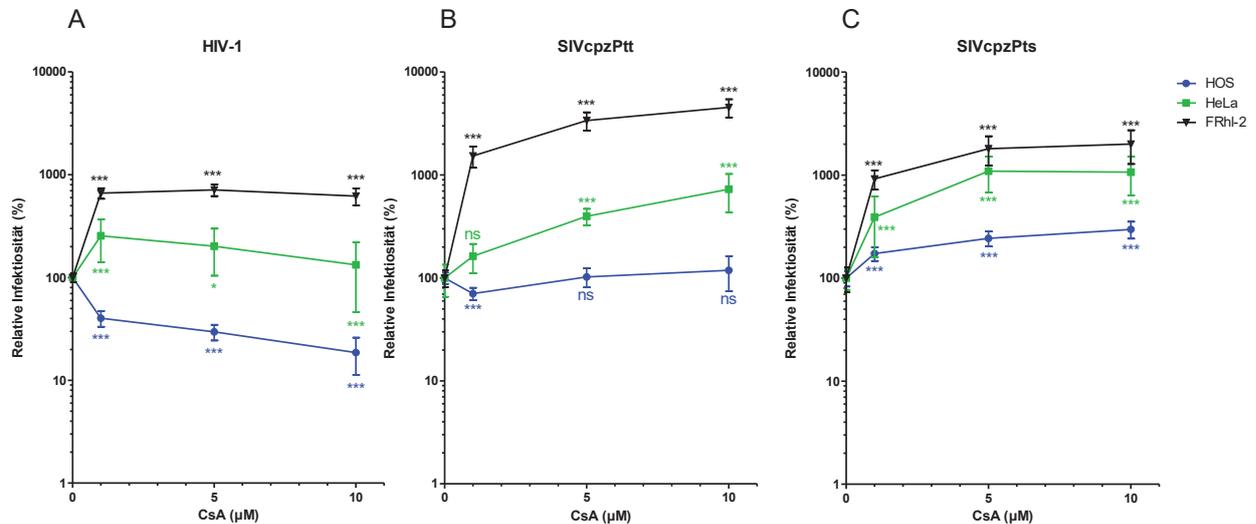


Abb. 19: Einfluss von Ciclosporin A auf die Infektion durch HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts

In der Abbildung ist die relative Infektiosität von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts unter dem Einfluss von Ciclosporin A (CsA) im Vergleich zur Kontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) gezeigt. HOS- (blau), HeLa- (grün) und FRhl-2-Zellen (schwarz) wurden jeweils zwei Stunden vor Infektion mit CsA oder DMSO behandelt. Die Infektiosität wurde zwei oder drei Tage später anhand der Luciferaseaktivität bestimmt. (A) HIV-1 wurde in HOS-Zellen in allen verwendeten Konzentrationen signifikant gehemmt. In HeLa- und besonders in FRhl-2-Zellen steigerte CsA die Infektiosität von HIV-1. (B) Die Infektiosität von SIVcpzPtt wurde in HOS-Zellen durch CsA nicht beeinflusst, allerdings steigerte CsA seine Infektiosität in HeLa- und FRhl-2-Zellen. (C) Die Infektion durch SIVcpzPts wurde durch CsA in allen drei Zelllinien signifikant gesteigert, den größten Effekt hatte CsA dabei in FRhl-2-Zellen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle ohne CsA, die mit DMSO versehen wurde. Die Signifikanz wurde mittels Mann Withney Test bestimmt. ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal in je dreifacher Ausführung durchgeführt. Diese Abbildung wurde modifiziert veröffentlicht (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

µM: Mikromolar, CsA: Ciclosporin A, FRhl-2: *Fetal Rhesus Monkey Lung*-Zellen, HeLa: Henrietta Lacks-Zellen, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, HOS: *Human Osteosarcoma*-Zellen, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*

3.5.4 Infektion mit HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts in Cyclophilin A-Knockout-Zellen

Um zu untersuchen, ob die durch Ciclosporin A hervorgerufenen Effekte auf die Interaktion mit zellulärem Cyclophilin A zurückzuführen sind, wurden in der Arbeitsgruppe hergestellte HOS-Cyclophilin A-Knockout-Zellen im Vergleich zu Leervektorzellen jeweils mit und ohne Ciclosporin A getestet.

Die Infektion aller drei getesteter Viren ähnelte in den Leervektorzellen denen in wildtypischen HOS-Zellen (vgl. Abbildung 19). Die Infektiosität von HIV-1 war in den Cyclophilin A-Knockout-Zellen (Cyp A-KO) nur ein Fünftel so groß wie in den

Leervektorzellen. Die Hinzugabe von Ciclosporin A verstärkte diese Inhibition kaum. Ciclosporin A in Leervektorzellen hemmte HIV-1 auf ein Viertel der ursprünglichen Infektiosität (Abbildung 20, A). Die Infektiosität von SIVcpzPtt war in den Cyp A-KO-Zellen 60% niedriger als in Leervektorzellen und wurde durch die Hinzugabe von Ciclosporin A wieder vollständig hergestellt. Ciclosporin A in Leervektorzellen hatte keinen sichtbaren Einfluss auf SIVcpzPtt (Abbildung 20, B). SIVcpzPtt wurde nicht durch das Cyclophilin A-*Knockout* beeinflusst und seine Infektiosität wurde durch Ciclosporin A sowohl in den Leervektor- als auch in den Cyp A-KO-Zellen auf 333%, bzw. 271% stark gesteigert (Abbildung 20, C). Die Infektion mit HIV-1 ließ sich durch ein Cyp A-*Knockout* ähnlich wie durch die Hinzugabe von CsA zu Leervektorzellen beeinflussen, während dies differierende Effekte auf Infektionen mit beiden SIVcpz hatte. Folglich war die beobachtete Wirkung von CsA zumindest nicht ausschließlich auf das Antagonisieren von Cyp A zurückzuführen.

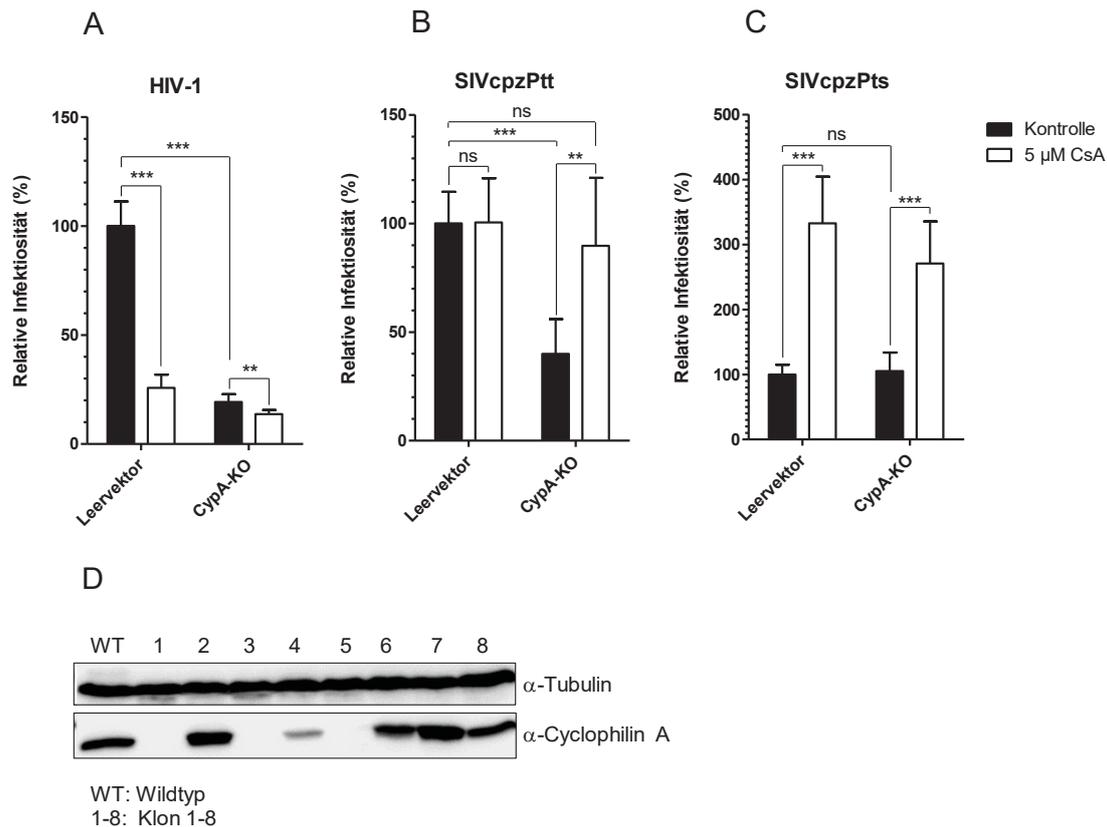


Abb. 20: Abhängigkeit der Infektiosität von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts von Cyclophilin A

Gezeigt ist die Infektiosität von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts in HOS-Cyclophilin A-Knockout-Zellen (Cyp A-KO) im Vergleich zu Leervektorzellen. Zusätzlich wurde der Einfluss von Ciclosporin A (CsA) in beiden Zelllinien getestet, welches jeweils zwei Stunden vor Infektion zur Zellkultur hinzugegeben wurde (weiß). Kontrollen (schwarz) wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Die Infektiosität wurde mittels Luciferaseaktivität zwei bzw. drei Tage später bestimmt. (A) Die Infektiosität von HIV-1 war in Cyp A-KO-Zellen signifikant geringer als in Leervektorzellen. Diese Restriktion wurde durch Ciclosporin A kaum verstärkt. Ciclosporin A erzeugte in Leervektorzellen eine ähnliche Restriktion wie ein Cyclophilin A-Knockout. (B) SIVcpzPtt konnte Cyp A-KO-Zellen weniger gut infizieren als Leervektorzellen. Diese Restriktion wurde durch Ciclosporin A wieder aufgehoben. Ciclosporin A hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Infektiosität von SIVcpzPtt in Leervektorzellen. (C) Die Infektion mit SIVcpzPts wurde durch ein Cyclophilin A-Knockout nicht beeinflusst. Sowohl in Leervektor-, als auch in Cyclophilin A-Knockout-Zellen wurde die Infektiosität von SIVcpzPts durch CsA verstärkt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle ohne CsA, die mit DMSO versehen wurde. Die Signifikanz wurde mittels Mann Withney Test bestimmt. ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Jedes Experiment wurde mindestens viermal in je dreifacher Ausführung durchgeführt. (D) Gezeigt ist ein Immunoblot, der die Expression von Cyclophilin A in Klonen von HOS-Zellen zeigt, in denen ein Cyclophilin A-Knockout herbeigeführt wurde. Im Vergleich dazu ist die Cyclophilin A-Expression in wildtypischen HOS-Zellen gezeigt (WT). Die Klone wurden durch Augustin Twizerimana hergestellt, der auch diesen Immunoblot durchführte. Für die Experimente in A-C wurde Klon 1 verwendet.

α: anti, µM: Mikromolar, 1-8: Klon 1-8, CsA: Ciclosporin A, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*, WT: Wildtyp

3.5.5 Einfluss von Cyclophilin A auf die inhibitorische Wirkung von PF74 und PF57

Cyclophilin A steht im Verdacht die Inhibition durch Capsidinhibitoren zu beeinflussen. Deshalb wurde zunächst die Auswirkung des Cyclophilin A-bindenden Ciclosporin A auf die inhibitorische Wirkung von PF74 und PF57 untersucht (Shi, Zhou et al. 2011, Saito, Ferhadian et al. 2016).

In geringer Konzentration (1 μM) reduzierte PF74 die Infektiosität von HIV-1 in HOS-Zellen um 85% und in HeLa-Zellen um 92%. In beiden Zelllinien verstärkte die Hinzugabe von 10 μM Ciclosporin A die Inhibition auf 97%. Eine Konzentration von 1 μM Ciclosporin A hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Inhibition durch PF74 (Abbildung 21, A). Eine höhere Konzentration PF74 (8 μM) alleine verstärkte die Inhibition auf 99% in HOS- und 98% in HeLa-Zellen. Die Hinzugabe von 1 μM CsA erhöhte in keiner der beiden Zelllinien diese Restriktion, 10 μM CsA brachten eine leichte Steigerung der Inhibition auf nahezu 100% in HOS- und 99% in HeLa-Zellen (Abbildung 21, B). PF57 inhibierte in einer Konzentration von 1 μM HIV-1 in HOS-Zellen um 31%, diese Inhibition wurde durch 1 μM CsA verdoppelt und durch 10 μM CsA auf 80% Inhibition verstärkt. In HeLa-Zellen erzielte 1 μM PF57 eine Hemmung um 78%. Eine Hinzugabe von 1 μM CsA erhöhte die Infektiosität von HIV-1 auf 174% des Ausgangswertes, 10 μM CsA reduzierten die Inhibition durch PF57 auf die Hälfte (Abbildung 21, A). PF57 in einer Konzentration von 8 μM hemmte HIV-1 in HOS-Zellen um 95% und in HeLa-Zellen um 93%. Die zusätzliche Verwendung von CsA veränderte dies nicht signifikant. Ein alleiniges Verwenden von Ciclosporin A in einer Konzentration von 1 μM reduzierte die Infektiosität von HIV-1 um 60% in HOS- und steigerte seine Infektiosität auf das 2,5-Fache in HeLa-Zellen. 10 μM CsA inhibierten HIV-1 in HOS-Zellen um 80% und hatten in HeLa-Zellen keinen inhibitorischen Effekt (Abbildung 21, A und B).

SIVcpzPtt wurde durch 1 μM PF74 in HOS- um 93% und HeLa-Zellen um 95% inhibiert. Diese Restriktion wurde unter Zugabe von Ciclosporin A in beiden Zelllinien teilweise aufgehoben, allerdings waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant (Abbildung 21, C). Eine höhere Konzentration von 8 μM PF74 inhibierte SIVcpzPtt in HOS-Zellen um 99% und in HeLa-Zellen um 95%. Ciclosporin A beeinflusste diese Hemmung nur in HOS-Zellen in einer Konzentration von 10 μM signifikant und verhinderte dort die Infektion fast vollständig (Abbildung 21, D). PF57 in einer Konzentration von 1 μM

erzielte eine Inhibition um 60% in HOS- und 83% in HeLa-Zellen. Eine Hinzugabe von 10 μM CsA stellte die Infektiosität wieder auf 93% des Ausgangswertes in HOS- und 818% des Ausgangswertes in HeLa-Zellen her. Zusätzlich beigefügtes CsA in einer Konzentration von 1 μM hatte nur in HeLa-Zellen einen signifikanten Effekt und stellte die Infektiosität von SIVcpzPtt wieder vollständig her (Abbildung 21, C). Höhere Konzentrationen PF57 (8 μM) hatten in HOS-Zellen einen inhibitorischen Effekt von 98% und in HeLa-Zellen von 90%. Durch Ciclosporin A wurde dieser Effekt in keiner Konzentration signifikant verändert. Ciclosporin A alleine hatte in HOS-Zellen in der Konzentration von 1 μM eine Inhibition von 23% zur Folge, 10 μM hatten keinen signifikanten Einfluss. In HeLa-Zellen steigerte 1 μM CsA die Infektiosität von SIVcpzPtt auf 227% und 10 μM CsA auf 2159% des Ausgangswertes (Abbildung 21, C und D).

Die Infektiosität von SIVcpzPts reduzierte sich durch 1 μM PF74 um 79% in HOS-Zellen, die Inhibition in HeLa-Zellen war nicht signifikant. Die Hinzugabe von 1 μM CsA stellte die Infektiosität in HOS-Zellen wieder vollständig her, 10 μM erhöhten sie auf 213%. In HeLa-Zellen erhöhte die zusätzliche Gabe von 1 μM CsA die Infektiosität auf das 2,5-Fache und 10 μM auf das 5,5-Fache des Ausgangswertes (Abbildung 21, E). In hohen Konzentrationen von 8 μM inhibierte PF74 SIVcpzPts ebenfalls nur in HOS-Zellen signifikant um 94%. Diese Inhibition wurde durch Ciclosporin A nicht verändert. Überraschenderweise ergab die Kombination aus 8 μM PF74 und 1 μM Ciclosporin A in HeLa-Zellen eine Inhibition von 61% (Abbildung 21, F). PF57 in einer Konzentration von 1 μM inhibierte SIVcpzPts um 44% in HOS-Zellen, in HeLa-Zellen fand man keine signifikante Hemmung. Das zusätzlich verwendete Ciclosporin A stellte die Infektiosität in HOS-Zellen wieder her und erhöhte sie darüber hinaus auf 170%. CsA in einer Konzentration von 10 μM erhöhte sie auf 312%. In HeLa-Zellen erhöhte die Kombination aus 1 μM PF57 und 1 μM CsA die Infektiosität auf 531%, die aus 1 μM PF57 und 10 μM CsA auf 1430% (Abbildung 21, E). Hohe Konzentrationen von 8 μM PF57 inhibierten SIVcpzPts nur in HOS-Zellen um 89%. Die Hinzugabe von 1 μM CsA stellte die Infektiosität wieder vollständig her, 10 μM erhöhten sie auf das Doppelte des Ausgangswertes. In HeLa-Zellen steigerte die Kombination aus 8 μM PF57 und 1 μM CsA die Infektiosität nur geringfügig auf das 1,2-Fache, während 10 μM CsA sie auf das 7,5-Fache erhöhten. Das alleinige Verwenden von CsA in HOS-Zellen verdoppelte bei einer Konzentration von 1 μM die Infektiosität und erhöhte sie auf das 3,5-Fache in einer Konzentration von 10 μM . In HeLa-Zellen erhöhte 1 μM CsA die Infektiosität auf das

7-Fache und 10 μM CsA auf das 17-Fache (Abbildung 21, E und F). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Ciclosporin A die Wirkung der Capsidinhibitoren virus- und zelltypspezifisch modifiziert.

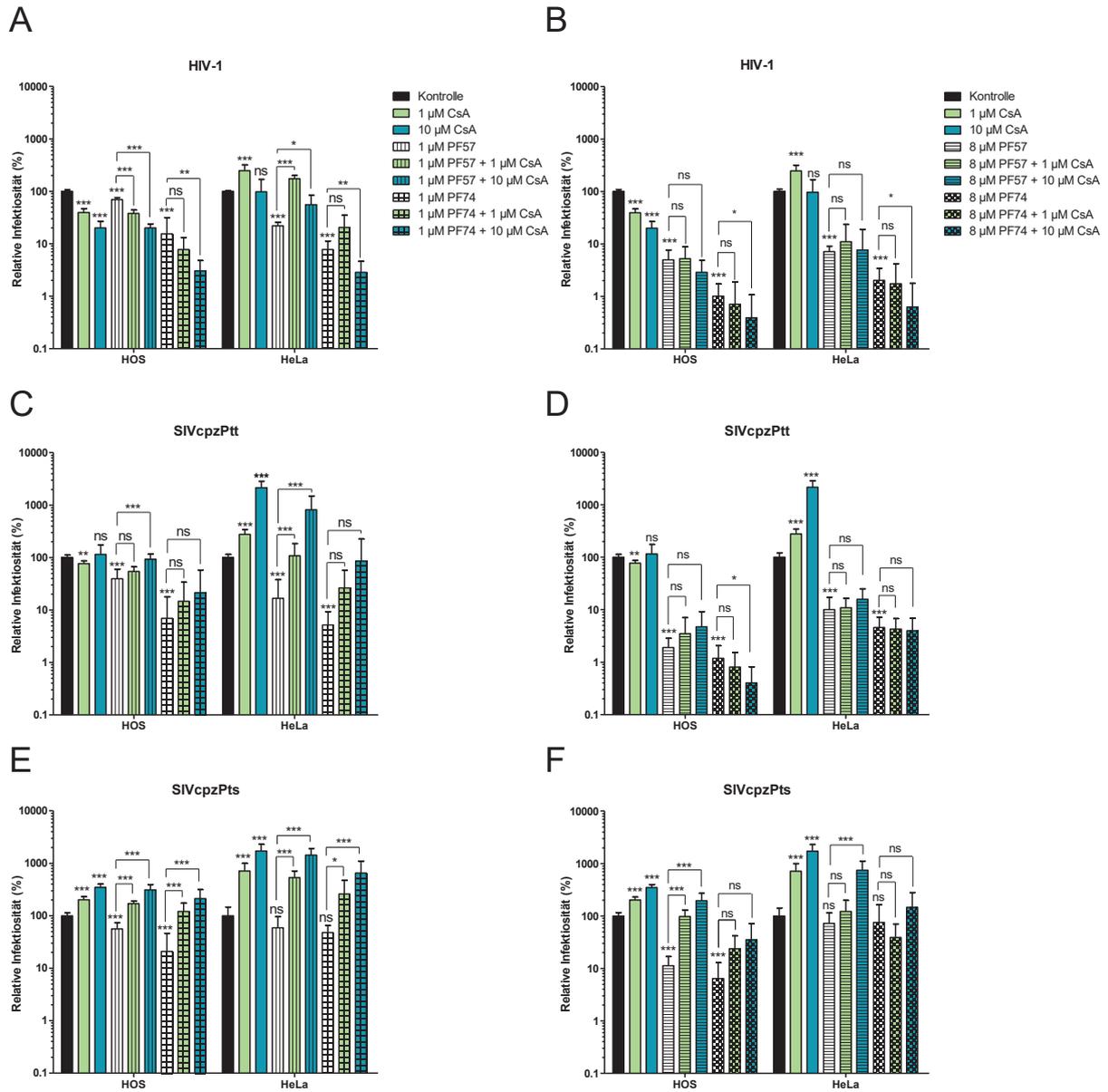


Abb. 21: Interaktion der Capsidinhibitoren PF74 und PF57 mit Ciclosporin A

Abb. 21: Interaktion der Capsidinhibitoren PF74 und PF57 mit Ciclosporin A

Die Abbildung zeigt die relative Infektiosität von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts unter Einfluss der Capsidinhibitoren PF74 und PF57 alleine oder in Kombination mit Ciclosporin A (CsA). Hierfür wurden HOS- und HeLa-Zellen zwei Stunden vor Infektion mit 1 μ M PF74 (kariert) bzw. 1 μ M PF57 (längsgestreift) oder 8 μ M PF74 (Schachbrettmuster) bzw. 8 μ M PF57 (quergestreift) plus gegebenenfalls 1 μ M (grün) oder 10 μ M CsA (blau) behandelt. Die relative Infektiosität wurde im Vergleich zur Luciferaseaktivität in mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelten Zellen (schwarz) zwei oder drei Tage nach Infektion bestimmt. (A, B) HIV-1 wurde in beiden Zelllinien sowohl durch niedrige als auch hohe Konzentrationen beider Capsidinhibitoren gehemmt. Die Inhibition durch PF74 wurde durch Hinzugabe von 10 μ M, nicht aber 1 μ M CsA, leicht gesteigert. In HOS-Zellen steigerte die Hinzugabe von Ciclosporin A die Hemmung von niedrigen, nicht aber von hohen Konzentrationen PF57. In HeLa-Zellen wurde die Hemmung durch niedrige Konzentrationen PF57 durch CsA aufgehoben. Ciclosporin A alleine hatte lediglich in HOS-Zellen einen inhibitorischen Effekt. (C, D) Hohe und niedrige Konzentrationen von PF74 und PF57 hatten auf SIVcpzPtt einen inhibitorischen Effekt in HOS- und HeLa-Zellen. Die Inhibition durch PF74 in einer Konzentration von 8 μ M konnte in HOS-Zellen durch 10 μ M CsA leicht verstärkt werden. In einer Konzentration von 1 μ M reduzierte CsA alleine die Infektiosität von SIVcpzPtt in HOS-Zellen leicht. In HeLa-Zellen steigerte CsA die Infektiosität auf das Doppelte bei 1 μ M und das 21-Fache bei 10 μ M. (E, F) SIVcpzPts wurde nur in HOS-, nicht aber in HeLa-Zellen, durch die Capsidinhibitoren gehemmt. Ciclosporin A konnte die Inhibition von PF74 in niedrigen Konzentrationen in HOS-Zellen wieder aufheben und in einer Konzentration von 10 μ M erhöhte CsA die Infektiosität auf das Doppelte des Ausgangswertes. Bei hohen Konzentrationen PF74 trat dies nicht auf. In HeLa-Zellen machte CsA SIVcpzPts gegen 8 μ M PF74 sensibel. Die Inhibition durch PF57 in HOS-Zellen konnte durch CsA vollständig aufgehoben werden, CsA steigerte zusätzlich die Infektiosität von SIVcpzPts über die des Ausgangswertes hinaus. In HeLa-Zellen verstärkte die Kombination aus 1 μ M PF57 und CsA die Infektiosität auf das 2,5-Fache (1 μ M CsA) bzw. 5,5-Fache (10 μ M CsA). Unter Verwendung hoher Konzentrationen PF57 hatte nur die Kombination mit 10 μ M CsA einen steigernden Effekt auf das 7,5-Fache der Ausgangsinfektiosität. Ciclosporin A alleine steigerte die Infektiosität von SIVcpzPts bei einer Konzentration von 1 μ M auf das Doppelte in HOS- und das 7-Fache in HeLa-Zellen. Eine Konzentration von 10 μ M bewirkte eine Steigerung auf das 3,5-Fache in HOS- und das 17-Fache in HeLa-Zellen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle ohne Inhibitor oder CsA, die mit DMSO versehen wurde. Die Signifikanz wurde mittels Mann Withney Test bestimmt. ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Jedes Experiment wurde mindestens viermal in je dreifacher Ausführung durchgeführt.

μ M: Mikromolar, CsA: Ciclosporin A, HeLa: Henrietta Lacks-Zellen, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, HOS: *Human Osteosarcoma*-Zellen, PF57: PF-3759857, PF74: PF-3450074, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*

3.5.5.1 Wirkung der Capsidinhibitoren in HOS-Cyclophilin A-Knockout-Zellen

Um zu überprüfen, ob die durch Ciclosporin A hervorgerufenen Effekte durch die Antagonisierung von Cyclophilin A bedingt sind, wurden Experimente in HOS-Cyclophilin A-Knockout-Zellen (Cyp A-KO) durchgeführt, die in der Arbeitsgruppe durch Augustin Twizerimana hergestellt wurden. Als Kontrolle wurden HOS-Leervektorzellen verwendet. Diese beiden Zelllinien wurden je zwei Stunden vor Infektion mit PF74 bzw. PF57 in je niedriger (1 μ M) und hoher (8 μ M) Konzentration, oder DMSO als Kontrolle behandelt.

Für alle drei getesteten Lentiviren zeigte sich in den HOS-Leervektorzellen eine ähnliche Inhibition durch PF74 und PF57 wie in wildtypischen HOS-Zellen (vgl. Abbildung 12). HIV-1 wurde durch 1 μ M PF74 in Leervektor- und Cyp A-KO-Zellen um 89,2% bzw. 79,9% gehemmt (Abbildung 22, A). 8 μ M PF74 hemmten in beiden Zelllinien um 99,8%

(Abbildung 22, B). Die Unterschiede zwischen Leervektor und *Knockout* waren für PF74 nicht signifikant. Die Inhibition durch PF57 betrug bei 1 μM 26% und bei 8 μM 95,4% in Leervektor-, und 37,2% bzw. 88,4% in Cyp A-KO-Zellen. Lediglich der Unterschied in der Inhibition durch hohe Konzentrationen PF57 in Leervektor- und Cyp A-KO-Zellen war hierbei statistisch signifikant (Abbildung 22, A und B).

Die Inhibition von SIVcpzPtt durch 1 μM PF74 betrug sowohl in Leervektor-, als auch in Cyp A-KO-Zellen ungefähr 95% (Abbildung 22, C), 8 μM PF74 erhöhte sie auf 98,8% in beiden Zelllinien (Abbildung 22, D). PF57 in geringer Konzentration reduzierte die Infektiosität von SIVcpzPtt auf ungefähr 40% bis 50% in beiden Zelllinien, und inhibierte um 97% bis 98% in hoher Konzentration. Die Unterschiede zwischen Leervektor- und Cyp A-KO-Zellen waren statistisch nicht signifikant (Abbildung 22, D).

SIVcpzPts wurde durch 1 μM PF74 in Leervektorzellen um 85,7% gehemmt. In Cyp A-KO-Zellen betrug die Inhibition nur 55,3% (Abbildung 22, E). Bei der Verwendung von 8 μM PF74 trat dieser Unterschied nicht auf, SIVcpzPts wurde in beiden Zelllinien um ungefähr 97% inhibiert (Abbildung 22, F). PF57 in geringer Konzentration brachte eine Hemmung von 61,3% in Leervektor- und 17% in Cyp A-KO-Zellen (Abbildung 22, E). Die Inhibition durch hohe Konzentrationen PF57 war in den Leervektorzellen mit 92,1% 1,2-fach so hoch wie in den Cyp A-KO-Zellen mit 76% (Abbildung 22, F).

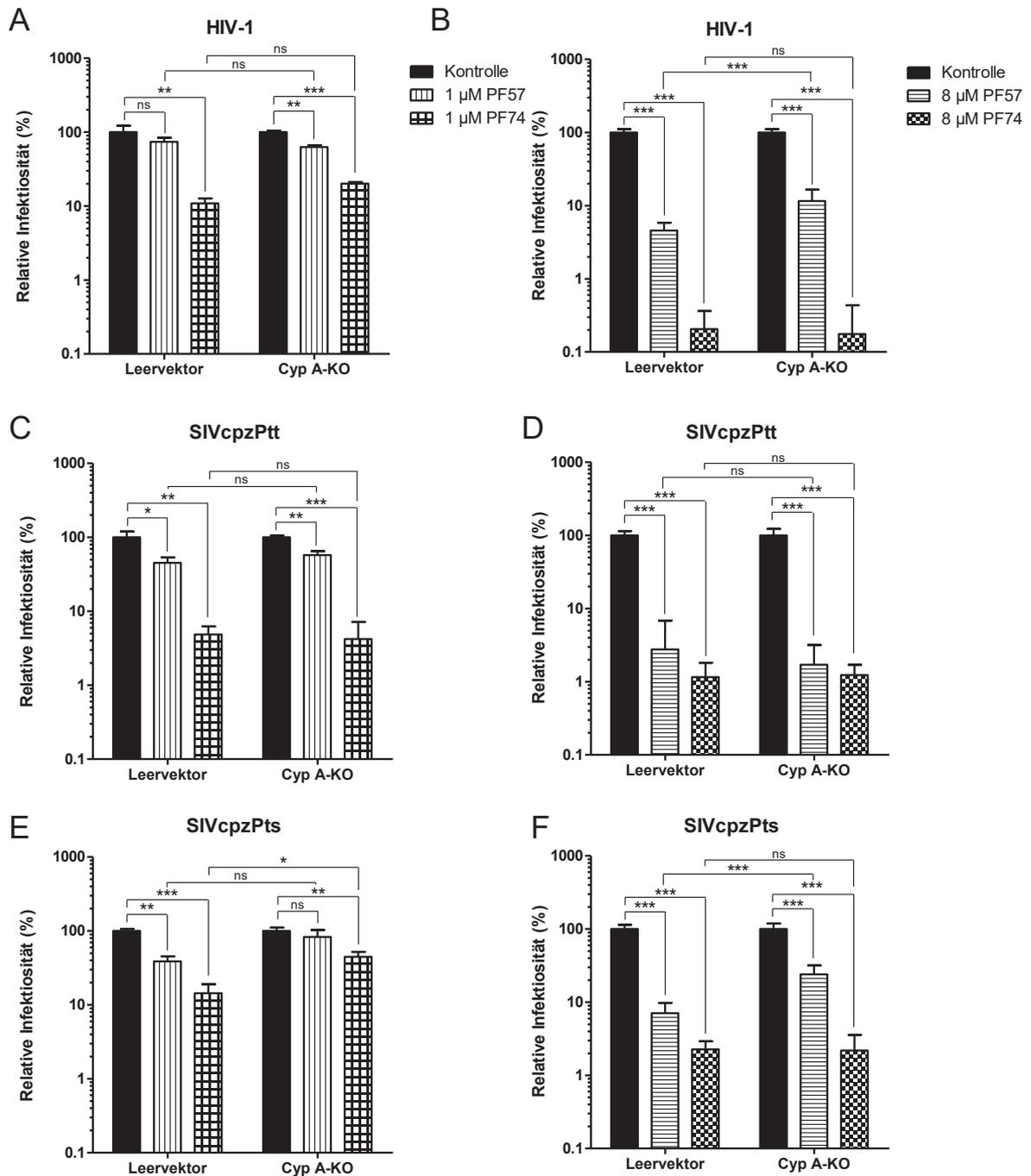


Abb. 22: Inhibition von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts durch PF74 und PF57 in *Human Osteosarcoma* (HOS)-Cyclophilin A-Knockout-Zellen

Die Abbildung zeigt die relative Infektiosität von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts bei Inhibition durch die Capsidinhibitoren PF74 (1 μ M: kariert, 8 μ M: Schachbrettmuster) und PF57 (1 μ M: längsgestreift, 8 μ M: quergestreift) in HOS-Leervektor- und Cyclophilin A-Knockout-Zellen (Cyp A-KO). Die Zellen wurden zwei Stunden vor Infektion mit PF74, PF57 oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kontrolle (schwarz) behandelt. Als Maß für die Infektiosität wurde die Luciferaseaktivität zwei bzw. drei Tage nach Infektion bestimmt. (A, B) HIV-1 wurde in Leervektorzellen durch die niedrige Konzentration (1 μ M) von PF74 und hohe Konzentration (8 μ M) von PF74 und PF57 signifikant gehemmt. In Cyp A-KO-Zellen war die Inhibition durch beide Capsidinhibitoren in niedriger und hoher Konzentration signifikant. PF57 hemmte HIV-1 in Leervektorzellen um 8% stärker als in Cyp A-KO-Zellen. (C, D) SIVcpzPtt wurde sowohl in Leervektor-, als auch in Cyp A-KO-Zellen signifikant durch niedrige und hohe Konzentration PF74 und PF57 inhibiert.

Abb. 22: Inhibition von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts durch PF74 und PF57 in *Human Osteosarcoma* (HOS)-Cyclophilin A-Knockout-Zellen

(E, F) In Leervektorzellen wurde SIVcpzPts durch PF74 und PF57 in niedriger und hoher Konzentration inhibiert. In Cyp A-KO-Zellen war die Inhibition durch sowohl 1 μ M als auch 8 μ M PF74 und durch 8 μ M PF57 statistisch signifikant. In niedriger Konzentration war die Inhibition durch PF74 in Leervektorzellen 1,5-mal so hoch wie in Cyp A-KO-Zellen, bei hoher Konzentration zeigte die antivirale Wirkung von PF74 keinen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien. PF57 inhibierte in niedriger Konzentration 3,6-mal so stark in Leervektor- wie in Cyp A-KO-Zellen, bei hoher Konzentration war die Inhibition 1,2-fach so hoch. Lediglich der Unterschied in hoher Konzentration war statistisch signifikant. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle ohne Inhibitor oder CsA, die mit DMSO versehen wurde. Die Signifikanz wurde mittels Mann Withney Test bestimmt. ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, Jedes Experiment wurde mindestens in dreifacher Ausführung durchgeführt.

μ M: Mikromolar, Cyp A-KO: Cyclophilin A-Knockout, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, PF57: PF-3759857, PF74: PF-3450074, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*

Zusammenfassend unterscheiden sich die Cyclophilin A-Bindungsschleifen von HIV-1 und SIVcpzPtt in einem und die von HIV-1 und SIVcpzPts in drei Aminosäureresten. Alle drei Viren verpackten Cyclophilin A auf ähnliche Weise in neu knospende Virionen, unterschieden sich aber hinsichtlich ihrer Zelltypspezifität bezüglich der Interaktion mit Cyclophilin A der Zielzelle. In HOS-Zellen war eine Infektion durch HIV-1 sowohl in Experimenten mit Ciclosporin A als auch bei *Knockout*-Experimenten Cyclophilin A-abhängig. SIVcpzPtt blieb in HOS-Zellen durch Ciclosporin A unbeeinflusst, zeigte aber eine Reduktion der Infektiosität in Cyclophilin A-KO Zellen, die durch Zugabe von CsA wieder aufgehoben wurde. Die Infektiosität von SIVcpzPts wurde sowohl in wildtypischen als auch HOS-Cyp A-KO-Zellen durch Ciclosporin A verstärkt. Das *Knockout* selbst hatte keinen Einfluss. In HeLa- und FRhl-2-Zellen erhöhte CsA die Infektiosität aller drei Viren. Bei den Untersuchungen der Abhängigkeit der Capsidinhibitoren PF57 und PF74 von Cyclophilin A in HOS-Zellen verstärkte CsA die Wirkung kleiner Dosen der Capsidinhibitoren gegen HIV-1. Die Restriktion von SIVcpzPtt durch geringe Dosen der Capsidinhibitoren wurde partiell, aber nicht statistisch signifikant aufgehoben. In Cyclophilin A-KO-Zellen zeigte sich lediglich eine geringe Verminderung der antiviralen Aktivität von hohen Konzentrationen PF57 gegen HIV-1. Die Inhibition von SIVcpzPts durch PF57 und niedrige Konzentrationen von PF74 wurde durch CsA vollständig aufgehoben. Ein Cyp A-Knockout reduzierte die antivirale Wirkung von niedrigen Konzentrationen PF74 und hohen Konzentrationen PF57 gegen SIVcpzPts.

In HeLa-Zellen hob Ciclosporin A die Wirkung von niedrigen Konzentrationen PF57 gegen HIV-1 teilweise und gegen SIVcpzPtt vollständig auf. SIVcpzPts wurde in HeLa-Zellen nicht durch die Capsidinhibitoren gehemmt. Die Hinzugabe von Ciclosporin A zu niedrigen Konzentrationen PF74 und PF57, sowie hohen Konzentrationen PF57 hatte aber

eine steigende Wirkung auf seine Infektiosität. Bemerkenswert war der Verlust der Resistenz von SIVcpzPts gegen hohe Konzentrationen PF74 in HeLa-Zellen bei Hinzugabe von CsA. Insgesamt deuteten die Ergebnisse auf eine virus- und zelltypabhängige Beeinflussung der Aktivität der Capsidinhibitoren durch Cyclophilin A hin. Es zeigten sich jedoch teilweise differierende Effekte zwischen der Anwendung von Cyclosporin A und einem Cyclophilin A-*Knockout*, weswegen die Wirkung von CsA nicht ausschließlich auf die Antagonisierung von Cyp A zurückzuführen war.

3.6 Einfluss des *Cleavage and Polyadenylation Specificity*- Faktors Untereinheit 6 (CPSF6) auf eine Infektion mit HIV-1

Die Capsidinhibitoren PF74 und PF57 binden an dieselbe Stelle des HIV-1-Capsids wie der zelluläre Faktor CPSF6 (Bhattacharya, Alam et al. 2014, Twizerimana, Scheck et al. 2020). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CPSF6-358, einer trunkeierten Version von CPSF6, auf HIV-1 untersucht. Hierfür wurden stabil CPSF6-358 exprimierende HeLa-Zellen hergestellt (Abbildung 23, B). CPSF6-358 ist vom Nucleus in das Zytoplasma versetzt und zerreißt nach dessen Eintritt in die Zielzelle das HIV-1-Core (Lee, Mulky et al. 2012, De Iaco, Santoni et al. 2013, Ning, Zhong et al. 2018). Die Infektiosität von HIV-1 war in den CPSF6-358 exprimierenden Zellen um 83,2% geringer als in wildtypischen HeLa-Zellen (Abbildung 23, A). Die Infektion mit SIVcpz lieferte keine reproduzierbaren Ergebnisse.

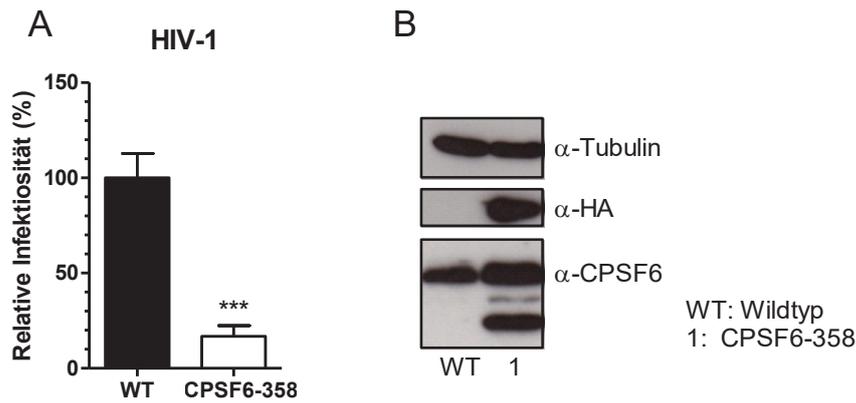


Abb. 23: Inhibition von HIV-1 durch CPSF6-358, einer trunkeierten Version des *Cleavage and Polyadenylation Specificity*-Faktors Untereinheit 6 (CPSF6) in HeLa-Zellen

Um die Auswirkung der trunkeierten CPSF6-358-Variante auf HIV-1 zu untersuchen, wurden HeLa-CPSF6-358-Zelllinien etabliert. Die CPSF6-358 exprimierenden Zellen (weiß) und wildtypische HeLa-Zellen als Kontrolle (schwarz) wurden mit HIV-1 infiziert und nach drei Tagen wurde die Infektiosität anhand der Luciferaseaktivität bestimmt. (A) Hierbei zeigte sich in den CPSF6-358 exprimierenden Zellen eine Restriktion von HIV-1 um 83,2%. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Verhältnis zur Infektion in wildtypischen HeLa-Zellen. Die Signifikanz wurde mittels Mann Withney Test bestimmt (***: $p < 0,001$). Das Experiment wurde dreimal in je dreifacher Ausführung durchgeführt. (B) Die verwendeten HeLa-Zellen wurden hinsichtlich ihrer CPSF6-358 Expression mittels Immunoblot untersucht. In der Abbildung gezeigt ist die Detektion des an CPSF6-358 gekoppelten HA-tags und die stärkere Expression von CPSF6 in den neu etablierten Zelllinien (1) im Vergleich zu wildtypischen HeLa-Zellen (WT).

α : anti, CPSF6: *Cleavage and Polyadenylation Specificity*-Faktor Untereinheit 6, HA: Humanes Influenzähämagglutinin, HIV-1: Humanes Immundefizienzvirus 1, WT: Wildtyp

3.7 Einfluss des SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltenden Proteins 1 (SAMHD-1) auf eine Infektion durch SIVcpzPtt und SIVcpzPts

SAMHD-1 ist ein zelluläres Protein, das durch Hydrolyse von Desoxynukleosidtriphosphaten HIV-1 in Dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten und ruhenden CD4⁺ T-Zellen inhibiert (Laguette, Sobhian et al. 2011, Bieniasz 2012, Twizerimana, Scheck et al. 2018). Um seine Auswirkung auf eine Infektion mit SIVcpz zu untersuchen, wurde ein Infektionsreihe in wildtypischen, SAMHD-1 enthaltenden THP-1-Zellen im Vergleich zu SAMHD-1-*Knockout*-Zellen (in der Arbeitsgruppe hergestellt durch Edmund Osei Kuffour) durchgeführt (Osei Kuffour, Schott et al. 2018). Hierbei zeigte sich weder für SIVcpzPtt noch für SIVcpzPts eine signifikante Inhibition durch SAMHD-1 (Abbildung 24).

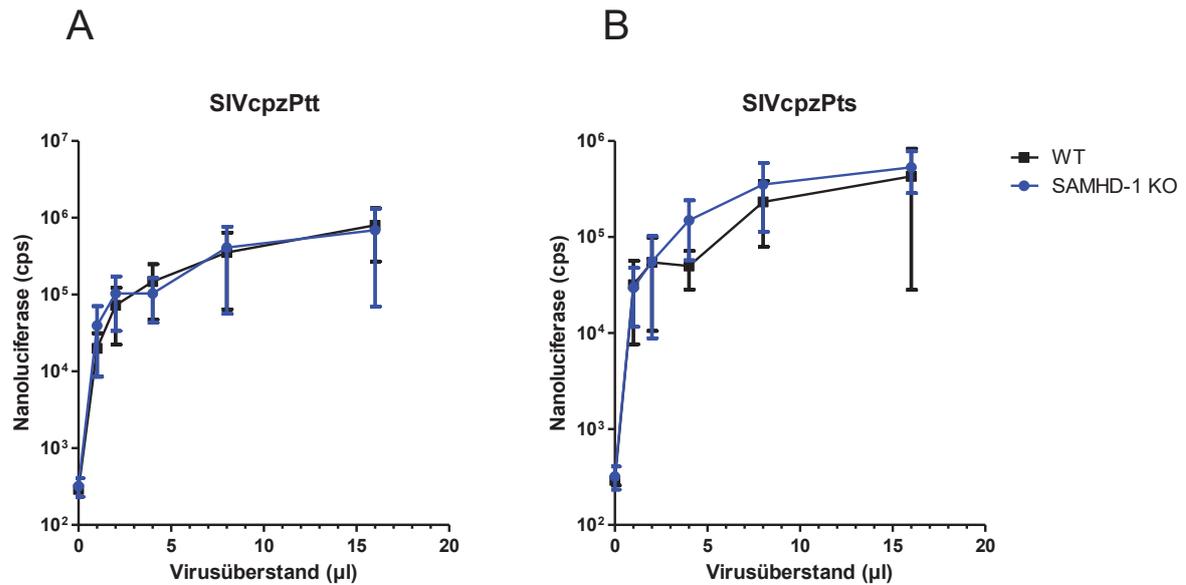


Abb. 24: Einfluss des SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltenden Proteins 1 (SAMHD-1) auf eine Infektion mit SIVcpzPtt und SIVcpzPts

Dargestellt ist die Infektion durch SIVcpzPtt und SIVcpzPts in SAMHD-1 enthaltenden wildtypischen THP-1-Zellen im Vergleich zur Infektion in SAMHD-1-*Knockout*-Zellen. Beide Zelllinien wurden mit Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) differenziert und nach zwei Tagen mittels Spinokulation mit SIVcpzPtt und SIVcpzPts infiziert. Bei keinem der beiden Viren zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen wildtypischen und *Knockout*-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Kein Ergebnis war nach Mann Withney Test zu dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ signifikant. Jedes Experiment wurde dreimal in je dreifacher Ausführung durchgeführt.

µl: Mikroliter, cps: *Counts Per Second*, KO: *Knockout*, SAMHD-1: SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltendes Protein 1, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*, WT: Wildtyp

Um zu testen, ob die Resistenz von SIVcpz gegen SAMHD-1 durch eine Degradierung des Restriktionsfaktors bedingt ist, wurden THP-1 Zellen mit einer Multiplizität der Infektion (MOI, *Multiplicity of Infection*) von 2 oder 5 infiziert und hinsichtlich der Proteinexpression von SAMHD-1 untersucht. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte THP-1-, sowie mit HIV-1 infizierte THP-1-Zellen. Als Positivkontrolle wurde ein Vektorkonstrukt aus pMDL und dem von HIV-2 stammenden Vpx (hergestellt durch Edmund Osei Kuffour) verwendet, welches SAMHD-1 degradiert (Laguette, Sobhian et al. 2011, Bieniasz 2012, Osei Kuffour, Schott et al. 2018). Es zeigte sich, dass die Infektion mit SIVcpzPtt und SIVcpzPts das Vorhandensein von SAMHD-1 nicht beeinflussten (Abbildung 25).

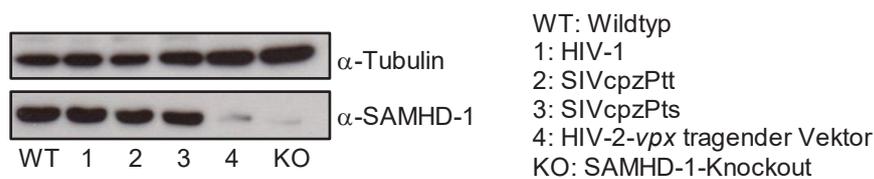


Abb. 25: SAMHD-1 wird nicht durch SIVcpz degradiert

Dargestellt ist zelluläres SAMHD-1 in THP-1-Zellen. Diese wurden differenziert und anschließend mit einer Multiplizität der Infektion von 2 und Spinokulation infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen lysiert und mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von SAMHD-1 überprüft. Wildtypische, uninfizierte (WT) und mit HIV-1 infizierte THP-1-Zellen (1) wurden als Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle dienten SAMHD-1-Knockout-THP-1-Zellen (KO) und THP-1-Zellen, die mit einem Vektorkonstrukt aus pMDL und von HIV-2 stammenden Vpx (4) infiziert wurden. Weder SIVcpzPtt (2) noch SIVcpzPts (3) veränderten die detektierte Menge SAMHD-1.

α : anti, HIV: Humanes Immundefizienzvirus, KO: *Knockout*, SAMHD-1: SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltendes Protein 1, SIVcpzPts: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIVcpzPtt: Simianes Immundefizienzvirus des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes*, THP-1: *Human Acute Monocytic Leukemia*-Zellen, Vpx: Virales Protein x, WT: Wildtyp

Zusammenfassend zeigten die Experimente mit THP-1- Zellen keinen Hinweis auf einen Einfluss von SAMHD-1 auf die Infektiosität von SIVcpzPtt oder SIVcpzPts, obwohl beide Viren nicht in der Lage waren SAMHD-1 zu degradieren.

4 Diskussion

Das die AIDS-Pandemie verursachende HIV-1 ist wahrscheinlich Anfang des 20. Jahrhunderts durch die Übertragung von SIVcpzPtt vom zentralafrikanischen Schimpansen auf den Menschen entstanden (Sharp and Hahn 2011). Trotz enger genetischer Verwandtschaft stammt kein HIV vom im ostafrikanischen Schimpansen vorkommenden SIVcpzPts ab, und dieses wurde nie im Menschen nachgewiesen (Santiago, Rodenburg et al. 2002, Santiago, Lukasik et al. 2003). Grundsätzlich kommen hierfür zwei Gründe infrage. Entweder fand nie ein Kontakt zwischen SIVcpzPts und dem Menschen und folglich auch keine Übertragung statt oder SIVcpzPts hat sporadisch Menschen infiziert, ist aber nicht endemisch geworden.

Damit ein Virus erfolgreich die Artenbarriere durchbrechen kann, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein, die sich grob in drei Kategorien einteilen lassen: Exposition, Übertragung und Verbreitung (Sauter and Kirchhoff 2019). Mit Exposition sind die geographische Verteilung der Reservoirspezies, die Prävalenz des Virus innerhalb dieser und der Kontakt zwischen den beiden Spezies gemeint. Schimpansen sind eine gefährdete Art und daher stellen sich invasive Untersuchungen zur Bestimmung von Seroprävalenz oder Viruslast schwer dar. Um einen Überblick über die Verbreitung von SIVcpz in verschiedenen Schimpansengruppen zu erhalten, greift man deshalb auf die Bestimmung von viraler RNA und Antikörpern in vom Boden gesammelten Proben an Fäkalien und Urin zurück (Santiago, Rodenburg et al. 2002, Santiago, Bibollet-Ruche et al. 2003, Keele, Van Heuverswyn et al. 2006, Takehisa, Kraus et al. 2007). Zentralafrikanische Schimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*) leben in Südkamerun, Gabun, der Zentralafrikanischen Republik, im Kongo und Äquatorialguinea, während ostafrikanische Schimpansen (*P. t. schweinfurthii*) in der Demokratischen Republik Kongo und verschiedenen ostafrikanischen Ländern wie Tansania und Uganda verbreitet sind (Keele, Van Heuverswyn et al. 2006, Locatelli and Peeters 2012). In beiden Unterarten findet man je nach lokaler Gruppe ungleich verteilte SIVcpz-Prävalenzen zwischen 0 und 35% (Santiago, Lukasik et al. 2003, Keele, Van Heuverswyn et al. 2006, Locatelli and Peeters 2012). Auffällig ist hierbei, dass die SIVcpzPtt-Stämme die höchste Prävalenz aufweisen, die zur Entstehung von HIV-1 Gruppe M und N geführt haben (Keele, Van Heuverswyn et al. 2006, Van Heuverswyn, Li et al. 2007).

Der Interspezieskontakt zwischen Schimpansen und Menschen, sowie die Transmissionsrouten beziehen sich vor allem auf Jagd und den Verzehr von

Schimpansenfleisch, bei dem es zu Virusübertragungen kommen kann (Locatelli and Peeters 2012). Zusätzlich wird die Übertragung von einer Spezies auf die andere durch die evolutionäre Divergenz der Wirte und die Viruslast in der Reservoirspezies bestimmt (Sauter and Kirchhoff 2019). Mensch und gemeiner Schimpanse sind in 98% ihres Genoms identisch und innerhalb der Gattung der Schimpansen sind sich *Pan troglodytes troglodytes* und *Pan troglodytes schweinfurthii* genetisch am ähnlichsten (Sharp, Shaw et al. 2005, Prado-Martinez, Sudmant et al. 2013). Es gibt wenige quantitative Daten zur Virämie bei Schimpansen. Wie beim Menschen scheint sie stadiumsabhängig zu sein und sich sowohl bei SIVcpzPtt als auch bei SIVcpzPts zwischen 10^4 und 10^6 RNA-Kopien/ml Blutplasma oder -serum zu bewegen (Ondoa, Kestens et al. 2001, Heeney, Rutjens et al. 2006, Etienne, Nerrienet et al. 2011, Greenwood, Schmidt et al. 2015). Für die Verbreitung des Virus innerhalb der neuen Spezies spielt seine Adaptationsfähigkeit an den neuen Wirt eine entscheidende Rolle (Sauter and Kirchhoff 2019). Das Virus muss in der Lage sein sich heterologe Wirtsfaktoren zu Nutze zu machen und einer Inhibition durch Restriktionsfaktoren zu entgehen. In dieser Arbeit wurden Interaktionen von SIVcpzPtt und SIVcpzPts im Vergleich zu HIV-1 mit wirtseigenen Faktoren untersucht, um Hinweise auf eine unterschiedliche Anpassung an menschliche Zellen zu erklären.

4.1 Die Infektionsfähigkeit von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts in simianen Zelllinien wird wesentlich, aber nicht ausschließlich, durch TRIM5-Proteine bestimmt

Virustitrationsexperimente zeigten eine unterschiedliche Permissivität von Zelllinien verschiedener Spezies für eine Infektion mit HIV-1, SIVcpzPtt oder SIVcpzPts (siehe Abbildung 8). Alle drei Viren infizierten besonders stark feline CRFK-Zellen, was durch das Fehlen einer antiretroviralen Aktivität des felines TRIM5-Proteins zu erklären ist (McEwan, Schaller et al. 2009). Besonders HIV-1 und SIVcpzPtt waren kaum in der Lage die simianen Zellen der äthiopischen Grünmehrkatze (CV-1, *Chlorocebus aethiops*) oder des Graukehl-Nachtaffens (OMK, *Aotus trivirgatus*) zu infizieren (siehe Abbildung 8). Auch für SIVcpzPts waren CV-1- und OMK-Zellen weniger permissiv als die verwendeten humanen oder felines Zelllinien, allerdings zeigte sich bei SIVcpzPts eine stärkere Infektion der Zellen bei höheren Virusmengen. Dies spricht dafür, dass die Inhibition in diesen Zellen sättigbar war. Aufgrund der VSV-G-Pseudotypisierung, die den Eintritt der Viren in die Zelle unabhängig von CD4 und Corezeptoren macht, handelte es sich um

einen Block, der nach dem viralen *Entry* in die Zelle stattfand (Aiken 1997). TRIM5-Proteine sind speziesspezifische Restriktionsfaktoren und sorgen für einen *Postentryblock*, der unter anderem zu einem vorzeitigen *Uncoating* führt und die reverse Transkription inhibiert (Twizerimana, Scheck et al. 2018). Um zu testen, ob die verminderte Infektion in simianen Zelllinien durch TRIM5-Proteine bedingt ist, wurden Infektionsassays in stabil TRIM5 exprimierenden CRFK-Zellen durchgeführt. HIV-1 und SIVcpzPtt wurden dabei stark durch das TRIM5 α -Protein der äthiopischen Grünmeerkatze (Agm, *African Green Monkey, Chlorocebus aethiops*) inhibiert, was die geringe Infektion der beiden Viren in CV-1-Zellen erklären könnte (siehe Abbildung 11). Die antivirale Aktivität von Agm-TRIM5 α gegen HIV-1 und SIVcpzPtt ist bereits vorbeschrieben (Keckesova, Ylinen et al. 2006, Kratovac, Virgen et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde SIVcpzPtt durch Agm-TRIM5 α zu 50% inhibiert, seine Infektionsfähigkeit war in CV-1-Zellen aber je nach Virusmenge 15- bis 50-fach geringer als in CRFK-Zellen (Abbildung 11, C). Bei Kratovac et al. zeigte sich SIVcpzPtt resistent gegen Agm-TRIM5 α (Kratovac, Virgen et al. 2008). Interessanterweise wurden sowohl HIV-1 als auch SIVcpzPtt und SIVcpzPts durch das TRIM-Cyclophilin A (TRIMCyp) des Graukehl-Nachaffen (OM, *Owl Monkey, Aotus trivirgatus*) nur um etwa 60% gehemmt, die Infektion in CRFK-Zellen war aber bis zu 10 000- (HIV-1), 1000- (SIVcpzPtt), bzw. 30-fach (SIVcpzPts) stärker als in OMK-Zellen. Dies widerspricht auch Vorergebnissen, bei denen OM-TRIMCyp die Infektion durch sowohl HIV-1 als auch SIVcpzPtt fast vollständig verhinderte und die durch SIVcpzPts stark einschränkte (Keckesova, Ylinen et al. 2006, Kratovac, Virgen et al. 2008). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten dadurch zustande kommen, dass Kratovac et al. vom Hamster stammende CHO-Zellen verwendeten, die sich in der Menge der exprimierten TRIM5-Proteine oder eventueller TRIM5-Cofaktoren von CRFK-Zellen unterscheiden könnten (Kratovac, Virgen et al. 2008). Keckesova et al. untersuchten HIV-1 allerdings wie in der vorliegenden Arbeit in OM-TRIMCyp exprimierenden CRFK-Zellen (Keckesova, Ylinen et al. 2006). Kratovac et al. verwendeten einen HIV-1 *gag-pol*-Vektor, der jeweils mit dem Capsid von SIVcpzPtt oder SIVcpzPts ausgestattet war und mit einem Vektor zur Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) cotransfiziert wurde (Kratovac, Virgen et al. 2008). In dieser Arbeit wurden für SIVcpz VSV-G-pseudotypisierte Vollängenviren verwendet, die lediglich statt *nef* das Gen für das Reporterenzym Luciferase trugen. Darüber hinaus testeten Kratovac et al. für SIVcpzPtt die Stämme GAB1 und GAB2, während in dieser Arbeit der Stamm MB897 untersucht

wurde, aus dem HIV-1 Gruppe M hervorging. SIVcpzPttGAB1 und SIVcpzPttGAB2 gehören sowohl für *gag*, *pol* als auch *env* in andere phylogenetische *Cluster* als SIVcpzMB897 und HIV-1 Gruppe M, was Unterschiede in der Interaktion mit zellulären Faktoren bedingen könnte (Van Heuverswyn, Li et al. 2007). Die Methode zur Bestimmung der Infektion unterschied sich ebenfalls, Kratovac et al. und Keckesova et al. untersuchten als Maß für eine erfolgte Infektion den Anteil GFP-positiver Zellen mittels FACS-Analyse, während in der hier vorliegenden Arbeit die Luciferaseaktivität als Korrelat zu transkribierten Virusgenen bestimmt wurde. Die Inhibition durch TRIM5-Proteine ist sättigbar und deshalb wäre es auch denkbar, dass die Unterschiede in der Stärke der Restriktion durch andere Mengen an verwendetem Virus zustande kommen (Besnier, Takeuchi et al. 2002, Stremlau, Song et al. 2006).

Die Replikation von HIV-1 in vom Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) stammenden Zellen wird ebenfalls durch einen TRIM5 α bedingten *Postentryblock* eingeschränkt (Münk, Brandt et al. 2002). Rhesuszellen exprimieren sowohl ein TRIM5 α - als auch ein TRIM-Cyclophilin A-Fusionsprotein (Wilson, Webb et al. 2008). In Übereinstimmung mit der Literatur wurde HIV-1 stark durch Rh-TRIM5 α , aber nicht durch das Fusionsprotein gehemmt (Kratovac, Virgen et al. 2008, Wilson, Webb et al. 2008). Auch SIVcpzPtt war resistent gegen das Fusionsprotein, ließ sich aber stark durch Rh-TRIM5 α inhibieren. Die Infektiosität von SIVcpzPts sank leicht durch Rh-TRIMCyp, durch Rh-TRIM5 α aber nur etwa halb so stark wie die von HIV-1 oder SIVcpzPtt (siehe Abbildung 11). Betrachtet man Infektionsdaten der drei Viren in vom Rhesusaffen stammenden FRhl-2-Zellen, sieht man im Vergleich zu HeLa-Zellen eine für HIV-1 100- und für SIVcpzPtt 2- bis 5-fach geringere Permissivität (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Da beide Viren in etwa gleichem Maße sensibel für eine Restriktion durch Rh-TRIM5 α waren, deutet dies auf einen zusätzlichen, virusspezifischen, die Inhibition beeinflussenden Faktor in Rhesuszellen hin. SIVcpzPts infiziert HeLa-Zellen nur geringfügig besser als FRhl-2-Zellen, was mit der geringeren Hemmung durch Rh-TRIM5 α erklärbar ist (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Der zelluläre Faktor Cyclophilin A sensibilisiert HIV-1 für eine Restriktion durch TRIM5 α von Rhesusaffen und äthiopischen Grünmeerkatzen, deshalb könnte eine verschiedene Cyclophilin A-Capsid-Interaktion die beobachteten Unterschiede zwischen den Infektionen in TRIM5 überexprimierenden CRFK- und simianen CV-1, FRhl-2- oder OMK-Zellen erklären (Keckesova, Ylinen et al. 2006, Lin and Emerman 2008). Da es sich aber bei Cyclophilin A um ein hochkonserviertes Protein handelt, ist es

allerdings unwahrscheinlich, dass sich die direkte Cyp A-Capsid-Interaktion in felines von der in simianen Zellen wesentlich unterscheidet (Stammes, Rutherford et al. 1992). HIV-1 und SIVcpz ähneln sich in ihrem Capsid, welches den Angriffspunkt von sowohl TRIM5 α als auch Cyclophilin A darstellt (Kratovac, Virgen et al. 2008, Twizerimana, Scheck et al. 2020). Der wirkverstärkende Effekt von Cyclophilin A auf simiane TRIM5-Proteine scheint sich hauptsächlich nach Capsidbindung und zu einem wesentlichen Teil nach erfolgter reverser Transkription auszuwirken (Keckesova, Ylinen et al. 2006, Stremlau, Song et al. 2006, Lin and Emerman 2008, Burse, Shi et al. 2017). Allerdings inhibieren Rh- und Agm-TRIM5 α auch Cyclophilin A-unabhängig (Stremlau, Song et al. 2006). Cyclophilin A könnte die Interaktion von HIV-1 mit dem nukleären Porenkomplex verändern, es so anfällig für Agm-TRIM5 α machen und den nukleären *Entry* hemmen (Burse, Shi et al. 2017). Eine verschiedene Nutzung von zellulären Faktoren wie beispielsweise CPSF6 oder der Nucleoporine 153 und 358 könnte die Unterschiede im Restriktionsmuster durch simiane TRIM5-Proteine zwischen HIV-1 bzw. SIVcpzPtt und SIVcpzPts erklären. Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass sich die postintegrativen Schritte des retroviralen Replikationszyklus in simianen, felines und humanen Zellen grundsätzlich unterscheiden. Die *Promotorsequenzen* der *Long Terminal Repeats* von SIVcpz könnten anders als die von HIV-1 an simiane oder humane Zellen angepasst sein und auch posttranskriptionale Schritte wie die mRNA-Prozessierung könnten differieren und so zu einer verschieden starken Expression viraler Proteine und der Luciferase führen. Interessant wären vergleichende Transduktionsexperimente in Zellen verschiedener Spezies mit einfachen retroviralen Vektoren, die entweder die LTRs von SIVcpz oder HIV-1, sowie ein Luciferasegen tragen, um unabhängig von den frühen spezifisch die postintegrativen Replikationsschritte von HIV-1, respektive SIVcpz zu betrachten.

4.2 HIV-1 und SIVcpz unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit humane Zelllinien zu infizieren

HIV-1 infizierte beide humanen Zelllinien HOS und HeLa in etwa gleich gut und ungefähr 10-fach geringer als CRFK-Zellen. Überraschenderweise zeigte sich für SIVcpzPtt und SIVcpzPts eine 10- bis 40-fach stärkere Infektion von HOS- als von HeLa-Zellen, was auf eine unterschiedliche Interaktion der Viren mit zellulären Faktoren hindeutet, die nach dem viralen *Entry* eine Rolle spielen. SIVcpzPtt konnte HOS- genauso gut und SIVcpzPts sogar stärker als CRFK-Zellen infizieren (siehe Abbildung 8).

In Experimenten mit humanem TRIM5 α (Hu-TRIM5 α) exprimierenden CRFK-Zellen zeigte sich eine um die Hälfte reduzierte Infektiosität von HIV-1 und SIVcpzPtt gegenüber wildtypischen CRFK-Zellen, welche kein antiretroviral wirksames TRIM5-Protein exprimieren (siehe Abbildung 11). Bei Kratovac et al. zeigte sich in Hu-TRIM5 α exprimierenden CHO-Zellen eine Resistenz aller drei Viren, andere Arbeiten zeigten eine leichte bis 50%ige Hemmung von HIV-1 durch Hu-TRIM5 α in CRFK-Zellen (Kratovac, Virgen et al. 2008, Battivelli, Migraine et al. 2011). TRIM5-Proteine stellen aufgrund ihrer Spezifität eine Barriere für die Übertragung von Lentiviren dar. Die TRIM5 α -Proteine von Schimpansen (*P. t. verus*) und Menschen unterscheiden sich in 9 bis 10 Aminosäureresten und zeigen beide ein ähnliches Restriktionsmuster für HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts (Kratovac, Virgen et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit war SIVcpzPts, das nie im Menschen gefunden wurde, resistent gegen Hu-TRIM5 α . HIV-1 und SIVcpzPtt ließen sich jedoch durch humanes TRIM5 α teilweise inhibieren, daher ist es unwahrscheinlich, dass Hu-TRIM5 α eine Barriere für die Übertragung von SIVcpz vom Schimpansen auf den Menschen darstellt.

Man ging lange davon aus, dass Cyclophilin A die Inhibition von humanem TRIM5 α unbeeinflusst lässt und letzteres nur einen geringen bis keinen inhibitorischen Effekt auf HIV-1 hat (Stremlau, Song et al. 2006). Neuere Forschung hat ergeben, dass Cyclophilin A in primären humanen Blutzellen die Restriktion durch Hu-TRIM5 α verhindert und eine Unterbindung der Cyclophilin A-Capsid-Interaktion in einer reduzierten Infektion resultiert (Kim, Dauphin et al. 2019, Selyutina, Persaud et al. 2020). Von Bedeutung scheint hier die Position 92 des Capsids zu sein. Die durch mehrere Passagen in mit einem Cyclosporin A-Analogon behandelten CD4⁺ HeLa-Zellen entstandene HIV-1-Mutante A92E ist trotz Bindung resistent gegen Hu-TRIM5 α (Aberham, Weber et al. 1996, Selyutina, Persaud et al. 2020). Während die Capside von HIV-1 und SIVcpzPtt an dieser Stelle mit Alanin und Prolin je eine unpolare Aminosäure tragen, befindet sich im SIVcpzPts Capsid das polare Glutamat, was die TRIM5 α -Capsid-Interaktion beeinflussen könnte (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Dennoch bleibt die Frage offen, warum sich diese Inhibition in TRIM5 α überexprimierenden Zellen nicht im selben Ausmaß zeigt. Die antiretrovirale Wirkung von Hu-TRIM5 α ist Immunoproteasom- und Interferon α -abhängig, deshalb wären weitere Cofaktoren denkbar, deren Expression sich in Lymphozyten und kommerziellen Zelllinien unterscheidet (Jimenez-Guardeno, Apolonia et al. 2019). Darüber hinaus wird seine antivirale Potenz durch das Verhältnis von humanem TRIM5 α und Proteinisofomen aus

alternativ gespleißten Transkripten bestimmt. Diesen TRIM5-Isoformen fehlt meistens die *SPRY*-Domäne, sie können das virale Capsid nicht binden und stören die antivirale Aktivität von TRIM5 α , weswegen man spekulieren kann, dass ihr Verhältnis sich in primären Zellen und HOS- und HeLa-Zelllinien jeweils unterscheidet (Battivelli, Migraine et al. 2011, Ganser-Pornillos and Pornillos 2019). Ein Immunoblot zur Detektion von Hu-TRIM5 α gibt Hinweise darauf, dass die TRIM5-Proteinisoformen unterschiedlich stark in HOS- und HeLa-Zellen exprimiert werden (siehe Abbildung 10). Dies bedarf aber weiterer Untersuchungen, die das TRIM5-Expressionsmuster quantitativ genauer bestimmen. Da sich HIV-1 und SIVcpzPtt in ihrer Interaktion mit Hu-TRIM5 α ähneln, sich aber in ihrer Fähigkeit HeLa-Zellen zu infizieren unterscheiden, scheint TRIM5 α keine ausreichende Erklärung für die unterschiedliche Infektion von HOS- und HeLa-Zellen durch SIVcpz zu bieten.

4.3 HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts zeigen unterschiedliche Zelltypabhängigkeiten hinsichtlich ihrer Sensibilität für Capsidinhibitoren

Die Experimente mit dem Capsidinhibitor PF74 und seinem schwächeren Analogon PF57 ergaben eine unterschiedliche Sensibilität von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts. Während HIV-1 in humanen HOS- und HeLa- und simianen FRh1-2-Zellen sensibel war, zeigte sich für SIVcpz ein zelltypabhängiges Inhibitionsmuster. SIVcpzPtt sprach nur in den beiden humanen Zelllinien und SIVcpzPts nur in HOS-Zellen auf eine Inhibition durch PF74 und PF57 an (siehe Abbildung 12). In anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe war ein ähnliches Muster in primären humanen Zellen sichtbar. Während HIV-1 10-fach durch PF74 in peripheren mononukleären Zellen (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) und Makrophagen gehemmt wurde, zeigten sich SIVcpzPtt in PBMCs und SIVcpzPts in PBMCs und Makrophagen resistent (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Diese Untersuchungen deuten auf intrinsische biologische Unterschiede der Viren hin, die zelltypabhängig die Interaktion mit den Capsidinhibitoren beeinflussen und eine Relevanz für Infektionen *in vivo* haben. Sie zeigen auch, dass sich die unterschiedliche Fähigkeit die humanen Zelllinien HOS und HeLa zu infizieren auch auf pharmakologische Substanzen auswirken. Da SIVcpzPtt und SIVcpzPts nicht grundsätzlich resistent gegen die Capsidinhibitoren waren, muss die differierende antivirale Aktivität von PF74 und PF57

auch durch Unterschiede in zellulären Signalwegen oder in der spezifischen Interaktion mit zellulären Faktoren bedingt sein (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

4.3.1 Die Wirkung von PF74 und PF57 ist weitestgehend TRIM5-unabhängig

Capsidinhibitoren wie PF74 haben je nach verwendeter Konzentration unterschiedliche Wirkmechanismen. Zielstruktur ist dabei das virale Capsid, das nach dem viralen *Entry* durch PF74 je nach verwendeter Konzentration stabilisiert oder zerrissen wird (Shi, Zhou et al. 2011, Bhattacharya, Alam et al. 2014, Fricke, Buffone et al. 2014). TRIM5 α wirkt destabilisierend auf das virale Capsid und könnte daher die Wirkung von Capsidinhibitoren beeinflussen (Nakayama and Shioda 2015, Twizerimana, Scheck et al. 2018). Wie in humanen HOS-Zellen zeigten sich alle drei Viren in wildtypischen CRFK-Zellen ohne antiretroviral aktives TRIM5-Protein sensibel für PF74 und PF57 (siehe Abbildung 13). Die Überexpression von TRIM5-Proteinen hatte kaum Einfluss auf die Wirkung der Capsidinhibitoren, mit Ausnahme von humanem TRIM5 α , das die Hemmung von HIV-1 durch PF57 und die von SIVcpzPtt durch PF74 und PF57 geringfügig verstärkte. Ebenso verstärkten beide Inhibitoren marginal die Restriktion von SIVcpzPtt durch Agm- und PF57 die durch Rh-TRIM5 α , während PF74 sie abschwächte. Die beschriebenen Effekte waren alle von sehr geringem Ausmaß (siehe Abbildung 14). TRIM5-Proteine scheinen die Wirkung der Capsidinhibitoren weitestgehend unbeeinflusst zu lassen und bieten daher keine ausreichende Erklärung für die Zelltypabhängigkeit von PF74 und PF57.

4.3.2 Das Capsid ist nicht die einzige Determinante für eine Resistenz gegen Capsidinhibitoren

PF74 und PF57 binden das virale Capsid, welches zwischen SIVcpzPtt und SIVcpzPts zu 78,63% gleich und zu 87,18% ähnlich ist (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Um die virusspezifische Zelltypabhängigkeit der Inhibition durch PF74 und PF57 zu untersuchen, wurde eine Virusmutante SIVcpzPtt(Pts-Capsid) getestet, die aus SIVcpzPtt besteht und das Capsid von SIVcpzPts trägt. SIVcpzPtt(Pts-Capsid) war ähnlich wie SIVcpzPtt in humanen HOS- und HeLa-Zellen sensibel für eine Restriktion durch Capsidinhibitoren und in simianen FRhl-2-Zellen weitestgehend resistent (siehe Abbildung 16). Die Capsidbindestelle für PF74 unterscheidet sich zwischen SIVcpzPtt und SIVcpzPts nur in einem Aminosäurerest: LEU172 vs. ILE175. Im HIV-1-Capsid findet sich an der entsprechenden Stelle wie bei SIVcpzPtt Leucin (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

Sowohl bei Leucin als auch bei Isoleucin handelt es sich um lipophile Aminosäuren, deren Austausch vermutlich keine Auswirkung auf die PF74-Bindung hat. Dies und die Ähnlichkeit des Restriktionsmusters der Virusmutante SIVcpzPtt(Pts-Capsid) mit dem von SIVcpzPtt gibt Anhaltspunkte für die Hypothese, dass die zellulären Faktoren, die die virusspezifische Zelltypabhängigkeit der Capsidinhibitoren bedingen, nicht ausschließlich oder nicht direkt mit dem viralen Capsid interagieren.

4.4 Die Abhängigkeit einer Infektion mit HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts von Cyclophilin A ist virus- und zelltypspezifisch

4.4.1 Cyclophilin A wird ähnlich in neu entstehende Virionen von HIV-1 und SIVcpz verpackt

Die Capsidbindestelle von Cyclophilin A (Cyp A) von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts ist größtenteils ähnlich und nur in den Aminosäureresten 91 bis 93 zwischen und innerhalb der Arten nicht konservativ substituiert (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Die wichtigsten Aminosäurereste G89 und P90 für die Cyp A-Capsidbindung sind bei allen drei Viren gleich (Gamble, Vajdos et al. 1996, Twizerimana, Scheck et al. 2020). Für HIV-1 ist bekannt, dass es Cyclophilin A in neu entstehende Virionen verpackt und dies durch Ciclosporin A (CsA) verhindert werden kann (Braaten, Franke et al. 1996). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies auch auf SIVcpzPtt und SIVcpzPts zutrifft (siehe Abbildung 18). Dies wird durch einen Glutathion S-Transferase (GST)-*Pulldownassay* von Augustin Twizerimana gestützt, bei dem Gag von HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts mit Cyclophilin A interagiert und diese Interaktion durch Ciclosporin A unterbunden wird (Twizerimana, Scheck et al. 2020).

4.4.2 Ciclosporin A hat Cyclophilin A-abhängige und -unabhängige Wirkungen auf HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts

Eine ähnliche Zelltypabhängigkeit, wie sie bei der Inhibition durch PF74 und PF57 gezeigt wurde, ist für die Wirkung von Cyclophilin A auf die Replikation von HIV-1 bekannt. Dabei ist das Cyclophilin A der infizierten und nicht der produzierenden Zelle relevant (Sokolskaja, Sayah et al. 2004, Hatzioannou, Perez-Caballero et al. 2005, De Iaco and Luban 2014). Wie vorbeschrieben zeigte sich durch *Knockout* oder funktionelles Blockieren mittels Ciclosporin A eine Cyp A-Abhängigkeit von HIV-1 in HOS-Zellen, während dies in HeLa-Zellen zu einer gesteigerten Infektion führte (Sokolskaja, Sayah et

al. 2004, De Iaco and Luban 2014, Campbell and Hope 2015, Twizerimana, Scheck et al. 2020).

Wie HIV-1 wurde SIVcpzPtt durch ein Cyp A-*Knockout* in HOS-Zellen in seiner Infektion reduziert, während SIVcpzPts davon unbeeinflusst blieb (siehe Abbildung 20). SIVcpzPtt und SIVcpzPts scheinen demzufolge eine unterschiedliche Abhängigkeit von Cyclophilin A zu besitzen. Auch in Hinblick auf den Einfluss von Ciclosporin A unterschieden sich die beiden SIVcpz. Beide ließen sich in keiner Zelllinie durch Ciclosporin A inhibieren und CsA steigerte für beide Viren die Permissivität von HeLa- und FRhl-2-, und für SIVcpzPts auch jene von HOS-Zellen (siehe Abbildung 19). Eine Cyp A-Depletion und ein funktionelles Umgehen mittels CsA hatten folglich unterschiedliche Auswirkungen auf die Infektion durch SIVcpzPtt und SIVcpzPts, was auf eine Cyclophilin A-unabhängige Wirkung von Ciclosporin A schließen lässt. Dies wird dadurch gestützt, dass sich die Infektiosität von SIVcpzPtt durch das Hinzufügen von Ciclosporin A zu Cyp A-depletierten HOS-Zellen wiederherstellen ließ und bei SIVcpzPts CsA in Leervektor- und Cyp A-KO-Zellen zu einer gesteigerten Infektion führte (siehe Abbildung 20). Zwar werden HeLa-Zellen durch das Ausschalten von Cyclophilin A, sowohl durch *Knockdown*, als auch durch CsA, permissiver für SIVcpzPtt und SIVcpzPts, aber auch hier steigert CsA die Infektion in Cyp A-depletierten Zellen zusätzlich (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Das lässt darauf schließen, dass Ciclosporin A die Infektiosität dieser Viren auch unabhängig von einer Cyp A-Antagonisierung verstärkt und dies einen Unterschied zu HIV-1 darstellt. Jedoch gibt es Hinweise, dass CsA auch eine HIV-1-Infektion Cyclophilin A-unabhängig moduliert. In HeLa-Zellen steigert ein Cyp A-*Knockdown* die Infektiosität von HIV-1, sie wird durch CsA aber trotz fehlendem Cyp A wieder herabgesetzt (Twizerimana, Scheck et al. 2020) und in HOS-Zellen wurde die durch eine Cyp A-Depletion geminderte Infektion durch CsA zusätzlich gehemmt (siehe Abbildung 20). Folglich scheint die Cyclophilin A-unabhängige Wirkung von CsA eine Infektion durch SIVcpz zu steigern, während sie die durch HIV-1 eher mindert.

Ciclosporin A hemmt HIV-1 an mindestens zwei verschiedenen Punkten im Replikationszyklus, einmal nach Eintritt des Virus in die Zielzelle und zum Zweiten scheint es das *Assembly* zu inhibieren. Letzteres ist unabhängig von der Verhinderung der Cyp A-Capsidbindung und der Inhibition von Calcineurin (Sokolskaja, Sayah et al. 2004). Da in dieser Arbeit als Maß für die Infektion durch HIV-1 die Luciferaseaktivität bestimmt wurde, die die virale Transkription widerspiegelt und zeitlich vor dem *Assembly* stattfindet,

kann dies nicht die beobachtete Restriktion durch CsA erklären. De Iaco et al. beschreiben, dass Ciclosporin A unabhängig davon, ob es die Infektiosität von HIV-1 insgesamt hemmt oder steigert, es eine leicht inhibitorische Wirkung auf die reverse Transkription hat (De Iaco and Luban 2014). Dies unterstreicht, dass Ciclosporin A an mehreren Stellen in den Replikationszyklus von HIV-1 eingreift. Desweiteren könnte der Cyclophilin A-unabhängige Effekt von Ciclosporin A auf die Interaktion mit anderen Cyclophilinen zurückzuführen sein. Es sind 15 verschiedene Proteine aus der Gruppe der Cyclophiline bekannt, die alle potentiell in der Lage sind Ciclosporin A zu binden und von denen einige das HIV-1-Capsid binden können (Franke, Yuan et al. 1994, Braaten and Luban 2001). Ihre Auswirkung auf eine Infektion durch Lentiviren gilt es weiter zu erforschen. Eine weitere denkbare Möglichkeit stellt eine direkte Wirkung von Ciclosporin A auf das Virus dar. Für das Influenza A-Virus wird eine Cyclophilin A-unabhängige Inhibition des nukleären mRNA-Exports durch Ciclosporin A vermutet (Liu, Zhao et al. 2012). Interessant wären weitere Infektionsexperimente in Cyclophilin A-depletierten Zellen, die die Auswirkung von Ciclosporin A auf HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts zu verschiedenen Zeitpunkten des Replikationszyklus untersuchen.

4.4.3 Ist TRIM5 α der zelluläre Faktor, der die zelltypspezifische

Wirkung von Cyclophilin A auf eine lentivirale Infektion erklärt?

HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts zeigen ein klar unterschiedliches Interaktionsmuster mit Cyclophilin A. Denkbar wäre eine unter Selektionsdruck entstandene unterschiedliche Cyclophilin A-Capsid-Interaktion zwischen HIV-1 und SIVcpz. Da aber sowohl Cyclophilin A als auch die entsprechende Bindestelle des viralen Capsids größtenteils konserviert sind, erscheint dies als alleiniger Grund unwahrscheinlich (Stammes, Rutherford et al. 1992, Twizerimana, Scheck et al. 2020). Betrachtet man zusätzlich die zelltypabhängige Wirkung von Cyclophilin A auf die Viren, ist es naheliegend, dass diese Interaktion von zusätzlichen zellulären Faktoren beeinflusst wird. Interessanterweise stellte SIVcpzPtt hinsichtlich seiner Cyclophilin A-Interaktion eine Art Zwischenposition zwischen HIV-1 und SIVcpzPts dar. Während alle drei Viren HeLa-Zellen durch eine Cyp A-Depletion besser infizierten, schien HIV-1 in HOS-Zellen etwas abhängiger von Cyp A zu sein als SIVcpzPtt (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Die Infektion mit SIVcpzPts blieb dagegen durch ein Cyp A-*Knockout* in HOS-Zellen unbeeinflusst (siehe Abbildung 20). Die Unterschiede in HOS- und HeLa-Zellen deuten auf zelltypspezifische Faktoren hin, die die Interaktion zwischen Virus und Cyclophilin A modulieren.

In primären humanen Zellen wird HIV-1 bei Unterbindung der Cyp A-Capsid-Interaktion durch TRIM5 α inhibiert (Kim, Dauphin et al. 2019, Selyutina, Persaud et al. 2020). Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Auswirkungen einer Cyclophilin A-Depletion in HOS-Zellen auf die Infektion von HIV-1 und SIVcpzPtt auf der einen Seite und SIVcpzPts auf der anderen sein. SIVcpzPts zeigte sich im Gegensatz zu den anderen beiden Viren resistent gegen eine Restriktion durch humanes TRIM5 α , was die ungehinderte Infektion in Cyp A-depletierten HOS-Zellen begründen könnte (siehe Abbildung 11 und 20). Auch die unterschiedlich starke Expression von TRIM5-Isoformen in HOS- und HeLa-Zellen zusammen mit der unterschiedlichen Auswirkung einer Cyp A-Depletion in diesen Zellen gibt Hinweise darauf, dass TRIM5 α einen Einfluss auf die Interaktionen zwischen Cyclophilin A und den drei Viren haben könnte. Hierfür sind weitere Untersuchungen mit überexprimierenden und *Knockout*-Zellen für TRIM5 α und Cyclophilin A, sowie eine genauere Bestimmung der TRIM5-Expression in HOS- und HeLa-Zellen notwendig

4.4.4 Die Interaktion zwischen Cyclophilin A und den Capsidinhibitoren ist komplex und sowohl virus-, als auch zelltypabhängig

Es ist vorbeschrieben, dass Cyclophilin A die Wirkung von Capsidinhibitoren auf HIV-1 moduliert (Shi, Zhou et al. 2011, Saito, Ferhadian et al. 2016). Zwar interagieren sowohl Cyp A, als auch PF74 mit dem viralen Capsid, ihre Bindestellen unterscheiden sich jedoch (Twizerimana, Scheck et al. 2020). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl das Ausschalten von Cyclophilin A durch ein *Knockout*, als auch das Verwenden von Ciclosporin A zelltyp- und virusspezifisch die Wirkung von PF74 und PF57 beeinflussen.

4.4.5 Ciclosporin A beeinflusst die Wirkung der Capsidinhibitoren Cyclophilin A-abhängig und -unabhängig

Ciclosporin A verstärkte in humanen Zellen die Inhibition von HIV-1 durch PF74 und PF57. Eine Ausnahme war die Hemmung durch niedrige Konzentrationen ($\leq 2\mu\text{M}$) PF57 in HeLa-Zellen, die durch CsA abgeschwächt wurde. In HeLa-Zellen mindert ein Cyp A-*Knockdown* die Wirkung von PF74 in niedrigen und von PF57 in allen Konzentrationen und hat einen wirkverstärkenden Effekt auf hohe Konzentrationen ($\geq 5\mu\text{M}$) PF74 (Shi, Zhou et al. 2011, Saito, Ferhadian et al. 2016, Twizerimana, Scheck et al. 2020). Paradoxerweise hatte ein Cyp A-*Knockout* in HOS-Zellen eine teilweise geringfügig schwächende Wirkung auf die Hemmung von HIV-1 durch die Capsidinhibitoren (siehe

Abbildung 22) (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Auch die Sensibilität von SIVcpzPtt gegen die Capsidinhibitoren ließ sich teilweise in unterschiedliche Richtungen durch eine Cyclophilin A-Depletion oder Ciclosporin A modifizieren (siehe Abbildung 21 und 22). Ciclosporin A stellte die durch geringe Konzentrationen PF74 und PF57 geminderte Infektion von SIVcpzPtt in sowohl HOS- als auch HeLa-Zellen weitestgehend wieder her, hatte aber einen tendenziell wirkverstärkenden Effekt auf hohe Konzentrationen der Capsidinhibitoren (siehe Abbildung 21). Dagegen hatte ein Cyclophilin A-KO in HOS-Zellen in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die PF74- und PF57-Wirkung gegen SIVcpzPtt. Augustin Twizerimana zeigte jedoch eine reduzierte Hemmung durch die Capsidinhibitoren in HOS-Cyp A-KO-Zellen, die vor allem hohe Konzentrationen betraf, sowie eine geringe Wirkverstärkung für PF74 in Cyp A-depletierten HeLa-Zellen (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Auch die HIV-1- und SIVcpzPtt-Mutanten G89V, die nicht in der Lage sind Cyclophilin A zu binden, verhalten sich in Bezug auf die Capsidinhibitoren anders als wildtypische Viren unter Einfluss von Ciclosporin A (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Die Inkongruenz der Effekte durch CsA, durch die Unterbindung der Cyclophilin A-Capsid-Interaktion durch die G89V-Mutation, und durch eine Cyclophilin A-Depletion lässt darauf schließen, dass CsA die Wirkung der Capsidinhibitoren moduliert und dies nicht ausschließlich auf das funktionelle Inaktivieren von Cyclophilin A zurückzuführen ist.

4.4.6 Cyclophilin A hat einen zelltypspezifisch schützenden Effekt auf SIVcpzPtt und SIVcpzPts gegen hohe Konzentrationen der Capsidinhibitoren

SIVcpzPts war in HeLa-Zellen resistent gegen PF74 und PF57 und CsA hatte einen tendenziell steigernden Effekt auf seine Infektiosität. Überraschenderweise zeigte SIVcpzPts eine partielle Sensibilität gegen hohe Konzentrationen PF74 bei Hinzugabe von CsA (siehe Abbildung 21). Seine Resistenz gegen vor allem hohe Konzentrationen der Capsidinhibitoren in HeLa-Zellen wird darüber hinaus durch ein Cyclophilin A-*Knockdown* oder eine Vorbehandlung mit CsA aufgehoben (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Eine G89V-Mutante von SIVcpzPts ist nicht in der Lage Cyclophilin A zu binden und zeigt sich ebenfalls sensibel gegen hohe Konzentrationen PF74 (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Auch die Wirkung hoher Konzentrationen PF74 gegen SIVcpzPtt kann in HeLa-Zellen durch Hinzugabe von Ciclosporin A (siehe Abbildung 21), die Verwendung

einer G89V-Mutante oder eine Depletion von Cyclophilin A leicht gesteigert werden (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Dies lässt auf einen zelltypabhängig schützenden Effekt von Cyclophilin A gegen hohe Konzentrationen von PF74 schließen, der für SIVcpzPts stärker ausgeprägt ist als für SIVcpzPtt.

Hohe Konzentrationen PF74 wirken auf Ebene der reversen Transkription und des *Uncoatings*, für die die Capsidstabilität eine entscheidende Rolle spielt (Saito, Ferhadian et al. 2016, Balasubramaniam, Zhou et al. 2019). Es ist vorbeschrieben, dass Cyclophilin A die Hemmung durch hohe Konzentrationen PF74 auf HIV-1 in HeLa-Zellen abschwächt, indem es der PF74-induzierten Capsiddestabilisierung und -zerreißung entgegen wirkt (Saito, Ferhadian et al. 2016). Dies lässt sich nicht auf das Analogon PF57 übertragen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es sich zudem um einen zelltypabhängigen Effekt handelt, der in HOS-Zellen nicht beobachtet wurde und der sich darüber hinaus unterschiedlich stark auf die getesteten Viren auswirkt (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Die Interaktion zwischen Cyclophilin A, Capsidinhibitoren und viralem Capsid scheint durch andere zelluläre Faktoren beeinflusst zu sein. Dadurch, dass hohe Konzentrationen PF74 den Replikationszyklus vor dem nukleären *Entry* stören, scheinen zumindest in HeLa-Zellen die Faktoren CPSF6 und die Nucleoporine 153 und 358 (NUP153, NUP358) keinen Einfluss auf die Wirkung der Inhibitoren zu haben (Saito, Ferhadian et al. 2016). Es wäre möglich, dass HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts unterschiedlich anfällig für eine veränderte Capsidstabilität sind und darauf die Viruspezifität der Sensibilität gegen PF74 beruht. Denkbar wären bisher unbekannte zelluläre Faktoren, die in HOS- und HeLa-Zellen verschieden stark exprimiert sind und die die capsiddestabilisierende Wirkung der Inhibitoren über die Modulation der Cyclophilin A-Virus-Interaktion beeinflussen.

4.4.7 Die Wirkung niedriger Capsidinhibitoren-Konzentrationen zeigt für HIV-1 und SIVcpz eine unterschiedliche Abhängigkeit von Cyclophilin A

HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts zeigten sich in HOS-Zellen sensibel gegenüber den Capsidinhibitoren (siehe Abbildung 12). Sowohl die Hinzugabe von Cyclosporin A als auch ein Cyclophilin A-*Knockout* sorgten in HOS-Zellen bei beiden SIVcpz für eine reduzierte antivirale Wirkung niedriger Konzentrationen der Capsidinhibitoren (siehe Abbildung 21 und 22) (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Dieser Effekt ist für SIVcpz zelltypspezifisch und zeigt sich nicht in HeLa-Zellen, wohingegen eine Cyclophilin A-Depletion

die antivirale Aktivität geringer Capsidinhibitor-Konzentrationen gegen HIV-1 in HeLa- und HOS-Zellen reduziert (siehe Abbildung 22) (Shi, Zhou et al. 2011, Saito, Ferhadian et al. 2016, Twizerimana, Scheck et al. 2020). Dies lässt eine Abhängigkeit der Wirkung geringer PF74- und PF57-Konzentrationen von Cyclophilin A vermuten, die für SIVcpz eine andere Zelltypspezifität besitzt als für HIV-1.

Niedrige PF74-Konzentrationen haben einen stabilisierenden Effekt auf das Capsid und wirken abhängig von den zellulären Proteinen CPSF6, NUP153 und NUP358 auf Ebene des nukleären *Entrys* und der Integration (Saito, Ferhadian et al. 2016, Balasubramaniam, Zhou et al. 2019). Quantitativ konnte in dieser Arbeit kein Unterschied in der Expression dieser Proteine oder von Cyclophilin A zwischen HOS- und HeLa-Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 10).

Lentiviren können ruhende Zellen infizieren und sind aufgrund der Größendifferenz zwischen Präintegrationskomplex und Nucleospore darauf angewiesen mit dem nukleären Porenkomplex zu interagieren (Yamashita and Engelman 2017). Cyclophilin A beeinflusst diese Teile des Replikationszyklus, indem es den nukleären *Entry* von HIV-1 über die Interaktion mit u.a. den Nucleoporinen 153 und 358 fördert und die Integrationsstelle beeinflusst (Schaller, Ocwieja et al. 2011, De Iaco and Luban 2014). Die Interaktion zwischen Capsid und NUP153 kann durch PF74 verhindert werden und eine NUP153-Depletion schwächt die Wirkung geringer PF74-Konzentrationen gegen HIV-1 in sowohl HOS- als auch HeLa-Zellen (Matreyek, Yucel et al. 2013, Saito, Ferhadian et al. 2016). PF74-resistente aber -bindende HIV-1-Varianten sind weniger NUP153 abhängig (Shi, Zhou et al. 2011, Zhou, Price et al. 2015, Saito, Ferhadian et al. 2016). Da eine Cyclophilin A-Depletion unterschiedliche Wirkungen auf die Inhibition von HIV-1 und SIVcpz durch niedrige Konzentrationen PF74 und PF57 hat, kann man vermuten, dass die Viren sich hinsichtlich ihrer Interaktion mit dem nukleären Porenkomplex unterscheiden und SIVcpz zelltypspezifisch andere Wege des nukleären *Entrys* als über NUP153 und NUP358 nutzen kann. Diese Fähigkeit scheint HIV-1 in der Anpassung an den Menschen verloren zu haben. Allerdings sind hierfür weitere Infektionsexperimente, die das Zusammenspiel von Cyclophilin A, den Capsidinhibitoren und dem nukleären Porenkomplex untersuchen, mit beispielsweise NUP358- und NUP153-depletierten Zellen, notwendig.

Auch CPSF6 spielt eine entscheidende Rolle beim nukleären *Entry* und der Integration von HIV-1 (Bejarano, Peng et al. 2019). In dieser Arbeit wurde eine Inhibition von HIV-1 durch das trunkierte CPSF6-358 gezeigt (siehe Abbildung 23). Die Capsidbindestelle von CPSF6 überlappt mit der von PF74 und NUP153 und befindet sich an der Schnittstelle zweier p24-Monomere innerhalb eines Hexamers (Matreyek, Yucel et al. 2013, Bhattacharya, Alam et al. 2014, Price, Jacques et al. 2014, Twizerimana, Scheck et al. 2020). Sie differiert dabei zwischen HIV-1 und SIVcpzPtt um 4% und zwischen HIV-1 und SIVcpzPts um 12% (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Während HIV-1 und SIVcpzPtt sich ähnlich Cyclophilin A-unabhängig durch CPSF6-358 inhibieren lassen, ist SIVcpzPts resistent (Lee, Ambrose et al. 2010, Lee, Mulky et al. 2012, De Iaco, Santoni et al. 2013, Saito, Henning et al. 2016, Twizerimana, Scheck et al. 2020). Eine Substitution von Threonin bei HIV-1 durch Asparagin bei SIVcpzPts an Position 186 bzw. 183 könnte einen Einfluss auf die Bindung zwischen Capsid und CPSF6-358 haben und die Resistenz von SIVcpzPts erklären (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Die Bindung zwischen Capsid und CPSF6-358 hat einen relevanten Einfluss auf seine inhibitorische Wirkung, da sich die HIV-1-Mutanten N74D und A77V, die weder CPSF6-358 noch CPSF6 binden, ebenfalls resistent zeigen (Saito, Henning et al. 2016, Twizerimana, Scheck et al. 2020). Im Gegensatz zur trunkierten Variante befindet sich CPSF6 als Vollängenprotein im Zellkern und lenkt den nukleären Import und die Integration von HIV-1 (Yamashita and Engelman 2017, Bejarano, Peng et al. 2019). Die Infektion durch HIV-1-Mutanten, die CPSF6 nicht binden, ist im Vergleich zu wildtypischen HIV-1 zwar nur geringfügig eingeschränkt, allerdings werden bei mehreren *in vivo* Passagen Viren selektiert, die wieder CPSF6 binden können. Folglich ist diese Fähigkeit zwar nicht essentiell für die Replikation von HIV-1, scheint aber einen evolutionären Vorteil mit sich zu bringen (Saito, Henning et al. 2016). In Bezug auf niedrige Konzentrationen PF74 reduziert eine CPSF6-Depletion die antivirale Wirkung gegen HIV-1 (Saito, Ferhadian et al. 2016). Zusammen mit der unterschiedlichen Sensibilität und Zeltypspezifität gegenüber einer Restriktion durch Capsidinhibitoren deuten die Resistenz von SIVcpzPts gegen CPSF6-358 und die potentiell unterschiedliche Capsidbindung darauf hin, dass sich nicht nur HIV-1 und die beiden SIVcpz, sondern auch SIVcpzPtt und SIVcpzPts untereinander hinsichtlich der Nutzung zellulärer Faktoren für den nukleären *Entry* und die Integration unterscheiden.

4.5 SAMHD-1 stellt kein Hindernis für die Durchbrechung der Speziesbarriere zwischen Schimpansen und Menschen dar

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltende Protein 1 (SAMHD-1) keine inhibitorische Wirkung auf SIVcpz hat und trotzdem weder HIV-1 noch SIVcpzPtt oder SIVcpzPts dazu in der Lage sind humanes SAMHD-1 zu degradieren. Die viralen Proteine x (Vpx) und r (Vpr) von bestimmten Lentiviren sind dazu fähig speziesspezifisch den proteasomalen Abbau von SAMHD-1 zu fördern und so seiner Restriktion zu entgehen (Laguette, Sobhian et al. 2011, Bieniasz 2012, Lim, Fregoso et al. 2012). HIV-1 und SIVcpz kodieren für ein Vpr, das SAMHD-1 nicht antagonisieren kann (Zhang, de Silva et al. 2012). Eine weitere wichtige Funktion von Vpr ist das Herbeiführen eines G2-Zellzyklusarrests, was zu einer verstärkten Virusproduktion führt (Dehart and Planelles 2008). Manche SIVs, wie das der äthiopischen Grünmeerkatze, sind jedoch dazu in der Lage mit ihrem Vpr sowohl einen Zellzyklusarrest, als auch eine SAMHD-1 Degradierung zu erwirken, weswegen sich diese beiden Funktionen nicht grundsätzlich ausschließen (Lim, Fregoso et al. 2012). HIV-2 ist in der Lage SAMHD-1 zu degradieren, ist aber weniger pathogen als HIV-1. Folglich verfügt HIV-1 entweder über andere Mechanismen, die trotz erschwelter Infektion von ruhenden Zellen eine ausreichende Replikation im Gesamtorganismus Mensch etablieren oder HIV-2 ist aufgrund seiner geringeren Pathogenität vermehrt darauf angewiesen SAMHD-1 zu antagonisieren (Lim, Fregoso et al. 2012). Für ersteres spricht, dass SIVrcm, einer der evolutionären Vorgänger von SIVcpz, für ein Vpx kodiert, welches beim Übergang auf den Schimpansen abhanden gekommen ist. Das Gen *vpx* liegt dabei zwischen *vpr* und *vif* und überlappt mit letzterem. Die Deletion von *vpx* resultierte durch *Overprinting* in einer Rekonstruktion des Gens *vif* (Etienne, Hahn et al. 2013, Twizerimana, Scheck et al. 2018). Unter *Overprinting* versteht man die Modifikation einer Sequenz, die ursprünglich nur für ein Protein kodierte, die zu einem zusätzlichen offenen Leserahmen führt. Während das Protein Vif von SIVrcm kaum Aktivität gegen den Restriktionsfaktor APOBEC3 in Schimpansen oder Menschen hat, wird dieser durch das neu resultierende Vif proteasomal degradiert (Etienne, Hahn et al. 2013). Folglich scheint APOBEC3 eine größere Hürde bei der Durchbrechung der Speziesbarriere darzustellen, und somit seine Antagonisierung wichtiger zu sein als die von SAMHD-1. Eine weitere Hypothese ist, dass die reduzierte DNA-Synthese in myeloischen Zellen zum Vorteil für die chronische Phase einer HIV-1-Infektion sein könnte. Durch das Verhindern des Ansammelns größerer Mengen viraler cDNA durch SAMHD-1 in v.a.

dendritischen Zellen wird die Antigenpräsentation und damit die Immunaktivierung gering gehalten (Laguette, Sobhian et al. 2011, Su, Biedma et al. 2014, Antonucci, St Gelais et al. 2017). Die reverse Transkriptase von HIV-1 ist darüber hinaus in der Lage auch bei niedrigen Konzentrationen von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) suffizient cDNA herzustellen, was ebenfalls dafür spricht, dass SAMHD-1 als Restriktionsfaktor keine Rolle bei der Übertragung und Verbreitung von HIV-1 im Menschen gespielt hat (Diamond, Roshal et al. 2004, Doyle, Goujon et al. 2015).

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Unterschiede zwischen HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts untersucht, um Erkenntnisse über die zoonotische Übertragung von Viren auf den Menschen zu gewinnen. Zwar sind SIVcpzPtt und SIVcpzPts beide *in vitro* in der Lage humane Lymphozyten zu infizieren, jedoch ist nur aus SIVcpzPtt die HIV-Pandemie hervorgegangen (Santiago, Rodenburg et al. 2002, Santiago, Lukasik et al. 2003, Takehisa, Kraus et al. 2007, Sharp and Hahn 2011).

Bei Experimenten in Zelllinien verschiedener Spezies trat für HIV-1 und beide SIVcpz ein *Postentryblock* in simianen Zellen auf, der größtenteils, aber nicht ausschließlich durch die Restriktion durch TRIM5-Proteine zu erklären ist und wahrscheinlich durch weitere zelluläre Faktoren beeinflusst wird. Bei der Infektion humaner Zellreihen infizierte HIV-1 HOS- und HeLa-Zellen in etwa gleich stark, während beide SIVcpz HOS- deutlich besser infizierten als HeLa-Zellen. HIV-1 und SIVcpzPtt, nicht aber SIVcpzPts, waren sensibel gegen humanes TRIM5 α , dessen antivirale Wirkung abhängig von dem Verhältnis zu seinen Isoformen ist. Deren Expression könnte sich in HOS- und HeLa-Zellen unterscheiden. Aufgrund der unterschiedlichen Sensibilität von SIVcpzPtt und SIVcpzPts gegen Hu-TRIM5 α bietet dies jedoch keine ausreichende Erklärung für die verschieden starke Permissivität der humanen Zelllinien. Allerdings könnten die alternativ gespleißten Transkripte Teil der Erklärung sein, warum es widersprüchliche Ergebnisse zur Sensibilität von HIV-1 gegen Hu-TRIM5 α gibt.

Aktuell ist eine HIV-Infektion nicht in der Breite steril heilbar, jedoch durch antiretrovirale Medikation über Jahrzehnte zu kontrollieren (Hoffmann and Rockstroh 2020). Die zunehmende Resistenzentwicklung gegen etablierte Therapien drängt auf die Entwicklung neuer Medikamente. Zwar sind PF74 und PF57 für einen therapeutischen Einsatz im

Menschen nicht stark genug antiretroviral aktiv, jedoch gibt es mit GS-6207 einen ersten Capsidinhibitor in klinischen Studien. GS-6207 bindet das Capsid an derselben Stelle und besitzt einen ähnlichen Wirkmechanismus wie PF74 (Kleinpeter and Freed 2020, Pham, Yoo et al. 2020). Das Capsid als Zielstruktur ist deshalb so interessant, da HIV-1-Mutanten, die resistent gegen Capsidinhibitoren sind, einen erheblichen Fitnessnachteil in ihrer Replikationsfähigkeit haben (Shi, Zhou et al. 2015, Carnes, Sheehan et al. 2018). Darüber hinaus ergibt die Forschung mit Capsidinhibitoren Erkenntnisse über frühe Schritte des lentiviralen Replikationszyklus. Dabei ist das Interaktionsmuster von PF74 und PF57 mit dem Capsid komplex und durch verschiedene virale und zelluläre Determinanten beeinflusst. Die Inhibitionskurve von PF74 ist für HIV-1 in HeLa-Zellen als triphasisch mit zwei inhibitorischen und einer dazwischenliegenden Plateauphase vorbeschrieben (Saito, Ferhadian et al. 2016). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese Inhibitionskurve nur eine von verschiedenen zelltyp- und virusspezifischen Inhibitionskurven von Capsidinhibitoren ist. Da die Zelltypspezifität und das Inhibitionsmuster der Capsidmutante SIVcpzPtt(Pts-Capsid) denen von SIVcpzPtt ähneln, erscheint es wahrscheinlich, dass das Capsid nicht die einzige virale Determinante für die Sensibilität gegen PF74 und PF57 darstellt.

Der zelluläre Faktor Cyclophilin A beeinflusst den Replikationszyklus von HIV-1 an verschiedenen Stellen (Bieniasz 2012). HIV-1, SIVcpzPtt und SIVcpzPts scheinen Cyclophilin A ähnlich in neu entstehende Virionen zu verpacken und diese Inkorporation kann durch Cyclosporin A unterbunden werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Permissivität von HeLa-Zellen für die beiden SIVcpz durch Cyclosporin A gesteigert werden kann. Infektionen in Cyp A-depletierten und mit CsA versetzten Zellen erzielten teilweise widersprüchliche Ergebnisse und CsA modulierte die Infektiosität auch in Cyp A-depletierten Zellen, was auf eine Cyclophilin A-unabhängige Wirkung von CsA schließen lässt. Diese unterscheidet sich wesentlich zwischen HIV-1 und SIVcpz. Während sie eine Infektion durch SIVcpz eher fördert, scheint sie HIV-1 zu inhibieren. Auch die Interaktion von HIV-1 und SIVcpzPtt mit den Capsidinhibitoren wurde durch die Cyp A-unabhängige Wirkung von CsA beeinflusst. Während CsA eine Infektion durch SIVcpzPtt steigerte, hemmte es HIV-1. Experimente in Cyclophilin A-depletierten Zellen zeigten, dass HIV-1 und SIVcpzPtt in ihrer Infektion in HOS-Zellen abhängiger von Cyp A sind als SIVcpzPts. Da Cyclophilin A HIV-1 in primären humanen Zellen vor einer TRIM5 α -

Restriktion schützt und SIVcpzPts im Gegensatz zu HIV-1 und SIVcpzPtt resistent gegen humanes TRIM5 α ist, bietet dies eine mögliche Erklärung für die Cyp A-Unabhängigkeit von SIVcpzPts in HOS-Zellen. Darüber hinaus konnte für Infektionen mit SIVcpz ein zelltypspezifisch schützender Effekt durch Cyp A gegen hohe Konzentrationen der Capsidinhibitoren gezeigt werden, der sich stärker auf SIVcpzPts als auf SIVcpzPtt auswirkt. Eine komplexe Modulation der Capsidstabilität durch Inhibitor, Cyclophilin A und weitere zelluläre Faktoren könnte das *Uncoating* und die reverse Transkription von HIV-1 und SIVcpz unterschiedlich beeinflussen. Jedoch ließen TRIM5-Proteine, die ebenfalls die Stabilität des Capsids verändern, die Wirkung von PF74 und PF57 weitestgehend unbeeinflusst.

Überraschenderweise scheint die Wirkung niedriger Konzentrationen PF74 und PF57 eher abhängig von Cyclophilin A zu sein. Dagegen besitzt auch diese Abhängigkeit eine Zelltypspezifität, die sich zwischen HIV-1 und SIVcpz unterscheidet. Cyclophilin A fördert einen NUP153-, NUP358- und CPSF6-abhängigen Weg des nukleären *Entry* und der Integration (Schaller, Ocowieja et al. 2011, De Iaco and Luban 2014). SIVcpz kann also vermutlich andere Wege nutzen als HIV-1. Entscheidend sind hierbei die Resistenzen von SIVcpzPts gegen CPSF6-358 und gegen Capsidinhibitoren in HeLa-Zellen, wobei letztere durch Störung der Cyclophilin A-Capsid-Interaktion aufgehoben werden kann (Twizerimana, Scheck et al. 2020). Das bedeutet, dass SIVcpzPtt und SIVcpzPts sich nicht nur von HIV-1, sondern auch untereinander hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von Cyclophilin A und der Nutzung der zellulären Faktoren CPSF6, NUP153 und NUP358 unterscheiden.

Es ist nach wie vor nicht vollständig geklärt, warum SIVcpzPtt die Artenbarriere zwischen Schimpanse und Menschen überwinden konnte und sich SIVcpzPts nicht im Menschen verbreitet hat. Obwohl es nicht auszuschließen ist, dass es Unterschiede in der SIVcpz-Prävalenz in den Unterarten *P. t. troglodytes* und *P. t. schweinfurthii* gab oder der Kontakt zwischen *Pan troglodytes troglodytes* und Menschen häufiger stattfand, erscheint es doch unwahrscheinlich, dass SIVcpzPts nie auf den Menschen übertragen wurde. Allerdings ist SIVcpzPts im *Homo sapiens* nicht endemisch geworden (Takehisa, Kraus et al. 2007, Sharp and Hahn 2011). Es ist möglich, dass Menschen sporadisch mit SIVcpzPts infiziert wurden und das Virus nicht suffizient genug replizieren konnte, um sich weiter zu verbreiten. SIVcpzPtt und SIVcpzPts scheinen unterschiedlich fähig zu sein humane

Restriktionsfaktoren zu antagonisieren und zelluläre Faktoren für ihre Replikation zu nutzen. Mitglieder der Familie der APOBEC3-Proteine werden in Virionen verpackt und sorgen bei der reversen Transkription in der Zielzelle für Hypermutationen in der cDNA (Twizerimana, Scheck et al. 2018). APOBEC3H wird in CD4+ T-Lymphozyten exprimiert, inhibiert SIVcpz und stellt eine potentielle Barriere für die Interspeziesübertragung von Schimpansen auf den Menschen dar (Zhang, Gu et al. 2017). HIV-1 und SIVcpz kodieren für das Protein Vif, das APOBEC3-Proteine potentiell degradieren kann. Zwar ist humanes APOBEC3H resistent gegen Vif von SIVcpzPtt und SIVcpzPts, jedoch unterscheidet sich die Vif-APOBEC3C-Interaktion zwischen den beiden Viren (Zhang, Gu et al. 2017). Da SAMHD1 kein Hindernis für die Replikation von SIVcpz darstellt, erscheint es somit logisch, dass im Genom von SIVcpz durch *Overprinting vif* auf Kosten von *vpx* entstand (Etienne, Hahn et al. 2013). Ein weiterer wichtiger Restriktionsfaktor bei der zoonotischen Übertragung von HIV-1 scheint Tetherin zu sein, welcher das Knospen neu entstehender Virionen inhibiert. HIV-1 antagonisiert ihn mit Hilfe von Vpu, während beide SIVcpz Nef als Gegenspieler des Schimpansen-tetherin nutzen. Sowohl Vpu als auch Nef von SIVcpz sind nicht in der Lage humanes Tetherin zu antagonisieren. Da dies jedoch auf SIVcpzPtt und SIVcpzPts zutrifft, hat HIV-1 diese Fähigkeit vermutlich bei der Verbreitung im Menschen gewonnen (Sauter, Schindler et al. 2009, Sato, Misawa et al. 2018). SIVcpzPtt könnte bereits vor der Transmission vom Schimpansen auf den Menschen besser als SIVcpzPts an das humane Immunsystem präadaptiert gewesen und HIV-1 durch *Gain of function*-Mutationen von u.a. *vpu* entstanden sein (Sato, Misawa et al. 2018). Jüngere Forschung, die die Evolution von SIVcpzPtt in humanisierten Mäusen nachspielt, stellt diese Hypothese aufgrund geringer Replikationsfähigkeit von SIVcpzPtt in Frage. Bei mehreren Passagen von SIVcpzPtt in humanisierten Mäusen traten viele transiente und wenig permanente Mutationen auf, letztere vor allem im Gen *env* (Sato, Misawa et al. 2018, Curlin, Schmitt et al. 2020, Schmitt, Curlin et al. 2020, Schmitt, Curlin et al. 2020). Durch die VSV-G-Pseudotypisierung wurde in dieser Arbeit der virale *Entry* und Unterschiede im Env-Protein außer Acht gelassen. Interessant wären weitere Infektionsexperimente mit Env-tragenden SIVcpz, die man in Zellen mit artifizieller CD4- und CCR5-Expression durchführt. Die Experimente dieser Arbeit zeigten, dass sich nicht nur SIVcpz und HIV-1, sondern auch SIVcpzPtt und SIVcpzPts untereinander wesentlich in ihrer Abhängigkeit von Wirtsfaktoren unterscheiden. Diese Unterschiede konzentrieren sich dabei vor allem auf die Interaktion mit Determinanten des nukleären *Entrys* und der

Integration, wie Cyclophilin A, CPSF6 und den Nucleoporinen 153 und 358. Weitere Untersuchungen könnten die genauere Betrachtung dieser Schritte im Replikationszyklus beinhalten. Dies könnte durch Korrelation von Infektionsdaten mit Markern für den nukleären *Entry* in Cyp A-, CPSF6-, NUP153- und NUP358-depletierten und überexprimierenden Zellen geschehen. Als Marker könnte die Menge an 2-LTR *Circles* dienen. Diese entstehen durch zelluläre Reparaturmechanismen, wenn sich virale, lineare DNA im Nucleus befindet (Sloan and Wainberg 2011). Die Integration könnte man quantitativ unter Zuhilfenahme von Integraseinhibitoren und qualitativ durch einen Vergleich von Integrationsstellen in *Knockout*- oder überexprimierenden Zellen beleuchten. Insgesamt lässt die Zelltypspezifität der Interaktion von Cyclophilin A und den Capsidinhibitoren darauf schließen, dass es weitere zelluläre Faktoren gibt, die lentivirale Infektionen beeinflussen. Die Liste der bekannten Restriktionsfaktoren erweitert sich kontinuierlich und ihre Auswirkung auf SIVcpzPtt und SIVcpzPts gilt es zu erforschen (Ghimire, Rai et al. 2018). Das Muster mit dem Wirt und Virus miteinander interagieren ist komplex und entwickelt sich durch ein Wettrüsten im Laufe der Evolution stetig weiter. Diese Arbeit liefert Erkenntnisse über die Voraussetzungen für die zoonotische Übertragung von SIVcpz auf den Menschen und trägt zu den Grundlagen für die Entwicklung neuer HIV-Therapien bei.

5 Literaturverzeichnis

- Aberham, C., S. Weber and W. Phares (1996). "Spontaneous mutations in the human immunodeficiency virus type 1 gag gene that affect viral replication in the presence of cyclosporins." *J Virol* **70**(6): 3536-3544.
- Aiken, C. (1997). "Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A." *J Virol* **71**(8): 5871-5877.
- Antonucci, J. M., C. St Gelais and L. Wu (2017). "The Dynamic Interplay between HIV-1, SAMHD1, and the Innate Antiviral Response." *Front Immunol* **8**: 1541.
- Arhel, N. (2010). "Revisiting HIV-1 uncoating." *Retrovirology* **7**: 96.
- Ayouba, A., C. Akoua-Koffi, S. Calvignac-Spencer, A. Esteban, S. Locatelli, H. Li, Y. Li, B. H. Hahn, E. Delaporte, F. H. Leendertz and M. Peeters (2013). "Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire." *AIDS* **27**(15): 2488-2491.
- Bahr, A., A. Singer, A. Hain, A. A. Vasudevan, M. Schilling, J. Reh, M. Riess, S. Panitz, V. Serrano, M. Schweizer, R. König, S. Chanda, D. Haussinger, G. Kochs, D. Lindemann and C. Munk (2016). "Interferon but not MxB inhibits foamy retroviruses." *Virology* **488**: 51-60.
- Bailes, E., F. Gao, F. Bibollet-Ruche, V. Courgnaud, M. Peeters, P. A. Marx, B. H. Hahn and P. M. Sharp (2003). "Hybrid origin of SIV in chimpanzees." *Science* **300**(5626): 1713.
- Balasubramaniam, M., J. Zhou, A. Addai, P. Martinez, J. Pandhare, C. Aiken and C. Dash (2019). "PF74 Inhibits HIV-1 Integration by Altering the Composition of the Preintegration Complex." *Journal of Virology* **93**(6): e01741-01718.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-871.
- Battivelli, E., J. Migraine, D. Lecossier, S. Matsuoka, D. Perez-Bercoff, S. Saragosti, F. Clavel and A. J. Hance (2011). "Modulation of TRIM5 α activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms." *J Virol* **85**(15): 7828-7835.
- Bejarano, D. A., K. Peng, V. Laketa, K. Borner, K. L. Jost, B. Lucic, B. Glass, M. Lusic, B. Muller and H. G. Krausslich (2019). "HIV-1 nuclear import in macrophages is regulated by CPSF6-capsid interactions at the nuclear pore complex." *Elife* **8**.
- Bell, S. M. and T. Bedford (2017). "Modern-day SIV viral diversity generated by extensive recombination and cross-species transmission." *PLoS Pathog* **13**(7): e1006466.
- Besnier, C., Y. Takeuchi and G. Towers (2002). "Restriction of lentivirus in monkeys." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11920-11925.
- Bhattacharya, A., S. L. Alam, T. Fricke, K. Zadrozny, J. Sedzicki, A. B. Taylor, B. Demeler, O. Pornillos, B. K. Ganser-Pornillos, F. Diaz-Griffero, D. N. Ivanov and M. Yeager (2014). "Structural basis of HIV-1 capsid recognition by PF74 and CPSF6." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(52): 18625-18630.
- Bibollet-Ruche, F., A. Heigele, B. F. Keele, J. L. Easlick, J. M. Decker, J. Takehisa, G. Learn, P. M. Sharp, B. H. Hahn and F. Kirchhoff (2012). "Efficient SIVcpz replication in human lymphoid tissue requires viral matrix protein adaptation." *J Clin Invest* **122**(5): 1644-1652.

- Bieniasz, P. D. (2012). "An overview of intracellular interactions between immunodeficiency viruses and their hosts." *AIDS* **26**(10): 1243-1254.
- Blair, W. S., C. Pickford, S. L. Irving, D. G. Brown, M. Anderson, R. Bazin, J. Cao, G. Ciaramella, J. Isaacson, L. Jackson, R. Hunt, A. Kjerrstrom, J. A. Nieman, A. K. Patick, M. Perros, A. D. Scott, K. Whitby, H. Wu and S. L. Butler (2010). "HIV capsid is a tractable target for small molecule therapeutic intervention." *PLoS Pathog* **6**(12): e1001220.
- Bock, M., K. N. Bishop, G. Towers and J. P. Stoye (2000). "Use of a transient assay for studying the genetic determinants of Fv1 restriction." *J Virol* **74**(16): 7422-7430.
- Bohne, J., H. Wodrich and H. G. Krausslich (2005). "Splicing of human immunodeficiency virus RNA is position-dependent suggesting sequential removal of introns from the 5' end." *Nucleic Acids Res* **33**(3): 825-837.
- Braaten, D., E. K. Franke and J. Luban (1996). "Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus SIV(CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses." *J Virol* **70**(7): 4220-4227.
- Braaten, D. and J. Luban (2001). "Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells." *EMBO J* **20**(6): 1300-1309.
- Burse, M., J. Shi and C. Aiken (2017). "Cyclophilin A potentiates TRIM5 α inhibition of HIV-1 nuclear import without promoting TRIM5 α binding to the viral capsid." *PLOS ONE* **12**(8): e0182298.
- Campbell, E. M. and T. J. Hope (2015). "HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection." *Nature Reviews Microbiology* **13**(8): 471-483.
- Carnes, S. K., J. H. Sheehan and C. Aiken (2018). "Inhibitors of the HIV-1 capsid, a target of opportunity." *Curr Opin HIV AIDS* **13**(4): 359-365.
- Coffin, J., S. Hughes and H. Varmus (1997). Processing of Retroviral RNA. *Retroviruses*. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Coffin, J., S. Hughes and H. Varmus (1997). Transcription. *Retroviruses*. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Craigie, R. and F. D. Bushman (2012). "HIV DNA integration." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(7): a006890.
- Curlin, J., K. Schmitt, L. Remling-Mulder, R. Moriarty, M. Stenglein, S. O'Connor, P. Marx and R. Akkina (2020). "SIVcpz cross-species transmission and viral evolution toward HIV-1 in a humanized mouse model." *J Med Primatol* **49**(1): 40-43.
- D'Arc, M., A. Ayouba, A. Esteban, G. H. Learn, V. Boue, F. Liegeois, L. Etienne, N. Tagg, F. H. Leendertz, C. Boesch, N. F. Madinda, M. M. Robbins, M. Gray, A. Cournil, M. Ooms, M. Letko, V. A. Simon, P. M. Sharp, B. H. Hahn, E. Delaporte, E. Mpoudi Ngole and M. Peeters (2015). "Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(11): E1343-1352.
- De Iaco, A. and J. Luban (2014). "Cyclophilin A promotes HIV-1 reverse transcription but its effect on transduction correlates best with its effect on nuclear entry of viral cDNA." *Retrovirology* **11**: 11.
- De Iaco, A., F. Santoni, A. Vannier, M. Guipponi, S. Antonarakis and J. Luban (2013). "TNPO3 protects HIV-1 replication from CPSF6-mediated capsid stabilization in the host cell cytoplasm." *Retrovirology* **10**(1): 20.

- de Sousa, J. D., V. Muller, P. Lemey and A. M. Vandamme (2010). "High GUD incidence in the early 20 century created a particularly permissive time window for the origin and initial spread of epidemic HIV strains." PLoS One **5**(4): e9936.
- Dehart, J. L. and V. Planelles (2008). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr links proteasomal degradation and checkpoint activation." J Virol **82**(3): 1066-1072.
- Delelis, O., K. Carayon, A. Saïb, E. Deprez and J. F. Mouscadet (2008). "Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase." Retrovirology **5**: 114.
- Dharan, A., N. Bachmann, S. Talley, V. Zwickelmaier and E. M. Campbell (2020). "Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus." Nat Microbiol **5**(9): 1088-1095.
- Diamond, T. L., M. Roshal, V. K. Jamburuthugoda, H. M. Reynolds, A. R. Merriam, K. Y. Lee, M. Balakrishnan, R. A. Bambara, V. Planelles, S. Dewhurst and B. Kim (2004). "Macrophage tropism of HIV-1 depends on efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase." J Biol Chem **279**(49): 51545-51553.
- Doyle, T., C. Goujon and M. H. Malim (2015). "HIV-1 and interferons: who's interfering with whom?" Nat Rev Microbiol **13**(7): 403-413.
- Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R. J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono and L. Naldini (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." J Virol **72**(11): 8463-8471.
- Etienne, L., B. H. Hahn, P. M. Sharp, F. A. Matsen and M. Emerman (2013). "Gene loss and adaptation to hominids underlie the ancient origin of HIV-1." Cell Host Microbe **14**(1): 85-92.
- Etienne, L., E. Nerrienet, M. LeBreton, G. T. Bibila, Y. Foupouapouognigni, D. Rousset, A. Nana, C. F. Djoko, U. Tamoufe, A. F. Aghokeng, E. Mpoudi-Ngole, E. Delaporte, M. Peeters, N. D. Wolfe and A. Ayouba (2011). "Characterization of a new simian immunodeficiency virus strain in a naturally infected Pan troglodytes troglodytes chimpanzee with AIDS related symptoms." Retrovirology **8**: 4.
- Fiorentini, S., E. Marini, S. Caracciolo and A. Caruso (2006). "Functions of the HIV-1 matrix protein p17." New Microbiol **29**(1): 1-10.
- Fischer, G. and F. X. Schmid (1990). "The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell." Biochemistry **29**(9): 2205-2212.
- Francis, A. C., M. Marin, M. J. Prellberg, K. Palermino-Rowland and G. B. Melikyan (2020). "HIV-1 Uncoating and Nuclear Import Precede the Completion of Reverse Transcription in Cell Lines and in Primary Macrophages." Viruses **12**(11).
- Francis, A. C., M. Marin, P. K. Singh, V. Achuthan, M. J. Prellberg, K. Palermino-Rowland, S. Lan, P. R. Tedbury, S. G. Sarafianos, A. N. Engelman and G. B. Melikyan (2020). "HIV-1 replication complexes accumulate in nuclear speckles and integrate into speckle-associated genomic domains." Nat Commun **11**(1): 3505.
- Franke, E. K., H. E. Yuan and J. Luban (1994). "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions." Nature **372**(6504): 359-362.
- Fricke, T., C. Buffone, S. Opp, J. Valle-Casuso and F. Diaz-Griffero (2014). "BI-2 destabilizes HIV-1 cores during infection and Prevents Binding of CPSF6 to the HIV-1 Capsid." Retrovirology **11**: 120.
- Gamble, T. R., F. F. Vajdos, S. Yoo, D. K. Worthylake, M. Houseweart, W. I. Sundquist and C. P. Hill (1996). "Crystal Structure of Human Cyclophilin A Bound to the Amino-Terminal Domain of HIV-1 Capsid." Cell **87**(7): 1285-1294.

- Ganser-Pornillos, B. K. and O. Pornillos (2019). "Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5." *Nat Rev Microbiol* **17**(9): 546-556.
- Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp and B. H. Hahn (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes* troglodytes." *Nature* **397**(6718): 436-441.
- Ghimire, D., M. Rai and R. Gaur (2018). "Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication." *J Gen Virol* **99**(4): 435-446.
- Goodsell, D. S., S. Dutta, C. Zardecki, M. Voigt, H. M. Berman and S. K. Burley (2015). "The RCSB PDB "Molecule of the Month": Inspiring a Molecular View of Biology." *PLoS Biology* **13**(5): e1002140.
- Greenwood, E. J., F. Schmidt, I. Kondova, H. Niphuis, V. L. Hodara, L. Clissold, K. McLay, B. Guerra, S. Redrobe, L. D. Giavedoni, R. E. Lanford, K. K. Murthy, F. Rouet and J. L. Heeney (2015). "Simian Immunodeficiency Virus Infection of Chimpanzees (*Pan troglodytes*) Shares Features of Both Pathogenic and Non-pathogenic Lentiviral Infections." *PLoS Pathog* **11**(9): e1005146.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hatzioannou, T., D. Perez-Caballero, S. Cowan and P. D. Bieniasz (2005). "Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells." *J Virol* **79**(1): 176-183.
- Heeney, J. L., E. Rutjens, E. J. Verschoor, H. Niphuis, P. ten Haaf, S. Rouse, H. McClure, S. Balla-Jhaghhoorsingh, W. Bogers, M. Salas, K. Cobb, L. Kestens, D. Davis, G. van der Groen, V. Courgnaud, M. Peeters and K. K. Murthy (2006). "Transmission of simian immunodeficiency virus SIVcpz and the evolution of infection in the presence and absence of concurrent human immunodeficiency virus type 1 infection in chimpanzees." *J Virol* **80**(14): 7208-7218.
- Hey, J. (2010). "The divergence of chimpanzee species and subspecies as revealed in multipopulation isolation-with-migration analyses." *Mol Biol Evol* **27**(4): 921-933.
- Hoffmann, C. and J. K. Rockstroh (2020). *HIV Buch 2020/2021*, Medizin Fokus Verlag.
- Hotter, D., T. Krabbe, E. Reith, A. Gawanbacht, N. Rahm, A. Ayoub, B. Van Driessche, C. Van Lint, M. Peeters, F. Kirchhoff and D. Sauter (2017). "Primate lentiviruses use at least three alternative strategies to suppress NF-kappaB-mediated immune activation." *PLoS Pathog* **13**(8): e1006598.
- Hu, W.-S. and S. H. Hughes (2012). "HIV-1 Reverse Transcription." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**(10).
- Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants and S. Wain-Hobson (1990). "Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1." *Nature* **345**(6273): 356-359.
- Hulme, A. E., O. Perez and T. J. Hope (2011). "Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(24): 9975-9980.
- Jimenez-Guardeno, J. M., L. Apolonia, G. Betancor and M. H. Malim (2019). "Immunoproteasome activation enables human TRIM5alpha restriction of HIV-1." *Nat Microbiol* **4**(6): 933-940.
- Jouvenet, N., S. M. Simon and P. D. Bieniasz (2011). "Visualizing HIV-1 assembly." *J Mol Biol* **410**(4): 501-511.
- Karn, J. and C. M. Stoltzfus (2012). "Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(2): a006916.

- Keckesova, Z., L. M. Ylinen and G. J. Towers (2006). "Cyclophilin A renders human immunodeficiency virus type 1 sensitive to Old World monkey but not human TRIM5 alpha antiviral activity." *J Virol* **80**(10): 4683-4690.
- Keele, B. F., J. H. Jones, K. A. Terio, J. D. Estes, R. S. Rudicell, M. L. Wilson, Y. Li, G. H. Learn, T. M. Beasley, J. Schumacher-Stankey, E. Wroblewski, A. Mosser, J. Raphael, S. Kamenya, E. V. Lonsdorf, D. A. Travis, T. Mlengeya, M. J. Kinsel, J. G. Else, G. Silvestri, J. Goodall, P. M. Sharp, G. M. Shaw, A. E. Pusey and B. H. Hahn (2009). "Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz." *Nature* **460**(7254): 515-519.
- Keele, B. F., F. Van Heuverswyn, Y. Li, E. Bailes, J. Takehisa, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, Y. Chen, L. V. Wain, F. Liegeois, S. Loul, E. M. Ngole, Y. Bienvenue, E. Delaporte, J. F. Brookfield, P. M. Sharp, G. M. Shaw, M. Peeters and B. H. Hahn (2006). "Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1." *Science* **313**(5786): 523-526.
- Kim, K., A. Dauphin, S. Komurlu, S. M. McCauley, L. Yurkovetskiy, C. Carbone, W. E. Diehl, C. Strambio-De-Castillia, E. M. Campbell and J. Luban (2019). "Cyclophilin A protects HIV-1 from restriction by human TRIM5 α ." *Nat Microbiol* **4**(12): 2044-2051.
- Kirmaier, A., F. Wu, R. M. Newman, L. R. Hall, J. S. Morgan, S. O'Connor, P. A. Marx, M. Meythaler, S. Goldstein, A. Buckler-White, A. Kaur, V. M. Hirsch and W. E. Johnson (2010). "TRIM5 suppresses cross-species transmission of a primate immunodeficiency virus and selects for emergence of resistant variants in the new species." *PLoS Biol* **8**(8).
- Klasse, P. J. (2012). "The molecular basis of HIV entry." *Cell Microbiol* **14**(8): 1183-1192.
- Kleinpeter, A. B. and E. O. Freed (2020). "HIV-1 Maturation: Lessons Learned from Inhibitors." *Viruses* **12**(9).
- Kratovac, Z., C. A. Virgen, F. Bibollet-Ruche, B. H. Hahn, P. D. Bieniasz and T. Hatzioannou (2008). "Primate lentivirus capsid sensitivity to TRIM5 proteins." *J Virol* **82**(13): 6772-6777.
- Kuang, Y. Q., H. L. Liu and Y. T. Zheng (2015). "The innate immune roles of host factors TRIM5 α and Cyclophilin A on HIV-1 replication." *Med Microbiol Immunol* **204**(5): 557-565.
- Kuramitsu, M., C. Hashizume, N. Yamamoto, A. Azuma, M. Kamata, N. Yamamoto, Y. Tanaka and Y. Aida (2005). "A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA." *Microbes Infect* **7**(9-10): 1150-1160.
- Laguet, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Segeal, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz and M. Benkirane (2011). "SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx." *Nature* **474**(7353): 654-657.
- Lee, K., Z. Ambrose, T. D. Martin, I. Oztop, A. Mulky, J. G. Julias, N. Vandegraaff, J. G. Baumann, R. Wang, W. Yuen, T. Takemura, K. Shelton, I. Taniuchi, Y. Li, J. Sodroski, D. R. Littman, J. M. Coffin, S. H. Hughes, D. Unutmaz, A. Engelman and V. N. KewalRamani (2010). "Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1." *Cell Host Microbe* **7**(3): 221-233.
- Lee, K., A. Mulky, W. Yuen, T. D. Martin, N. R. Meyerson, L. Choi, H. Yu, S. L. Sawyer and V. N. Kewalramani (2012). "HIV-1 capsid-targeting domain of cleavage and polyadenylation specificity factor 6." *J Virol* **86**(7): 3851-3860.
- Lewinski, M. K., M. Yamashita, M. Emerman, A. Ciuffi, H. Marshall, G. Crawford, F. Collins, P. Shinn, J. Leipzig, S. Hannenhalli, C. C. Berry, J. R. Ecker and F. D. Bushman (2006). "Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection." *PLoS Pathog* **2**(6): e60.

- Li, Y., A. K. Kar and J. Sodroski (2009). "Target cell type-dependent modulation of human immunodeficiency virus type 1 capsid disassembly by cyclophilin A." *J Virol* **83**(21): 10951-10962.
- Lim, E. S., O. I. Fregoso, C. O. McCoy, F. A. Matsen, H. S. Malik and M. Emerman (2012). "The ability of primate lentiviruses to degrade the monocyte restriction factor SAMHD1 preceded the birth of the viral accessory protein Vpx." *Cell Host Microbe* **11**(2): 194-204.
- Lin, T. Y. and M. Emerman (2008). "Determinants of cyclophilin A-dependent TRIM5 alpha restriction against HIV-1." *Virology* **379**(2): 335-341.
- Liu, X., Z. Zhao, Z. Li, C. Xu, L. Sun, J. Chen and W. Liu (2012). "Cyclosporin A Inhibits the Influenza Virus Replication through Cyclophilin A-Dependent and -Independent Pathways." *PLOS ONE* **7**(5): e37277.
- Locatelli, S., R. J. Harrigan, P. R. Sesink Clee, M. W. Mitchell, K. A. McKean, T. B. Smith and M. K. Gonder (2016). "Why Are Nigeria-Cameroon Chimpanzees (*Pan troglodytes ellioti*) Free of SIVcpz Infection?" *PLoS One* **11**(8): e0160788.
- Locatelli, S. and M. Peeters (2012). "Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population." *AIDS* **26**(6): 659-673.
- Mandell, M. A., T. Kimura, A. Jain, T. Johansen and V. Deretic (2014). "TRIM proteins regulate autophagy: TRIM5 is a selective autophagy receptor mediating HIV-1 restriction." *Autophagy* **10**(12): 2387-2388.
- Marciniak, R. A., B. J. Calnan, A. D. Frankel and P. A. Sharp (1990). "HIV-1 Tat protein trans-activates transcription in vitro." *Cell* **63**(4): 791-802.
- Matreyek, K. A., S. S. Yucel, X. Li and A. Engelman (2013). "Nucleoporin NUP153 phenylalanine-glycine motifs engage a common binding pocket within the HIV-1 capsid protein to mediate lentiviral infectivity." *PLoS Pathog* **9**(10): e1003693.
- McEwan, W. A., T. Schaller, L. M. Ylinen, M. J. Hosie, G. J. Towers and B. J. Willett (2009). "Truncation of TRIM5 in the *Felis catus* explains the absence of retroviral restriction in cells of the domestic cat." *J Virol* **83**(16): 8270-8275.
- Meier, K., A. A. Jaguva Vasudevan, Z. Zhang, A. Bähr, G. Kochs, D. Häussinger and C. Münk (2018). "Equine MX2 is a restriction factor of equine infectious anemia virus (EIAV)." *Virology* **523**: 52-63.
- Meyerson, N. R., C. J. Warren, D. Vieira, F. Diaz-Griffero and S. L. Sawyer (2018). "Species-specific vulnerability of RanBP2 shaped the evolution of SIV as it transmitted in African apes." *PLoS Pathog* **14**(3): e1006906.
- Miller, M. D., C. M. Farnet and F. D. Bushman (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition." *J Virol* **71**(7): 5382-5390.
- Münk, C., S. M. Brandt, G. Lucero and N. R. Landau (2002). "A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(21): 13843-13848.
- Nakayama, E. E. and T. Shioda (2015). "Impact of TRIM5alpha in vivo." *AIDS* **29**(14): 1733-1743.
- Nermut, M. V. and A. Fassati (2003). "Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes." *J Virol* **77**(15): 8196-8206.
- Ning, J., Z. Zhong, D. K. Fischer, G. Harris, S. C. Watkins, Z. Ambrose and P. Zhang (2018). "Truncated CPSF6 Forms Higher-Order Complexes That Bind and Disrupt HIV-1 Capsid." *J Virol* **92**(13).

- Ondoa, P., L. Kestens, D. Davis, C. Vereecken, B. Willems, K. Fransen, J. Vingerhoets, G. Zissis, P. ten Haaf, J. Heeney and G. van der Groen (2001). "Longitudinal comparison of virus load parameters and CD8 T-cell suppressive capacity in two SIVcpz-infected chimpanzees." *J Med Primatol* **30**(5): 243-253.
- Osei Kuffour, E., K. Schott, A. A. Jaguva Vasudevan, J. Holler, W. A. Schulz, P. A. Lang, K. S. Lang, B. Kim, D. Häussinger, R. König and C. Münk (2018). "USP18 (UBP43) Abrogates p21-Mediated Inhibition of HIV-1." *J Virol* **92**(20).
- Pham, H. T., S. Yoo and T. Mesplède (2020). "Combination therapies currently under investigation in phase I and phase II clinical trials for HIV-1." *Expert Opinion on Investigational Drugs* **29**(3): 273-283.
- Plantier, J. C., M. Leoz, J. E. Dickerson, F. De Oliveira, F. Cordonnier, V. Lemeé, F. Damond, D. L. Robertson and F. Simon (2009). "A new human immunodeficiency virus derived from gorillas." *Nat Med* **15**(8): 871-872.
- Pollard, V. W. and M. H. Malim (1998). "The HIV-1 Rev protein." *Annu Rev Microbiol* **52**: 491-532.
- Pornillos, O., B. K. Ganser-Pornillos, B. N. Kelly, Y. Hua, F. G. Whitby, C. D. Stout, W. I. Sundquist, C. P. Hill and M. Yeager (2009). "X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid." *Cell* **137**(7): 1282-1292.
- Prado-Martinez, J., P. H. Sudmant, J. M. Kidd, H. Li, J. L. Kelley, B. Lorente-Galdos, K. R. Veeramah, A. E. Woerner, T. D. O'Connor, G. Santpere, A. Cagan, C. Theunert, F. Casals, H. Laayouni, K. Munch, A. Hobolth, A. E. Halager, M. Malig, J. Hernandez-Rodriguez, I. Hernando-Herraez, K. Prufer, M. Pybus, L. Johnstone, M. Lachmann, C. Alkan, D. Twigg, N. Petit, C. Baker, F. Hormozdiari, M. Fernandez-Callejo, M. Dabad, M. L. Wilson, L. Stevison, C. Camprubi, T. Carvalho, A. Ruiz-Herrera, L. Vives, M. Mele, T. Abello, I. Kondova, R. E. Bontrop, A. Pusey, F. Lankester, J. A. Kiyang, R. A. Bergl, E. Lonsdorf, S. Myers, M. Ventura, P. Gagneux, D. Comas, H. Siegismund, J. Blanc, L. Agueda-Calpena, M. Gut, L. Fulton, S. A. Tishkoff, J. C. Mullikin, R. K. Wilson, I. G. Gut, M. K. Gonder, O. A. Ryder, B. H. Hahn, A. Navarro, J. M. Akey, J. Bertranpetit, D. Reich, T. Mailund, M. H. Schierup, C. Hvilsom, A. M. Andres, J. D. Wall, C. D. Bustamante, M. F. Hammer, E. E. Eichler and T. Marques-Bonet (2013). "Great ape genetic diversity and population history." *Nature* **499**(7459): 471-475.
- Price, A. J., D. A. Jacques, W. A. McEwan, A. J. Fletcher, S. Essig, J. W. Chin, U. D. Halambage, C. Aiken and L. C. James (2014). "Host cofactors and pharmacologic ligands share an essential interface in HIV-1 capsid that is lost upon disassembly." *PLoS Pathog* **10**(10): e1004459.
- Purcell, D. F. and M. A. Martin (1993). "Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity." *J Virol* **67**(11): 6365-6378.
- Rockstroh, J. K. (2020). Einleitung. *HIV Buch 2020/2021*. C. Hoffmann and J. Rockstroh. Hamburg, Medizin Fokus Verlag: 713.
- Saito, A., D. Ferhadian, G. A. Sowd, E. Serrao, J. Shi, U. D. Halambage, S. Teng, J. Soto, M. A. Siddiqui, A. N. Engelman, C. Aiken and M. Yamashita (2016). "Roles of Capsid-Interacting Host Factors in Multimodal Inhibition of HIV-1 by PF74." *J Virol* **90**(12): 5808-5823.
- Saito, A., M. S. Henning, E. Serrao, B. N. Dubose, S. Teng, J. Huang, X. Li, N. Saito, S. P. Roy, M. A. Siddiqui, J. Ahn, M. Tsuji, T. Hatzioannou, A. N. Engelman and M. Yamashita (2016). "Capsid-CPSF6 Interaction Is Dispensable for HIV-1 Replication in Primary Cells but Is Selected during Virus Passage In Vivo." *J Virol* **90**(15): 6918-6935.

- Sakurai, Y., K. Komatsu, K. Agematsu and M. Matsuoka (2009). "DNA double strand break repair enzymes function at multiple steps in retroviral infection." *Retrovirology* **6**: 114.
- Santiago, M. L., F. Bibollet-Ruche, E. Bailes, S. Kamenya, M. N. Muller, M. Lukasik, A. E. Pusey, D. A. Collins, R. W. Wrangham, J. Goodall, G. M. Shaw, P. M. Sharp and B. H. Hahn (2003). "Amplification of a complete simian immunodeficiency virus genome from fecal RNA of a wild chimpanzee." *J Virol* **77**(3): 2233-2242.
- Santiago, M. L., M. Lukasik, S. Kamenya, Y. Li, F. Bibollet-Ruche, E. Bailes, M. N. Muller, M. Emery, D. A. Goldenberg, J. S. Lwanga, A. Ayouba, E. Nerrienet, H. M. McClure, J. L. Heeney, D. P. Watts, A. E. Pusey, D. A. Collins, R. W. Wrangham, J. Goodall, J. F. Brookfield, P. M. Sharp, G. M. Shaw and B. H. Hahn (2003). "Foci of endemic simian immunodeficiency virus infection in wild-living eastern chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*)." *J Virol* **77**(13): 7545-7562.
- Santiago, M. L., C. M. Rodenburg, S. Kamenya, F. Bibollet-Ruche, F. Gao, E. Bailes, S. Meleth, S. J. Soong, J. M. Kilby, Z. Moldoveanu, B. Fahey, M. N. Muller, A. Ayouba, E. Nerrienet, H. M. McClure, J. L. Heeney, A. E. Pusey, D. A. Collins, C. Boesch, R. W. Wrangham, J. Goodall, P. M. Sharp, G. M. Shaw and B. H. Hahn (2002). "SIVcpz in wild chimpanzees." *Science* **295**(5554): 465.
- Sato, K., N. Misawa, J. S. Takeuchi, T. Kobayashi, T. Izumi, H. Aso, S. Nagaoka, K. Yamamoto, I. Kimura, Y. Konno, Y. Nakano and Y. Koyanagi (2018). "Experimental Adaptive Evolution of Simian Immunodeficiency Virus SIVcpz to Pandemic Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Using a Humanized Mouse Model." *J Virol* **92**(4).
- Sauter, D. and F. Kirchhoff (2019). "Key Viral Adaptations Preceding the AIDS Pandemic." *Cell Host Microbe* **25**(1): 27-38.
- Sauter, D., M. Schindler, A. Specht, W. N. Landford, J. Munch, K. A. Kim, J. Votteler, U. Schubert, F. Bibollet-Ruche, B. F. Keele, J. Takehisa, Y. Ogando, C. Ochsenbauer, J. C. Kappes, A. Ayouba, M. Peeters, G. H. Learn, G. Shaw, P. M. Sharp, P. Bieniasz, B. H. Hahn, T. Hatziioannou and F. Kirchhoff (2009). "Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains." *Cell Host Microbe* **6**(5): 409-421.
- Schaller, T., K. E. Ocwieja, J. Rasaiyaah, A. J. Price, T. L. Brady, S. L. Roth, S. Hue, A. J. Fletcher, K. Lee, V. N. KewalRamani, M. Noursadeghi, R. G. Jenner, L. C. James, F. D. Bushman and G. J. Towers (2011). "HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency." *PLoS Pathog* **7**(12): e1002439.
- Schmitt, K., J. Curlin, L. Remling-Mulder, R. Moriarty, K. Goff, S. O'Connor, M. Stenglein, P. Marx and R. Akkina (2020). "Cross-Species Transmission and Evolution of SIV Chimpanzee Progenitor Viruses Toward HIV-1 in Humanized Mice." *Front Microbiol* **11**: 1889.
- Schmitt, K., J. Curlin, L. Remling-Mulder, R. Moriarty, K. Goff, S. O'Connor, M. Stenglein, P. Marx and R. Akkina (2020). "Mimicking SIV chimpanzee viral evolution toward HIV-1 during cross-species transmission." *J Med Primatol* **49**(5): 284-287.
- Selyutina, A., M. Persaud, L. M. Simons, A. Bulnes-Ramos, C. Buffone, A. Martinez-Lopez, V. Scoca, F. Di Nunzio, J. Hiatt, A. Marson, N. J. Krogan, J. F. Hultquist and F. Diaz-Griffero (2020). "Cyclophilin A Prevents HIV-1 Restriction in Lymphocytes by Blocking Human TRIM5alpha Binding to the Viral Core." *Cell Rep* **30**(11): 3766-3777 e3766.
- Sertznig, H., F. Hillebrand, S. Erkelenz, H. Schaal and M. Widera (2018). "Behind the scenes of HIV-1 replication: Alternative splicing as the dependency factor on the quiet." *Virology* **516**: 176-188.

- Sharp, P. M. and B. H. Hahn (2011). "Origins of HIV and the AIDS pandemic." Cold Spring Harb Perspect Med **1**(1): a006841.
- Sharp, P. M., G. M. Shaw and B. H. Hahn (2005). "Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees." J Virol **79**(7): 3891-3902.
- Shi, J., J. Zhou, U. D. Halambage, V. B. Shah, M. J. Burse, H. Wu, W. S. Blair, S. L. Butler and C. Aiken (2015). "Compensatory substitutions in the HIV-1 capsid reduce the fitness cost associated with resistance to a capsid-targeting small-molecule inhibitor." J Virol **89**(1): 208-219.
- Shi, J., J. Zhou, V. B. Shah, C. Aiken and K. Whitby (2011). "Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization." J Virol **85**(1): 542-549.
- Simm, M., M. Shahabuddin, W. Chao, J. S. Allan and D. J. Volsky (1995). "Aberrant Gag protein composition of a human immunodeficiency virus type 1 vif mutant produced in primary lymphocytes." J Virol **69**(7): 4582-4586.
- Sloan, R. D. and M. A. Wainberg (2011). "The role of unintegrated DNA in HIV infection." Retrovirology **8**(1): 52.
- Sokolskaja, E. and J. Luban (2006). "Cyclophilin, TRIM5, and innate immunity to HIV-1." Curr Opin Microbiol **9**(4): 404-408.
- Sokolskaja, E., D. M. Sayah and J. Luban (2004). "Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity." J Virol **78**(23): 12800-12808.
- Sparrer, K. M. J. and M. U. Gack (2018). "TRIM proteins: New players in virus-induced autophagy." PLoS Pathog **14**(2): e1006787.
- Stamnes, M. A., S. L. Rutherford and C. S. Zuker (1992). "Cyclophilins: a new family of proteins involved in intracellular folding." Trends in Cell Biology **2**(9): 272-276.
- Stremlau, M., B. Song, H. Javanbakht, M. Perron and J. Sodroski (2006). "Cyclophilin A: an auxiliary but not necessary cofactor for TRIM5alpha restriction of HIV-1." Virology **351**(1): 112-120.
- Su, B., M. E. Biedma, A. Lederle, M. Peressin, M. Lambotin, A. Proust, T. Decoville, S. Schmidt, G. Laumond and C. Moog (2014). "Dendritic cell-lymphocyte cross talk downregulates host restriction factor SAMHD1 and stimulates HIV-1 replication in dendritic cells." J Virol **88**(9): 5109-5121.
- Sundquist, W. I. and H. G. Krausslich (2012). "HIV-1 assembly, budding, and maturation." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(7): a006924.
- Swanstrom, R. and J. Wills (1997). Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins. Retroviruses. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Takehisa, J., M. H. Kraus, J. M. Decker, Y. Li, B. F. Keele, F. Bibollet-Ruche, K. P. Zammit, Z. Weng, M. L. Santiago, S. Kamenya, M. L. Wilson, A. E. Pusey, E. Bailes, P. M. Sharp, G. M. Shaw and B. H. Hahn (2007). "Generation of infectious molecular clones of simian immunodeficiency virus from fecal consensus sequences of wild chimpanzees." J Virol **81**(14): 7463-7475.
- Telesnitsky, A. and S. Goff (1997). Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. Retroviruses. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Twizerimana, A. P., R. Scheck, D. Becker, Z. Zhang, M. Wammers, L. Avelar, M. Pflieger, D. Haussinger, T. Kurz, H. Gohlke and C. Munk (2020). "Cell type-dependent escape of capsid inhibitors by simian immunodeficiency virus SIVcpz." J Virol.

- Twizerimana, A. P., R. Scheck, D. Häussinger and C. Münk (2018). "Post-entry restriction factors of SIVcpz." Future Virology **13**(10): 727-745.
- UNAIDS. (2020). "Global HIV and AIDS statistics - 2020 fact sheet." Retrieved 14.12.2020, from www.unaids.org.
- Vallari, A., V. Holzmayer, B. Harris, J. Yamaguchi, C. Ngansop, F. Makamche, D. Mbanya, L. Kaptue, N. Ndembi, L. Gurtler, S. Devare and C. A. Brennan (2011). "Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon." J Virol **85**(3): 1403-1407.
- Van Heuverswyn, F., Y. Li, E. Bailes, C. Neel, B. Lafay, B. F. Keele, K. S. Shaw, J. Takehisa, M. H. Kraus, S. Loul, C. Butel, F. Liegeois, B. Yangda, P. M. Sharp, E. Mpoudi-Ngole, E. Delaporte, B. H. Hahn and M. Peeters (2007). "Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon." Virology **368**(1): 155-171.
- Van Heuverswyn, F., Y. Li, C. Neel, E. Bailes, B. F. Keele, W. Liu, S. Loul, C. Butel, F. Liegeois, Y. Bienvenue, E. M. Ngolle, P. M. Sharp, G. M. Shaw, E. Delaporte, B. H. Hahn and M. Peeters (2006). "Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas." Nature **444**(7116): 164.
- Vogt, P. (1997). Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses. Retroviruses. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vogt, V. (1997). Retroviral Virions and Genomes. Retroviruses. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wilson, S. J., B. L. Webb, L. M. Ylinen, E. Verschoor, J. L. Heeney and G. J. Towers (2008). "Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3557-3562.
- Worobey, M., M. Gemmel, D. E. Teuwen, T. Haselkorn, K. Kunstman, M. Bunce, J. J. Muyembe, J. M. Kabongo, R. M. Kalengayi, E. Van Marck, M. T. Gilbert and S. M. Wolinsky (2008). "Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960." Nature **455**(7213): 661-664.
- Yamashita, M. and A. N. Engelman (2017). "Capsid-Dependent Host Factors in HIV-1 Infection." Trends Microbiol **25**(9): 741-755.
- Zeitlmann, L., P. Sirim, E. Kremmer and W. Kolanus (2001). "Cloning of ACP33 as a novel intracellular ligand of CD4." J Biol Chem **276**(12): 9123-9132.
- Zhang, C., S. de Silva, J. H. Wang and L. Wu (2012). "Co-evolution of primate SAMHD1 and lentivirus Vpx leads to the loss of the vpx gene in HIV-1 ancestor." PLoS One **7**(5): e37477.
- Zhang, Z., Q. Gu, M. de Manuel Montero, I. G. Bravo, T. Marques-Bonet, D. Haussinger and C. Munk (2017). "Stably expressed APOBEC3H forms a barrier for cross-species transmission of simian immunodeficiency virus of chimpanzee to humans." PLoS Pathog **13**(12): e1006746.
- Zhao, G., J. R. Perilla, E. L. Yufenyuy, X. Meng, B. Chen, J. Ning, J. Ahn, A. M. Gronenborn, K. Schulten, C. Aiken and P. Zhang (2013). "Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics." Nature **497**(7451): 643-646.
- Zhou, J., A. J. Price, U. D. Halambage, L. C. James and C. Aiken (2015). "HIV-1 Resistance to the Capsid-Targeting Inhibitor PF74 Results in Altered Dependence on Host Factors Required for Virus Nuclear Entry." J Virol **89**(17): 9068-9079.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Carsten Münk für die Möglichkeit in seinem Labor forschen zu können und für seine gute Betreuung. Danke, dass ich an diesem spannenden Thema arbeiten durfte. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Heiner Schaal für sein ausführliches Feedback und die interessanten fachlichen Diskussionen.

Ich danke Herrn Prof. Thomas Kurz, Herrn Prof. Greg Towers, Herrn Prof. Thomas Gramberg, sowie Herrn Prof. Jonathan Stoye für die Bereitstellung von Materialien, die ich in dieser Arbeit verwendet habe.

Danke an die gesamte AG Münk, die mich die letzten Jahre begleitet hat, besonders an Augustin Twizerimana für die tolle Zusammenarbeit an unseren Veröffentlichungen und Zeli Zhang für die geduldige und ausführliche Einarbeitung. Außerdem danke ich Qinyong Gu, Ananda Ayyappan Jaguva Vasudevan und Edmund Osei Kuffour. Ich danke auch Kristina Meier und Sebastian Tischler für ihre kompetenten Anregungen und ihre Freundschaft. Ein ganz besonderer Dank gilt Wioletta Hörschken. Danke für deinen exzellenten fachlichen Rat, deine Tatkraft, deine tolle Organisation und deine bestärkenden Worte jeden Morgen im Labor.

Vielen Dank auch an Peter Schröder, der in mir mit seinen exzellenten Kursen und Seminaren die Freude an Wissenschaft geweckt hat.

Danke an meine Mutter Dörte Neumann-Scheck für die Zeit und Anstrengungen, die sie unternommen hat meine Arbeit zu verstehen und mich zu unterstützen. Ich danke auch meinem Vater Florian Scheck, der mir vorgelebt hat, wie interessant wissenschaftliches Arbeiten ist. Vielen Dank an meinen Bruder Raffael Scheck für seine Anmerkungen, es hat mich sehr gefreut, dass du dir die Mühe gemacht hast, dich mit meiner Forschung auseinanderzusetzen.

Danke an Natalie Hoffmann, die viel Zeit und Kraft aufgebracht hat mich während des Schreibprozesses zu unterstützen. Danke an Daniel Santa-Maria und Levent Peter Kaygusuz, die mich von Anfang an durch das gesamte Medizinstudium begleitet haben. Danke für eure lange Freundschaft, eure Loyalität und euren Support!

Besonders danke ich meinen jüngeren Brüdern Moritz Scheck und Felix Scheck, denen diese Arbeit gewidmet ist. Danke für eure bedingungslose Liebe und Unterstützung, danke für euren guten Zuspruch und euer Interesse an mir und meiner Arbeit.