

Analyse des mutagenen Einflusses von APOBEC
auf den Tropismus von HIV-1

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Eva Heger

aus Karl-Marx-Stadt

2016

Berichterstatter:

Prof. Dr. Siegfried Roth
Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister

Tag der Disputation:

22. Januar 2015

1	Einleitung	1
1.1	Das Humane Immundefizienzvirus (HIV) und AIDS	1
1.1.1	Verlauf der HIV-Infektion	1
1.1.2	Subtypen von HIV	3
1.1.3	Klassifizierung von HIV	3
1.1.4	Morphologie von HIV-1	3
1.1.5	Genomorganisation von HIV-1	4
1.1.6	Struktur und Funktion der Proteine von HIV-1	5
1.1.7	Replikationszyklus von HIV und Angriffspunkte antiretroviraler Medikamente	8
1.1.8	Mutationen und Mutationsraten	9
1.1.9	Variabilität von HIV-1	10
1.1.10	Tropismus von HIV-1	11
1.1.10.1	Die Korezeptoren von HIV-1	11
1.1.10.2	Bestimmung des Korezeptorgebrauchs von HIV-1	13
1.2	APOBEC	14
1.2.1	Entdeckung	14
1.2.2	Die APOBEC-Genfamilie und ihre Funktionen	14
1.2.3	APOBEC3-Cytidin-Deaminasen	15
1.2.4	Restriktion von HIV-1 durch A3G und A3F	16
1.2.5	Restriktion von A3G und A3F durch Vif	19
1.3	Ziele der Arbeit	20
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Statistische Analyse	22
2.1.1	Sequenzdatensätze der statistischen Analyse	22
2.1.1.1	Sequenzdaten aus der Los Alamos Datenbank	22
2.1.1.2	Sequenzdaten des HIV-GRADE Konsortiums	22
2.1.1.3	Longitudinale Sequenzdaten	23
2.1.2	Statistische Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung von V3 Sequenzen mit definiertem Tropismus	23
2.2	Biologische Materialien	24
2.2.1	Bakterienstämme	24
2.2.2	Eukaryontische Zelllinien	24
2.2.3	Plasmide und Vektoren	25
2.2.3.1	Expressionsplasmide	25
2.2.3.2	Virusplasmide	26
2.2.4	Antikörper	28
2.2.4.1	Primäre Antikörper	28

2.2.4.2	Sekundäre Antikörper	29
2.2.5	Oligonukleotide	29
2.2.5.1	Oligonukleotide für die quantitative Analyse	29
2.2.5.2	Oligonukleotide für die PCR und Sequenzierung	29
2.2.5.3	Oligonukleotide für die in vitro-Mutagenese	30
2.2.6	Kits und Längenstandards	30
2.2.7	Enzyme und Reagenzien	30
2.2.8	Medien und Pufferlösungen	31
2.2.8.1	Sonstige Pufferlösungen	32
2.2.8.2	Für Proteinanalysen mittels Western Blot	32
2.2.9	Reagenzien und Chemikalien	32
2.3	Methoden	33
2.3.1	Methoden zur Bakterienkultivierung	33
2.3.1.1	Herstellung kompetenter Bakterien	33
2.3.1.2	Transformation	33
2.3.1.3	Kulturen zur Plasmidisolierung	33
2.3.2	Generierung rekombinanter HIV-Vif-Varianten	33
2.3.2.1	Sequenz-spezifische Mutagenese und Klonierung	33
2.3.2.2	Transfektion	34
2.3.2.3	Herstellung hochtitriger Überstände	34
2.3.2.4	Bestimmung des infektiösen Titers	35
2.3.3	Zellkulturmethoden eukaryontischer Zellen	35
2.3.3.1	Stimulation von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs)	35
2.3.3.2	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	35
2.3.4	Generierung einer stabil transfizierten Zelllinie	36
2.3.4.1	Das TetON-System	36
2.3.4.2	Bestimmung der minimal-toxischen Konzentration	37
2.3.4.3	Bestimmung der optimalen Transfektionsbedingungen	38
2.3.4.4	Stabile Transfektion	38
2.3.4.5	Selektion stabil transfizierter Zellen	38
2.3.4.6	Charakterisierung der stabil transfizierten Zellklone	39
2.3.5	Analyse- und Nachweismethoden	39
2.3.5.1	Durchflusszytometrie	39
2.3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
2.3.5.3	p24 Ag-Bestimmung	40
2.3.6	Molekularbiologische Methoden	41
2.3.6.1	cDNA-Synthese	41
2.3.6.2	In vitro Mutagenese	41
2.3.6.3	Amplifikationstechniken	41

2.3.7	Extraktionsmethoden	44
2.3.7.1	RNA-Präparation aus Zellen	44
2.3.7.2	DNA-Präparation	44
2.3.7.3	Präparation von Proteinextrakten	44
2.3.7.4	DNA-Standardmethoden	45
2.3.8	Analyse der mutagenen Aktivität APOBECs auf die V3-Region von HIV	45
2.3.8.1	Analyse der mutagenen Aktivität von A3G und A3F im induzierbaren TetON-System ...	45
2.3.8.2	Analyse in PBMC (Periphere Blut-Mononukleäre Zellen) -Virus-Kulturen	46
2.3.8.3	Generierung und Auswertung der NGS-Daten	46
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Statistische Analyse von V3-Sequenzen mit definiertem Tropismus	48
3.1.1	Analyse der Tripletzzusammensetzung und der Tripletthäufigkeit	49
3.1.2	Korrelationsanalyse der Substitutionshäufigkeit	51
3.1.3	Analyse longitudinaler Datensätze	53
3.2	Experimentelle Analyse des mutagenen Einflusses von APOBEC auf den Korezeptorgebrauch von HIV	54
3.2.1	Herstellung rekombinanter unterschiedlich Vif-defizienter HI-Viren	54
3.2.2	Generierung einer Tetrazyklin-induzierbaren APOBEC-exprimierenden Zelllinie ...	56
3.2.2.1	Klonierung der benötigten Vektoren	56
3.2.2.2	Charakterisierung der endogenen APOBEC-Level humaner Zellen	56
3.2.2.3	Stabile Transfektion	57
3.2.2.4	Charakterisierung der generierten induzierbaren APOBEC-exprimierenden Zellklone ...	60
3.2.2.5	Evaluation der Assaybedingungen	62
3.2.3	Analyse der mutagenen Aktivität von APOBEC auf HIV-Vif-Varianten im induzierbaren System	63
3.2.3.1	Untersuchung der antiviralen Effekte von A3G und A3F auf HIV-Vif-Varianten im induzierbaren System	63
3.2.3.2	Genomanalyse der im induzierbaren Expressionssystem kultivierten Viruspopulationen	65
3.2.3.3	Analyse der APOBEC-induzierten Sequenzmutationen im induzierbaren System	68
3.2.3.4	Mutationsraten in <i>env</i> und <i>nef</i> in den Viruskulturen WT, K22E und Del-Vif im induzierbaren APOBEC-Expressionssystem	69
3.2.4	Analyse des mutagenen Einflusses von APOBEC auf HIV-Vif-Varianten in PBMC- Virus-Kulturen	70
3.2.4.1	Bestimmung des Anteils an HIV-infizierbaren CD4+/CCR5+-Zellen in primären PBMC- Kulturen	70
3.2.4.2	Untersuchung der antiviralen Effekte von A3G und A3F auf HIV-Vif-Varianten im PBMC- System	71
3.2.4.3	Genomanalyse von in PBMC-Kulturen generierten Viruspopulationen	73

3.2.4.4	Analyse der APOBEC-induzierten Sequenzmutationen in den PBMC-Virus-Kulturen	76
3.2.4.5	Mutationsraten von A3G und A3F in den PBMC-Virus-Kulturen	78
4	Diskussion	81
5	Literaturverzeichnis	94
6	Zusammenfassung.....	114
7	Abstract	116
8	Abkürzungsverzeichnis	118
9	Danksagung	121
10	Erklärung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Das Humane Immundefizienzvirus (HIV) und AIDS

Im Jahr 1981 wurde von einer Gruppe junger homosexueller Männer aus Los Angeles mit dem bis dahin unbekanntem Krankheitsbild einer schweren Immundefizienz berichtet. Ein Jahr nach der Beschreibung der ersten Krankheitsfälle wurde das variable Krankheitsbild als erworbenes Immundefizienz-Syndrom (*engl.*: acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) zusammengefasst.

Kurz darauf konnte die Arbeitsgruppe von Luc Montagnier am Institut Pasteur in Paris aus dem Lymphknoten eines Lymphadenopathie-Patienten mit AIDS-assoziierten Symptomen ein bisher unbekanntes Retrovirus isolieren (Barre-Sinoussi et al., 1983). Serologische Untersuchungen erhärteten die Assoziation mit der AIDS-Erkrankung (Brun-Vezinet et al., 1984). Durch die Entdeckung weiterer Isolate (Gallo et al., 1984; Levy et al., 1984; Popovic et al., 1984) konnte es als ursächlicher Erreger der Immunschwächekrankheit identifiziert werden und wurde als Humanes Immundefizienzvirus vom Typ 1 (HIV-1) bezeichnet (Coffin et al., 1986).

Den letzten Schätzungen zufolge sind derzeit etwa 35 Millionen Menschen weltweit mit dem HI-Virus infiziert (UNAIDS, 2014). Die Zahl der Neuinfektionen sank seit 2011 um 13 % auf die niedrigste Anzahl an Neuinfektion (2,1 Millionen) in diesem Jahrzehnt. Auch bei den AIDS-bedingten Todesfällen zeigte sich ein stetiger Rückgang auf derzeit 1,8 Millionen pro Jahr, der einer Reduktion um 35% gegenüber dem Jahr 2005 entspricht. Tuberkulose bleibt weltweit die Haupttodesursache für HIV-Infizierte. Obgleich sich bei Neuinfektionen und der Todesrate ein positiver Trend abzeichnet, stellt HIV weiterhin eine große gesellschaftliche Bedrohung insbesondere für Schwellen- und Entwicklungsländer dar.

Trotz intensiver Aufklärungsarbeit gilt der ungeschützte Geschlechtsverkehr auch in Industrieländern als bedeutendste Infektionsquelle. Transmissionen des HI-Virus durch intravenösen Drogenkonsum oder durch eine Mutter-zu-Kind Übertragung sind von untergeordneter Bedeutung (Forsman et al., 2008).

1.1.1 Verlauf der HIV-Infektion

Die HIV-Infektion wird in drei Phasen unterteilt: die akute Phase, die chronische Phase und die AIDS-assoziierte Phase (Flint et al., 2009) (Abb. 1.1).

Die akute Phase schließt unmittelbar an die primäre HIV-Infektion an und erstreckt sich über einen Zeitraum von 4-8 Wochen. In den ersten zwei Wochen nach der HIV-Exposition treten häufig Schwellungen der Lymphknoten (Lymphadenopathie) oder Grippe-ähnliche Symptome auf. In dieser ersten Hälfte der akuten Phase steigt die Viruslast massiv bis zu einem

Maximalwert von 1×10^7 viralen RNA Kopien pro mL Plasma an und nimmt dann in der zweiten Hälfte wieder kontinuierlich ab (Sierra et al., 2005). Parallel zur initialen Virämie ist eine deutliche Reduktion an zirkulierenden CD4-positiven T-Zellen zu verzeichnen, deren Zahl gegen Ende der akuten Phase wieder ansteigt (Flint et al., 2009).

Der akuten Phase folgt eine chronische, die zunächst asymptomatisch ist, in deren Verlauf die HIV-Infizierten jedoch mit fortschreitender Schädigung des Immunsystems anfälliger für Infektionskrankheiten werden. Die chronische Phase kann bis zu 10 Jahre dauern und ist hauptsächlich durch ein langsames Absinken der zirkulierenden CD4-positiven T-Zellen bei gleichbleibender Viruslast im Blut charakterisiert.

Das Ende der chronischen Phase und damit der Beginn des Krankheitsbildes AIDS ist durch das Abfallen der CD4-positiven T-Zellen im Blut unter eine Konzentration von 200 Zellen/ μ L und einen starken Anstieg der Viruslast gekennzeichnet (Forsman et al., 2008; Flint et al., 2009). Durch die Schädigung des Immunsystems verstärken sich opportunistische Infektionen der Haut, der Lunge sowie des Gastrointestinal-Traktes.

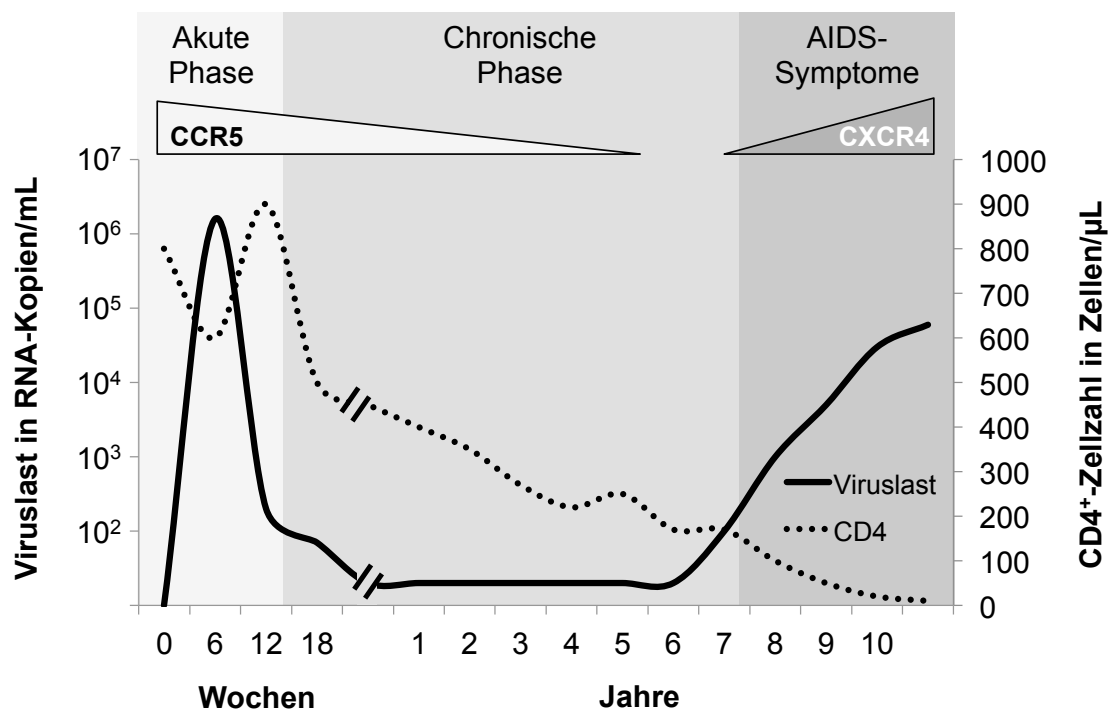


Abbildung 1.1: Schematischer Verlauf einer typischen HIV-1 Infektion

Dargestellt ist die Änderung von zwei wichtigen Parametern im Verlauf der HIV-Infektion: HIV-RNA-Kopienzahl im Plasma und Anzahl der CD4⁺-Zellen im Blut des Patienten. Die Einteilung der HIV-Infektion in akute (hellgrau), chronische (grau) und AIDS-assoziierte Phase (dunkelgrau) ist im Diagramm markiert. Die Dreiecke oberhalb des Diagramms zeigen den von den Viren zum jeweiligen Zeitpunkt der Infektion präferenziell genutzten Korezeptor, adaptiert nach (Weber, 2001).

In der frühen und chronischen Phase der HIV-Infektion sind fast ausschließlich Viren präsent, die neben dem CD4-Molekül als Hauptrezeptor CCR5 als Korezeptor für die Infektion nutzen

(CCR5-trope, kurz R5-Viren) (Roos et al., 1995; Brumme et al., 2005; Moyle et al., 2005) (Abb. 1.1). Selbst bei Transmissionen, in denen der Überträger CXCR4-dominante Viruspopulationen beherbergt, treten bei Neuinfizierten R5-Viren auf. Dieser Befund ist unabhängig vom Infektionsweg wie sexuelle Transmission, intravenöser Drogenmissbrauch, Bluttransfusion mit kontaminierten Blutprodukten oder Übertragung von der Mutter auf das Kind während der Geburt (van't Wout et al., 1994). In der asymptomatischen Phase findet bei 30 – 50% der Patienten auch unter antiretroviraler Therapie ein Wechsel des Tropismus (Korezeptorswitch) statt und es lassen sich CXCR4-trope oder dualtrope (R5/X4) Viren, die sowohl CCR5 als auch CXCR4 als Korezeptor benutzen können, nachweisen (Koot et al., 1992; Connor et al., 1997; Melby et al., 2006; Sierra et al., 2007; Wilkin et al., 2007) (Abb. 1.1).

1.1.2 Subtypen von HIV

HIV-1 ist in die vier Hauptgruppen M, N, O und P eingeteilt. Die meisten HIV-Infektionen werden durch Isolate der Hauptgruppe M („main phylogenetic group“) verursacht, welche (als Affen-Immundefizienz-Viren (*simian immunodeficiency virus*, SIV) vom Schimpansen auf den Menschen übertragen worden sind. Gruppe M kann in die Subtypen A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J und K, sowie in rekombinante Formen unterteilt werden (HIV- und SIV-Nomenklatur, www.hiv.lanl.gov). Der vorherrschende Subtyp in Westeuropa und in den USA ist der Subtyp B.

1.1.3 Klassifizierung von HIV

HIV-1 gehört wie HTLV (*Humanes T-Zell-Leukämie-Virus*) zur Familie der Retroviridae und ist aufgrund morphologischer (Gelderblom et al., 1987) und genomischer (Gonda et al., 1985) Eigenschaften der Untergattung der Lentiviren zugeordnet. Das namensgebende Kennzeichen der Retroviren ist eine retrograde Weitergabe der genetischen Information während der Replikation, bei welcher die virale RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben wird und als Provirus in das Wirtszellgenom integriert. Lentiviren (*lat. lentis* = langsam) sind behüllte Viren mit zwei Kopien eines einzelsträngigen RNA-Genoms in Plusstrangorientierung und zeichnen sich vor allem durch einen langsam fortschreitenden Krankheitsverlauf aus (Coffin JM, 1997).

1.1.4 Morphologie von HIV-1

Die 100 - 120 nm großen infektiösen Viruspartikel von HIV-1 sind von einer Lipid-Doppelmembran umgeben, die sich von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle ableitet (Gelderblom, 1991) (Abb. 1.2). Mit dieser Membran sind etwa 75 Spikes assoziiert, die von je drei Heterodimeren der Glykoproteine gp120 und gp41 gebildet werden. gp41 verankert durch eine etwa 20 Aminosäuren (AS) lange, hydrophobe α -Helix die Heterodimere in der Membran

und bindet über seine externe Domäne nicht-kovalent das hydrophile Oberflächenprotein gp120.

Das Matrixprotein p17 (MA) ist mit der Innenseite der viralen Membran assoziiert und bildet eine netzartige Proteinschicht. Im Inneren des reifen Virions befindet sich das für Lentiviren typische konische Kapsid, welches aus identischen Untereinheiten des Kapsidproteins p24 (CA) besteht (Gelderblom, 1991). Das Link-Protein p6 stellt die Verbindung zwischen Kapsid und Membran her (Gelderblom, 1991). Das Kapsid umhüllt die beiden 9,8 kb großen RNA-Stränge und die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Das Nukleokapsid-Protein p7/p9 (NC) liegt gebunden an die RNA-Moleküle vor und interagiert mit diesen über ein Zinkfingermotiv (Abb.1.2).

Darüber hinaus beinhaltet das Kapsid drei der sechs akzessorischen Proteine, Vif, Vpr und Nef, sowie zelluläre membranständige und zytoplasmatische Proteine wie beispielsweise APOBEC3G (Sheehy et al., 2002; Ott, 2008).

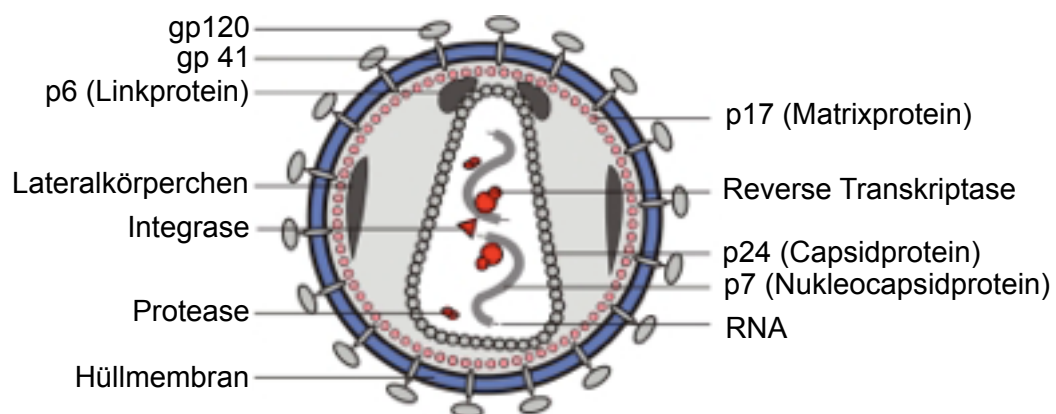


Abbildung 1.2: Aufbau und Struktur des HIV-1-Virions

Die Virusmembran ist blau dargestellt. In die Virusmembran eingelagert ist das Transmembranprotein gp41, das mit dem externen Hüllprotein gp120 assoziiert ist (grau). An der Innenseite der Membran findet man die Matrixproteine p17 (rosa). Das Linkprotein p6 und die Lateralkörperchen (dunkelgrau) sind mit dem Matrixprotein assoziiert. Die Virusmembran umschließt das Kapsid, das von dem Kapsidprotein p24 (hellgrau) gebildet wird und die beiden Kopien der viralen RNA enthält. Das Nukleokapsidprotein p7 (grau) und die Reverse Transkriptase (roter Kreis) sind mit der RNA assoziiert. Im Kapsid befindet sich außerdem die Integrase (Dreieck) (Abb. modifiziert nach Modrow und Falke, 1997).

1.1.5 Genomorganisation von HIV-1

Das in das Wirtszellgenom integrierte Genom von HIV, das sogenannte Provirus, umfasst ungefähr 9,8 kb (Muesing et al., 1985). Als Folge der Reversen Transkription des RNA-

Genoms flankieren regulatorische repetitive Sequenzfolgen, sogenannte *long terminal repeats* (LTRs), das Genom.

Mit seiner 5'-Cap-Struktur und 3'-Polyadenylierung ähnelt das HIV-Genom einer eukaryontischen mRNA und kodiert in neun offenen Leserahmen insgesamt für 15 Proteine. Drei dieser offenen Leserahmen tragen die Information für die retroviralen Polyproteine Gag (*group specific antigen*), Pol (*polymerase*) und Env (*envelope*). Diese werden als Vorläuferproteine translatiert und durch proteolytische Spaltung in die sogenannten Strukturproteine prozessiert (Frankel et al., 1998; Peterlin et al., 2003; Wu, 2004). Sechs weitere Leserahmen kodieren für die regulatorischen Proteine Tat und Rev, die die virale Transkription aktivieren (Tat) bzw. den Kernexport viraler RNAs ermöglichen (Rev), sowie für die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef (Abb. 1.3) (Peterlin et al., 2003).

1.1.6 Struktur und Funktion der Proteine von HIV-1

Durch Translation des *gag*-Genbereiches entsteht ein 55 kDa großes Vorläuferprotein (PR55), das durch proteolytische Spaltung in die vier inneren Strukturproteine p17 (CA), p24 (MA), p7 (NC) und p6 prozessiert wird. Die Gag-Proteine präsentieren Epitope für zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), welche für die immunologische Kontrolle der HIV-Infektion entscheidend sind (Rosenberg et al., 2000).

Die vom *pol*-Gen kodierten Proteine Protease, Reverse Transkriptase und Integrase werden als Gag/Pol-Vorläuferproteine translatiert. Nach autokatalytischer Aktivierung der Protease spaltet diese anschließend die Proteine p9, Reverse Transkriptase und Integrase heraus (Henderson et al., 1992). Die Reverse Transkriptase (RT), ein an die RNA-Stränge gebundenes Heterodimer (Schulze et al., 1991), erfüllt zwei Funktionen. Als DNA-Polymerase katalysiert es die (Retro-) Transkription der viralen RNA in DNA und bedingt aufgrund des fehlenden Korrekturlese-Mechanismus die hohe Variabilität von HIV. Als RNase H entfernt es den RNA-Bestandteil in RNA-DNA-Heteroduplexen (Mansky et al., 1995). Die Integrase (IN) p38 besitzt als Bestandteil des Präintegrationskomplexes Endonuklease- und Ligase-Funktion. So bindet sie an die Enden des linearen, in doppelsträngige DNA übersetzten Virusgenoms und ist für seine Integration in die Wirtszell-DNA verantwortlich. Die viralen Proteine Protease, Reverse Transkriptase und Integrase sind Angriffspunkte der antiretroviralen Therapie. Diese besteht aus einer Kombination von Medikamenten mehrerer Wirkstoffklassen und wird HIV-Infizierten zur Reduktion der Viruslast bis unter die Nachweisgrenze von 50 RNA-Kopien/mL Blut verabreicht (Miller et al., 1997; Palella et al., 1998).

Das *env*-Gen kodiert für die Glykoproteine der Virushülle, die als Vorläuferprotein gp160 synthetisiert und dann durch eine zelluläre Protease prozessiert werden (Moulard und Decroly, 2000). Dabei entstehen das Oberflächenprotein gp120 und das Transmembranprotein gp41. Die exponierte Lage von gp120 und gp41 ist dafür verantwortlich, dass ein Großteil der

humoralen Immunantwort gegen sie gerichtet ist. Gp120 vermittelt die für die Infektion von Wirtszellen erforderliche Bindung an den Hauptrezeptor CD4 sowie die Bindung des Korezeptors.

Der HIV-1 negative Faktor (Nef) gehört zu den früh exprimierten viralen Proteinen und liegt bereits kurz nach der Infektion in großen Mengen im Zytosol vor. Dieses 27 kDa schwere Protein steigert die virale Replikation und reduziert durch Endozytose von CD4-Molekülen eine Komplexierung neu synthetisierter Env-Moleküle mit CD4 (Guy et al., 1987; Rhee et al., 1994). In der Folge wird eine Reinfektion mit sich abknospenden Virionen verhindert, und gesteigerte Mengen an Env-Proteinen können in die Virushülle inkorporiert werden. Über die Verringerung von MHC Klasse II-Molekülen (Major Histo-compatibility Complex) auf der Oberfläche von infizierten Zellen nimmt Nef Einfluss auf die Antigenpräsentation antigenpräsentierender Zellen und beeinflusst die Expression von mehr als dreißig zellulären Proteinen (Kammula et al., 2012).

Rev vermittelt über die RRE-Region (Rev Resonse Element) den Transport ungespleißter viraler mRNAs aus dem Nukleus in das Zytoplasma. In Abwesenheit von Rev entstehen vollständig gespleißte mRNAs (kodierend für Tat, Rev und Nef), die die Transkription früher Gene sicherstellen. Ist Rev exprimiert, transportiert es über Interaktion mit der Kernexportmaschinerie ungespleißte und einfach gespleißte mRNAs ins Zytoplasma, sodass die Strukturproteine Gag-Pol, Env sowie die akzessorischen Proteine Vpu, Vif und Vpr exprimiert werden können (Malim et al., 1989; Rosen et al., 1990).

In der frühen Phase des HIV-1 Infektionszyklus wird die Transkription der proviralen DNA durch Unterdrückung der Elongationsphase terminiert. Tat bindet als Transkriptionsaktivator im 5'-Bereich neu initiiertes Transkripts an die TAR-Region (trans-activation response element), stabilisiert den RNA-Polymerase II-Komplex und steigert somit die Transkriptionsrate um ein Vielfaches (Kao et al., 1987; Muesing et al., 1987).

Vif, ein 23 kDa schweres zytoplasmatisches Protein, besteht aus ungefähr 190 AS und wird von einer einfach gespleißten, Rev-abhängigen mRNA translatiert (Garrett et al., 1991). Über die Interaktion mit der genomischen HIV-RNA werden etwa 30 Vif-Moleküle als Teil des Nukleoproteinkomplexes in die Viruspartikel integriert (Simon et al., 1998; Khan et al., 2001). Vif-defekte Viren zeigen eine veränderte Partikelmorphologie mit inhomogener Einlagerung der Kapsidproteine (Borman et al., 1995) sowie eine inkomplette Synthese der doppelsträngigen proviralen DNA (Goncalves et al., 1996). 1992 wurde überraschenderweise Vif als essentieller Faktor für die HIV-Replikation in bestimmten Zellen (u.a. primären CD4⁺-T-Zellen und Makrophagen, PM1) identifiziert (Akari et al., 1992; Fan et al., 1992; Gabuzda et al., 1992; Michaels et al., 1993; von Schwedler et al., 1993). Aufgrund der HIV-Inhibition wurden diese als restriktive oder nicht-permissive Zelllinien bezeichnet (Sova et al., 1993). Andere Zelllinien (Jurkat, SupT1, CEM-SS) zeigten keine Vif-abhängige Virusvermehrung und wurden als

permissive Zellen bezeichnet. Im Jahr 2002 identifizierten Sheehy et al. durch eine cDNA-Subtraktionsanalyse einen zellulären Faktor, APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G), der die Ergebnisse in den nicht-permissiven Zellen erklären konnte. Eine direkte Interaktion von Vif mit APOBEC3G vermittelt über den ElonginBC/Cullin5/Rbx2-E3-Ligase-Komplex dessen Ubiquitinylierung (Yu et al., 2003; Mehle et al., 2006) und die proteasomale Degradation (Stopak et al., 2003). In Abwesenheit von Vif werden APOBEC3G (A3G) und APOBEC3F (A3F) in Viruspartikel inkorporiert und führen in neu-infizierten Zellen zur Hypermutation der viralen DNA, inhibieren die Reverse Transkription sowie die Entstehung proviraler DNA (Fitzgibbon et al., 1993; Liddament et al., 2004).

Das Vpr-Protein, das im Nukleokapsid eng mit der RNA assoziiert ist, ist durch mehrere Funktionen für eine effiziente HIV-Replikation verantwortlich. Mit Hilfe unterschiedlicher Protein-Domänen minimiert es die Mutationsrate während der Reversen Transkription durch seine Interaktion mit der Uracil-DNA-Glykosylase 1 (Mansky, 2000), sichert den Transport des Präintegrationskomplexes in den Nukleus (Le Rouzic et al., 2005) und arretiert die Zelle im G2-Stadium des Zellzyklus (He et al., 1995).

Vpu veranlasst durch seine Bindung an CD4 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) dessen Ubiquitinylierung und Abbau (Bour et al., 2003). Damit wird das neu gebildete Env im ER vor der Komplexierung mit ebenfalls dort lokalisiertem CD4 geschützt. Durch endosomal-lysosomale Degradation von Tetherin verhindert es die Tetherin-vermittelte Partikel-Immobilisierung sich neu bildender, abknospender Virionen und ermöglicht deren Freisetzung (Yang et al., 2010).

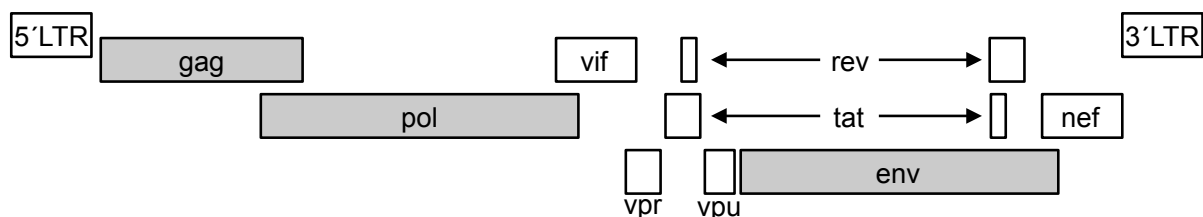


Abbildung 1.3: Genomstruktur von HIV-1

Das provirale HIV Genom hat eine Länge von ca. 9800 Basenpaaren. Es ist unterteilt in die Bereiche LTR, *gag*, *pol*, *env* sowie die sechs regulatorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat* und *nef*. Das *gag*-Gen kodiert für die vier Strukturproteine p17, p24, p6 und p7. Das *pol*-Gen kodiert die Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase. Das *env*-Gen kodiert für die beiden Hüllproteine gp41 und gp120, modifiziert nach (Peterlin et al., 2003).

1.1.7 Replikationszyklus von HIV und Angriffspunkte antiretroviraler Medikamente

Der erste Schritt der Infektion einer Wirtszelle mit HIV-1 ist die Bindung des viralen Hüllproteins gp120 an den zellulären CD4-Rezeptor (Klatzmann et al., 1984). Der CD4-Rezeptor, der zur Superfamilie der Immunglobuline gehört, wird von CD4⁺T-Lymphozyten (60% der T-Lymphozyten), Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems auf der Zelloberfläche exprimiert. Bereits 1984 konnte CD4 als primärer, für die Infektion mit HIV-1, HIV-2 und SIV notwendiger Rezeptor identifiziert werden (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984). Die CD4-Bindungsdomäne befindet sich dabei in der vierten konservierten Region des gp120 (Lasky et al., 1987), aber auch für andere Bereiche des Glykoproteins wurde eine Interaktion mit CD4 beschrieben (Kowalski et al., 1987; Olshevsky et al., 1990; Polzer et al., 2001).

Eine anschließende Konformationsänderung im gp120 führt zur Formation und Exposition von Epitopen, die im nativen Stadium verdeckt sind (Thali et al., 1993). Diese konservierte Struktur, auch als Korezeptor-Bindungsstelle (coreceptor binding site) bezeichnet, beinhaltet neben V1/V2 und Anteilen von C4 (β 20- β 21), dem sogenannten „bridging sheet“, auch die dritte variable Schleife und ermöglicht die Bindung an den Korezeptor (Wu et al., 1996; Kwong et al., 1998).

Die wichtigsten Korezeptoren sind die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 (Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996). Seit 2007 ist mit Maraviroc (Celsentri) ein CCR5-Antagonist verfügbar, der die Infektion von Zellen mit CCR5-tropen Viren verhindert.

Durch die Bindung an den Korezeptor werden weitere Konformationsänderungen im Transmembranprotein gp41 induziert, die zur Exposition einer fusogenen Peptidomäne des gp41 führen und nachfolgend zur Fusion der Virus- und Wirtszellmembran (Gallaher, 1987; Cao et al., 1993; Weissenhorn et al., 1996; Chan et al., 1997). Die konformationelle Änderung des gp41 wird durch das synthetische Peptid T-20 (Enfuvirtide / Fuzeon) gehemmt, welches bereits erfolgreich in der HIV-Therapie eingesetzt wird. Nach Freisetzung des Viruskapsids in das Zytoplasma (Perez et al., 1992) erfolgt die Reverse Transkription, bei der das virale RNA-Genom von der Reversen Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA transkribiert wird (Peliska et al., 1992). Aufgrund der essentiellen Funktion der RT im viralen Replikationszyklus sind derzeit diverse antivirale Substanzen verfügbar, die den Substanzklassen NRTI (Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren) und NNRTI (Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren) zugeordnet werden. Während der kompetitive Einbau von NRTIs zum Kettenabbruch führt, bewirken NNRTIs eine allosterische Hemmung der RT-Aktivität. Auch zelluläre antivirale Restriktionsfaktoren, wie das G-zu-A Mutationen

induzierende A3G, zeigen ihre inhibitorische Wirkung während der Reversen Transkription (Fitzgibbon et al., 1993; Bishop et al., 2008).

Nach vollständiger Dissoziation der Kapsidhülle wird die mit den Nukleoproteinen assoziierte virale DNA als Präintegrationskomplex in den Zellkern transportiert (Fouchier et al., 1999). Im Zellkern bewirkt schließlich die mitgeführte HIV-Integrase das Aufspalten der Wirtszell-DNA und den Einbau des doppelsträngigen DNA-Moleküls in das Wirtszellgenom (Whitcomb et al., 1992). Derzeit sind drei sogenannte Integrase-Strangtransfer-Inhibitoren verfügbar, die die irreversible Bindung der viralen DNA an die Wirtszell-DNA hemmen.

HIV-1 kann als integriertes Provirus in der Zelle persistieren oder in das Stadium der aktiven Virusproduktion übergehen. Die Synthese des Vorläuferhüllproteins gp160 erfolgt am rauen endoplasmatischen Retikulum. Nach Glykosylierung im Golgi-Apparat wird gp160 zur Zellmembran transportiert und von einer zellulärer Furinprotease in das Oberflächenprotein gp120 und das Transmembranprotein gp41 gespalten. Diese sind nicht kovalent verbunden und werden als Oligomere in die Zellmembran eingelagert (McCune et al., 1988). Die Translation der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine erfolgt im Zytoplasma. Die unprozessierten Polyproteine werden an die Plasmamembran transportiert und dort zusammengelagert. Zusammen mit zwei Kopien ungespleißter genomischer viraler RNA bilden Gag und Gag-Pol unreife Viruspartikel, die unter Aufnahme der Hüllproteine aus der Zellmembran abknospen. Die Reifung zum infektiösen Partikel erfolgt nach autokatalytischer Aktivierung der HIV-1-Protease, die nachfolgend die Gag- und Gag/Pol-Polyproteine in funktionellen Virusproteine spaltet. Strukturelle Umlagerungen der Strukturproteine führen zur Ausbildung des konischen Kapsids. Die Viruspartikel sind nunmehr infektiös. Proteaseinhibitoren, die im aktiven Zentrum der Protease binden, unterbinden das Herausspalten funktioneller Strukturproteine und damit die Reifung der Viruspartikel (Youle, 2007).

1.1.8 Mutationen und Mutationsraten

Mutationen sind natürliche Begleiter der Evolution. Während der Vervielfältigung des genetischen Materials können Mutationen aufgrund von Nukleotid-Fehlpaarungen entstehen. Nukleotide können von einer stabilen zu den seltenen instabilen tautomeren Formen wechseln, die in einem Verhältnis von ca. $1:10^{-4}$ bis 10^{-5} vorkommen (Suen et al., 1999). Entstehen diese tautomeren Formen genau während der Polymerisation eines neuen komplementären Stranges, sind Mutationen die Folge. Mithilfe ihres Korrekturlesemechanismus (3'-5'-Exonukleaseaktivität) erkennt die DNA-Polymerase II falsch gepaarte Nukleotide und entfernt diese durch Hydrolyse. Dies reduziert die Fehlerrate der DNA-Polymerase auf 10^{-9} bis 10^{-10} Nukleotide pro Replikation. Der Reversen Transkriptase von HIV fehlt diese 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Somit zeigt diese, dem Verhältnis von stabilen zu instabilen tautomeren

Formen der Nukleotide entsprechend, eine Mutationsrate von 10^{-4} bis 10^{-5} pro Nukleotid pro Replikation (Suen et al., 1999).

Im Vergleich mit Reversen Transkriptasen anderer Retroviren zeigt das Enzym von HIV-1 eine zehnfach erhöhte Fehlerrate in vitro (Preston et al., 1988). Sowohl die Reverse Transkription als auch die Bildung neuer RNA-Genome durch die RNA Polymerase II sind mit einer Fehlerrate von etwa einem falsch eingebauten Nukleotid pro 10^4 Nukleotiden behaftet. Jedes neu produzierte Virus mit etwa 10 kb besitzt somit durchschnittlich 1-2 fehlerhaft eingebaute Nukleotide (Preston et al., 1988; Roberts et al., 1988). Mutationsfördernde Faktoren können sowohl physikalischer (z.B. UV-Strahlung) als auch chemischer Natur (z.B. Nitrosamine) sein. Des Weiteren wurden die Mitglieder der APOBEC-Familie als mutationsinduzierende Proteine identifiziert (Goila-Gaur et al., 2008).

1.1.9 Variabilität von HIV-1

Die hohe genetische Variabilität von HIV-1 wird ebenfalls auf die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase zurückgeführt. Aufgrund dieser kann HIV sich der Kontrolle durch das Immunsystem entziehen. Die hohe Variabilität führt bei der Behandlung HIV-Infizierter durch die Entstehung Resistenz-vermittelnder Mutationen (RAMs) zum Versagen einer antiretroviralen Therapie (HAART) und erschwert die Entwicklung einer wirksamen Vakzine. Grund für die genetische Variabilität ist neben der bereits erwähnten Mutationsrate der Reversen Transkriptase auch die massive Reproduktionsrate sowie die kurze Generationszeit von HIV (Coffin, 1995; Perelson et al., 1996). Rekombinationsereignisse während der Reversen Transkription erweitern die genetische Variabilität zusätzlich (Srinivasan et al., 1989; Neher et al., 2010).

Ausgehend von wenigen Infektionsereignissen während der Primärinfektion entwickelt sich mit dem Fortschreiten der Infektion aus der anfangs homogenen Viruspopulation eine Quasispezies mit einer Vielzahl von Virusvarianten (Zhu et al., 1993), die sich in Sequenz und Phänotyp unterscheidenden (Simmons et al., 1998) und durch den selektiven Druck des Immunsystems oder der antiretroviralen Therapie in ihrer Evolution beeinflusst werden (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995)

Der Druck des Immunsystems vor allem auf exponierte Proteindomänen des Virus äußert sich in einer großen Sequenzvariabilität im Bereich des *env*-Gens (Kuiken et al., 1993). Innerhalb des Oberflächenglykoproteins gp120 wechseln sich stark variable Bereiche (V1-V5) und konservierte Regionen (C1-C5) ab (Alizon et al., 1986; Starcich et al., 1986). Dabei sind in den variablen Regionen weniger als 25% der Aminosäurereste konserviert (Modrow et al., 1987) und weisen neben Aminosäuresubstitutionen häufig auch kurze Insertionen oder Deletionen auf (Alizon et al., 1986; Starcich et al., 1986).

Von den fünf variablen Bereichen des gp120 zeigen die V3- und die V1/V2-Region die größte Diversität. Die 34-36 AS umfassende V3-Domäne wird von zwei hochkonservierten Cysteinresten flankiert, die über Disulfidbindung eine Peptidschleife arretieren, in dessen Mitte sich ein hochkonserviertes Motiv aus vier AS, das GPGR-Motiv, befindet (Goudsmit et al., 1988; Palker et al., 1988). Die große Variabilität der V1/V2-Regionen zeigt sich vor allem in einer stark variierenden Länge, die die Bindung von neutralisierenden Antikörpern beeinflusst (Rolland et al., 2012; Liao et al., 2013). Spätere Rekombinationsexperimente und Antikörperstudien bestätigten den V3-Bereich als bedeutendste Korezeptor-determinierende Region für die Bindung an die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 (Choe et al., 1996; Xiao et al., 1998).

1.1.10 Tropismus von HIV-1

Die Variabilität der V3-Domäne, die aufgrund der unterschiedlichen Korezeptor-Affinität in einem variablen Wirtszell-Tropismus resultiert, zeigte auch in in vitro Experimenten unterschiedliche Zytotoxizität und Replikationskinetiken (Cheng-Mayer et al., 1991). So besaßen Virusisolate, die zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion isoliert wurden, geringe Replikationsraten und Virustiter in vitro und konnten in primären Makrophagen kultiviert werden. Isolate des selben Patienten aus fortgeschrittenen Krankheitsstadien infizierten effizient T-Zelllinien und zeigten hohe Replikationsraten. Aufgrund dieser Befunde wurde in einer ersten Nomenklatur zwischen Makrophagen-tropen bzw. Monozyten-tropen (M-tropen) und T-Zell-tropen (T-tropen) Virusvarianten unterschieden (Connor et al., 1994; Fenyo et al., 1994; Miedema et al., 1994). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zeigte sich in der Fähigkeit zur Bildung von Synzytien. Synzytien entstehen in einer HIV-1 infizierten Zellkultur durch die Verschmelzung mehrerer Zellen zu einer Riesenzelle. Diese Fähigkeit besaßen nur T-Zell-trope Viren und wurden nachfolgend als SI (syncytium inducing)-Viren bezeichnet. M-trope Viren zeigten dieses Phänomen nicht und wurden deshalb als NSI (non syncytium inducing)-Viren benannt. 1995 konnte schließlich die variable Expression von Korezeptoren auf den CD4-positiven Zelltypen für den unterschiedlichen Zelltropismus von HIV-1 verantwortlich gemacht werden (Broder et al., 1995) und lieferte damit die Erklärung für die verschiedenen Phänotypen.

1.1.10.1 Die Korezeptoren von HIV-1

Als erster Korezeptor wurde der Chemokinrezeptor CXCR4 identifiziert. Er gehört in die Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen (*engl.*: seven transmembrane G protein coupled receptor; 7TMGPCR) und konnte den T-Zell-tropen HIV-1 Isolaten zugeordnet werden (Feng et al., 1996). Cocchi et al. (1996) konnten den inhibitorischen Effekt der β -Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β auf die Infektion mit M-

tropen Viren in vitro zeigen. Kurz darauf wurde der dazugehörige Rezeptor CCR5 beschrieben (Samson et al., 1998) und als Korezeptor für M-trope HIV-1 Isolate identifiziert (Choe et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996; Alkhatib et al., 1997).

Seit der Entdeckung der Korezeptoren werden die M-tropen NSI Viren aufgrund ihres Korezeptorgebrauchs als CCR5-trope (R5) Viren bezeichnet. Der mit dem Gebrauch des CXCR4-Rezeptors übereinstimmende Phänotyp der T-tropen SI Viren führte demnach zu der Bezeichnung CXCR4-trope (X4) Viren. Doranz et al. (1996) zeigten, dass es neben Viren, die ausschließlich CCR5 oder CXCR4 nutzen, auch solche gibt, die beide Rezeptoren nutzen können und daher als dualtrop bezeichnet werden. Diese Virusstämme treten während des Übergangs vom ausschließlich CCR5- zum ausschließlich CXCR4-gebrauchenden Phänotyp auf (Scarlati, 1997) und induzieren in PBMC-Zellkulturen kleine Synzytien (Schneeweis et al., 1990). Existieren X4- und R5-Viren in einem HIV-1 Infizierten nebeneinander, wird von einer mixed-tropen Viruspopulation gesprochen (Schuitemaker et al., 1992; Connor et al., 1997).

Das Vorherrschen von R5-Viren während der frühen Phase bis zum Auftreten AIDS-assoziiierter Krankheitssymptome kann mit einem Replikationsvorteil der R5-Viren gegenüber X4-Viren in CD4-Zellen erklärt werden. R5-Viren konnten im Vergleich zu X4-Viren die Zellaktivierungslevel unstimulierter PBMCs erhöhen und induzierten in infizierten CD4-Zellen eine höhere Zellproliferation als X4-Viren. Somit zeigen R5-infizierte CD4-Zellen einen selektiven Vorteil gegenüber X4-infizierten CD4-Zellen im Sinne von Überleben und Virusverteilung (Locher et al., 2005). R5-Viren besitzen außerdem eine stärkere N-Glykosylierungsfrequenz als X4-Viren. Dadurch sind R5-Viren weniger immunogen, während X4-Viren der humoralen Restriktion neutralisierender Antikörper stärker exponiert sind (Polzer et al., 2002; Nabatov et al., 2004b; Kalinina et al., 2013).

Die in späteren Stadien auftretenden X4-Viren sind im Allgemeinen vom dualtropen Virustyp, da ausschließlich CXCR4-trope Viren (reine X4-Viren) relativ selten vorkommen (Scarlati et al., 1997). Eine reine X4-Viruspopulation wird nicht bei jedem Patienten sichtbar.

Umstritten ist der Einfluss der X4-Viren auf die Pathogenese und die Wirksamkeit der antiretroviralen Therapie. Obwohl bei einem signifikanten Anteil der HIV-1 Infizierten in AIDS-Stadien R5-Viren nachweisbar sind, kommt es bei Patienten, bei denen ein Wechsel von R5- zu X4-Viren erfolgte, zu einem raschen Absinken der CD4⁺T-Zellzahl und zur Krankheitsprogression (Koot et al., 1993; Connor et al., 1997; Kupfer et al., 1998). Im Gegensatz dazu können X4-Viren von einer antiretroviralen Therapie effektiver supprimiert werden (Philpott et al., 2001). Unklar ist immer noch, ob die Vermehrung der X4-Viren zur dominierenden Viruspopulation eine Folge oder die Ursache der Immundefizienz ist (Schlecht et al., 2008).

1.1.10.2 Bestimmung des Korezeptorgebrauchs von HIV-1

Voraussetzung für die Wirksamkeit von CCR5-Antagonisten als Bestandteil der antiretroviralen Therapie ist das Vorliegen einer R5-tropen Viruspopulation sowie die gleichzeitige Abwesenheit von dualtropen, mixed-tropen oder reinen CXCR4-tropen Viren (Fatkenheuer et al., 2005; Westby et al., 2006). Eine Bestimmung des Tropismus kann durch phänotypische oder genotypische Verfahren erfolgen. Während phänotypische Assays den Korezeptorgebrauch über Virusvermehrung in geeigneten Zellen bestimmen, untersuchen genotypische Methoden die Korezeptor-determinierende Genomregion V3 und sagen anhand der Sequenzinformation mittels Interpretationssystemen den Korezeptorgebrauch vorher (Sierra et al., 2007). Obwohl phänotypische Assays in allen Zulassungsstudien genutzt wurden, gibt es Limitierungen, die zur Nutzung genotypischer Verfahren drängen (Rose et al., 2009). So sind phänotypische Verfahren kosten- und arbeitsintensiver, haben eine begrenzte geographische Verfügbarkeit und benötigen ein höheres Probenvolumen. Bis zur routinemäßigen Nutzung hochauflösender Sequenzierverfahren (next generation sequencing, ultra deep sequencing) lag ein bedeutender Vorteil der phänotypischen Verfahren in der sensitiveren Detektion (zwischen 1-10%) minorer X4-Varianten. Die genotypischen Verfahren konnten dagegen mit der konventionell verwendeten populations-basierten Sanger-Sequenzierung Minoritäten nur mit einer Sensitivität von ca. 20% nachweisen (Schuurman et al., 1999; Palmer et al., 2005; Low et al., 2007). Mittlerweile erlauben ultrahochoflösende Sequenzierverfahren die Detektion minorer X4-Varianten mit einer Sensitivität von weniger als 0.1 % (Archer et al., 2009). Dabei liefern sie zunächst eine Vielzahl individueller Einzel-Sequenzen, die bioinformatisch aufbereitet und durch Interpretationsprogramme, wie Web-PSSM (<http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>), wetcat (<http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wetcat/v3.html>) und geno2pheno_[coreceptor] (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) ausgewertet werden müssen. Zur Entwicklung bioinformatischer Interpretationsprogramme wie geno2pheno_[coreceptor], die aus der V3-Sequenzinformation den Tropismus vorhersagen können, werden korrespondierende Analysen-Paare phäno- und genotypischer Verfahren benötigt (Lengauer et al., 2006).

1.2 APOBEC

1.2.1 Entdeckung

Eine erste Beobachtung und damit der Hinweis auf die physiologische Bedeutung einer gezielten Nukleotidveränderung der mRNA wurde 1987 in der Arbeitsgruppe um James Scott anhand der mRNA des Apolipoprotein B (Apo B-100) gemacht (Scott et al., 1988). Diese Veränderung (Editing) der mRNA, die durch Deaminierung eines Cytidins zu Uridin eine Triplettänderung von CAA (Gln, Q) zu UAA (Stopcodon) zur Folge hat, resultiert somit in einem verkürzten Protein (Apo B-48). 1993 konnte die Struktur der enzymatisch aktiven Untereinheit des für das Editing verantwortlichen Enzyms aufgeklärt werden. Es wurde APOBEC1 Enzym (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) genannt und der Gruppe der Cytidin-Deaminasen zugeordnet (Teng et al., 1993). Seit der Entdeckung der Activation-induced Cytidine Deaminase (AID) als APOBEC1 ähnliches Protein (Muramatsu et al., 1999) sind eine Reihe APOBEC1 verwandter Proteine mit Cytidin-Deaminase-Aktivität identifiziert und zur APOBEC-Proteinfamilie zusammengefasst worden.

1.2.2 Die APOBEC-Genfamilie und ihre Funktionen

Die Familie der APOBEC-Proteine beinhaltet die Unterfamilien AID und APOBEC1 (lokalisiert auf Chromosom 12), APOBEC2 (Chromosom 6), APOBEC3 (Chromosom 22) und APOBEC4 (Chromosom 1) (Jarmuz et al., 2002) (Abb. 1.5). Der Unterfamilie APOBEC3 (A3) gehören die sieben Mitglieder APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3DE, APOBEC3F, APOBEC3G und APOBEC3H an, deren Gene tandem-artig aufeinanderfolgend auf Chromosom 22 in einem Gencluster kodiert sind. Das gemeinsame Charakteristikum aller Mitglieder der APOBEC-Proteinfamilie ist das Vorhandensein von katalytisch-aktiven Cytidin-Deaminase-Domänen (Jarmuz et al., 2002; Conticello et al., 2005).

APOBEC1 spielt eine wichtige Rolle beim Lipidmetabolismus. Da es das Cytosin an Position 6666 der mRNA des Apo B-100 zu Uracil deaminiert und somit ein Stoppcodon generiert, wird ein verkürztes Apolipoprotein B (Apo B-48) exprimiert (Blanc et al., 2010). Apo B-48 ist ein essentieller Bestandteil von Lipoproteinpartikeln (Transportform der über die Nahrung aufgenommenen Fette) und kann durch seine Trunkierung nicht mehr an den LDL-Rezeptor binden.

AID (activation induced deaminase) wird in den B-Zellen im Keimzentrum der Lymphknoten exprimiert und induziert im Gegensatz zu APOBEC1 Nukleotidveränderungen in der genomischen DNA. Durch Initiierung der somatischen Hypermutation ist es für die Affinitätsreifung von Antikörpern und für den Wechsel des Isotyps der Immunglobuline

verantwortlich (Larijani et al., 2012).

Über die genauen Funktionen von APOBEC2 und APOBEC4 ist bisher nur wenig bekannt. APOBEC2 wird in Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert und man vermutet eine Rolle bei der Embryogenese (Liao et al., 1999; Vonica et al., 2011). APOBEC4 wird in den Hoden exprimiert, und es scheint, dass APOBEC4 in die Spermatogenese involviert ist (Rogozin et al., 2005).

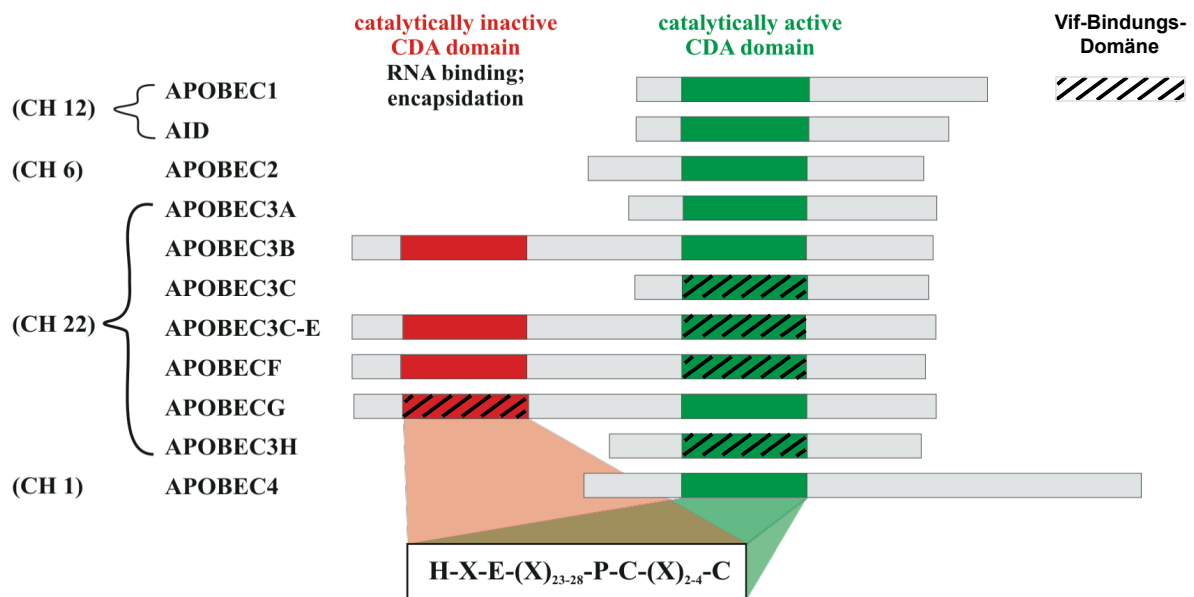


Abbildung 1.4: Die Familie der APOBEC-Proteine

Übersicht über die APOBEC-Unterfamilien und ihre Mitglieder, ausgerichtet am charakteristischen Merkmal dieser Gruppe, der katalytisch-aktiven Cytidin-Deaminase-Domäne (CDA, in grün). Einige Mitglieder tragen eine katalytisch-inaktive Cytidin-Deaminase-Domäne (in rot). Die der CDA zugrundeliegende Konsensus-Sequenz ist im Kasten hervorgehoben. Chromosomale Lokalisation der einzelnen Gene, siehe linker Rand, nach (Goila-Gaur et al., 2008); modifiziert nach (Siu et al., 2013).

1.2.3 APOBEC3-Cytidin-Deaminasen

Die sieben Vertreter der APOBEC3-Proteine zeigen ihre antivirale Aktivität durch die Hemmung der Replikation von HIV-1 und in der Kontrolle der Mobilität endogener Retroelemente (Chiu et al., 2009; Koito et al., 2011). Transpositionen des *Long Interspersed Nuclear Elements-1* (LINE-1) machen ungefähr 17% des humanen Genoms aus und konnten mit einer Reihe schwerer Erkrankungen wie der Duchenne Muskeldystrophie, β -Thalassämie und der Entwicklung von Darmkrebs in Verbindung gebracht werden (Kinomoto et al., 2007). Die Expression von APOBEC3A, 3B, 3C und 3F reduzierte die Retrotransposition von LINE-1-Elementen bis zu 85% (Muckenfuss et al., 2006; Wissing et al., 2011).

Die APOBEC3-vermittelte Restriktion ist nicht nur auf Lentiviren wie HIV-1 begrenzt, sondern

konnte auch für weitere Retroviren wie Foamyvirus (Russell et al., 2005), XMRV (Paprotka et al., 2010), HTLV (Sasada et al., 2005) und andere Virustypen wie HBV (Lei et al., 2006), MV, MuV, RSV (Fehrholz et al., 2012) gezeigt werden.

1.2.4 Restriktion von HIV-1 durch A3G und A3F

Von allen APOBEC3-Proteinen hemmen A3F und A3G die HIV-1-Replikation am wirkungsvollsten und zeigen dabei eine 100- bis 1000-fache Reduktion der Infektiosität (Sheehy et al., 2003; Stopak et al., 2003; Wiegand et al., 2004). Die Restriktion resultiert dabei in erster Linie aus der Deaminierungs-abhängigen Hypermutation des viralen Genoms (Harris et al., 2003; Mangeat et al., 2003; Zhang et al., 2003). In Abwesenheit von Vif werden A3F und A3G aktiv in sich zusammenlagernde Virus-Corepartikel inkorporiert (Mariani et al., 2003; Song et al., 2012) (Abb. 1.7), ihre antivirale Aktivität entfaltet sich aber erst im Infektionszyklus einer neuen Wirtszelle. Nach Reverser Transkription des viralen RNA-Genoms (plus-Strang) werden die entstandenen RNA/DNA-Hybride durch die RNase H zu einzelsträngigen DNA-Molekülen (minus-Strang) prozessiert. A3G und A3F binden am neusynthetisierten DNA-minus-Strang und spalten unter Hydrolyse Aminogruppen vom C4-Atom des Cytosins ab (Suspene et al., 2004). Das durch die Deaminierung entstehende Uracil ist komplementär zu Adenin und führt bei der Synthese des komplementären DNA-Stranges zu einer G-zu-A Mutation des viralen Genoms. Da 3'-lokalisierte DNA-Bereiche dem deaminierenden Effekt der APOBEC3-Proteine stärker ausgesetzt sind, verteilen sich die Mutationen nicht gleichmäßig über das virale Genom, sondern sind 5'-wärts der RNase H-resistenten Polypurin-Trakte (PPT) des Integrase-Gens und nahe des 3'LTRs konzentriert (Abb. 1.6), (Suspene et al., 2006; Wurtzer et al., 2006).

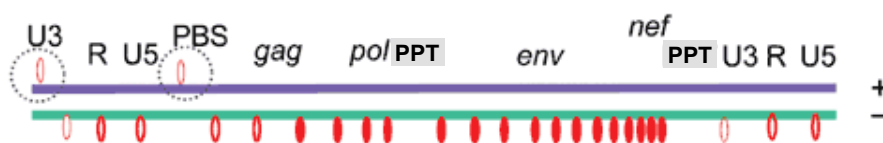


Abbildung 1.5: Verteilung der APOBEC-vermittelten Mutationshäufigkeit im HIV-Genom

Unterschiedliche Expositionszeiten führen zu ungleichmäßiger Verteilung der APOBEC3-vermittelten G-zu-A Mutationen. Nach Reverser Transkription des RNA-plus-Stranges (blau) zeigen die Bereiche 5' der RNase H-resistenten Polypurin-Trakte (PPT, grau unterlegt) verstärkte Cytidin-Deaminierungen (rot-gefüllte Ellipsen) im neu synthetisierten DNA-Strang (grün), adaptiert nach (Yu et al., 2004b).

Obwohl A3G und A3F sich in ihrer Proteinsequenz zu 60 % ähnlich sind, unterscheiden sie sich in einigen Charakteristika, so auch hinsichtlich ihrer DNA-Erkennungssequenz (Wang et al., 2007). Während A3G vorzugsweise das zweite Cytosin im 5'-CC Kontext deaminiert, zeigt A3F eine Präferenz für Cytosin im 5'-TC Dinukleotid (Beale et al., 2004; Bishop et al., 2004; Suspene et al., 2004).

Die Vielzahl an G-zu-A Mutationen im revers-transkribierten HIV-Genom führt zur Degradation der meisten viralen Transkripte, noch bevor sie in das Wirtsgenom integriert werden. Diese Degradation wird zum einen durch zelluläre DNA-Reparaturproteine, wie die Uracil-DNA-Glykosylase (UDG), vermittelt, die Uracil aus DNA herausschneidet, zum anderen durch AP-Endonukleasen (Apurin/Apyrimidin-), die Nucleotide mit fehlenden Basen entfernen. Weiterhin können G-zu-A Mutationen zur Entstehung der Translationsstopp-Triplets TAG, TAA und TGA führen und die Expression nicht-funktioneller Virusproteine zur Folge haben (Chiu et al., 2009). A3F und A3G enthalten wie APOBEC3B und APOBEC3C-E zwei durch Duplikation entstandene Cytidin-Deaminase-Domänen, die von einer pseudoaktiven Domäne unterbrochen werden (Abb. 1.5). Während die C-terminale Cytidin-Deaminase-Domäne katalytische Aktivität besitzt (Shindo et al., 2003; Hache et al., 2005; Schumacher et al., 2008), ist die N-terminale Deaminase-Domäne katalytisch inaktiv und beeinflusst eher die Intensität der DNA-Editierung (Feng et al., 2011). Die konserviertesten Positionen des charakteristischen Motivs der Deaminase-Domäne sind drei Zn^{2+} -koordinierende Reste (His und zwei Cys) und die Aminosäure Glu, welche den Protonentransport während der Katalyse gewährleisten (Abb. 1.5) (Jarmuz et al., 2002).

APOBEC-Proteine liegen normalerweise als Homodimere vor (Jarmuz et al., 2002), für A3F konnte aber auch eine Heterodimerisierung mit A3G beschrieben werden (Wiegand et al., 2004). Die Zink-koordinierenden AS (H_{65} , C_{97} , C_{100}) der pseudoaktiven N-terminalen Domäne vermitteln die Multimerisierung von A3G und seine Inkorporation in das Viruspartikel. Weitere AS ($Y_{124}YFW_{127}$) ebenso wie eine direkte Interaktion mit RNA sind für Multimerisierung und Inkorporation essentiell (Cen et al., 2004; Huthoff et al., 2007). Diese RNA-Brücke assoziiert A3G und A3F mit Gag-Vorläuferproteinen während der Core-Partikelbildung und gewährleistet so die Einschleusung in das Viruskapsid (Alce et al., 2004; Burnett et al., 2007).

Während des Zusammenbaus der Core-Partikel werden ca. 7 (± 4) A3G-Moleküle pro Viruspartikel inkorporiert, die ausreichend für die effektive Hemmung der HIV-Replikation sind (Xu et al., 2007). Innerhalb der Partikel liegt A3G zusammen mit dem viralen RNA-Genom und den Proteinen NC, IN und Vpr in einem Ribonukleoprotein-Komplex vor, der die intrinsische Deaminaseaktivität von A3G hemmt, jedoch durch die RNase H-Aktivität während der Reversen Transkription wieder aufgelöst wird (Soros et al., 2007). Somit entfaltet A3G seine antivirale Aktivität erst nach Infektion einer neuen Wirtszelle (Stenglein et al., 2008).

In Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der CD4-Zellen liegen A3G und A3F im Zytoplasma in hochmolekularen (HMM, high molecular mass) enzymatisch-inaktiven Ribonukleoprotein-Komplexen oder in einer niedermolekularen (LMM, low molecular mass) enzymatisch-aktiven Form vor (Abb. 1.7) (Stopak et al., 2003; Wang et al., 2007). Ruhende CD4-Zellen exprimieren A3G in der LMM-Form, das so seine Funktion als potenter HIV-1-Restriktionsfaktor erfüllen kann. Eine Aktivierung der CD4 T-Zellen oder eine Differenzierung von Monozyten zu

Makrophagen rekrutiert A3G in 5–15 MDa schwere hochmolekulare Komplexe (Stopak et al., 2007; Chiu et al., 2009), die eine Restriktion der Alu-Retrotransposition, aber keine antivirale Aktivität zeigen (Esnault et al., 2005; Chiu et al., 2006). Eine in vitro-Inkubation der HMM-Komplexe von A3G mit RNase A zerlegt diese in die Deaminase-aktive, viral-restriktive LMM-Form, die einem Mono- oder Dimer (~47-95 kDa) entspricht (Chiu et al., 2005). HMM-Komplexe von A3F zeigen sich dagegen RNase-resistent (Wang et al., 2007).

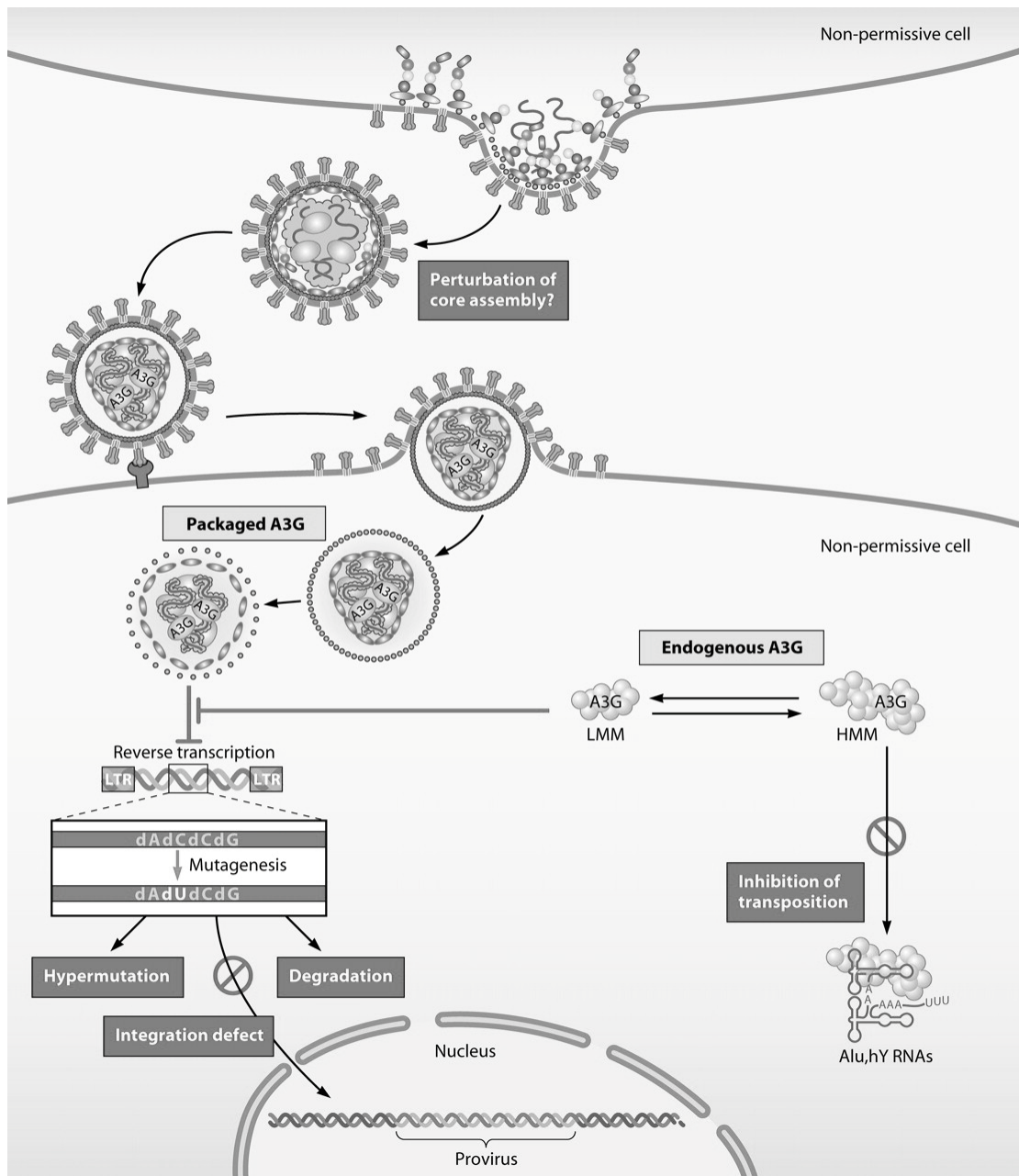


Abbildung 1.6: A3G-vermittelte Restriktion von HIV in Abwesenheit von Vif, nach (Henriet et al., 2009).

Katalytisch-inaktive A3G-Mutanten zeigten, dass die Restriktion der Virusreplikation zu einem gewissen Anteil auch auf Deaminase-unabhängigen Mechanismen basiert (Newman et al., 2005; Bishop et al., 2008; Chiu et al., 2009). Dazu gehört zum einen die A3G- und A3F-eigene Fähigkeit ssRNA zu binden und so die Elongation der Reversen Transkripte zu behindern. Zum anderen inhibieren A3G und A3F durch ihre Affinität zu DNA den Transfer des DNA-plus-Stranges und die Integration des viralen Provirus (Abb. 1.7) (Mbisa et al., 2007; Henriët et al., 2009; Mbisa et al., 2010).

1.2.5 Restriktion von A3G und A3F durch Vif

Seit im Jahre 2002 A3G als Gegenspieler von Vif identifiziert wurde (Sheehy et al., 2002), konnte der Einfluss des akzessorischen Proteins Vif (viral infectivity factor) auf die Infektiosität von HIV-1 in nicht-permissiven Zellen erklärt werden (von Schwedler et al., 1993).

Nachfolgende Studien zeigten, dass Vif die Ubiquitin-abhängige Degradation von A3G und A3F durch das zelluläre 26S Proteasom induziert und somit die antivirale Aktivität neutralisiert (Marin et al., 2003; Sheehy et al., 2003). Aber auch Degradations-unabhängige Mechanismen tragen zur Restriktion APOBECs bei. In diesem Zusammenhang wurde eine Vif-induzierte Hemmung der APOBEC-mRNA Translation (Stopak et al., 2003; Mercenne et al., 2010), die Blockade der A3G-Partikelinkorporation durch kompetitive Bindung der Inkorporations-vermittelnden Bereiche (Goila-Gaur et al., 2008) und die Vif-vermittelte Rekrutierung von A3G in antiviral-inaktive HMM-Komplexen beschrieben (Goila-Gaur et al., 2008).

Mutationsanalysen identifizierten mehrere im N-terminalen Bereich von Vif lokalisierte Sequenzbereiche für die Interaktion mit A3G/A3F. Die Motive Y₄₀RHHY₄₄ und Y₆₉XXL₇₂ vermitteln die direkte Interaktion mit A3G, wohingegen die Interaktion mit A3F über D₁₄RMR₁₇ und Y₆₉XXL₇₂ vermittelt wird (Schrofelbauer et al., 2004; Russell et al., 2009b). Weiterhin konnten zusätzliche Regionen in Vif identifiziert werden, die zwar nicht direkt mit A3G interagieren, jedoch dessen antivirale Restriktion beeinflussen (Chen et al., 2009; Dang et al., 2009).

Als Vif-Interaktionsdomäne wurde für A3G die N-terminale Deaminase-Domäne (AS F₁₂₆WDPDYQ₁₃₂), für A3F dagegen die C-terminale Region (AS ₂₈₃₋₃₀₀) beschrieben (Abb. 1.5) (Zhang et al., 2008; Russell *et al.*, 2009b). Die Interaktion zwischen Vif und A3G/A3F initialisiert den proteasomalen Abbau und rekrutiert einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex (Yu *et al.*, 2004b; Mehle *et al.*, 2006).

1.3 Ziele der Arbeit

APOBEC3G und APOBEC3F wurden als zelluläre Restriktionsfaktoren gegenüber HIV identifiziert. Als Teile des angeborenen Immunsystems agieren sie gegen retrovirale Infektionen durch Mutagenisierung der einzelsträngigen proviralen DNA. Das HIV-spezifische Protein Vif kann die antivirale Aktivität von APOBEC abschwächen oder sogar neutralisieren.

HIV benutzt zwei unterschiedliche Korezeptoren, CCR5 und CXCR4, wobei der Gebrauch durch HIV determiniert wird und im Laufe der Infektion wechseln kann. Während CCR5-trope Varianten in frühen Stadien der HIV-Infektion dominieren, können CXCR4-trope Varianten in späteren Stadien die Vorherrschaft übernehmen. Ein Wechsel des Tropismus von CCR5 zu CXCR4, auch als Korezeptorswitch bezeichnet, ist mit einer Krankheitsprogression assoziiert. Aufgrund der unterschiedlichen Korezeptoraffinität ist der Tropismus-determinierende Bereich von HIV, die V3-Region des *env*-Gens, bei X4-Viren stärker positiv geladen als bei R5-Viren. Zur Interpretation des Tropismus anhand der Sequenzinformation des V3-Bereichs stehen bioinformatische Interpretationssysteme zur Verfügung, die in der vorliegenden Arbeit genutzt werden.

Um einen möglichen Einfluss von APOBEC auf den Tropismuswechsel von HIV zu untersuchen, soll in dieser Arbeit die mutagene Aktivität von APOBEC auf den *env*-V3-Bereich analysiert werden.

Die Arbeit gliedert sich in eine statistische Analyse, die die Unterschiede zwischen R5- und X4-Sequenzen bezüglich APOBEC untersucht. Durch eine erweiterte Analyse soll geprüft werden, ob Unterschiede in der Aminosäurekomposition bei R5- und X4-Viren durch die Deaminase-Aktivität von A3F oder A3G erklärbar sind. Es soll aufgedeckt werden, ob die entsprechenden APOBEC-Motive von A3G und A3F (GG und GA) im V3-Bereich von R5- und X4-Sequenzen unterschiedlich häufig vorkommen und ob der Unterschied auf die Aktivität von APOBEC zurückzuführen ist. Weiterhin soll statistisch analysiert werden, ob APOBEC-assoziierte G-zu-A Mutationen, die einen Wechsel von negativ zu positiv geladenen Aminosäuren nach sich ziehen, als Unterscheidungsmerkmal tatsächlich zwischen R5- und X4-Sequenzen auftreten.

In Zellkultursystemen mit den entsprechenden APOBEC- und Vif-Varianten soll die Hypothese der Beteiligung von APOBEC am Korezeptorswitch durch die Zunahme von X4-Varianten geprüft werden. Dazu sollen Zellkultursysteme etabliert werden, in denen kontrolliert die Aktivitäten und gegenseitige Beeinflussung von Virus und Wirtszelle benutzt werden, die Auswirkungen auf die Aminosäurekomposition des V3-Bereichs zu untersuchen. Während Vif-Proteine von Wildtyp-HI-Viren eine vollständige Neutralisation APOBECs induzieren können, werden Vif-defiziente Viren APOBEC-abhängig inhibiert. Vif-defiziente Viren sind Varianten des *vif*-Gens, die in Elite-Controllern oder Long-Term-Non-Progressors identifiziert werden konnten, jedoch auch in HIV-Patienten mit Therapieversagen. Je nach APOBEC-Menge in der Zelle

kann die uneingeschränkte APOBEC-Aktivität zu einer letalen Hypermutation und damit zur Blockade der HIV-Replikation führen oder durch gesteigerte Mutationsraten die Diversität der Viruspopulation erhöhen.

Um die Auswirkungen der mutagenen Aktivität von A3G und A3F auf HIV gezielt zu untersuchen, sollen Zellkultursysteme mit jeweils kontrollierter A3G/A3F-Aktivität hergestellt werden. Varianten mit unterschiedlicher Vif-Defizienz sollen die APOBEC-Aktivität modulieren, um die mutagene Wirkung gradueller APOBEC-Aktivitäten darzustellen. Zusätzlich sollen die Effekte der Vif-Varianten in PBMC-Kulturen mit unterschiedlich intrazellulären APOBEC-Mengen untersucht werden.

Die jeweilige Wirkung wird anhand der Entstehung mutierter HIV-Varianten kontrolliert. Eine hochauflösende Sequenzanalyse (next generation sequencing) im V3-Bereich identifiziert die entstehenden Mutationen, die im Hinblick auf den Tropismus analysiert werden. Mittels bioinformatischer Interpretationssysteme können die Sequenzinformationen des V3-Bereichs zur Tropismusvorhersage genutzt werden. Die entstehenden Mutationen werden auf HIV-Region und APOBEC-Motiv differenziert und entsprechende Mutationsraten statistisch ausgewertet.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen Faktoren, die die Entstehung von X4-Viren fördern, aufzeigen, da die Mechanismen, die zum Korezeptorswitch führen, bislang immer noch weitgehend unklar sind.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Statistische Analyse

2.1.1 Sequenzdatensätze der statistischen Analyse

2.1.1.1 Sequenzdaten aus der Los Alamos Datenbank

Aus der Los Alamos Datenbank wurden Nukleotidsequenzen der HIV-1 V3-Region von Viren mit experimentell bestimmtem Korezeptor-Tropismus ausgewählt. Zur Vermeidung statistischer Verzerrungen wurde bei Vorliegen mehrerer Sequenzen eines Patienten nur eine Sequenz pro Patient zufällig ausgewählt und verwendet. Somit ergab sich ein Datensatz mit 1026 V3-Sequenzen, von denen 874 als R5-trop und 152 als X4-trop in der Datenbank annotiert waren. Die Sequenzen wurden mit Hilfe von CLUSTALW (Larkin et al., 2007) in Proteinsequenzen übersetzt und aneinander ausgerichtet (aligniert). Dieses Alignment der Proteinsequenzen diente als Ausgangsmatrix für die Analyse mit dem geno2pheno_[corezeptor] Alignment-Verfahren (Thielen et al., 2012). In diesem wird jede V3-Loop-Sequenz einzeln an einem Sequenz-Referenzprofil ausgerichtet, welches Lücken an bekannten Insertionspositionen erlaubt. Anhand des so erstellten Aminosäure-Alignments wurden dann die korrespondierenden Nukleotidsequenzen aneinander ausgerichtet und entsprechend ihres Tropismus in R5- und X4-Datensätze geteilt. In jedem Datensatz wurde anschließend der prozentuale Anteil eines jeden Nukleotids (A, C, G, T) an jeder Position der V3-Region bestimmt.

2.1.1.2 Sequenzdaten des HIV-GRADE Konsortiums

501 V3-Sequenzen (349 davon mittels geno2pheno_[corezeptor] als R5-trop klassifiziert, 152 als X4-trop) wurden von der HIV-GRADE Datenbank zur Verfügung gestellt (www.hiv-grade.de). Die Sequenzen stammen von Patienten-Proben, die aufgrund eines möglichen Therapieeinsatzes des CCR5 Antagonisten Maraviroc hinsichtlich ihres Korezeptor-Tropismus mittels des Monogram Trofile Tropism Assays untersucht wurden.

Die Bearbeitung und Analyse der Sequenzdaten erfolgte analog zu dem oben (unter 2.1.1.1) beschriebenen Verfahren. Die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Sequenzen aus der Los Alamos und HIV-GRADE Datenbank erfolgte anhand der Supty B V3-Konsensussequenz "Consensus B" (Los Alamos HIV Sequence Database, November 16th 2009).

2.1.1.3 Longitudinale Sequenzdaten

Zusätzlich zu den Los Alamos und HIV-GRADE Datensätzen mit jeweils einer Sequenz pro Patient (cross sectional data) wurden auch 26 longitudinale Sequenzdaten von 10 HIV-Patienten aus der RESINA Kohorte analysiert (Reuter et al., 2011). Im Rahmen des RESINA Projektes werden Plasmaproben von HIV-Infizierten vor Beginn einer antiretroviralen Therapie gesammelt und analysiert. Dazu wurde die HIV-RNA aus den Plasmaproben isoliert und die V3-Region mittels Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) und Nested PCR amplifiziert und sequenziert. Die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Proben betragen im Minimum einen Monat. Mit Hilfe des Korezeptor-Vorhersage-Tools $\text{geno2pheno}_{[\text{coreceptor}]}$ wurde der Tropismus dieser Sequenzen vorhergesagt. Das $\text{geno2pheno}_{[\text{coreceptor}]}$ -Tool ermittelt eine Wahrscheinlichkeit der falschen Vorhersage eines X4-Tropismus in Form einer Falsch-Positiv-Rate (FPR). Je niedriger die FPR, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass CXCR4-trope Viren vorherrschen. Nach den europäischen Leitlinien zur Vorhersage des Korezeptorgebrauchs entspricht eine FPR von größer 20 % einer R5-tropen und eine FPR von kleiner 10 % einer X4-tropen Viruspopulation. FPR-Werte zwischen 10 % und 20 % sollten mit phänotypischen Verfahren überprüft werden (Vandekerckhove et al., 2011).

2.1.2 Statistische Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung von V3 Sequenzen mit definiertem Tropismus

Um die Verteilung der verschiedenen Nukleotide innerhalb der V3-Region in Bezug auf die R5- und X4-Sequenzen zu bestimmen, wurde zuerst die Häufigkeit (*engl.* frequency, f) jedes Nukleotids (nt) an jeder Sequenzposition innerhalb der R5- und X4-Datensätze errechnet.

$$f_{R5/X4, \text{Position}}(nt)$$

Häufigkeit (f) des Nukleotids (nt) X (G, A, C oder T) im R5- oder X4-Datensatz an einer bestimmten Position Y in der V3-Region.

Die Unterschiede (*engl.* differences, d) der Häufigkeiten zwischen R5- und X4-Sequenzen wurden bestimmt, um eine mögliche Verschiebung von einem Nukleotid zu einem anderen anzuzeigen.

$$d_{\text{Position}}(nt) = f_{R5, \text{Position}}(nt) - f_{X4, \text{Position}}(nt)$$

Unterschiede (d) der Häufigkeit des Nukleotids (nt) X an der Position Y ist gleich die Häufigkeit des Nukleotids (nt) X an der Position Y im R5-Datensatz minus die Häufigkeit des Nukleotids (nt) X an der Position Y im X4-Datensatz.

Zuletzt wurden die Differenzen der Häufigkeiten mit Hilfe des Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten Rho (R) (von Bravais und Pearson) korreliert. Dieser Korrelationskoeffizient gilt als Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen und kann Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen. Besitzt Rho einen Wert von $+1$ (bzw. -1), so besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Bei einem Korrelationskoeffizient von 0 gibt es keine lineare Abhängigkeit der beiden Merkmale voneinander. Der so berechnete Korrelationskoeffizient weist in unserm Fall darauf hin, ob beim Vergleich von R5- und X4-Viren an einer bestimmten Position z.B. eine Mutation von einem C zu einem T stattfindet. In diesem Falle würde die Änderung der Häufigkeit des Nukleotids C an einer bestimmten Position $dPos(C)$ der Änderung der Häufigkeit des Nukleotid T an dieser Position $dPos(T)$ entsprechen, d.h. der relative Abfall von C in den R5 Viren würde durch einen ähnlichen Anstieg von T in den X4 Viren kompensiert. Erfolgt keine direkte Mutation von C zu T, liegen die Unterschiede in den Häufigkeiten nicht in einer ähnlichen Größenordnung.

2.2 Biologische Materialien

2.2.1 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli JM109</i>	Transformationen im Rahmen von Plasmidpräparationen (Promega GmbH, Mannheim)
<i>Epicurian coli XL1 blue</i>	anspruchsvolle Transformationen (Stratagene GmbH, Heidelberg)
<i>Escherichia coli One Shot XL</i>	Transformation nach Mutagenese (Invitrogen, Karlsruhe)

2.2.2 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Charakterisierung, Referenz	Herkunft
M7R5	CEMx174-Abkömmling, periphere T-Lymphoblasten, stabil transfiziert mit einem modifizierten Konstrukt des CCR5 Rezeptors, EGFP und Luciferase unter der Kontrolle der HIV-Promotors (Brandt et al., 2002).	zur Verfügung gestellt von S. Pöhlmann
PM1	Abkömmling der Hut 78 Zellen, exprimiert den CD4-, CXCR4- und CCR5-Rezeptor und kann sowohl von R5- als auch von X4-tropen Virusstämmen infiziert werden (Lusso et al., 1995).	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program

293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, exprimiert nach stabiler Transfektion das SV40 T-Ag und erlaubt damit die DNA-Replikation von Plasmiden mit SV40 Origin (Sena-Esteves et al., 1999).	zur Verfügung gestellt von H. Walter
SupT1	Humane lymphoblastische T-Zell-Lymphom-Zelllinie, exprimiert den CD4-Rezeptor (Smith et al., 1984).	zur Verfügung gestellt von HG. Kräusslich
SupT1R5	Abkömmling von SupT1 Zellen, exprimiert zusätzlich stabil den CCR5-Rezeptor (Means et al., 2001).	zur Verfügung gestellt von HG. Kräusslich

2.2.3 Plasmide und Vektoren

2.2.3.1 Expressionsplasmide

Im Labor vorhanden:

pET14b (4,7 kb) erlaubt die Expression von Proteinen, die N-terminal mit einem Epitop aus sechs Histidinresten fusioniert sind, unter der Kontrolle eines T7-Promotors (Novagen, Madison, USA).

pcDNA3 (5,4 kb) erlaubt die Expression von Proteinen unter der Kontrolle eines T7- und des CMV-Promotors (Invitrogen, Karlsruhe).

pcDNA4/TO/myc-HisB (5,1 kb) ist ein Expressionsvektor, welcher einen Hybrid-Promotor bestehend aus humanem CMV immediate-early Promoter und zwei Tetrazyklin Operator (TetO₂) Elementen besitzt und somit eine Tetrazyklin-regulierte Expression des zu untersuchenden Gens erlaubt (Invitrogen, Karlsruhe).

pcDNA3.1/APOBEC3G (6,6 kb) erlaubt die Expression von APOBEC3G unter der Kontrolle des T7- bzw. CMV-Promotors, als Ausgangsvektor für die Klonierung und als Standardplasmid für Realtime-PCR verwendet (zur Verfügung gestellt von Michael Malim, King's College London).

pcDNA3.1/APOBEC3F (6,4 kb) erlaubt die Expression von APOBEC3F unter der Kontrolle des T7- bzw. CMV-Promotors als Ausgangsvektor für die Klonierung und als Standardplasmid für Realtime-PCR verwendet (zur Verfügung gestellt von Michael Malim, King's College London).

pcDNA6/TR (6,7 kb) ist ein regulatorischer Vektor, welcher den Tetrazyklin-Repressor unter der Kontrolle des humanen CMV Promotors exprimiert (Invitrogen, Karlsruhe).

pTBP (6,9 kb) Bakterieller Expressionsvektor, der die cDNA des TATA-box Binding Proteins (TBP) enthält und als Standardplasmid für Echtzeit-PCR verwendet wurde.

pHPRT (3,1 kb) enthält die cDNA der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT) und wurde als Standardplasmid für Realtime-PCR verwendet.

pEGFP (4,2 kb) exprimiert unter dem CMV-Promotor die cDNA des Gens EGFP (enhanced green fluorescent protein). Das EGFP entstammt dem GFP-Gen, bei dem durch eine zweifache AS-Substitution eine Steigerung der Fluoreszenz und Expression erreicht wurde

pUHC13-3 exprimiert unter der Kontrolle eines tetO-CMV-minimal Promotors ein Luziferase-Reporter-Konstrukt (Gossen and Bujard, 1992; zur Verfügung gestellt von Gertrud Steger).

In dieser Arbeit generiert:

pcDNA4/TO/A3F basiert auf dem Vektor pcDNA4/TO/myc-HisB, in den unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen HindIII und XhoI die cDNA von APOBEC3F kloniert wurde, ermöglicht somit die Expression von APOBEC3F nach Tetrazyklin-Induktion.

pcDNA4/TO/A3G basiert auf dem Vektor pcDNA4/TO/myc-HisB, in den unter Verwendung der Restriktionsenzyme HindIII und XhoI die cDNA von APOBEC3G kloniert wurde, ermöglicht somit die Expression von APOBEC3G nach Tetrazyklin-Induktion.

pET14b_NL4-3 beinhaltet ein 2,3 kb umfassendes, durch PCR generiertes NL4-3 Fragment, welches mithilfe der Restriktionsenzyme BamHI und Sall in pET14b kloniert wurde. Diente als Ausgangsvektor zur Generierung der Vif-Mutationen (K22E, Y40H, E45G).

pET14b_K22E entstand nach sequenzspezifischer Mutagenese und enthält im NL4-3 Fragment die Vif-Mutation K22E.

pET14b_Y40H entstand nach sequenzspezifischer Mutagenese und enthält im NL4-3 Fragment die Vif-Mutation Y40H.

pET14b_E45G entstand nach sequenzspezifischer Mutagenese und enthält im NL4-3 Fragment die Vif-Mutation E45G.

2.2.3.2 Virusplasmide

Im Labor vorhanden:

pNL4-3 (14,8 kb) pUC18-Vektor mit rekombinantem infektiösem proviralem HIV-1 Genom, wurde erstmals beschrieben von Adachi, 1986 (Adachi et al., 1986), (EMBL-Datenbank Nr. M19921) und kann über das NIH AIDS Research and Reference Reagent Programm

(Katalog-Nr. 114) bezogen werden.

pNL4-3_vif(-) (14,6 kb) entstammt dem pNL4-3 Klon und trägt eine 178-bp Deletion im vif-Gen, die zu einer Leserasterverschiebung führt, beschrieben unter Karczewski et al., 1996. Zur Verfügung gestellt von H. Walter, Erlangen.

pCAGGStat-envR5 (7,9 kb) exprimiert unter dem CMV-Promotor und dem Huhn- β -Aktin-Promotor das erste Exon des *tat*-Gens und das Glykoprotein gp160 des CXCR4-tropen HIV-1-Referenzstammes NL4-3 Subtyp B, welches durch sequenzspezifische Mutagenese in der V3-Region in ein CCR5-tropes Envelope mutagenisiert wurde (J. Münch, pers. Mitteilung).

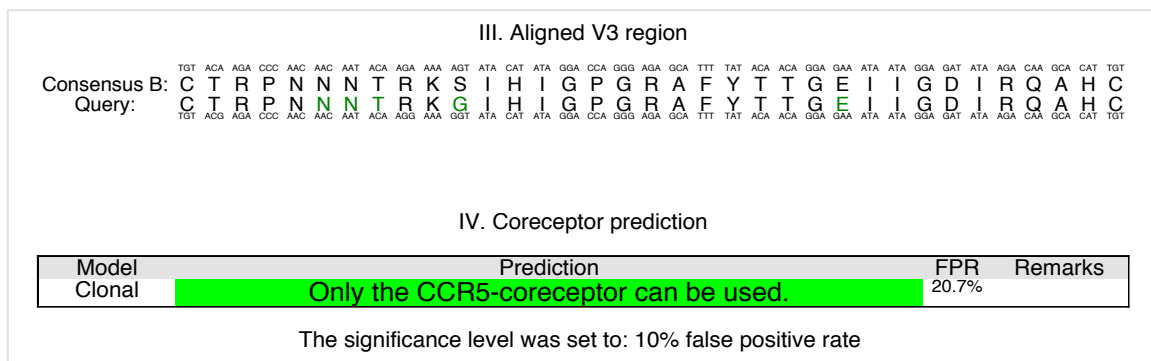


Abbildung 2.1: V3-Sequenz und Vorhersage des Korezeptorgebrauches des pCAGGAtat-envR5-Plasmids

In dieser Arbeit generiert:

pNL4-3_WT_R5 (kurz WT) in pNL4-3 wurde mithilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI das R5-trope Envelope des pCAGGStat-envR5 Vektors kloniert.

pNL4-3_K22E_R5 (kurz K22E) aus dem Hilfsvektor pET14b_K22E, zur Generierung der Vif-Mutation mithilfe sequenzspezifischer Mutagenese verwendet, wurde mittels der Restriktionsenzyme AgeI und EcoRI das mutagenisierte Vif-Konstrukt in pNL4-3_R5 kloniert.

pNL4-3_Y40H_R5 (kurz Y40H) aus dem Hilfsvektor pET14b_Y40H, zur Generierung der Vif-Mutation mithilfe sequenzspezifischer Mutagenese verwendet, wurde mittels der Restriktionsenzyme AgeI und EcoRI das mutagenisierte Vif-Konstrukt in pNL4-3_R5 kloniert.

pNL4-3_E45G_R5 (kurz E45G) aus dem Hilfsvektor pET14b_E45G, zur Generierung der Vif-Mutation mithilfe sequenzspezifischer Mutagenese verwendet, wurde mittels der Restriktionsenzyme AgeI und EcoRI das mutagenisierte Vif-Konstrukt in pNL4-3_R5 kloniert.

pNL4-3_Del_vif_R5 (kurz Del-Vif) in pNL4-3_vif(-) wurde mithilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI das R5-trope Envelope des pCAGGStat-envR5 Vektors kloniert.

Tabelle 2.1 Übersicht über die verwendeten rekombinanten Vif-Varianten

Kurzbezeichnung	Name	Vif	Envelope
WT	pNL4-3_WT_R5	Wildtyp	NL4-3-R5
K22E	pNL4-3_K22E_R5	K22E	NL4-3-R5
Y40H	pNL4-3_Y40H_R5	Y40H	NL4-3-R5
E45G	pNL4-3_E45G_R5	E45G	NL4-3-R5
Del-Vif	pNL4-3_Del_vif_R5	Deletion	NL4-3-R5

2.2.4 Antikörper

2.2.4.1 Primäre Antikörper

anti-A3G	polyklonales IgG aus dem Kaninchen, gegen die 17 C-terminalen AS des humanen APOBEC3G gerichtet, in der Verdünnung 1:5000 im Western Blot eingesetzt (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program)
anti-A3F	polyklonales IgG aus dem Kaninchen, gegen die 18 C-terminalen AS des humanen APOBEC3F gerichtet, in der Verdünnung 1:3000 im Western Blot eingesetzt (zur Verfügung gestellt von Michael Malim)
anti-β-actin	Monoklonales IgG1, Klon C4, aus der Maus, in der Verdünnung 1:5000 im Western Blot eingesetzt (Millipore)
CD4-APC	Monoklonales IgG ₁ (Klon RPA-T4) aus der Maus, gerichtet gegen CD4 und gekoppelt an APC, 1:50 verdünnt eingesetzt zur Durchflusszytometrie-Analyse (BD Bioscience, Heidelberg)
CCR5-PE	Monoklonales IgG _{2a} (Klon 2D7/CCR5) aus der Maus, gerichtet gegen CD195 und gekoppelt an PE, 1:50 verdünnt eingesetzt zur Durchflusszytometrie-Analyse (BD Bioscience, Heidelberg)
CXCR4-PE	Monoklonales IgG _{2a} (Klon 12G5) aus der Maus, gerichtet gegen CD184 und gekoppelt an PE, 1:50 verdünnt eingesetzt zur Durchflusszytometrie-Analyse (BD Bioscience, Heidelberg)
IgG2a-Isotyp-PE	Monoklonales IgG _{2a} (Klon S43.10) Isotyp-Kontroll-Antikörper aus der Maus, gekoppelt an PE, 1:50 verdünnt eingesetzt zur Durchflusszytometrie-Analyse (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

2.2.4.2 Sekundäre Antikörper

anti-rabbit-HRP	Peroxidase-konjugiertes anti-Kaninchen IgG aus der Ziege, im Western Blot in der Verdünnung 1:10000 eingesetzt (Dianova)
anti-mouse-HRP	Peroxidase-konjugiertes anti-Maus IgG aus der Ziege, im Western Blot in der Verdünnung 1:3000 eingesetzt (Dianova)

2.2.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für qualitative PCR, Sequenzierungen und invitro Mutagenesen wurden von der Firma Operon Biotechnologies (München) bezogen. Die Oligonukleotide für die quantitative Analyse wurden bei tib-Molbiol (Berlin) synthetisiert.

2.2.5.1 Oligonukleotide für die quantitative Analyse

Name	Genebank-ID; Lokalisation	Sequenz 5' → 3'
A3FsH	NM_145298.5; Nt 434 → 451	ccgtttggacgcaaagat
A3FasH	NM_145298.5; Nt 560 ← 540	ccaggtgatctggaaacactt
UPL27	NM_145298.5; Nt 527 → 537	gctgcctg
A3GsH	NM_021822.3; Nt 668 → 686	ccgaggacccgaaggttac
A3GasH	NM_021822.3; Nt 826 ← 807	tccaacagtgtgaaattcg
UPL79	NM_021822.3; Nt 735 → 742	ccaggagg
TBPsh	NM_003194.2; Nt 703 → 720	cccatgactcccatgacc
TBPasH	NM_003194.2; Nt 788 ← 810	tttacaaccaagattcactgtgg
UPL51	NM_003194.2; Nt 728 → 735	ggcaggag
tetR_UPL_F	U89929.1; Nt 1274 → 1296	cgccattattacgacaagctatc
tetR_UPL_R	U89929.1; Nt 1330 ← 1350	caattcaaggccgaataagaa
UPL21	U89929.1; Nt 1319 → 1326	cagagcca
HPRT1F	NM_000194.2; Nt 578 → 598	tgacactggcaaaacaatgca
HPRT1R	NM_000194.2; Nt 650 ← 671	ggtcctttcaccagcaagct

2.2.5.2 Oligonukleotide für die PCR und Sequenzierung

Name	Position in NL4-3	Sequenz 5' → 3'
6955RQ	6955←6973	ccatgtgtRcattgtactg
H3466BamHIs	3466→3491	acagggggatcctaaaagaaccgga
Env-R	7810←7836	agtgtctctgtctctcyaagaacct
Env-F	6595→6617	caaagcctaaagccatgtgtaa
Env-2F	6863→6889	gtccaaaggatccttgagccaattc

Env-2R	7738←7767	caccactctctctttgccttggtgggtgc
KVL072mod_8365s	8365→8390	aatagagtaggmagggatattcacc
KVL073	9634←9655	actcaaggcaagctttattgag
KVL074	8531→8548	ggarcctgtgcctctca

2.2.5.3 Oligonukleotide für die in vitro-Mutagenese

Name	Position in NL4-3	Sequenz 5' → 3'
K22E_s	5080→5130	gacaggatgaggattaacacatgggagagattagtaaacaccatagtat
K22E_as	5080←5130	atacatatggtgtttactaatctctcccatgtgtaatcctcatcctgtc
Y40H_s	5135→5180	caaggaaagctaaggactggttcatagacatcactatgaaagtac
Y40H_as	5135←5180	gtactttcatagtgtatgtctatgaaaccagtccttagcttctcttg
E45G_s	5149→5199	gactggtttatagacatcactatggaagtactaatcaaaaaataagtca
E45G_as	5149←5199	tgaactatttttgattagtacttccatagtgtatgtctataaacaccagtc
W79A_s	5257→5294	catacaggagaaagagacgcgcatttgggtcagggagt
W79A_as	5257←5294	actccctgacccaaatgcgctctcttctctctgtatg

2.2.6 Kits und Längenstandards

QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
UPL TaqMan® Universal PCR Master Mix	Roche Applied Science, Mannheim
SuperScript® III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
HotStarTaq® DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Applied Science, Mannheim
QIAquick® PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
1kb-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy® RNA Isolation Kit	Qiagen, Hilden
QIAPrep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAPrep® Spin Maxiprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.2.7 Enzyme und Reagenzien

dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
EcoRI, BamHI, Sall, XhoI, AgeI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DMR1E-C Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Superfect® Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen

Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe
Blasticidin	Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Tetrazyklin	Sigma, Taufkirchen
Doxyzyklin	Sigma, Taufkirchen
CCLR	Promega, Mannheim/Dübendorf
BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate	Roche Applied Science, Mannheim
RNase-free DNase	Qiagen, Hilden
Bio-Rad Protein Assay Dye	Bio-Rad Laboratories, München
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
BigDye® Terminator v2.0 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt

Reagenzien zur Selektion und Induktion

Reagenz	Konzentration	Bezogen von:
Ampicillin	100 µg/mL	Sigma, Taufkirchen
Zeocin	22 µg/mL	Invitrogen, Karlsruhe
Blasticidin	6 µg/mL	Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin	3 µg/mL	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Tetrazyklin	1 µg/mL	Sigma, Taufkirchen
Doxyzyklin	1 µg/mL	Sigma, Taufkirchen
Polybrene	2 µg/mL	Sigma-Aldrich, Steinheim
PHA-P	2 v/v%	Life Technologies, Darmstadt
Poly I:C	25 µg/mL	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Il-2	20 U/mL	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

2.2.8 Medien und Pufferlösungen

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	20 g LB wurden in 1L H ₂ O gelöst und autoklaviert, vor Gebrauch mit entsprechenden Antibiotika versetzt
LB-Agar	20 g LB-Agar wurden in 1L H ₂ O gelöst und autoklaviert, nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C mit entsprechenden Antibiotika versetzt und auf 10 cm-Platten gegossen
RPMI (Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640, mit Glutamax)	ohne Natriumpyruvat, mit 4500 mg Glucose, mit Pyridoxin (Invitrogen/Gibco, Karlsruhe), supplementiert mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), mit Streptomycinsulfat 10 mg/l, Penicillin 10.000 U/l versetzt

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, mit Glutamax)	ohne Natriumpyruvat, mit 4500 mg Glucose, mit Pyridoxin (Invitrogen/Gibco, Karlsruhe), supplementiert mit fötalem Kälberserum (FCS) 10% (v/v), mit Streptomycinsulfat 10 mg/l, Penicillin 10.000 U/l versetzt
Trypsin-EDTA	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Streptomycin-Penicillin	10.000 U/mL, Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Opti-MEM (Opti-MEM I Reduced-Serum Medium)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)

2.2.8.1 Sonstige Pufferlösungen

TSB	PEG (MW=3350) 30 mM, DMSO 5%, MgCl ₂ 10 mM, MgSO ₄ 10 mM
FACS Waschpuffer	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , versetzt mit 1% FCS und 0.1% Natriumazid (NaN ₃), steril filtriert

2.2.8.2 Für Proteinanalysen mittels Western Blot

4x Tris/Cl/SDS, pH 8,8	Tris-Base 1,5 M, SDS 0,4% (mit HCl auf pH 8,8 eingestellt)
4x Tris/Cl/SDS, pH 6,8	Tris-Base 0,5 M, SDS 0,4% (mit HCl auf pH 6,8 eingestellt)
Trenngel 12%:	30% Acrylamid 3 mL, Tris/Cl/SDS (pH 8,8) 1,875 mL, H ₂ O 2,63 mL, 10% Ammoniumpersulfat 25 µL, TEMED 5 µL
Sammelgel 4%:	30% Acrylamid 0,65 mL, Tris/Cl/SDS (pH 6,8) 1,25 mL, H ₂ O 3,05 mL, 10% Ammoniumpersulfat 25 µL, TEMED 5 µL
2x SDS-Probenpuffer	TrisCl, pH 6,8; 125 mM, Glycerin 20%, SDS 2%, β-Mercaptoethanol 2%, Bromphenol-Blau 15 µM, (mit HCl auf pH 6,8 eingestellt)
SDS-Elektrophorese-Puffer	Tris-Base 25 mM, Glycin 192 mM, SDS 0,1%
Transfer-Puffer	Tris-Base 25 mM, 192 mM Glycin, 20% Methanol
TBST	Tris/HCl, pH 7,9 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%

2.2.9 Reagenzien und Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Applichem (Darmstadt) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.3 Methoden

2.3.1 Methoden zur Bakterienkultivierung

2.3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Transformationskompetente *E. coli* JM109 wurden nach der Methode von Chung und Miller (1988) hergestellt. Dazu wurden 250 ml LB-Medium mit 10 ml frischer Bakterienkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} zwischen 0,5-0,6 unter Schütteln wachsen gelassen. Die Bakterien wurden 15 min auf Eis inkubiert, dann bei 3000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, in 15 ml kaltem TSB resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in vorgekühlte Eppendorfgefäße zu 100 µL aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz der neu hergestellten kompetenten Bakterien wurde durch eine Testtransformation mit 20 pg eines Testplasmids bestimmt.

2.3.1.2 Transformation

Die Transformation kompetenter Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock. Hierfür wurde die zu transformierende DNA (ca. 1 ng bzw. 10 µL des Ligationsansatzes) mit 100 µl Bakteriensuspension 20 min auf Eis inkubiert und anschließend einem 45-sekündigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach einer weiteren Inkubation (ca. 2 min) auf Eis wurden die Bakterien zur Selektion auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.3.1.3 Kulturen zur Plasmidisolierung

Zur analytischen Plasmidisolierung wurden 5 ml LB-Amp-Medium (mit 100µg/mL Ampicillin) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Rotationsinkubator bei 37°C vermehrt. Für die präparative Plasmidisolierung wurden Bakterienkulturen in 200 ml LB-Amp-Medium (100µg/mL Ampicillin) in einem sterilen Erlenmeyer-Kolben angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

2.3.2 Generierung rekombinanter HIV-Vif-Varianten

2.3.2.1 Sequenz-spezifische Mutagenese und Klonierung

Um rekombinante HI-Viren zu generieren, welche die Vif-Varianten K22E, Y40H und E45G tragen, wurde zunächst ein 3.5 kb (pNL4-3 nt3466-nt6955) umfassendes Fragment des proviralen HIV-Vektors pNL4-3 mittels PCR amplifiziert. Eine präparative Restriktionsanalyse

des gereinigten Amplifikates mit den Restriktionsendonukleasen BamHI and Sall erlaubte die Insertion eines 2.3 kb großen Vif-beinhaltenden Fragmentes in den Vektor pET14b.

Nach Protokoll des *Site-Directed Mutagenesis* Kits der Firma Stratagene wurden unter Verwendung spezifischer Mutageneseprimer die Vif-Variationen K22E, Y40H und E45G in pET14b inseriert. Der Erfolg der Mutagenese im Vif-Bereich von pNL4-3 wurde nach Transformation in *E. coli* JM109 durch Sequenzierung der aus einzelnen Bakterienklonen isolierten Plasmidpräparationen bestätigt.

Der Env-Expressionsvektor pCAGGStat-env_R5 diente als Ausgangssequenz der env-Region. Dazu wurde die R5-trope env-Region mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI in den proviralen HIV-Vektor pNL4-3 inseriert und durch Sequenzanalysen überprüft. Dieser R5-trope provirale HIV-Klon pNL4-3_R5 diente dann als Grundlage für die Insertion der Vif-Varianten K22E, Y40H und E45G aus den pET14b-Konstrukten ebenso wie der NL4-3-Vif-Deletionsmutante Del-Vif über die Restriktionsendonukleasen AgeI und EcoRI. Nach Isolierung der Plasmid-DNA überprüften und bestätigten Restriktions- und Sequenzanalysen den Klonierungserfolg. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde bestimmt und die Plasmide wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.3.2.2 Transfektion

Zur Herstellung rekombinanter Virusüberstände wurden 293T-Zellen zu 1.5×10^6 Zellen in 10cm-Schalen ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurden 6 µg der unter 2.3.2.1 präparierten Plasmid-DNA mit Hilfe des *SuperFect Transfection Reagent* (Firma Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben in die Zellen transfiziert. Nach 3 Stunden wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und zur weiteren Kultivierung unter Standardbedingungen (37°C, 6% CO₂) in DMEM (10% FCS, 1% PS) resuspendiert. Nach 2 weiteren Tagen wurden die Überstände abgenommen und zur Sedimentierung von Zellresten zentrifugiert.

2.3.2.3 Herstellung hochtitriger Überstände

2 ml der unter 2.3.2.2 hergestellten Virusüberstände wurden auf 8 ml mit 1×10^5 SupT1R5 Zellen/mL zur Überinfektion transferiert. Die infizierten SupT1R5-Zellkulturen wurden nach Bedarf gesplittet und bis zu einer Woche kultiviert. Ein tägliches Monitoring kontrollierte das Entstehen von Synzytien (Riesenzellen) oder zytopathischen Effekten (*engl.* cytopathic effect, CPE). Bei einem visuellen CPE-Anteil von über 50% der Zellen wurden die Kulturen zentrifugiert, aliquotiert und die Überstände bei -80°C zur weiteren Verwendung gelagert. Von je einem Aliquot erfolgte die Bestimmung des infektiösen Titers mit Hilfe der TCID 50% (tissue culture infective dose 50%).

2.3.2.4 Bestimmung des infektiösen Titers

Der infektiöse Titer der Virusüberstände, bekannt als TCID₅₀, wurde anhand der Infizierbarkeit von M7R5 Zellen bestimmt. Diese Zellen exprimieren nach HIV-Infektion aufgrund der TAT-vermittelten Aktivierung der Reportergene GFP und Luziferase. Dazu wurden die Virusüberstände 1:5, 1:10, 1:50, 1:250, 1:1250, 1:6250 mit RPMI vorverdünnt, 50.000 M7R5 Zellen in 96 Loch-Platten (in 25 µL) ausgesät und mit 25 µL der verdünnten Überstände unter Zugabe von 2 µg/mL Polybrene infiziert. Nach 2 h wurden 200 µL RPMI zu jedem Ansatz gegeben und diese Ansätze für 4 Tage unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert. Nach 3 und 4 Tagen erfolgte die Bestimmung der GFP positiven Zellen jedes Ansatzes anhand mikroskopischer Beurteilung. Die Berechnung der TCID₅₀ erfolgte nach der Spearman-Kärber-Formel (Villegas, 1998):

$$\lg(\text{TCID}_{50}) = \frac{1}{2} - \lg(a) - \frac{\lg(v) \cdot n^-}{n}$$

a = höchste getestete Verdünnung

n⁻ = Anzahl der Wells, die keinen CPE aufweisen

n = Anzahl der Wells pro Verdünnungsstufe

2.3.3 Zellkulturmethoden eukaryontischer Zellen

2.3.3.1 Stimulation von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs)

Aus EDTA-Blut gesunder Spender wurden PBMCs über einen Ficoll-Gradienten isoliert und die Erythrozyten durch 5 minütiges Inkubieren in 155mM Ammoniumchlorid lysiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die PBMCs zu 1x10⁶ Zellen/mL in RPMI1640 aufgenommen. Zur Stimulation der PBMCs wurden diese mit Phytohämagglutinin (PHA, Gibco) 2 v/v % für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden zur weiteren Kultivierung 20 U Interleukin-2 pro mL Medium zugegeben.

2.3.3.2 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Die hier verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, 6% CO₂ und 80-90% Luftfeuchtigkeit in geeignetem Medium in Zellkulturflaschen kultiviert. Die gesamten Zellkulturarbeiten fanden unter einer Sterilwerkbank statt.

2.3.4 Generierung einer stabil transfizierten Zelllinie

2.3.4.1 Das TetON-System

Um Tetrazyklin-induzierbare APOBEC3F und APOBEC3G exprimierende Zellen zu generieren, wurde das von Gossen und Bujard beschriebene TetON-System verwendet (Gossen et al., 1992). Dieses beruht auf der Interaktion des Tet-Repressors mit Tet-Operator-Elementen (TetO₂), welche die Expression des nachgeschalteten Gens steuert.

Der Tet-Repressor, der unter der Kontrolle eines CMV-Promotors steht, wird in diesem System konstitutiv exprimiert. Der Response-Vektor (pcDNA4/TO) beinhaltet 2 TetO₂-Sequenzen stromaufwärts des humanen CMV immediate-early Promotors und kontrolliert somit die Expression der stromabwärts eingefügten cDNA des zu untersuchenden Gens. In Abwesenheit von Tetrazyklin/Doxyzyklin bindet der Tet-Repressor an die Operator-Sequenzen und verhindert die Transkription des Gens. Unter Zugabe von Tetrazyklin/Doxyzyklin wird die Repression aufgehoben und die Transkription erfolgt (Abb. 2.2).

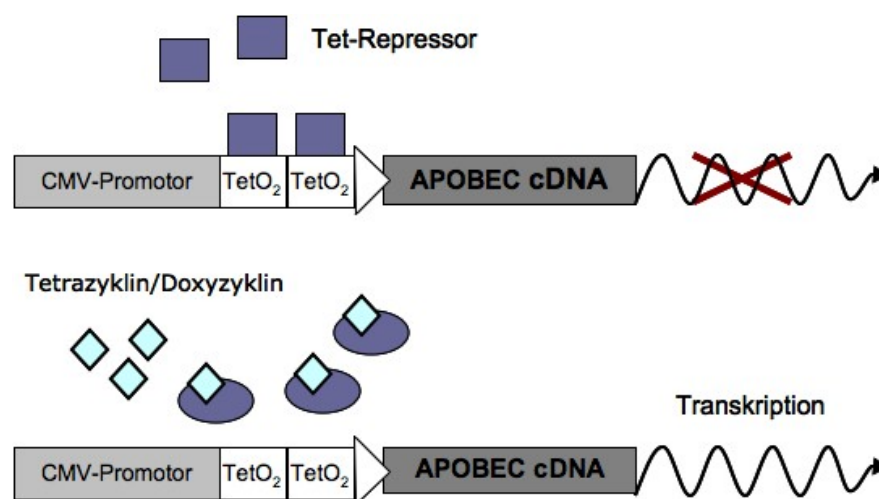


Abbildung 2.2: Funktionsweise des TetON-Systems

Die SupT1R5 Zellen, ausgewählt aufgrund ihrer Eigenschaft A3G und A3F nicht zu exprimieren, wurden zunächst mit dem Vektor pcDNA6/TR, welcher den Tet-Repressor exprimiert und ein Blasticidin-Resistenzgen trägt, transfiziert. Transfizierte Zellen konnten anhand ihrer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Blasticidin identifiziert werden. Nach Selektion, Isolierung und Kultivierung mehrerer Zellklone wurden die Zelllinien mit Hilfe einer quantitativen PCR auf eine hohe mRNA-Expression des Tet-Repressors hin untersucht.

Die zwei Zelllinien mit den höchsten Tet-Repressor mRNA-Mengen an wurden für eine zweite Transfektion mit pcDNA4/TO/A3F bzw. pcDNA4/TO/A3G verwendet. Da dieser Vektor für ein Zeocin-Resistenzgen kodiert, erfolgte die Selektion der transfizierten Zellen mit Zeocin. Nach Selektion, Isolierung und Kultivierung von Zellklonen wurden diese ohne und nach Tetrazyklin-Gabe mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf hohe Induzierbarkeit von APOBEC bei gleichzeitig niedriger basaler Expression hin getestet.

Die ausgewählten Zelllinien wurden in weiteren Experimenten charakterisiert. So wurde die induzierbare APOBEC-Expression auf Proteinebene mit Hilfe von Western Blots, die Expression der Oberflächenmarker (CD4, CXCR4 und CCR5) mittels Durchflusszytometrie (2.3.5.1) und die HIV-Infizierbarkeit untersucht.

2.3.4.2 Bestimmung der minimal-toxischen Konzentration

Um stabil transfizierte Zellen zu selektionieren, muss die zur Selektion geeignete Konzentration des Selektionsreagenz bestimmt werden. Diese entspricht der geringsten Konzentration, die notwendig ist, um möglichst alle nicht-transfizierten Zellen zu töten, dabei aber das Wachstum der transfizierten Zellen nicht inhibiert. Die verwendeten transfizierten Vektoren enthielten die Selektionsmarker Blastocidin und Zeocin. Aufgrund der bestehenden Puromycinresistenz der SupT1R5 Zellen, zur persistenten Expression des CCR5-Rezeptors, wurde die Bestimmung der minimal-toxischen Konzentration jeweils in Anwesenheit von 3 µg/mL Puromycin durchgeführt. Dazu wurden 25.000 Zellen in 100 µL RPMI (versetzt mit 3 µg/mL Puromycin) mit den bestehenden Selektionssubstanzen versetzt und ansteigende Mengen an Selektionsreagenz (Blasticidin: 0, 2, 4, 6 und 8 µg/mL; Zeocin: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL) zugegeben und für 5 Tage kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf Gesamt-Zellzahl und den Anteil der lebenden und toten Zellen hin analysiert. Die minimal-toxische Konzentration zur Selektion entsprach der Konzentration, bei der sich der Anteil der lebenden Zellen auf unter 10% reduzieren ließ. Die Selektion nach Transfektion mit 6TR erfolgte mit 6 µg/mL Blastocidin und 3 µg/mL Puromycin. Die Selektion nach erfolgter Transfektion mit pcDNA/TO/A3F bzw. A3G wurde mit 6 µg/mL Blastocidin, 22 µg/mL Zeocin und 3 µg/mL Puromycin durchgeführt.

2.3.4.3 Bestimmung der optimalen Transfektionsbedingungen

Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen von Suspensionszellen wurden die Transfektionsreagenzien Lipofectamin2000 und DMRIE-C unter Verwendung von Opti-MEM in verschiedenen Konditionen getestet. Im 24-Loch-Format wurden 5×10^5 SupT1R5 Zellen mit 800 ng des Plasmids pEGFP mittels Lipofectamin nach Herstellerangaben transfiziert. Zur Austestung der Transfektionseffizienz von DMRIE-C wurde die gleiche Zellzahl mit 0 μ L, 0.5 μ L, 1 μ L, 1.5 μ L, 2 μ L und 3 μ L des DIMRIE-C Reagenzes nach Herstellerempfehlung versetzt. Nach 4 h wurden 500 μ L RPMI mit 15% FCS, nach weiteren 24 h 1 mL RPMI (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) zu jedem Testansatz gegeben. Am Tag 2 wurde die EGFP Expression der Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

2.3.4.4 Stabile Transfektion

SupT1R5 Zellen wurden nach den unter 2.3.4.3 ermittelten optimierten Transfektionsbedingungen zuerst mit dem pcDNA6/TR Plasmid, welches den Tet-Repressor exprimiert und das Blastocidin-Resistenzgen beinhaltet, transfiziert. Nach erfolgreicher stabiler Transfektion von pcDNA6/TR erfolgte die Transfektion des Tetrazyklin-induzierbaren APOBEC-exprimierenden Plasmids pcDNA4/TO/A3F bzw. pcDNA4/TO/A3G. Adaptiert auf 6-Loch-Format, wurden je 500 μ L Opti-MEM versetzt mit 6 μ L DMRIE-C Reagenz bzw. 4 μ g des zu transfizierenden Plasmids, zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurden 200 μ L Serum-freies RPMI mit 2×10^6 Zellen zugegeben und bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach 4 h wurden 2 mL RPMI, versetzt mit 15 % FCS, zugegeben. Mit der Selektion stabil transfizierter Zellen wurde nach 48 h begonnen.

2.3.4.5 Selektion stabil transfizierter Zellen

Die Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgte mit der unter 2.3.4.2 ermittelten minimal-toxischen Konzentration Blastocidin (6 μ g/mL) und Zeocin (22 μ g/mL). Die Zellen wurden in periodischen Zyklen von Selektion, Isolierung der noch lebenden Zellen via Ficoll-Gradient und Kultivierung der Zellen in normalem RPMI ohne Selektionsmarker über 2 Wochen passagiert, bis eine kleine Zellpopulation entstand. Nach mehreren Selektionszyklen wurden 3 μ g/mL Puromycin zum Selektionsmedium gegeben, um die dauerhafte Expression des CCR5-Rezeptors zu gewährleisten. Die entstandene Zellpopulation wurde zu 20 Zellen pro Loch in 96-Loch-Platten ausgesät und expandiert.

2.3.4.6 Charakterisierung der stabil transfizierten Zellklone

Die nach Selektion erhaltenen Zellklone wurden jeweils in Selektionsmedium in Gegenwart von 3 µg/mL Puromycin, 6 µg/µL Blasticidin und, nach erfolgter zweiter Transfektion, 22µg/mL Zeocin bis zur weiteren Analyse kultiviert. Alle nachfolgenden Testansätze erfolgten ohne Selektionsmedium.

Nach der ersten stabilen Transfektion mit pcDNA6/TR wurde zur Analyse der Tet-Repressor-Expression von 10 Zellklonen die zelluläre Gesamt-RNA isoliert und mittels quantitativer Echtzeit-PCR die Menge an Tet-Repressor mRNA-Kopien bestimmt. Die zwei Zellklone mit der höchsten Tet-Repressor Kopienanzahl wurden für die nachfolgende stabile Transfektion mit pcDNA4/TO/APOBEC3F bzw. G verwendet.

Nach Selektion und Isolierung mehrerer doppelt stabil transfizierter Zellklone (pcDNA6/TR und pcDNA4/TO/APOBEC3F bzw. G) wurde die Funktionalität des TetON-Systems überprüft. Dazu wurden in 1 mL RPMI 500.000 Zellen/ml in 24-Loch-Platten ausgesät und unter Tetrazyklin-Gabe von 1 µg/mL für 24 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und zelluläre Gesamt-RNA wurde isoliert. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR wurden die Zellklone auf eine hohe Tetrazyklin-induzierbare APOBEC-Expression bei niedriger Hintergrund-Expression untersucht.

Um zu gewährleisten, dass die Tetrazyklin-abhängige APOBEC-Expression über mehrere Tage auf einem vergleichbaren Niveau induziert werden kann, wurde die APOBEC-Expression über 6 Tage analysiert. Dazu wurden Zellen (500.000 Zellen pro mL RPMI) in 6-Loch-Platten ausgesät und über 6 Tage alle 24 h mit 1 µg/mL Tetrazyklin induziert. Jeweils 24 h nach Tetrazyklin-Induktion (Tag 0, ohne Tetrazyklin-Induktion) wurden 1×10^6 Zellen zur Expressionsanalyse mittels Western Blot und quantitativer Echtzeit-PCR abgenommen. Dieser Versuch wurde mit der gleichen Konzentration an Doxyzyklin wiederholt.

Um die Kultivierung von HIV in den stabil transfizierten Zellen zu gewährleisten, wurden die für eine HIV-Infektion relevanten Oberflächen-Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 auf den selektionierten Zellklonen mittels Durchflusszytometrie analysiert, und die Infektion und Replikation R5-troper HI-Viren in diesen Zellklonen wurde durch Zellkulturexperimente überprüft.

2.3.5 Analyse- und Nachweismethoden

2.3.5.1 Durchflusszytometrie

Alle Messungen zur Durchflusszytometrie wurden mit einem MACSQuant Analyzer der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt.

Die Analyse der Oberflächenmarker CD4, CCR5 und CXCR4 erfolgte durch Anfärben der Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern der Firma BD Bioscience. Dazu wurden jeweils 1×10^5 Zellen einmal mit PBS gewaschen, die Antikörper gegen CD4, CCR5, CXCR4, und in Kombination CD4/CCR5 und CD4/CXCR4, in einer 1:50 Verdünnung zugegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach 4 Waschschritten mit Waschpuffer wurden die Zellen analysiert. Zur Detektion unspezifischer Hintergrundsignale und Einteilung der Quadranten diente als Negativkontrolle eine Isotyp-Färbung. Diese erfolgte mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern, die dem Immunglobulin-Isotyp des spezifischen Primär-Antikörpers entsprechen.

Die Analyse zur Transfektionsoptimierung und zur Bestimmung der minimal-toxischen Konzentration erfolgte direkt nach einem einmaligen Waschschriff mit PBS. Die Auswertung erfolgte jeweils mittels MACSQuant Software.

2.3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. 2 µl Proteinextrakt, 1:5 verdünnt, wurden als Doppelansatz in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Als Eichkurve diente eine BSA-Verdünnungsreihe (0, 1, 2, 4, 8, 10 µg), gemischt mit jeweils 2 µl 0,2%iger CCLR-Lösung. Die Proben wurden mit 150 µl einer 1:5 Verdünnung des BioRad Protein Assay Reagenz (BioRad, München) versetzt. Anschließend wurde die OD620 in einem Spektralphotometer (Spectra, Tecan, Crailsheim) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve ermittelt.

2.3.5.3 p24 Ag-Bestimmung

Die Bestimmung der Menge an p24 Ag erfolgte mit dem Abbott Architect HIV Ag/Ak Combi Assay. Mit diesem können, basierend auf einem Zwei-Schritt-Chemilumineszenz-Mikropartikel-Immunoassay (CMIA), sowohl p24 Ag als auch Antikörper gegen HIV detektiert werden. In der Probe vorliegendes p24 Ag bindet dabei an die mit HIV-p24-Antikörper (Maus, monoklonal) beschichteten Mikropartikel. Nach diversen Waschschriffen wird erst akridiniummarkiertes Konjugat und darauffolgend ein Reaktionsgemisch aus Pre-Trigger- und Triggerlösung zugegeben. Die resultierende Chemilumineszenzreaktion wird in relativen Lichteinheiten (RLU, relative light units) gemessen. Die Menge an HIV-Antigen und Antikörpern in der Probe ist direkt proportional zu den vom optischen System der Architect-Einheit gemessenen relativen Lichteinheiten. Eine Quantifizierung wird durch das Mitführen einer internen Kontrolle des Assaysystems ermöglicht.

2.3.6 Molekularbiologische Methoden

2.3.6.1 cDNA-Synthese

Als Ausgangssubstrat für die quantitative Echtzeit-PCR wurde jeweils 1 µg RNA mit Hilfe des Reagenziensystems (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis) der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.6.2 In vitro Mutagenese

Mit Hilfe des Reagenziensystems „QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, La Jolla, USA) wurden Punktmutationen in DNA bzw. die damit verbundenen Aminosäureaustausche in Proteinen eingeführt. Mithilfe des QuickChange Primer Design Programms wurden die zueinander komplementären Oligonukleotide, die jeweils die gewünschte Mutation enthielten, generiert. In einer PCR-Reaktion wurden diese und die zu mutierende Plasmid-DNA nach Herstellerempfehlungen amplifiziert.

2.3.6.3 Amplifikationstechniken

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die selektive Amplifikation einer DNA-Sequenz. In Anlehnung an die Verdopplung der DNA während der Replikation synthetisiert die DNA-Polymerase eine identische Kopie der DNA-Matrize. Dazu werden zwei Oligonukleotide (Primer) so gewählt, dass sie den zu amplifizierenden Bereich auf der DNA-Matrize einrahmen, indem sie in 5'- und 3'-Richtung an den Sensestrang der DNA hybridisieren. Mehrere aufeinanderfolgende Temperatur-Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung der Oligonukleotide und DNA-Synthese, ermöglichen dann die Vervielfältigung der DNA-Sequenz.

One-Step RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)

Die OneStep RT-PCR vereint die cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase und die klassische Amplifikation mittels PCR in einem Reaktionsansatz. Durch die Verwendung spezieller Pufferbedingungen erfolgt nach Zugabe der RNA und Inkubation unter optimierten Temperaturbedingungen zuerst die cDNA-Synthese, ausgehend vom genspezifischen 3'-Oligonukleotid. Der darauffolgende Denaturierungs- und PCR-Initiationsschritt inaktiviert die Reverse Transkriptase und startet die anschließende Amplifikation der cDNA-Matrize.

In einem Reaktionsvolumen von 50 µL wurden jeweils 30 pmol der beiden Primer, je 10 pmol der vier Desoxynukleotide sowie 10 µL Q-Solution (Qiagen) und 5x OneStep RT-PCR Buffer (Qiagen) eingesetzt. Zuletzt wurden 40 U RNase-Inhibitor (Roche), 2 µL Enzymmix (Qiagen) sowie 10 µL RNA-Template als Matrize zugegeben und die Ansätze unmittelbar darauf in das auf 50 °C vorgeheizte PCR-Gerät (T3-Thermocycler, Biometra, Göttingen) gestellt. Eine

typische Reaktion hatte folgendes Profil: 1. Schritt: 50 °C für 30 min (cDNA-Synthese); 2. Schritt: 94 °C für 15 min (Inaktivierung der Reversen Transkriptase, Aktivierung der HotStarTaq und Denaturierung des cDNA Templates); 3. Schritt: 30 Zyklen à: 94 °C für 15 sec (Denaturierung), 52 °C für 30 sec (Hybridisierung), 72 °C für 1,5 min (Polymerisierung); 4. Schritt: 72 °C für 10 min.

PCR

Amplifikationen für präparative und analytische Zwecke wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µL durchgeführt. 5 µL DNA-Template wurden als Matrize eingesetzt und mit jeweils 30 pmol beider Primer sowie je 10 pmol der vier Desoxynukleotide gemischt. Unmittelbar nach Zugabe von 2,5 U HotStarTaq-DNA-Polymerase wurden die Ansätze in das auf 94 °C vorgeheizte PCR-Gerät (T3-Thermocycler, Biometra, Göttingen) gestellt. Die Reaktion wurde nach folgendem Basisschema gestartet: 1. Schritt: 94 °C für 15 min; 2. Schritt: 35 Zyklen à: 94 °C für 15 sec (Denaturierung), 52 °C für 30 sec (Hybridisierung), 72 °C für 1,5 min (Polymerisierung); 3. Schritt: 72 °C für 10 min.

Die PCR-Bedingungen (Temperatur der Hybridisierung und die Zeitdauer der Extension) wurden je nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Bereiches variiert. Die Größe und Menge des erhaltenen PCR-Produktes sind ein Indikator für die Spezifität der PCR und wurden mittels Gelelektrophorese überprüft.

Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR vereint die Amplifikation spezifischer Zielsequenzen der herkömmlichen PCR mit gleichzeitiger Quantifizierung der Transkripte. Dadurch kann die relative Ausgangsmenge der Transkripte ermittelt werden. Eine Möglichkeit zur Quantifizierung ist die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Sonden. Die Sonden sind jeweils mit einem Reporterfarbstoff und einem Quencher-Farbstoff (Fluoreszenz-Löcher) markiert, wobei die räumliche Nähe des Quenchers zum Reporterfarbstoff dessen Fluoreszenz nivelliert. Durch den Abbau der Sonden während der PCR wird der kompensierende Einfluss des Quenchers aufgehoben, das Fluoreszenz-Signal des Reporters steigt proportional zum generierten PCR-Produkt. Für die Quantifizierung der APOBEC-Expression und des Haushaltsgens TBP (TATA-box Binding Protein) wurden fluoreszenzmarkierte Sonden der Universal Probe Library (UPL) (Roche) verwendet, wobei zielgenspezifische Assays (Primer und Sonde) mit dem Assay-Design-Center des Roche UPL-Systems (www.roche-applied-science.com) entworfen wurden. Der PCR-Zyklus, in dem die Fluoreszenz einen gesetzten Schwellenwert übersteigt, wird als Threshold Cycle (Ct)-Wert angegeben. Ein PCR Ansatz enthielt 0.2 µL UPL-Sonde, je 0.2 µM Primer, 1x TaqMan Universal PCR Master Mix und 5 µL 1:5 verdünnte cDNA in einem Reaktionsvolumen von 15 µL.

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Transkripte stellt der Gebrauch von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen dar. In dieser Arbeit wurde SYBRGreen I zur Bestimmung der mRNA Kopienzahl des Tet-Repressors und des Haushaltgens HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) verwendet, dessen Fluoreszenzemission nach Einlagerung in doppelsträngige (ds) DNA ansteigt und somit mit der Menge an dsDNA korreliert.

Für alle quantitativen Echtzeit-PCRs wurden Standardreihen zur Quantifizierung erstellt. Plasmide, die das entsprechende Gen kodieren, wurden entsprechend ihrer Konzentration verdünnt und analysiert. Ein bei jeder PCR mitgeführter Standard erlaubte die Bestimmung der absoluten Kopienanzahl in den verschiedenen Zellen anhand von Standardreihen. Die Expressionsrate von A3F, A3G und 6TR wurde am Referenzstandard und am entsprechenden Haushaltsgen normiert.

PCR, Fluoreszenzmessung und Datenanalyse erfolgte in einem LightCycler® 480.

Tabelle 2.2: Schematischer Ablauf der Real-Time-PCR-Zyklen.

	A3F, A3G, TBP (45 Zyklen)		6TR, HPRT (35 Zyklen)	
Vorinkubation:	95°C	10 min	95°C	10 min
Amplifikation:	95°C	10 sec	95°C	01 sec
	60°C	10 sec	56°C	05 sec
	72°C	05 sec	72°C	15 sec
Kühlung:	40°C	30 sec	40°C	10 sec

Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Plasmiden und Amplifikaten wurden jeweils 3 pmol Primer, 200- 500 ng Plasmid-DNA bzw. 50-100 ng PCR-Amplifikat, 1 µL 5xPuffer und 0,3 µL Taq Dye Terminator Ready Reaction Mix, BigDye® Version 2.0 (Applied Biosystems), in einem Gesamtvolumen von 4 µl eingesetzt. Die PCR erfolgte nach dem folgenden Programm: 36 Zyklen von je: 94°C für 10 sec (Denaturierung), 50°C für 10 sec (Hybridisierung), 60°C 4 min (Polymerisierung), 1 Zyklus: 4°C für unendlich.

Zur Aufreinigung des Sequenzansatzes und Entfernung überschüssiger Di-desoxynukleotide wurde Sephadex TMG-50 superfine-Pulver in die Vertiefungen eines Multiscreen Column Loader gefüllt und in eine MultiScreen96-Platte mit permeabler Membran überführt. Nach der Zugabe von 300 µL Wasser wurde die Platte 3 Stunden bei 4 °C quellen gelassen. Eine Zentrifugation bei 910g für 5 min entfernte überschüssige Flüssigkeit, und auf das entstandene Gelbett wurde der (mit Reinstwasser) auf 20 µl aufgefüllte Sequenzansatz gegeben. Die

aufgereinigten Produkte wurden während einer zweiten Zentrifugation (5 min bei 910g) in speziellen Probengefäßen aufgefangen.

Die Analyse erfolgte an einem 16 Kapillar-Sequenzier (ABI 3130xl™ Genetic Analyzer, Applied Biosystems Hitachi, Foster City, CA, USA). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe von Softwareprogrammen der Firma Applied Biosystems und DNA STAR (SeqMan™ II).

2.3.7 Extraktionsmethoden

2.3.7.1 RNA-Präparation aus Zellen

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurden 5×10^6 Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und bei -80°C bis zur Präparation gelagert. Die Proben wurden unter Zugabe von RLT-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) aufgetaut und mittels eines QIAshredders (Qiagen, Hilden) homogenisiert. Die weitere RNA-Präparation erfolgte nach Herstellerangaben und beinhaltete einen DNase-Verdau auf den Säulchen. Die Konzentration der RNA wurde am Nanodrop ND-1000 (PEQLAB) spektralphotometrisch bestimmt. Die aufgereinigte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.7.2 DNA-Präparation

Präparative und analytische Plasmidisolierungen sowie DNA-Fragment-Aufreinigungen wurden mit Reagenziensystemen (QIAPrep Spin Mini- und Maxiprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit) der Firma Qiagen (Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Sie basieren auf der alkalischen Lyse und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen (Quarzel). Der DNA-Gehalt wurde spektrometrisch bei 260 nm im Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer der Firma PEQLAB-Biotechnologie (Erlangen) bestimmt.

2.3.7.3 Präparation von Proteinextrakten

Zur Herstellung von Protein-Extrakten wurden 5×10^5 Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und bei -80°C bis zur Extraktion gelagert oder direkt unter Zugabe von 30 μL 1 x CCLR-Reagenz (Cell Culture Lysis Reagent) lysiert und nachfolgend 10 min im 30 Sekunden Takt auf Eis mit dem Bioruptor® Plus der Firma Diagenode (Liège, Belgium) sonifiziert. Ein zweifacher Zentrifugationsschritt diente zum Sedimentieren der Zellbestandteile, der Überstand wurde jeweils in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die aufgereinigten Proteinextrakte wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.7.4 DNA-Standardmethoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von Maniatis et al. (1989), Ausubel et al. (1994) oder nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

- Ethanol-fällung von DNA
- DNA-Konzentrationsbestimmung
- Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase
- Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen
- Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Gelextraktion

2.3.8 Analyse der mutagenen Aktivität APOBECs auf die V3-Region von HIV

2.3.8.1 Analyse der mutagenen Aktivität von A3G und A3F im induzierbaren TetON-System

Zur Analyse des mutagenen Effekts von A3G und A3F auf die V3-Region von HIV wurden die unter 2.3.4 generierten Zelllinien 6TR, DG9 und DF5 mit den unter 2.3.3 beschriebenen HIV-Vif-Varianten infiziert, und die neue Virusgeneration wurde hinsichtlich des Effektes von APOBEC analysiert.

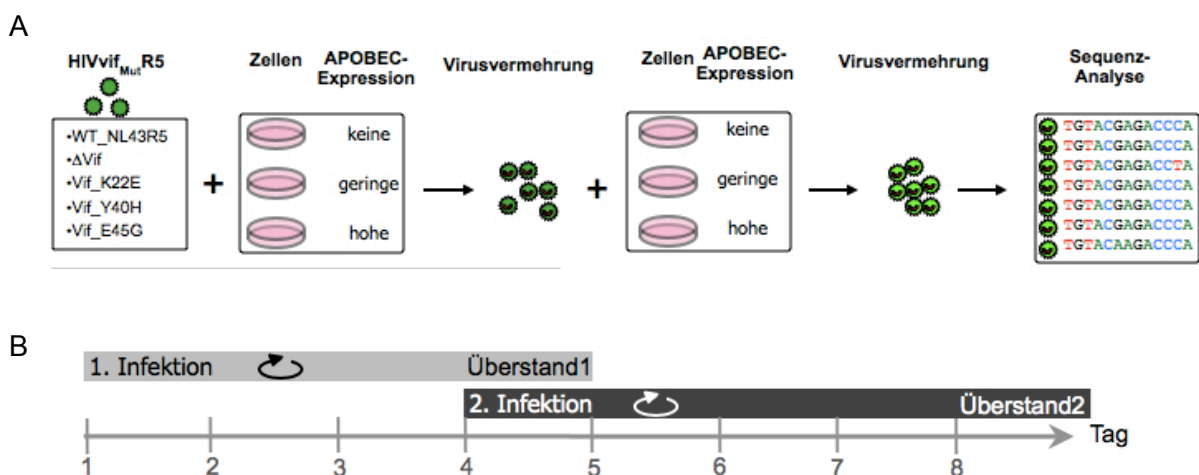


Abbildung 2.3: A) Schematischer Ablauf zur Analyse des mutagenen Effektes von APOBEC auf HIV

B) Zeitskala

Eine entsprechende Zellzahl der Zelllinien DG9 bzw. DF5 wurde zuvor 24 Stunden unter 1µg/ml Dox kultiviert, um eine maximale Expression von A3G und A3F zu gewährleisten. Am Tag 1 wurden je 500.000 Zellen 6TR, DG9 und DF5, jeweils mit basaler (ohne Dox) und mit Dox

induzierter Expression von APOBEC, mit 50 TCID₅₀ des WT-Virus NL4-3R5, des Del-Vif Virus und der drei HIV-Vif-Varianten K22E, Y40H und E45G infiziert (Infektionsmodus: 1x10⁶Zellen/mL). Einen Tag nach Infektion wurden die Zellen, um freie Viruspartikel zu entfernen, zweimal mit PBS gewaschen. Je 500.000 Zellen/mL wurden dann in frischem RPMI resuspendiert. Zur Aufrechterhaltung der maximalen APOBEC Expression wurde in die entsprechenden Kulturen täglich 1µg/mL Dox zugegeben. Am Tag 4 wurden 200 µL Überstand auf die gleichen, am Vortag entsprechend vorbehandelten Zellen (gleicher Infektionsmodus) überinfiziert. Am Tag 5 erfolgte die Beseitigung der freien Viruspartikel. Am Tag 8 wurde der Überstand zur weiteren Analyse abgenommen. Die Bestimmung der p24Ag Menge der Kulturen erfolgte jeweils an Tag 4 und Tag 8.

2.3.8.2 Analyse in PBMC (Periphere Blut-Mononukleäre Zellen) -Virus-Kulturen

Um den mutagenen Effekt von APOBEC möglichst nahe am "in vivo" System zu untersuchen, wurde der Versuch unter 2.3.8.1 auf PBMCs übertragen. Aus 50 mL Vollblut von drei gesunden Spendern wurden jeweils mittels Ficoll-Gradienten die Lymphozyten isoliert und diese zur Verbesserung der Infizierbarkeit mit HIV drei Tage lang mit PHA (2% v/v) stimuliert. Analog zu 2.3.8.1 wurden 500.000 Zellen mit den unter 2.3.3 generierten Virusüberständen, jedoch mit einer höheren TCID₅₀ von 5.000 infiziert. Die Zellen wurden einen Tag nach Infektion zur Eliminierung des Inputvirus zweimal mit PBS gewaschen und zu 500.000 Zellen/mL in frischem RPMI, versetzt mit 20 U/mL Interleukin-2, resuspendiert. Am Tag 5 wurden 500.000 frische PHA-stimulierte PBMCs des gleichen Spenders zu den jeweiligen Kulturen hinzugegeben. Am darauffolgenden wurde das Medium gewechselt. Am Tag 10 wurde der Überstand zur weiteren Analyse abgenommen. Die Bestimmung der p24 Ag-Menge der Kulturen erfolgte jeweils an Tag 5 und Tag 10.

2.3.8.3 Generierung und Auswertung der NGS-Daten

Zusätzlich zur Sequenzierungsmethode nach Sanger stehen derzeit weitere hochsensitive Sequenz-Analyseverfahren zur Verfügung. Ein Verfahren ist das Sequenzieren-durch-Synthese-Verfahren (SBS). Jedes zu analysierende DNA-Fragment durchläuft dabei eine Neusynthese, welche zu einer Gesamtzahl von mehreren tausend Sequenzinformationen führt, die mit bioinformatischen Interpretationssystemen aufbereitet werden. Hier wurden PCR-Amplifikate des *env*- und *nef*-Genbereichs der Inputviruspopulation und von HIV-Vif-Varianten nach Kultivierung auf diversen Zellkulturen mit Hilfe des MiSeq® Systems der Firma Illumina untersucht. Die Generierung und Reinigung der PCR-Produkte erfolgte am Institut für Virologie. Sequenzierung und Interpretation der Rohdaten erfolgte in Kooperation mit Martin Däumer und Alexander Thielen (SeqIT, Kaiserslautern) in Kaiserslautern.

Anhand der ca. 20.000 generierten Einzelsequenzen pro Amplifikat wurden die prozentualen Anteile von X4-Varianten mit Hilfe des geno2pheno[454]-Tools (Thielen, Lengauer, 2011) bei unterschiedlichen FPR-Cutoffs (1%, 2%, 5%, 10% und 20%) bestimmt. Alle APOBEC-relevanten Positionen wurden pro Position und prozentualem Anteil der G und A-Nukleotide summiert und pro Anzahl der analysierten APOBEC-Motive nach Region oder Motiv berechnet. Die Kalkulation der p-Werte erfolgte anhand des zweiseitigen T-Testes für ungepaarte Stichproben des Excel-Programmes.

3 ERGEBNISSE

3.1 Statistische Analyse von V3-Sequenzen mit definiertem Tropismus

Obwohl in und nach der Primärinfektion mit HIV überwiegend R5-Viren nachweisbar sind, können durch hochauflösende Sequenzieretechniken (next generation sequencing) zu fast jedem Zeitpunkt der Infektion X4-Varianten detektiert werden (Saliou et al., 2011; Rozera et al., 2014). Ein Wechsel der prädominanten Viruspopulation von R5- zu X4-Viren wird als Korezeptorswitch bezeichnet. Dieser findet bei 50 bis 60 % aller HIV-Infizierten statt und ist mit einer schlechteren Krankheitsprognose assoziiert (Berger et al., 1999). Der zugrundeliegende Mechanismus, der die Entwicklung einer minoren X4-Variante zur dominierenden Viruspopulation erklärt, ist jedoch nicht bekannt. Eine Hypothese besagt, dass mit fortschreitender Schädigung des Immunsystems X4-Varianten nicht mehr kontrolliert werden können und somit zur vorherrschenden Viruspopulation heranwachsen (Harouse et al., 2003).

Die hohe Mutationsrate von HIV, die mit dem fehlenden Korrekturmechanismus der Reversen Transkriptase (Mansky et al., 1995) sowie der zellulären DNA-abhängigen RNA-Polymerase und dem hohen Virusumsatz (Replikation und Elimination) erklärt werden kann, kann zur Entstehung CXCR4-troper Varianten führen. Weitere mutationsfördernde Faktoren sind z.B. die G-zu-A Mutationen generierenden APOBEC-Proteine APOBEC3G (A3G) und APOBEC3F (A3F). So entwickeln sich in Gegenwart von A3G Resistenz-assoziierte Mutationen (RAM) schneller (Mulder et al., 2008).

Die Aminosäurezusammensetzung des V3-Bereichs, der Tropismus- (Korezeptorgebrauch) determinierenden Region, legt fest, ob CCR5 oder CXCR4 als Korezeptor benutzt wird. Dies führte zur Entwicklung von Interpretationssystemen, die den Tropismus einer Virusvariante anhand der Sequenz des V3-Bereichs vorhersagen können. Das mathematisch einfachste Modell zur Tropismushersage ist die 11/24/25-Regel. Diese Regel sagt für eine V3-Sequenz einen R5-Tropismus vorher, wenn im V3-Bereich an den Positionen 11, 24 und 25 negativ geladene Aminosäuren stehen. Ein X4-Tropismus wird dagegen beim Vorhandensein von positiv geladenen Aminosäuren an eben diesen Positionen vorhergesagt. Im Unterschied dazu verwendet das komplexere bioinformatische Verfahren `geno2pheno[coreceptor]` die Information aller Aminosäuren in diesem Bereich, um den Korezeptorgebrauch vorherzusagen.

A3F und A3G können durch G-zu-A Mutationen Aminosäureänderungen in replizierenden Viren verursachen. Um zu prüfen, ob die unterschiedliche Aminosäurekomposition von R5- und X4-Viren durch die Deaminase-Aktivität von A3F oder A3G erklärbar ist, wurden verschiedene Sequenzdatensätze bzgl. der Aminosäurekomposition in der env-V3-Region von HIV analysiert.

Von drei unabhängigen Datenbanken (Los Alamos Sequence Database (n=1026), HIV-GRADE (n=501) und Arevir (n=26)) wurden insgesamt 1553 V3-Sequenzen zusammengetragen und analysiert. Da die Sequenzdaten des HIV-GRADE Consortium und der Los Alamos Sequenz-Datenbank fast ausschließlich cross-sektionale Daten und keine longitudinalen Daten enthalten, konnten diese nicht direkt auf Mutationswege untersucht werden. Entsprechend ihrer Annotationen in den Datenbanken wurden beide Datensätze jeweils in CCR5- und CXCR4-trope Virussequenzen (im Nachfolgenden kurz R5 und X4 genannt) unterteilt und diese dann vergleichend auf die im Folgenden aufgeführten Charakteristika hin untersucht.

3.1.1 Analyse der Tripletzzusammensetzung und der Tripletthäufigkeit

Um zu untersuchen, ob die Fähigkeit von APOBEC, G-zu-A Mutationen in der V3-Region zu generieren, einen Einfluss auf die Entstehung von X4-Viren hat, wurde zunächst die Tripletzzusammensetzung dieser Region analysiert. In Übereinstimmung mit der 11/24/25-Regel zeigten sich die markantesten Unterschiede der Tripletzzusammensetzung zwischen R5 und X4 an den Positionen 11, 22, 24 und 25 der V3-Region (Abb. 3.1).

In den Datensätzen zeigte sich an Position 11 in 60 bis 80 % der R5-Sequenzen das Triplet AGT (Ser), aber nur in 40 bis 50 % der X4-Sequenzen. Dafür enthielten an dieser Position bis zu 20 % der X4-Sequenzen die Triplets AGA (Arg), AGG (Arg), CGT (Arg) und AAG (Lys).

Während Position 22 bei 70 % der R5-Sequenzen das Triplet GCA (Ala) und bei ca. 20 % das Triplet ACA (Thr) zeigte, war dies nur bei 40 bis 50 % der X4-Sequenzen der Fall. In den R5-Sequenzen fand sich an Position 24 zu 60 bis 80 % das Triplet GGA (Gly). Die X4-Datensätze dagegen zeigten eine variabelere Tripletzzusammensetzung. Neben GAA in 40 bis 60 % der Sequenzen waren in bis zu 10 % der Sequenzen auch die Triplets GGA (Gly), GAC (Asp), GAT (Asp) und AAA (Lys) vertreten.

Aminosäure 25 zeigte schon in den R5-Sequenzen eine variabelere Tripletzzusammensetzung. So waren die Triplets GAC (Asp), GAA (Glu) und GAT (Asp) häufiger als im X4-Datensatz, im Gegensatz dazu besaßen X4-Sequenzen häufiger AAA (Lys), AGA (Arg), AAG (Lys), AAC (Asn) und CAA (Gln).

Somit zeigte sich in der statistischen Analyse beim Vergleich der R5- mit den X4-Sequenzen vor allem an Position 24 und 25 verstärkt eine Reduktion jener Triplets mit A3G- (GGA) bzw. A3F-Erkennungsmotiven (GGA, GAC, GAA und GAT). In den X4-Sequenzen stiegen entsprechend die Anteile jener Triplets, die einer A3G- (AGA) bzw. A3F-vermittelten (GAA, AAC, AAA und AAT) G-zu-A Mutation folgen (Abb. 3.1). Die im Kontext der APOBEC-Motive beobachteten G-zu-A Mutationen bestärken unsere Hypothese, dass APOBEC den Korezeptorgebrauch von HIV-1 beeinflusst.

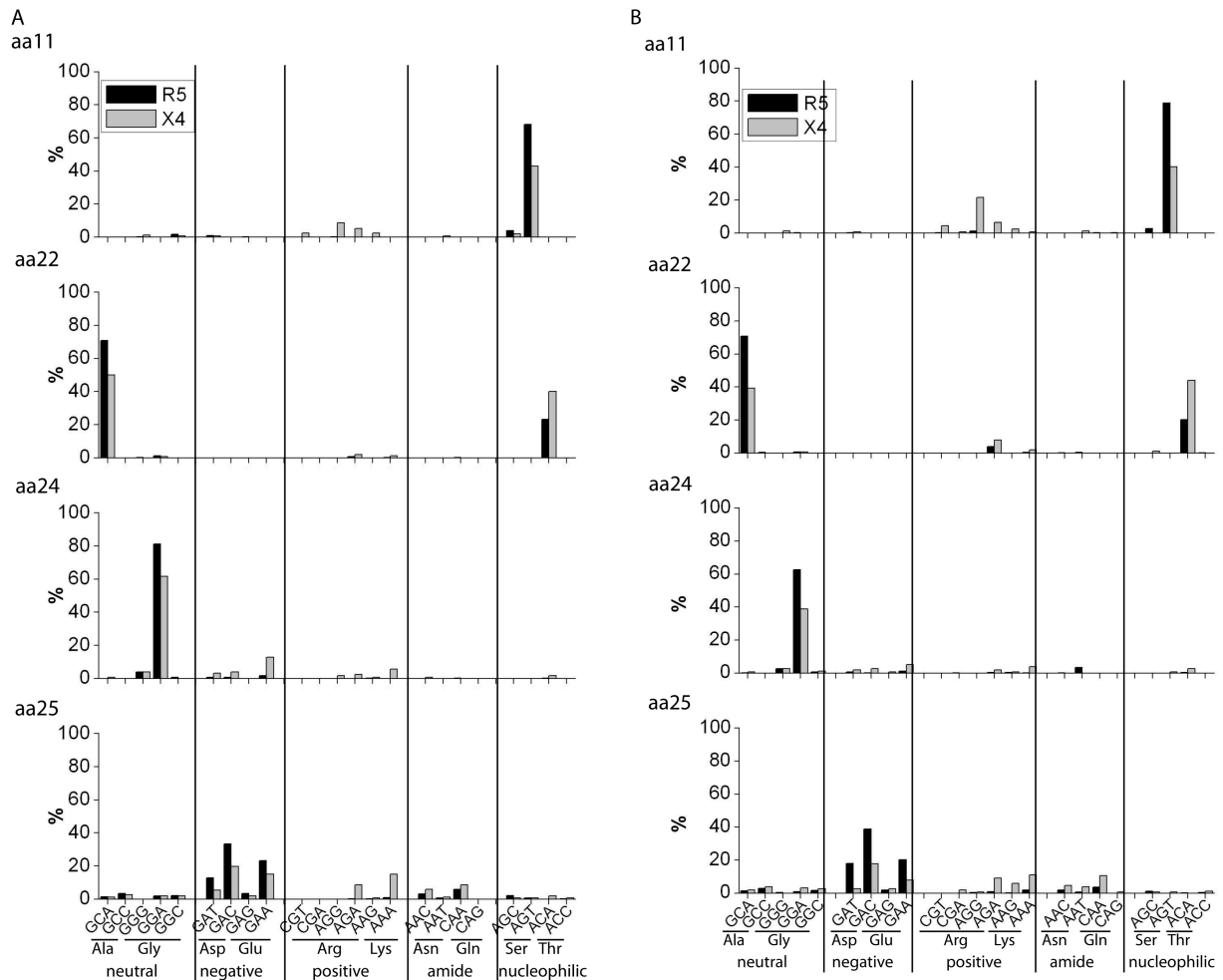


Abbildung 3.1: Tripletzzusammensetzung von R5- und X4-Sequenzen an den Aminosäurepositionen der V3-Region (11, 22, 24 und 25)

Prozentuale Tripletthäufigkeit von R5 (schwarz) und X4 (grau) an den V3-Positionen 11, 22, 24 und 25 der Sequenzdaten des HIV-GRADE (A) und des Los Alamos (B) Datensatzes.

Die Triplets wurden entsprechend den Aminosäure-Charakteristika gruppiert.

Des Weiteren wurde die durchschnittliche Tripletthäufigkeit der V3-Region zwischen R5 und X4 verglichen (Tab. 3.1). In beiden Datensätzen (HIV-GRADE und Los Alamos) konnte sowohl für das Triplett GGN (Gly) als auch für GAN (Glu/Asp), die das Erkennungsmotiv von A3G (GG) bzw. A3F (GA) enthalten, eine Reduktion in der Häufigkeit von R5 zu X4 beobachtet werden. Diese Abnahme ging mit einer gleichzeitigen Zunahme der Häufigkeit der Triplets AGR (Arg) und AAR (Lys) einher, die als Resultat einer G-zu-A Mutation aus den APOBEC-Erkennungsmotiven hervorgehen. Somit könnte APOBEC durch seine Fähigkeit, G-zu-A Mutationen zu generieren, die Entstehung von X4-Viren fördern.

Tabelle 3.1: Durchschnittliche Tripletthäufigkeiten der Sequenz-Datensätze der HIV-GRADE und Los Alamos Datenbanken in der V3-Region

Triplet	HIV-GRADE		Los Alamos	
	R5	X4	R5	X4
GGN (Gly)	4.19	4.00	4.18	4.07
AGR (Arg)	3.81	4.11	3.72	4.13
GAN (Glu/Asp)	1.61	1.45	1.67	1.27
AAR (Lys)	1.06	1.67	0.96	1.50

3.1.2 Korrelationsanalyse der Substitutionshäufigkeit

Eine Korrelationsanalyse der Nukleotidfrequenzen sollte aufzeigen, ob eine G-zu-A Substitution einen Tropismuswechsel von R5 zu X4 begünstigt. Dazu wurde jede mögliche Nukleotidsubstitution (G/C, G/T, T/A, C/A, C/T und G/A) anhand der Nukleotidfrequenz pro Position in V3 analysiert. Für alle sechs Nukleotidsubstitutionen wurden hierfür die Differenzen (d) der Nukleotidfrequenz zwischen R5 und X4 für jede Position berechnet und diese dann für jedes Nukleotidpaar (z.B. G/A) korreliert.

Ein Korrelationswert von -1 entspricht einer größtmöglichen Korrelation und hieße in diesem Fall, dass die Reduktion von Guanosin an Position (X) im gleichen Maße dem Anstieg von Adenosin an Position (X) entspricht.

Das Substitutionspaar G/A zeigte, sowohl innerhalb des HIV-GRADE Datensatzes als auch für den Los Alamos Datensatz, die stärkste Korrelation mit einem Korrelationswert R von -0.71 (HIV-GRADE) bzw. -0.53 (Los Alamos) (Abb. 3.2 A, B, Diagramm 6). Die Korrelationskalkulationen der anderen Substitutionspaare (Abb. 3.2, Diagramm 1-5) resultierten in Werten zwischen -0.36 und -0.12 und zeigten damit geringere Korrelationen. Da sich entgegengesetzte Nukleotiddifferenzen in Quadrant II (links oben) und IV (rechts unten) positionieren, enthält Quadrant IV jene Positionen mit der Substitutionsrichtung G-zu-A. Dort befinden sich in der G/A Korrelation des HIV-GRADE Datensatzes neben den Positionen 9 (Nukleotid/Aminosäure, nt/aa, nt26/aa9) und 22 (nt64/aa22) vor allem die Tropismus-relevanten Positionen 11, 24 und 25 (nt32/aa11, nt70/aa24, nt71/aa24 und nt73/aa25) (Abb. 3.2 A, Diagramm 7). Die gleichen Positionen sind mit Ausnahme der Position 9 ebenfalls im Los Alamos Datensatz zu beobachten (Abb. 3.2 B, Diagramm 7).

Die starke Korrelation der G-zu-A Substitutionsanalyse an den Tropismus-relevanten Positionen sowie der große Abstand der Positionen zum Nullpunkt spiegelt das Ausmaß der G-zu-A Differenz der Nukleotidfrequenzen wider und unterstreicht die Bedeutung von APOBEC für den Tropismuswechsel von R5 zu X4.

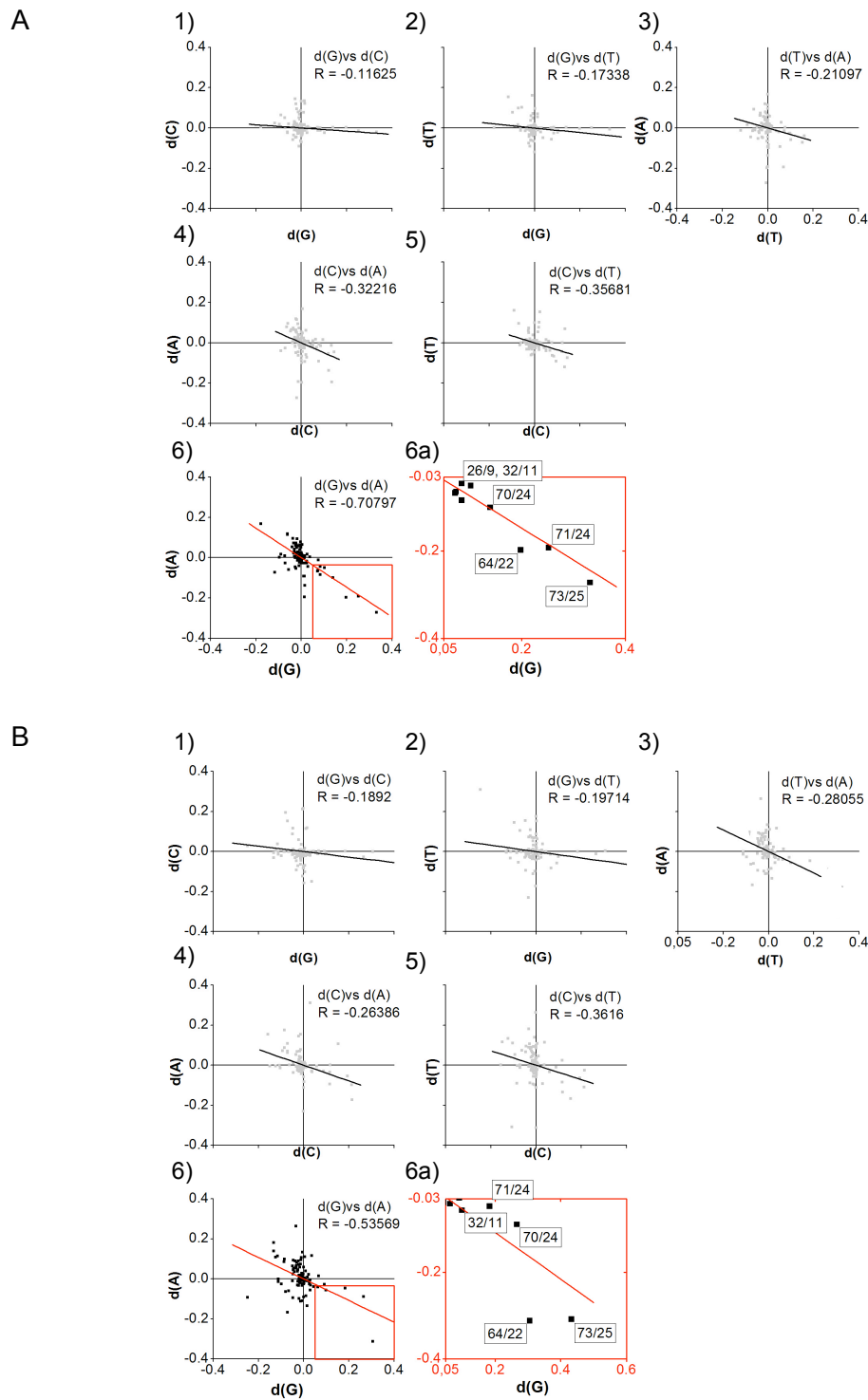


Abbildung 3.2: Korrelationsanalyse der Nukleotid-Substitutionshäufigkeit der V3-Sequenzen des HIV-GRADE und Los Alamos Datensatzes

Für alle möglichen Nukleotidsubstitutionen (G/C, G/T, T/A, C/A, C/T und G/A) wurden die Differenzen der Nukleotidfrequenzen zwischen R5 und X4 pro Position berechnet und korreliert. Die Diagramme 1–6 zeigen die Korrelationsanalysen der Nukleotidpaare G/C, G/T, T/A, C/A, C/T und G/A mit dem jeweiligen R-Wert im I. Quadranten, wobei jeder Punkt im Diagramm einer Position in V3 entspricht. In der Vergrößerung des IV. Quadranten des G/A Paares (6a) sind die Positionen in V3 (Nukleotid/Aminosäure) markiert, die die stärksten Differenzen und somit den deutlichsten Unterschied zwischen R5 und X4 zeigen.

A) Korrelationsanalyse der V3-Sequenzen des HIV-GRADE Datensatzes

B) Korrelationsanalyse der V3-Sequenzen des Los Alamos Datensatzes

3.1.3 Analyse longitudinaler Datensätze

Im dritten Teil der statistischen Analysen wurden longitudinale Daten aus der Arevir-Datenbank analysiert. Dazu wurden Sequenzdaten von 10 HIV-Patienten mit einem Korezeptorswitch von R5 zu X4 bzw. mit einer Reduktion in der Falsch-Positiv-Rate (FPR), was eine Annäherung an CXCR4-trope Sequenzen bedeutet, untersucht. Von diesen 10 Patienten standen 26 V3-Sequenzen zur detaillierten Analyse zur Verfügung. Der Tropismus der Sequenzen wurde mit Hilfe des geno2pheno_[coreceptor]-Tools mit einem Cutoff der FPR von 20 % vorhergesagt. Wie bereits in den Analysen des Los Alamos und HIV-GRADE Datensatzes gezeigt, konnten auch in dieser Analyse G-zu-A Substitutionen an A3F- und A3G-Erkennungsmotiven, die mit einer Verringerung der Falsch-Positiv-Rate einhergingen, beobachtet werden (Tab. 3.2). So zeigte sich z.B. in der ersten Probe von Patient 4 an Position 24 mit GA ein A3F- und an Position 25 mit GG ein A3G-Erkennungsmotiv. In der darauffolgenden Probe, die 41 Monate später entnommen wurde, konnten G-zu-A Mutationen entsprechend dem APOBEC-Mutationsmuster an diesen Positionen detektiert werden.

In den longitudinalen Sequenzdaten der 10 untersuchten Patienten wurden an den analysierten Positionen fünf APOBEC3G und sieben APOBEC3F assoziierbare G-zu-A Mutationen nachgewiesen. Des Weiteren zeigten sich sieben G-zu-A Mutationen, die nicht in APOBEC-Erkennungsmotiven lagen.

Tabelle 3.2: Analyse der G-zu-A Mutationen longitudinaler V3-Sequenzdaten von 10 HIV-infizierten Patienten der Arevir-Datenbank

Ausschnitt aus dem V3-Nukleotidalignment von 10 Patienten, die einen Korezeptorswitch oder eine Reduktion der Falsch-Positiv-Rate (FPR) aufwiesen. Aufgeführt sind das Zeitintervall zwischen den Probenentnahmen, die FPR mit entsprechendem Tropismus und die Aminosäuren (AS) 11, 22, 23, 24 und 25 mit entsprechender Nukleotidsequenz.

Grau: APOBEC3G-Erkennungsmotiv (GG) mit G-zu-A Mutation

Schwarz: APOBEC3F-Erkennungsmotiv (GA) mit G-zu-A Mutation

Fett: G-zu-A Mutation unabhängig von einem APOBEC-Erkennungsmotiv

Zeitintervall in Monaten	Patient	geno2pheno		AS11			AS22			AS23			AS24			AS25		
		Tropismus	FPR (%)	-31	-32	-33	-64	-65	-66	-67	-68	-69	-70	-71	-72	-73	-74	-75
0	1	X4	16.4	A	G	T	A	C	A	A	C	A	G	G	A	G	G	C
1		X4	11.5	G	G	T	A	C	A	A	C	A	G	G	A	G	G	C
38		X4	6.8	A	G	T	A	C	A	A	C	A	-	-	-	A	A	A
0	2	R5	89.1	A	G	T	G	C	A	A	C	A	G	G	A	G	A	C
4		X4	17.8	A	G	T	G	C	A	A	G/c	A	-	-	-	G	A	C
0	3	R5	23.9	A	G	T	G	C	A	G	G	A	-	-	-	G	A	C
1		X4	15.6	A	G	T/c	G	C	A	G	G/c	A	-	-	-	G	A	C
4		X4	14.3	A	G	T	G	C	A	A	C	A	G	G	A	G/A	A	A
2		X4	1.7	A	G	G/C	A	C	A	A	C	A	G	G	A	C	A	C
0	4	R5	60.8	A	G	T	A	C	A	A	C	A	G	G	A	G	A	T
41		X4	1.7	A	G	T/g	G/a	C	A	A	C	A	G/a	G	A	G/A	A	T/C
0	5	R5	28.7	G/A	G	T	G/A	C	G/A	A	A	G/A	G/A	A	G	A	A	A
12		X4	1.7	G	G	T	A	C	A	A	C	A	-	-	-	A	A	A
0	6	R5	67	A	G	T	A	C	A	A	C	A	G	G	A	G	A	A
60		R5	51.8	A	G	T	G	C	A	A	C	A	G	G	A	G/a	A/g	C/t
0	7	R5	25.6	A	G	T	G	C	A	A	C	A	G	G	A	G	G	C/a
17		X4	18.2	A	G	T	G	C	A	A	C	A	G	G	A	G	A/g	A/g
0	8	R5	38.1	A	G	T	A	C	A	A	C	A	G	G	G/a	G	A/g	T
30		R5	21.2	A	G	T	A	C	A	A	C	A	G	G	A	G	A	T
2		R5	43	A	G	T	A	C	A	A	C	A	G	G	A	G	A	T
29		X4	15.6	A	G	T	A	C	A	A	C	A	G	G	A	G	A	T
1	X4	15.6	A	G	T	A	C	A	A	C	A	G	G	A	G	A	T	
0	9	R5	90	A	G	T	G	C	A	A	C	A	G	G	A	G	A	A
23		X4	1.7	C	A	T	A	C	A	A	C	A	G	G	A	G	A	C
0	10	R5	23	G/a	G	T	G	C	A	A	C	A	G	G	A	G/c	A	A/t
1		X4	0.1	A/gc	G/a	T	G	C	A	A	C	A	G	G/a	A	A/gc	A	A

Zusammenfassend zeigten die statistischen Analysen mit Sequenzdaten von drei unabhängigen Datenbanken (Los Alamos Sequence Database, HIV-GRADE und Arevir) deutliche Unterschiede zwischen den R5- und X4-Sequenzdatensätzen, sowohl in der relativen Triplettzusammensetzung als auch in der durchschnittlichen Triplett Häufigkeit. In den Datensätzen HIV-GRADE und Los Alamos konnte sowohl für das Triplett GGN (Gly) als auch für GAN (Glu/Asp), die APOBEC-Erkennungsmotive beinhalten, eine Reduktion in der Häufigkeit von R5 zu X4 gezeigt werden. Diese Abnahme ging mit einer gleichzeitigen Zunahme der Häufigkeit der Triplets AGR (Arg) und AAR (Lys) einher, die als Resultat einer G-zu-A Mutation aus den APOBEC-Erkennungsmotiven hervorgehen. In einer Korrelationsanalyse aller möglichen Nukleotidsubstitutionen zwischen R5- und X4-Sequenzen ging die G-zu-A Substitution als häufigste Nukleotidsubstitution hervor, mit der stärksten Ausprägung an Tropismus-relevanten Positionen. Auch in der Analyse der longitudinalen Daten konnten G-zu-A Mutationen an APOBEC3F- und 3G-Erkennungsmotiven mit einer Abnahme der FPR assoziiert werden. Somit verstärkt diese statistische Analyse den Hinweis auf einen Einfluss von APOBEC auf den Korezeptorswitch durch die Entstehung von CXCR4-tropen Varianten.

3.2 Experimentelle Analyse des mutagenen Einflusses von APOBEC auf den Korezeptorgebrauch von HIV

Aufgrund der Ergebnisse der statistischen Analyse, die G-zu-A Substitutionen verstärkt in APOBEC-Erkennungsmotiven an Tropismus-relevanten Positionen aufzeigte, verfestigten sich die Hinweise, dass APOBEC an der Entstehung von X4-Varianten bzw. am Korezeptorswitch beteiligt sein könnte. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, sollte der Einfluss von APOBEC auf den Tropismus von HIV experimentell im Zellkultursystem analysiert werden.

Die mutagene Wirkung von APOBEC auf HIV ist eng an die Funktionalität des viralen Gegenspielers Vif (Viral Infektivitätsfaktor) gebunden. Um den Einfluss APOBECs möglichst nah am in vivo System zu analysieren, sollte der Effekt APOBECs unter Wechselwirkung beider Faktoren, APOBEC und Vif, in Zellkultursystemen analysiert werden.

3.2.1 Herstellung rekombinanter unterschiedlich Vif-defizienter HI-Viren

Die Arbeitsgruppe von Paul D. Bieniasz beschrieb 2005 natürlich auftretende Variationen im *vif*-Gen von HIV und deren Einfluss auf APOBEC3G/3F (Simon et al., 2005). Die Vif-Varianten K22E, Y40H und E45G zeigten unterschiedlich starke Neutralisationsaktivitäten gegenüber den APOBEC-Proteinen A3F und A3G (Abb. 3.3). Sowohl A3F als auch A3G wurden am stärksten vom Wildtyp NL4-3 neutralisiert. K22E zeigte nur geringfügige Neutralisationsaktivitäten

gegenüber A3F und A3G. Die Vif-Varianten Y40H und E45G konnten im Vergleich zu K22E A3F und A3G stärker neutralisieren, jedoch nicht so stark wie der HIV-Wildtyp NL4-3.



Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Neutralisationsaktivität von Vif-Varianten gegenüber A3G und A3F

(adaptiert nach Simon et al., 2005)

Auf der Grundlage dieser Publikation wurden die Vif-Varianten K22E, Y40H und E45G für die Analyse des Einflusses von APOBEC auf HIV ausgewählt, um Vif-abhängig die Aktivität von APOBEC3G/3F zu modulieren.

Durch sequenzspezifische Mutagenese wurden die Vif-Variationen K22E, Y40H und E45G in den *vif*-Bereich des NL4-3 beinhaltenden pET14b-Vektors eingebracht und anhand von Sequenzanalysen bestätigt. Eine replikationsfähige NL4-3-Vif-Deletionsvariante wurde von Klaus Strebel zur Verfügung gestellt. Parallel dazu wurde die CCR5-trope *env*-Region des Env-Expressionsplasmids pCAGGStat-env_R5 mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI in den proviralen HIV-Vektor pNL4-3 kloniert und durch Sequenzanalysen überprüft. In diesem CCR5-tropen proviralen HIV-Klon pNL4-3_R5 erfolgte dann die Insertion der 4 Vif-Varianten Del-Vif, K22E, Y40H und E45G aus den pET14b-Konstrukten über die Restriktionsendonukleasen AgeI und EcoRI. Restriktions- und Sequenzanalysen überprüften und bestätigten den Klonierungserfolg. Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht über die 5 generierten rekombinanten HIV-Klone.

Durch Transfektion der Plasmid-DNA in 293T-Zellen und anschließende Überinfektion auf SupT1R5-Zellen wurden Virusüberstände hergestellt. Diese wurden bezüglich ihrer TCID50 (Tissue culture infectious dose 50 %) charakterisiert.

Tabelle 3.3: Übersicht über die generierten und verwendeten rekombinanten HIV-Vif-Varianten

Kurzbezeichnung	Name	Vif	Envelope
WT	pNL4-3_WT_R5	Wildtyp	NL4-3-R5
K22E	pNL4-3_K22E_R5	K22E	NL4-3-R5
Y40H	pNL4-3_Y40H_R5	Y40H	NL4-3-R5
E45G	pNL4-3_E45G_R5	E45G	NL4-3-R5
Del-Vif	pNL4-3_Del_vif_R5	Deletion	NL4-3-R5

3.2.2 Generierung einer Tetrazyklin-induzierbaren APOBEC-exprimierenden Zelllinie

Um die mutagene Wirkung gradueller Aktivitäten von A3G und A3F auf replizierende Viren gezielt untersuchen zu können, sollten HIV-infizierbare Zellkultursysteme mit jeweils kontrollierter A3G/A3F-Aktivität hergestellt werden. Zur Herstellung dieser APOBEC-exprimierenden Zelllinien wurde das induzierbare TetOn-Expressionssystem verwendet. Um eine Vergleichbarkeit mit anderen HIV-Replikationssystemen zu gewährleisten, sollte dieses System stabil in ein bestehendes HIV-Zellkultursystem eingebracht werden. Dazu mussten Zelllinien generiert werden, welche Tetrazyklin-abhängig A3G bzw. A3F exprimieren und weiterhin eine Virusreplikation ermöglichen. HIV sollte nachfolgend in diesen Zellen replizieren, um den mutagenen Effekt von APOBEC auf HIV analysieren zu können.

3.2.2.1 Klonierung der benötigten Vektoren

Zur Generierung der Tetrazyklin-induzierbaren APOBEC-exprimierenden Zelllinien dienten die Vektoren pcDNA6/TR und pcDNA4/TO/myc-HisB. Die cDNAs von APOBEC3G und 3F wurden mittels präparativer Restriktionsanalyse mit HindIII und XhoI aus den Expressionsplasmiden pcDNA3.1/APOBEC3G und pcDNA3.1/APOBEC3F isoliert und in den pcDNA/TO/myc-HisB Vektor ligiert. Der Erfolg der Klonierung in die Vektoren pcDNA4/TO/A3F und pcDNA4/TO/A3G wurde anhand einer Sequenzanalyse der Rekombinanten bestätigt.

3.2.2.2 Charakterisierung der endogenen APOBEC-Level humaner Zellen

Die Quantifizierung der endogenen APOBEC-Konzentrationen erfolgte nach den von Refsland et al. (2010) veröffentlichten Methoden zur Bestimmung von APOBEC-mRNA-Spiegeln in verschiedenen Zelltypen und wurde am Haushaltsgen TBP relativiert. Dazu wurden die PBMCs von zwei HIV-negativen Spendern mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten isoliert und für drei Tage ohne bzw. mit dem Stimulanz PHA (2 v/v%) kultiviert. Die Zelllinien PM1, 293T und SupT1R5 wurden nach dem Auftauen für eine Woche unter Normalbedingungen kultiviert. Die primären

PBMCs lieferten unstimuliert A3G-mRNA-Kopienzahlen von 20.000 bzw. 40.000 (Abb. 3.4). Die Stimulation mit PHA führte, wie auch in anderen Publikationen schon beschrieben (Stopak et al., 2003; Refsland et al., 2010), zu einem Anstieg der A3G-mRNA-Kopienzahlen auf 70.000 Kopien/ 10^4 Kopien TBP. Die PM1-Zellen, die als nicht-permissive Zellen eingestuft wurden (Han et al., 2008), zeigten A3G-Kopien von 16.000 und A3F-Kopien von 4.000 Kopien/ 10^4 Kopien TBP. In den 293T-Zellen und in den SupT1R5-Zellen, die für die Herstellung der Tetrazyklin-induzierbaren APOBEC-exprimierenden Zelllinie verwendet werden sollte, konnten mittels quantitativer Echtzeit-PCR keine relevanten Kopienzahlen gemessen werden (Abb. 3.4).

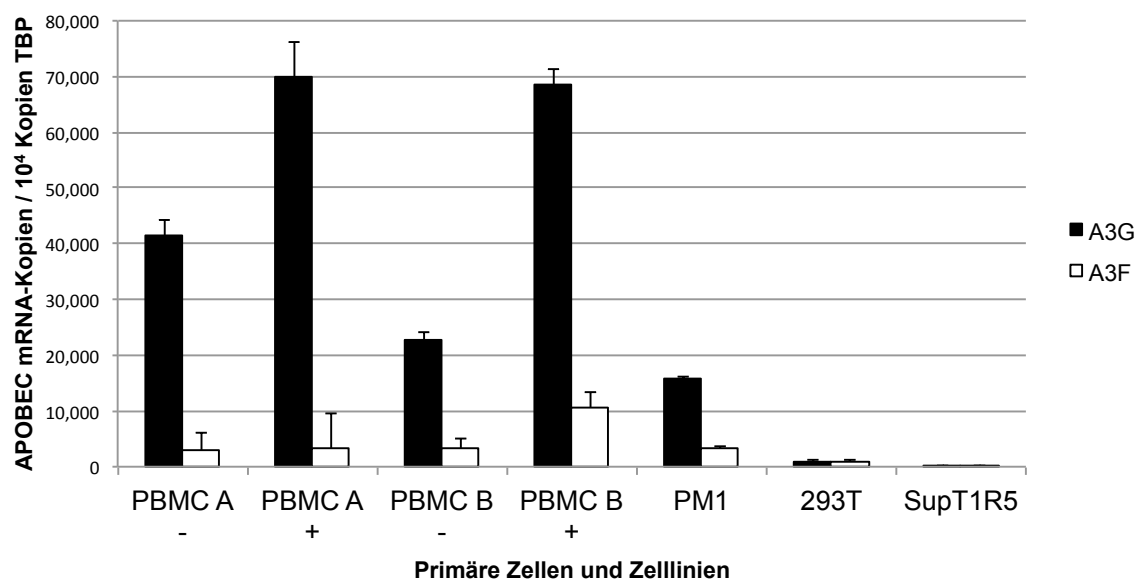


Abbildung 3.4: Endogene A3G und A3F mRNA-Konzentrationen primärer Zellen und Zelllinien

Quantifizierung der A3G (schwarz) und A3F (weiß) mRNA-Level verschiedener Zellen. Die PBMCs zweier HIV-negativer Spender (A und B) wurden mittels Ficoll-Gradient isoliert und für drei Tage ohne (-) oder mit dem Stimulanz PHA (+) kultiviert. Die Bestimmung der APOBEC mRNA-Kopien in den Zelllinien PM1, 293T und SupT1R5 erfolgte nach einer Woche Kultivierung. Alle RNA-Kopien wurden auf 10^4 Kopien des Haushaltsgens TBP bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. Die quantitative Bestimmung erfolgte in Duplikaten.

3.2.2.3 Stabile Transfektion

SupT1R5-Zellen, die durch stabile Transfektion des CCR5-Korezeptors (Means et al., 2001) aus SupT1-Zellen erzeugt wurden, exprimieren kein endogenes APOBEC (Abb. 3.4). Daher wurden sie für die Herstellung der Tetrazyklin-induzierbaren APOBEC-exprimierenden Zelllinie verwendet. Unter optimierten Transfektionsbedingungen wurden in SupT1R5-Zellen die Vektoren pcDNA6/TR und pcDNA4/TO/A3F bzw. pcDNA4/TO/A3G kotransfiziert. Obwohl die minimal-toxischen Konzentrationen der Selektionsreagenzien Blastocidin und Zeocin zuvor

bestimmt wurden, konnten unter Blasticidin/Zeocin-Selektion keine doppelt-stabil transfizierten Zellklone angezüchtet werden.

Die Einzeltransfektion des Vektors pcDNA6/TR und anschließende Selektion mit Blasticidin resultierte jedoch in einer Blasticidin-resistenten Zellpopulation. Nach klonaler Selektion und Anzucht homogener Zellpopulationen wurden diese hinsichtlich ihrer Expression des Tet-Repressors mittels quantitativer Echtzeit-PCR getestet. Eine vorausgegangene funktionelle Testung durch Transfektion eines entsprechenden Luziferase-Reporterkonstruktes pUHC13-3, welches in Anwesenheit des Tet-Repressors Luziferase exprimiert, blieb aufgrund zu geringer Transfektionseffizienz erfolglos.

Die mRNA-Expressionsmengen des Tet-Repressor-Konstrukts von zehn Zellklonen ergaben Kopienzahlen zwischen 20.000 und 40.000 mRNA-Kopien/ 10^4 Kopien HPRT. In den untransfizierten SupT1R5-Zellen konnten wie erwartet keine Tet-Repressor-Kopien nachgewiesen werden (Abb. 3.5).

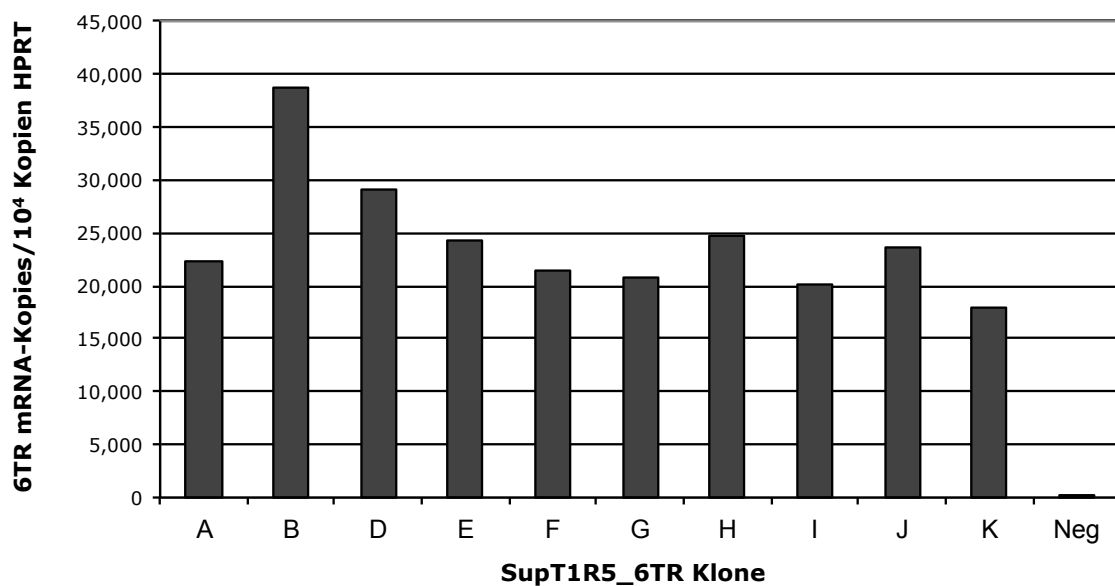


Abbildung 3.5: mRNA-Expressionslevel des Tet-Repressor-Konstrukts 6TR stabil transfizierter Zellklone

Nach Transfektion des Tet-Repressor-Konstrukts 6TR wurden die mRNA-Kopien von 10 selektierten Zellklonen A-K, angeglichen an das Haushaltsgen HPRT, analysiert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte SupT1R5-Zellen mitgeführt.

Die Zellklone B und D mit den höchsten Tet-Repressor-Kopienzahlen wurden für die nachfolgende Transfektion kultiviert und die minimal-toxische Zeocin-Konzentration wurde bestimmt. Dabei zeigte sich eine 10-fach erhöhte Empfindlichkeit der 6TR-transfizierten Zellen

gegenüber Zeocin, verglichen mit den ursprünglich getesteten SupT1R5-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Nach Transfektion von pcDNA4/TO/A3F bzw. pcDNA4/TO/A3G in die 6TR-transfizierten SupT1R5_B und _D-Zellen konnten durch die angeglichenen Zeocin-Konzentrationen erfolgreich Zellpopulationen selektioniert und klonal expandiert werden. Der Erfolg der stabilen Transfektion wurde in einer ersten Analyse von 48 Zellklonen durch eine quantitative Bestimmung der mRNA-Kopien von A3G bzw. A3F kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

Anhand der ermittelten Basalexpression (5.000 – 9.000 APOBEC-mRNA-Kopien/10⁴ Kopien TBP) wurden neun Zellklone mit geringer basaler Expression, vier A3F- und fünf A3G-exprimierende Zellklone, ausgewählt. Von diesen neun Zellklonen wurde die basale und die Tet-induzierte APOBEC-mRNA-Kopienzahl 20 h nach Induktion bestimmt (Abb. 3.6). A3F-induzierbare Zellklone zeigten eine leicht erhöhte mRNA-Basalexpression von durchschnittlich 7.500 mRNA-Kopien gegenüber den A3G-induzierbaren Klonen mit durchschnittlich 6.000 mRNA-Kopien. Allerdings konnten im Gegensatz dazu in den A3G-Klonen durch Tetrazyklin höhere A3G-mRNA-Mengen induziert werden. Die Maximalwerte für A3G lagen bei 30.000 Kopien/10⁴ Kopien TBP und für A3F bei 24.000 Kopien/10⁴ Kopien TBP. Eine hohe Induzierbarkeit (fache Induzierbarkeit, Abb. 3.6) von A3F bzw. A3G und eine niedrige Basalexpression dienten als Auswahlkriterien von je einem A3F- bzw. A3G-Zellklon (DF5 und DG9) zur weiteren Charakterisierung.

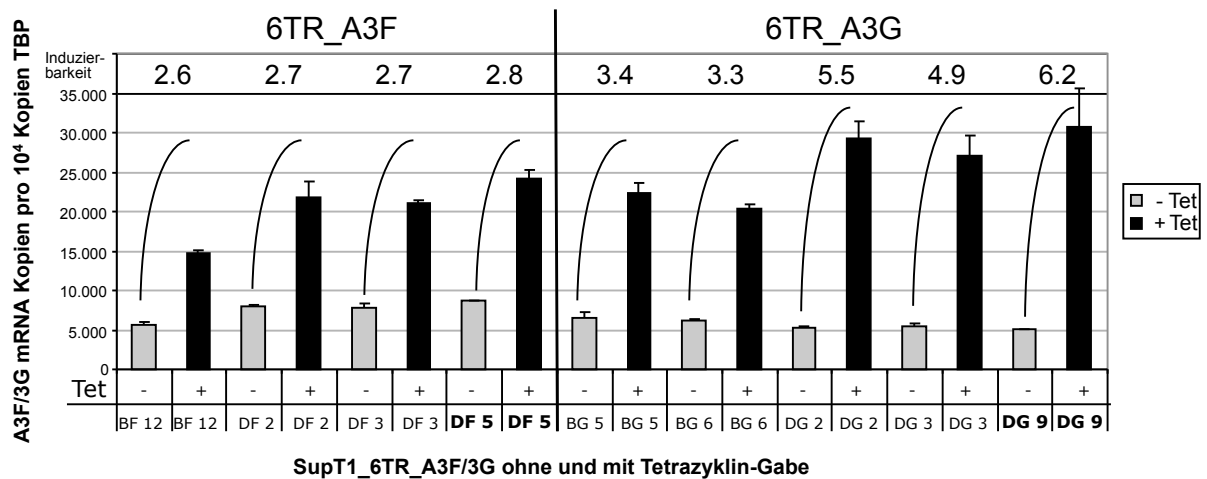


Abbildung 3.6: Bestimmung der Induzierbarkeit stabil transfizierter Tet-induzierbarer APOBEC3F/3G-exprimierender SupT1R5-Zellklone

Messung der A3F- und A3G-mRNA Kopien von 4 A3F (BF12-DF5) und 5 A3G (BG5 – DG9) SupT1R5-Zellklonen. Die basal exprimierte APOBEC-mRNA-Kopien sind in grau und die APOBEC-mRNA-Mengen nach Tetrazyklin-Induktion sind in schwarz dargestellt. Die Zellklone DF5 und DG9 wurden zur weiteren Analyse ausgewählt. Die fache Induzierbarkeit wurde für jeden Zellklon berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten im Doppelansatz.

3.2.2.4 Charakterisierung der generierten induzierbaren APOBEC-exprimierenden Zellklone

Stabilität der APOBEC-Expression

Nach Bestätigung der APOBEC-Induzierbarkeit mit dem stabileren Tetrazyklinderivat Doxyzyklin (Dox) wurden alle weiteren Versuche mit Dox durchgeführt. Da die HIV-Replikation über einen längeren Zeitraum untersucht werden sollte, wurde die APOBEC-Induzierbarkeit der 2 Zellklone DF5 (A3F) und DG9 (A3G) nach täglicher Dox-Zugabe über 6 Tage analysiert. Für beide Zellklone zeigte sich ein reproduzierbarer und stabiler Anstieg der APOBEC-mRNA-Kopienzahlen von ca. 5.000 APOBEC-Kopien/ 10^4 Kopien TBP auf ca. 20.000 Kopien APOBEC-Kopien/ 10^4 Kopien TBP (Abb. 3.7).

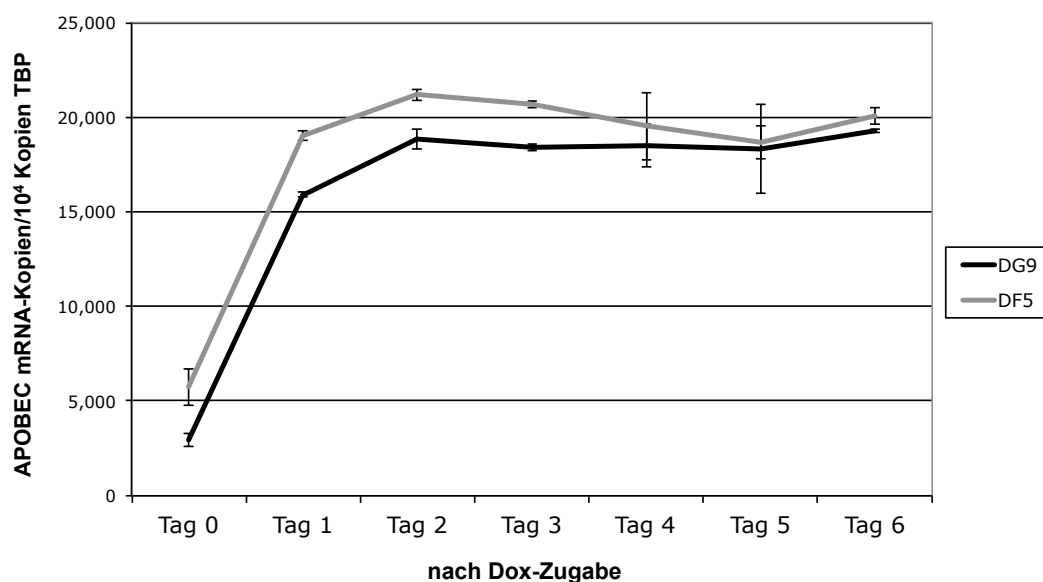


Abbildung 3.7: Induzierte APOBEC-mRNA-Expression der Zellklone DF5 und DG9 über 6 Tage

Die APOBEC-Induzierbarkeit der 2 Zellklone DF5 (A3F, grau) und DG9 (A3G, schwarz) nach täglicher Dox-Zugabe wurde anhand der APOBEC-mRNA-Kopienzahl 6 Tage lang analysiert. Die APOBEC-mRNA-Konzentrationen wurden in Relation zum Haushaltsgen TBP quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten im Doppelansatz.

Die gesteigerten Mengen an A3G nach induzierter Expression konnten auf Proteinebene in einer Western Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 3.8). Als Positivkontrolle diente ein Proteinextrakt von PBMCs, die endogenes A3G exprimieren (Spur 1). Als Negativkontrolle wurden die Ausgangszellen der stabilen Transfektion SupT1R5 verwendet, in welchen auch auf mRNA-Ebene mit der sensitiveren quantitativen Echtzeit-PCR keine Kopien detektierbar waren

(Spur 2). Wie in Spur 1 zu sehen, konnte in den PBMCs A3G nachgewiesen werden. Die SupT1R5-Zellen (Spur 2) sowie die stabil transfizierten A3G-induzierbaren DG9-Zellen (Spur 3) zeigten ohne Induktion keine sichtbaren Mengen an Protein. Eine Induktion der Expression mit Dox resultierte in nachweisbaren A3G-Proteinmengen. Diese waren im Vergleich zu den PBMCs etwas geringer, jedoch während der 6-tägigen Induktion stabil.

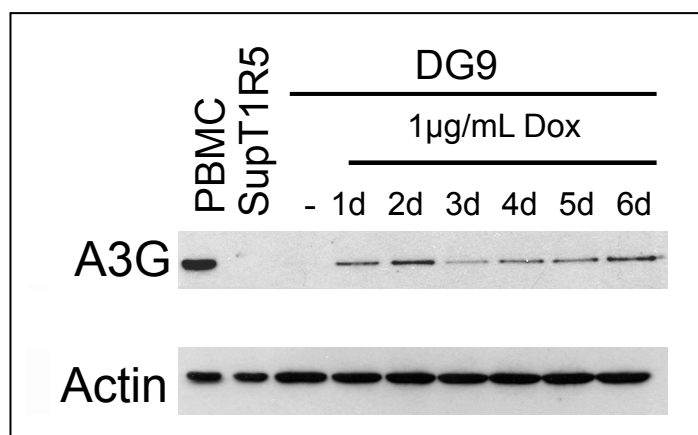


Abbildung 3.8: Nachweis Dox-induzierbarer A3G-Expression in der neugenerierten Zelllinie DG9 im Western Blot

Spur 1: PBMC-Extrakt (Positivkontrolle), Spur 2: untransfizierte SupT1R5-Zellen, Spur 3: stabil transfizierte DG9-Zellen ohne Dox, Spur 4-9: induzierbare APOBEC-Expression der stabil transfizierten DG9-Zellen nach täglicher Zugabe von Dox zum Zellkulturmedium über 6 Tage (1 d bis 6 d). Inputkontrolle: Actin.

Eine Bestätigung der APOBEC3F-Proteinmengen im Western Blot war aufgrund unspezifischer Signale nicht erfolgreich.

Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle

Um eine Vergleichbarkeit der stabilen Zelllinien untereinander und mit anderen HIV-Zellkultur-Systemen zu gewährleisten, wurden die Zelllinien 6TR, DG9 und DF5 hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Als Negativkontrolle diente eine Isotyp-Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die dem Immunglobulin-Isotyp der spezifischen Primärantikörper entsprachen. Dabei konnten keine Veränderungen im Expressionsmuster der für die HIV-Infektion relevanten Rezeptoren und Korezeptoren (CD4, CCR5 und CXCR4) beobachtet werden (Abb. 3.9).

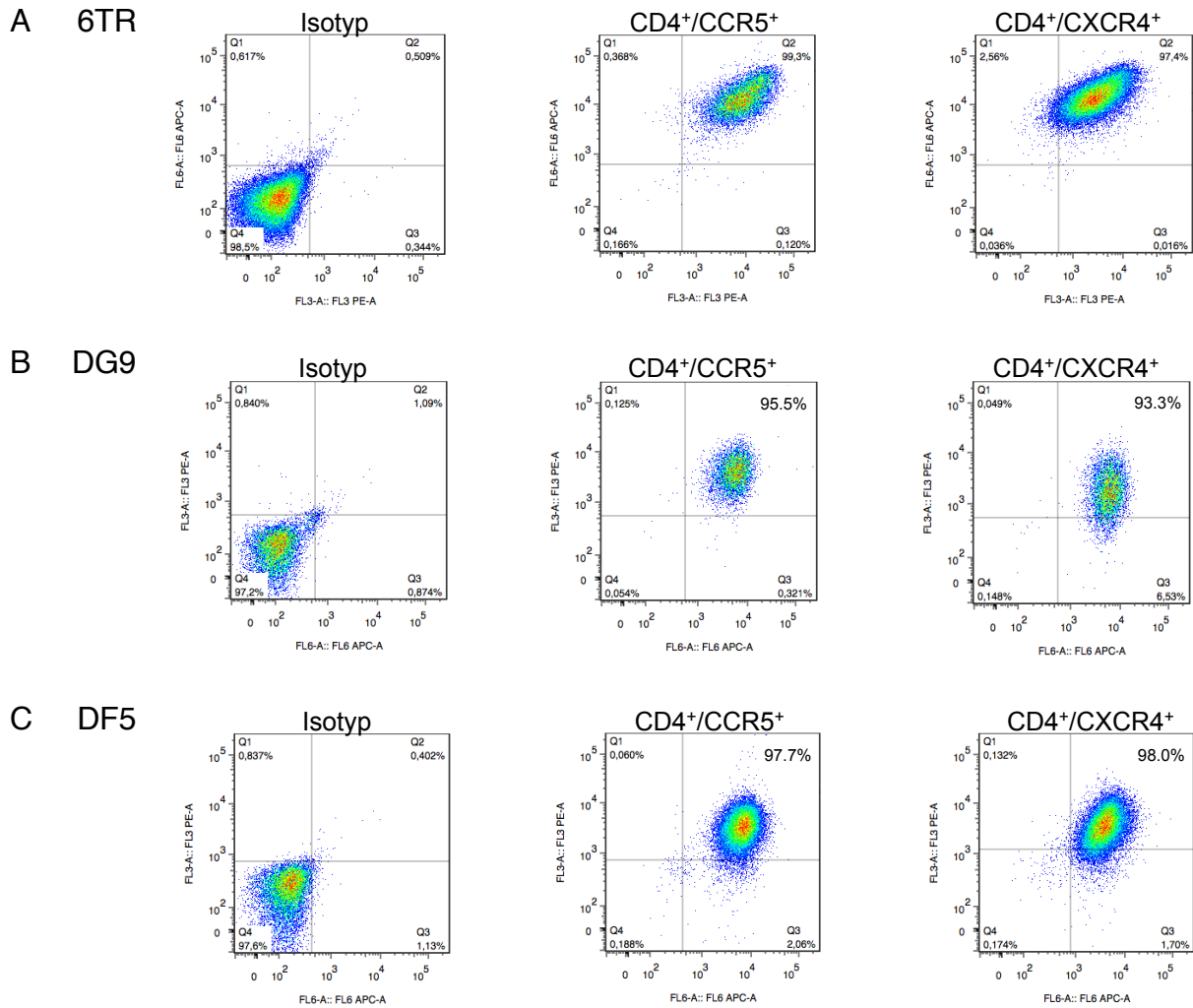


Abbildung 3.9: FACS-Analyse der für die HIV-Infektion relevanten Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4

Die Charakterisierung der Oberflächenmoleküle der Zellklone 6TR (A), DG9 (B) und DF5 (C) erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse durch Doppel-Färbungen der Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen CD4/CCR5 und CD4/CXCR4. Als Negativkontrolle diente eine Isotyp-Kontrollfärbung.

3.2.2.5 Evaluation der Assaybedingungen

In einem ersten Experiment wurde die Infizierbarkeit der Zellen und die Replikationsfähigkeit von CCR5-tropen HI-Viren in den Zellklonen 6TR, DG9 und DF5 überprüft. Dabei zeigte sich, dass Vif-defiziente Viren wie K22E und Del-Vif trotz der Basalexpression von A3F und A3G in diesen Zellklonen replizieren können. Somit konnten die neugenerierten Zellen für die Analyse des APOBEC-vermittelten Effektes verwendet werden. In weiteren Experimenten wurden die optimale Infektionsdosis der mittels TCID₅₀ charakterisierten Virusüberstände und der optimale Versuchsablauf ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass Vif-defiziente Viren trotz APOBEC-Basalexpression nach einem Replikationszyklus messbare p24 Ag-Mengen zeigten und eine erneute Überinfektion erfolgreich war. Der Wildtyp führte weder in der ersten noch in der

zweiten Infektion zu einer vollständigen Lyse der Zellkultur. Ein Infektionsmodus mit 50 TCID₅₀ pro 500.000 Zellen und 200 µL transferiertem Virusüberstand konnte alle Voraussetzungen erfüllen.

Die unter 3.2.2 generierten und charakterisierten Tet-induzierbaren APOBEC3G- bzw. 3F-exprimierenden SupT1R5-Zellklone DG9 und DF5 erreichten nach Induktion APOBEC-Expressionsmengen von 20.000 mRNA-Kopien/10⁴ Kopien TBP. Im Vergleich zu den APOBEC-negativen 6TR-Zellen zeigten sie eine unveränderte Expression von CD4- und Ko-Rezeptoren und erlaubten die Replikation Vif-defizienter HI-Viren. Die Zellklone DG9 (A3G) und DF5 (A3F) wurden expandiert, um anhand ihrer basalen und induzierten APOBEC-Expression den mutagenen Einfluss von APOBEC auf HIV zu untersuchen.

3.2.3 Analyse der mutagenen Aktivität von APOBEC auf HIV-Vif-Varianten im induzierbaren System

3.2.3.1 Untersuchung der antiviralen Effekte von A3G und A3F auf HIV-Vif-Varianten im induzierbaren System

Die APOBEC-exprimierenden SupT1R5-Zellen 6TR, A3G (DG9) und A3F (DF5) (vgl. 3.2.2) wurden jeweils mit und ohne Dox-Induktion mit den fünf verschiedenen HIV-Vif-Varianten Del-Vif, K22E, Y40H, E45G und dem Wildtyp (NL4-3) infiziert (vgl. 3.2.1). Nach acht Tagen Kultivierung, mit Überinfektion auf die gleichen Zellen, erfolgte die Analyse der p24 Ag-Menge als Maß der Replikationsfähigkeit. Die Überstände der ersten Infektion dienten dabei als Inputkontrolle, da sich die antivirale Wirkung von APOBEC erst nach Überinfektion entfaltet und somit APOBEC-vermittelte Effekte erst in den Überständen der zweiten Infektion erkennbar sein sollten.

Während der Wildtyp auch bei ansteigenden Mengen an APOBEC3G (A3G, A3G+) und 3F (A3F, A3F+) unverändert replizieren konnte (gemessen als p24 Ag-Menge) (Abb. 3.10 A), führten ansteigende Mengen an APOBEC3G und 3F in den Vif-defizienten Virus-Kulturen zu einer unterschiedlich starken Verminderung der Replikation (Abb. 3.10 B-E). Die stärkste Reduktion zeigte die Del-Vif-Variante. Im Vergleich zu den APOBEC-negativen 6TR-Zellen reduzierten die basalen Expressionsmengen von A3G die p24 Ag-Menge der Del-Vif-Viruskultur um 1,6 log, die Dox-induzierte A3G-Menge (A3G+) um 2,9 log (Abb. 3.10 B).

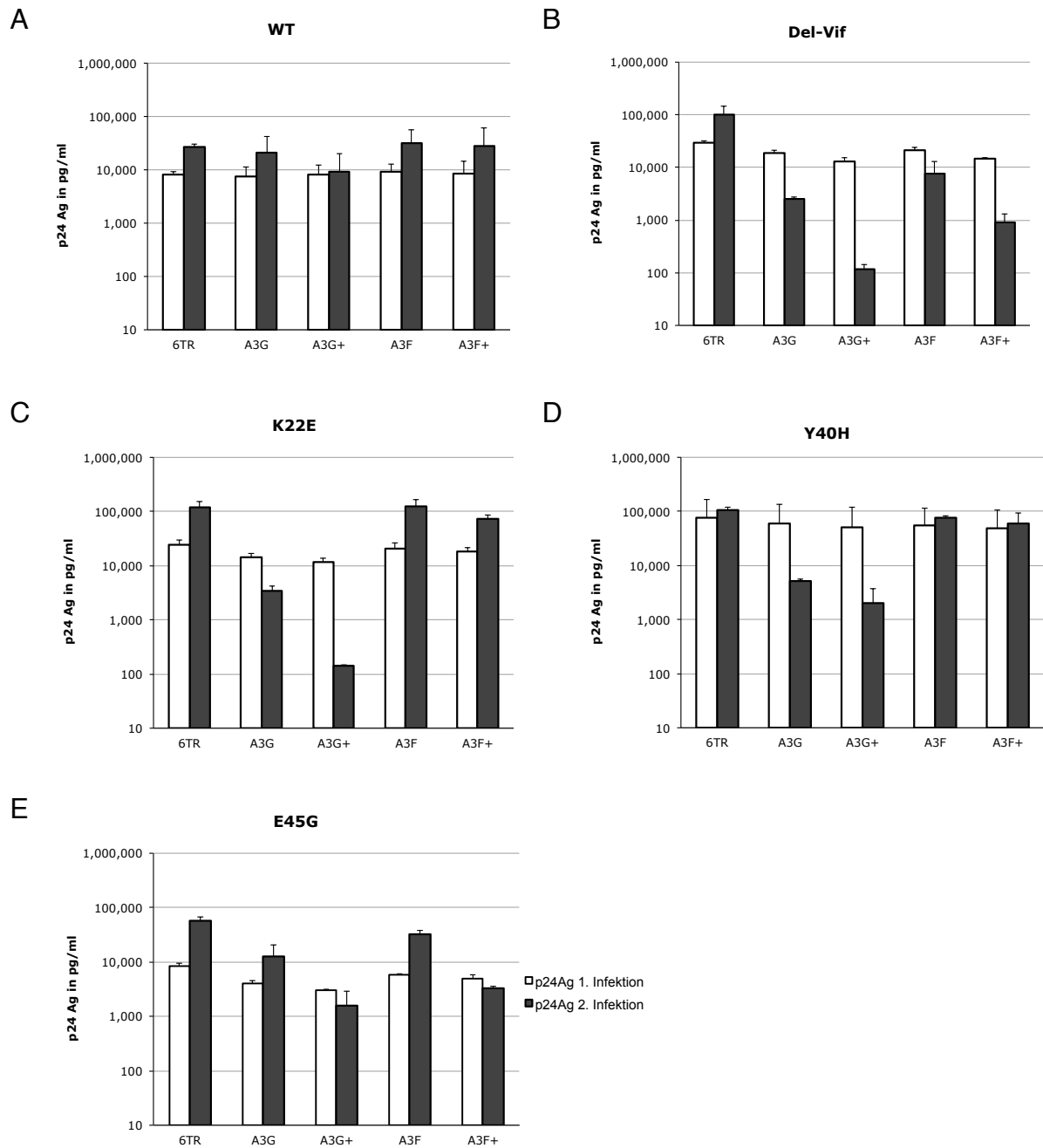


Abbildung 3.10: APOBEC-vermittelte Inhibition der Replikation verschiedener Vif-defizienter HI-Viren

p24 Ag-Mengen unterschiedlich Vif-defizienter Viruskulturen nach 1. und 2. Infektion (Überinfektion) unter steigenden APOBEC-Mengen der Zellen: 6TR (kein APOBEC), A3G (DG9, A3G-Basalexpression), A3G+ (DG9, induzierte A3G-Menge), A3F (DF5, A3F-Basalexpression), A3F+ (DF5, induzierte A3F-Menge). Zusätzlich zum WT als Negativkontrolle (A) und Del-Vif als Positivkontrolle (B) wurden die Vif-Varianten K22E (C), Y40H (D) und E45G (E) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Die antiviralen Effekte von A3F fielen geringer aus. Unter basalen Expressionsmengen von A3F reduzierten sich die p24 Ag-Mengen von Del-Vif um 1,1 log und bei induzierten A3F-Mengen (A3F+) um 2,0 log (Abb. 3.10 B). Ähnlich inhibitorische Effekte zeigte auch die Vif-Variante K22E. Deren Replikation sank unter basaler und induzierter A3G-Expression (A3G- und A3G+) um 1,5 log bzw. 2,9 log. A3F zeigte bei dieser Vif-Variante keinen inhibitorischen Effekt. In den Vif-Varianten Y40H und E45G führten ansteigende A3G-Mengen zu einem p24 Ag-Abfall um 1,7 log (Y40H) bzw. 1,6 log (E45G) (Abb. 3.10 D, E). Ferner zeigte die Vif-Variante E45G inhibitorische Effekte durch Dox-induzierte Mengen an A3F (A3F+) um 1,2 log (Abb. 3.10 E).

Die APOBEC-vermittelte Inhibition der Vif-Varianten bestätigte die antivirale Funktionalität der APOBEC3F/3G-exprimierenden SupT1R5-Zellen und ließ einen mutagenen Einfluss von APOBEC auf die nachfolgende Virusgeneration der kultivierten Vif-Varianten vermuten.

3.2.3.2 Genomanalyse der im induzierbaren Expressionssystem kultivierten Viruspopulationen

Die Ergebnisse der vorausgegangenen Experimente lieferten starke Indizien für einen mutagenen Einfluss APOBECs auf HIV. In diesem Fall müssten die Sequenzen der Nachkommenviren APOBEC-spezifische Mutationen zeigen. Um dies zu überprüfen, erfolgte mittels NGS (next generation sequencing) eine Genomanalyse der unter APOBEC-Expression kultivierten Viruspopulationen. Dazu wurden die *env*- und *nef*-Bereiche der Viruspopulationen des Wildtyps, der Vif-Varianten K22E und Del-Vif der folgenden sechs Zellkulturen Input (SupT1R5), 6TR, A3G, A3G+ (DG9, basal und induziert), A3F, A3F+ (DF5, basal und induziert) analysiert. Die aus den Überständen der APOBEC-SupT1R5-Virus-Kulturen extrahierte RNA wurde mittels One-Step-RT-PCR amplifiziert und aufgereinigt. Zum Vergleich wurde das für die Infektion verwendete Inputvirus ebenfalls analysiert. Nach äquimolarer Mischung der *env*- und *nef*-Amplifikate wurden diese zur parallelen NGS-Analyse versandt.

Die standardmäßige Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der generierten NGS-Sequenzen erfolgte von der *env*-Region. Die jeweiligen Viruspopulationen zeigten dabei, mit Ausnahme der WT-A3G+-Probe, eine vergleichbare Anzahl an Varianten und Einzelsequenzen (Tab. 3.4). Pro *env*-Bereich wurden ca. 21.000 Einzelsequenzen generiert, von denen im Durchschnitt 20.000 die Qualitätsstandards zur weiteren Auswertung erfüllten. Die PCR-Amplifikate enthielten durchschnittlich 320 unterschiedliche Varianten.

Tabelle 3.4: Qualitative und quantitative Analyse der im induzierbaren Zellkultursystem kultivierten Viruspopulationen

Übersicht über die während der NGS-Analyse generierte Anzahl an *env*-Varianten, Einzelsequenzen (Reads) und den Qualitätsstandards entsprechenden *env*-Sequenzen (Qualitative Reads), die für die Vorhersage des Tropismus verwendet wurden. Pro Virus (WT, K22E, Del-Vif) wurden die Viruspopulationen aus 6 Zellkulturen analysiert: Input (SupT1R5), 6TR, A3G, A3G+, A3F, A3F+.

	Name	Varianten	Reads	Qualitative Reads
WT	Input	308	15093	13989
	6TR	698	66960	65178
	A3G	16	307	285
	A3G+	393	25085	23873
	A3F	352	21381	20376
	A3F+	300	19279	18654
K22E	Input	264	16568	16245
	6TR	171	6552	6262
	A3G	244	12410	11631
	A3G+	421	20049	18961
	A3F	401	20711	19488
	A3F+	319	18369	17121
Del-Vif	Input	261	12961	12110
	6TR	533	52767	51539
	A3G	368	24296	22911
	A3G+	270	15337	14581
	A3F	181	7291	6931
	A3F+	294	14015	13071
	Mittelwert	322	20524	19623

Die so untersuchten Genbereiche *env* (760 bp) und *nef* (617 bp) enthielten insgesamt 201 APOBEC-Erkennungsmotive (Tab. 3.5), von denen 95 im *env*- und 106 im *nef*-Bereich lagen. Von den 95 APOBEC-Motiven der *env*-Region wurden 53 A3F- und 42 A3G-Motiven zugeordnet. Im analysierten *nef*-Bereich waren 57 A3F- und 49 A3G-Motive lokalisiert. Somit wurden die Effekte auf 110 A3F- und 91 A3G-Motive analysiert (Tab. 3.5).

Tabelle 3.5: Übersicht über die Anzahl an APOBEC3F und 3G-Motiven in den im induzierbaren System untersuchten Genbereichen *env* und *nef*

	APOBEC Motive		Gesamt
	A3F (GA)	A3G (GG)	
<i>env</i> -Region	53	42	95
<i>nef</i> -Region	57	49	106
	110	91	201

Mithilfe des geno2pheno_[coreceptor]-Tools für NGS-Daten wurde der Korezeptorgebrauch aller Einzelsequenzen mit einem Cutoff der FPR von 10 % (European Guidelines, Vandekerckhove, 2011) vorhergesagt. Anhand dieser Klassifizierung wurden die Anteile der X4-Varianten in den

Viruspopulationen bestimmt und daraus folgend der prozentuale Anstieg gegenüber der Inputpopulation errechnet.

Die WT-Population zeigte auf den APOBEC-negativen 6TR-Zellen und den APOBEC-exprimierenden Zellen einen Anstieg der X4-Varianten um 1,1 % (3.11 A). In der Viruspopulation der Vif-Variante K22E riefen das basale Expressionslevel von APOBEC3G (A3G) und die induzierten A3G-Mengen (A3G+) einen Anstieg der X4-Varianten um 2,9 % bzw. 3,3 % hervor (Abb. 3.11 B). In der Population der Vif-Deletionsvariante stiegen die Anteile an X4-Varianten nach A3G-Induktion (A3G+) um 2,5 % (Abb. 3.11 C). Auch basale und induzierte A3F-Level konnten in der Viruspopulationen Del-Vif die Anteile an X4-Varianten um 1,4 % (A3F) bzw. 3,6 % (A3F+) steigern (Abb. 3.11 C).

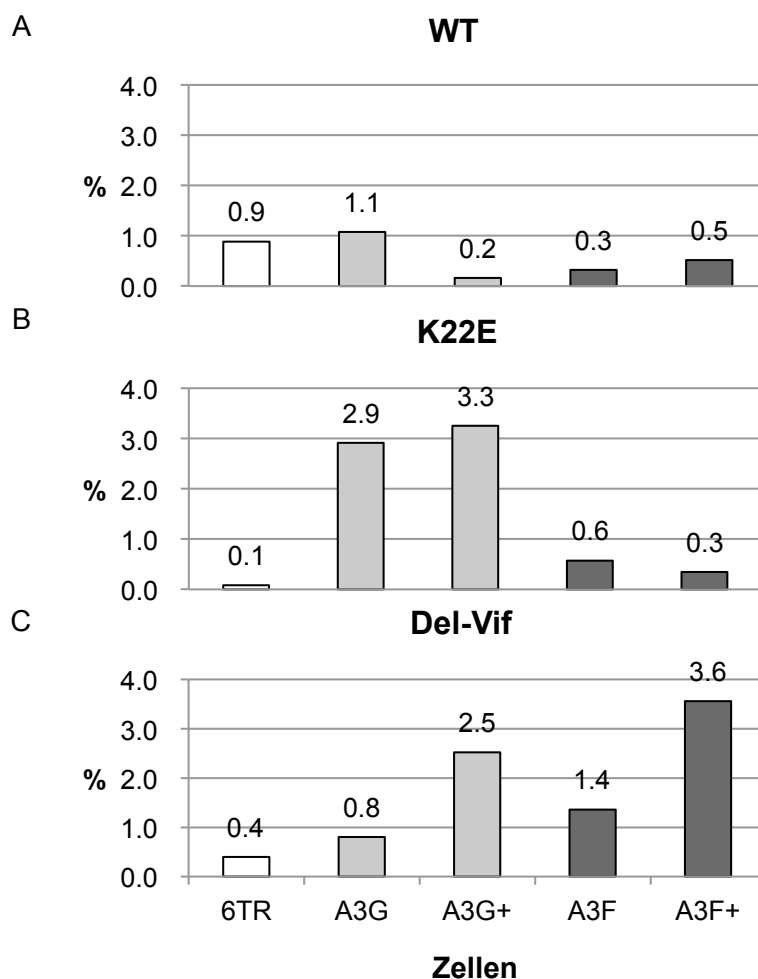


Abbildung 3.11: Anteil von CXCR4-tropen Varianten in Vif-defizienten Viruspopulationen nach Kultivierung in Zellen mit unterschiedlicher APOBEC-Expression

Prozentualer Anstieg der X4-Varianten unterschiedlich Vif-defizienter Viruskulturen nach Kultivierung in den Zellen: 6TR (kein APOBEC), A3G (A3G-Basalexpression), A3G+ (induzierte A3G-Expression), A3F (A3F-Basalexpression) und A3F+ (induzierte A3F-Expression). Der Anstieg der X4-Varianten in Viruspopulationen: WT (A), K22E (B) und Del-Vif (C) wurde gegenüber dem Inputvirus bestimmt. Die Tropismusvorhersage erfolgte mittels geno2pheno anhand der NGS-Sequenzdaten.

Der Anstieg an X4-Varianten in den Vif-defizienten Viruspopulationen unter APOBEC-Expression bestätigte die Hypothese, dass die APOBEC-Proteine A3G und A3F das Entstehen CXCR4-troper Virusvarianten fördern, da im Gegensatz zur WT-Population infolge der Vif-Defizienz APOBEC nicht oder nur teilweise abgebaut werden kann und dadurch G-zu-A Mutationen induziert.

3.2.3.3 Analyse der APOBEC-induzierten Sequenzmutationen im induzierbaren System

Da hauptsächlich die V3-Region den HIV-Tropismus determiniert und damit die Grundlage für die Korezeptorvorhersage bildet, wurden die nach Viruskultivierung auf den APOBEC-SupT1R5-Zellen entstandenen G-zu-A Mutationen anhand der NGS-Sequenzdaten analysiert (Abb. 3.12).

Dazu wurden pro Viruspopulation für jedes APOBEC-Motiv die prozentualen Anteile von Adenosin nach Passage im APOBEC-Zellkultursystem mit der Inputpopulation verglichen. Die häufigsten G-zu-A Mutationen in der WT-Population zeigten sich unter A3G-Basalexpression (A3G) an den Aminosäure-Positionen 17 und 24 (Abb. 3.12 A). An beiden Positionen befindet sich ein Glycin, welches an Position 24 durch das Triplet GGA und an Position 17 durch das Triplet GGG kodiert wird und somit zwei überlappende APOBEC3G-Motive (GG) enthält. Die beiden G-zu-A Mutationen an Aminosäure 17 (Glycin; GGG) sind mit bis zu 19 % die häufigsten G-zu-A Mutationen der WT-Population in V3 und bewirken einen Anstieg der X4-Varianten um 1,1 % (vgl. Abb. 3.11 A).

Die Viruspopulation der Vif-Variante K22E zeigte die häufigste G-zu-A Substitution in der A3G-Zellkultur an Aminosäure 24 (Glycin, GGA) mit 2,5 %. Unter induzierter A3G-Expression ließen sich keine G-zu-A Mutationen identifizieren (Abb. 3.12 B).

Ein geringer Anstieg der G-zu-A Mutationshäufigkeit zeigte sich dagegen in der Viruspopulation Del-Vif unter A3G-Basalexpression an Aminosäure 15 (0,5 %), 17 (0,6 %) und 28 (0,3 %). Basale (A3F) und induzierte (A3F+) Mengen an A3F resultierten in G-zu-A Mutationen an Aminosäure 9 (0,25 %) und 25 mit einer Häufigkeit von 1 % (A3F) bzw. 2,6 % (A3F+) (Abb. 3.12 C).

Der durch die APOBEC-Expression induzierte Anstieg von X4-Varianten in den Viruspopulationen (vgl. Abb. 3.11) konnte somit bis auf Aminosäure 25 keinen weiteren spezifischen Aminosäuren in V3 zugeordnet werden.

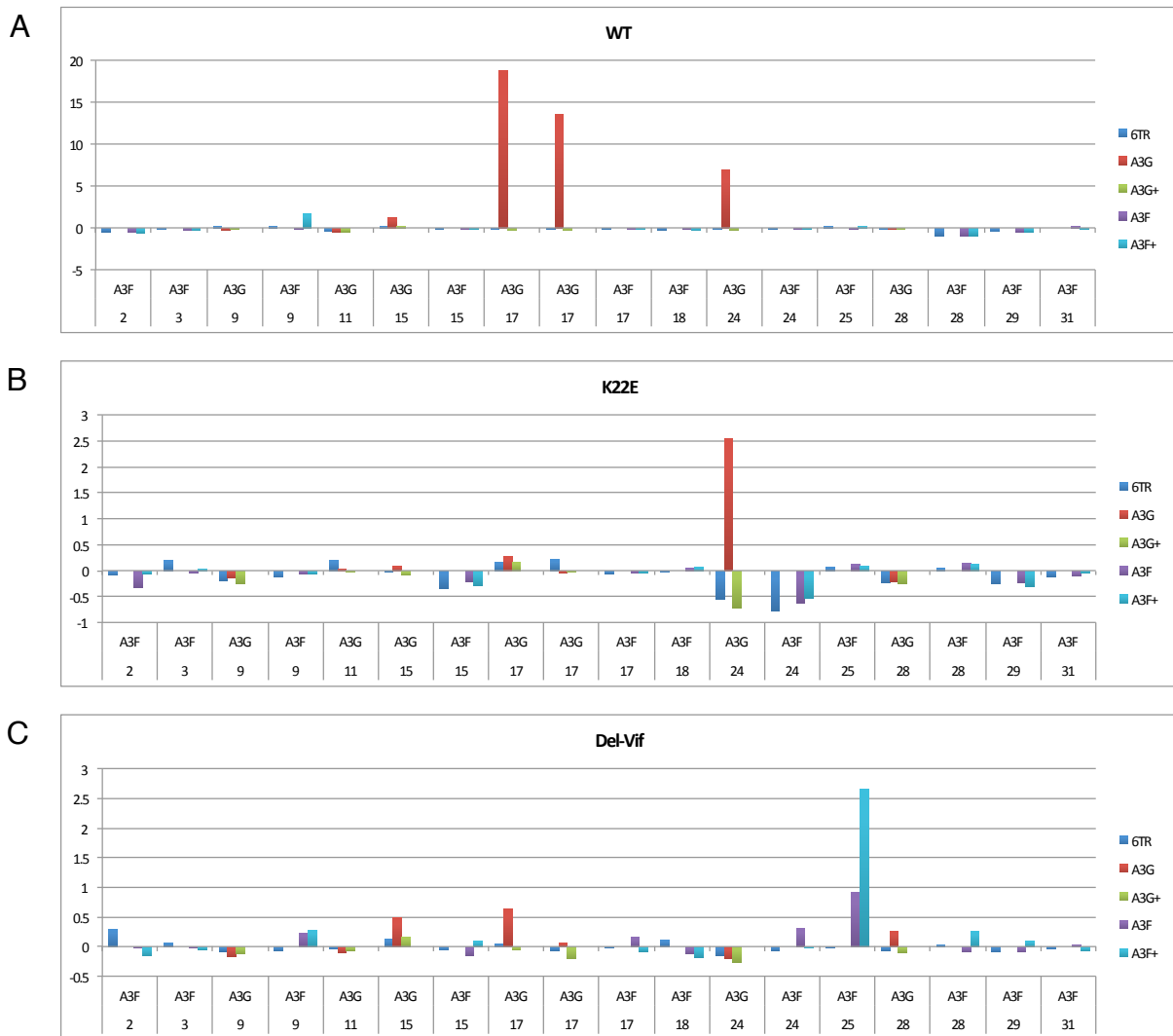


Abbildung 3.12: Analyse der G-zu-A Mutationen in der V3-Region unterschiedlicher Viruspopulationen

G-zu-A Mutationshäufigkeit an APOBEC-Erkennungsmotiven der V3-Region nach Viruskultivierung auf 6TR-Zellen und APOBEC-exprimierenden Zellen: 6TR (blau), A3G (rot), A3G+ (grün), A3F (lila), A3F+ (hellblau). Die prozentuale G-zu-A Mutationshäufigkeit des WT-Virus (A), der K22E-Vif-Variante (B) und der Del-Vif-Variante (C) wurde mit der des Inputvirus abgeglichen.

3.2.3.4 Mutationsraten in *env* und *nef* in den Viruskulturen WT, K22E und Del-Vif im induzierbaren APOBEC-Expressionssystem

Zur Kalkulation der Mutationsraten pro Position wurden die prozentualen Anteile aller G-zu-A Substitutionen summiert und durch die Anzahl der Motive des jeweiligen Bereichs geteilt. Dies ermöglichte einen Vergleich der Mutationsraten pro analysierter Viruspopulation zwischen den HIV-Genombereichen *env* und *nef* (Tab. 3.6). Alle analysierten Viruskulturen WT, K22E und Del-Vif zeigten unter A3G-Basalexpression (A3G) im Vergleich zu den 6TR-Zellen gesteigerte Mutationsraten im *env*-Bereich. Gesteigerte Mutationsraten in *nef* wurden jedoch nur in den

Viruskulturen K22E und Del-Vif detektiert. Nach induzierter A3G-Expression (A3G+) konnten nur in Del-Vif Viren in der *env*-Region erhöhte Mutationsraten nachgewiesen werden.

Die basale Expression von A3F führte in allen Viruspopulationen in den *env* und *nef*-Genomregionen, mit Ausnahme der WT-Population im *env*-Bereich, zu erhöhten Mutationsraten. Die induzierte A3F-Expression (A3F+) steigerte die Mutationsraten in *env* und *nef* in den Vif-defizienten Viruspopulationen K22E und Del-Vif. Die Mehrheit der analysierten Proben (23 von 32) zeigte unter dem Einfluss von APOBEC erhöhte Mutationsraten (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Mutationsraten in *env* und *nef* in den Viruskulturen WT, K22E und Del-Vif im APOBEC-Expressionssystem

Veränderung der Mutationsraten der WT, K22E und Del-Vif Viruspopulationen verglichen mit 6TR (kein APOBEC) nach Kultivierung unter basaler (A3G) und induzierter (A3G+) A3G-Expression, ebenso wie unter basaler (A3F) und induzierter (A3F+) A3F-Expression. Anstiege der Mutationsraten gegenüber 6TR (positive Werte) wurden grau unterlegt.

Region	Virus	A3G	A3G+	A3F	A3F+
NEF	WT	-0.39	-0.25	0.07	-0.06
NEF	K22E	0.57	-0.20	0.00	0.03
NEF	Del-Vif	0.11	-0.04	0.07	0.24
ENV	WT	1.08	-0.13	-0.14	-0.25
ENV	K22E	0.18	-0.10	0.01	0.02
ENV	Del-Vif	0.14	0.98	0.21	0.26

3.2.4 Analyse des mutagenen Einflusses von APOBEC auf HIV-Vif-Varianten in PBMC-Virus-Kulturen

3.2.4.1 Bestimmung des Anteils an HIV-infizierbaren CD4+/CCR5+-Zellen in primären PBMC-Kulturen

Zur Bestätigung des mutagenen Einflusses der APOBEC-Proteine auf die V3-Region von HIV wurden vergleichende Analysen in PBMC-Virus-Kulturen durchgeführt. Von drei HIV-negativen Donoren wurden dazu die PBMCs über einen Ficoll-Gradienten isoliert und nach 3-tägiger Stimulation durch PHA mit den Vif-Varianten Del-Vif, K22E, Y40H und dem Wildtyp infiziert.

Da die Anzahl infizierbarer CD4+/CCR5+-Zellen individuell verschieden ist, wurde der prozentuale Anteil dieser Zellen in den stimulierten PBMC-Kulturen bestimmt. Dies sollte gewährleisten, dass mögliche p24 Ag-Unterschiede nicht auf einer unterschiedlichen Anzahl infizierbarer Zellen basieren. Als Negativkontrolle diente eine Isotyp-PE/APC-Färbung. Dabei wurden die Zellen mit unspezifischen Antikörpern des gleichen Isotyps zur Detektion des Hintergrundsignals gefärbt und zur Positionierung der Quadranten verwendet (Abb. 3.13 A). In einer durchflusszytometrischen Analyse konnten durch eine Doppelfärbung gegen CD4- und

CCR5-Moleküle in den PBMC-Kulturen physiologische Anteile von CD4+/CCR5+-Zellen zwischen 5 % und 12.5 % determiniert werden (Abb. 3.13 B) (Mack et al., 1999).

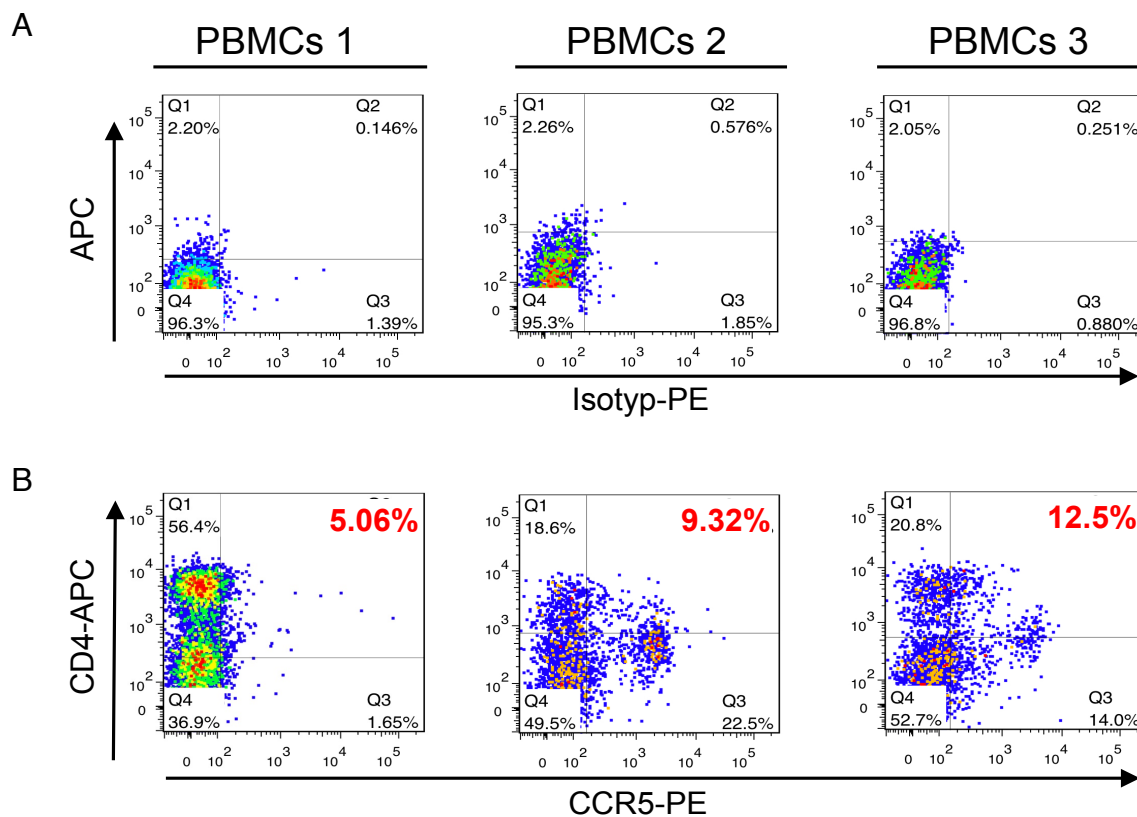


Abbildung 3.13: Quantifizierung HIV-infizierbarer Zellen der PBMC-Kulturen anhand HIV-relevanter Oberflächen-Rezeptoren

Mittels Antikörperfärbung gegen die Oberflächen-Moleküle CD4 und CCR5 wurden die Anteile an doppelt positiven Zellen von drei stimulierten PBMC-Kulturen bestimmt (B). Als Kontrolle diente eine Isotyp-PE/APC-Färbung (A).

3.2.4.2 Untersuchung der antiviralen Effekte von A3G und A3F auf HIV-Vif-Varianten im PBMC-System

Die Infektion der isolierten PBMCs mit den Vif-Varianten erfolgte analog zum induzierbaren Expressionssystem. Um messbare p24 Ag-Mengen zu erhalten, musste aber eine 100-fach höhere Infektionsdosis verwendet werden, da im Gegensatz zu den APOBEC-SupT1R5-Kulturen nur ca. 10 % der Zellen HIV-infizierbar sind.

Zusätzlich wurden von den unstimulierten (nativen), PHA-stimulierten und den HIV-infizierten PBMC-Kulturen fünf Tage nach Infektion die A3G- und A3F-mRNA-Kopienzahlen bestimmt. Diese lagen zwischen 6.000 und 16.000 für A3F bzw. bei 40.000 und 200.000 mRNA-Kopien/ 10^4 Kopien TBP für A3G (Abb. 3.14 A). Wie auch schon in anderen Publikationen gezeigt (Stopak et al., 2003; Refsland et al., 2010), steigerte die Stimulation mit PHA die Menge

an APOBEC-mRNA-Kopien in den PBMCs aller Donoren. Eine Infektion mit HIV reduzierte dagegen die APOBEC-mRNA-Mengen (Abb. 3.14 A).

Nach Infektion mit den Vif-Varianten (WT, Y40H, K22E und Del-Vif) wurde die p24 Ag-Menge der PBMC-Kulturen, der am Tag 5 und 10 nach Infektion entnommenen Überstände, bestimmt (Abb. 3.14 B). Als Input- und Replikationskontrolle diente die p24 Ag-Menge der ersten Infektion, die innerhalb einer Virus-Variante eine annähernd gleiche Infektionsdosis und Replikation bestätigte. Die Überstände der zweiten Infektion wiesen in allen PBMC-Kulturen, in Abhängigkeit von der Vif-Defizienz des Virus, eine APOBEC-vermittelte Hemmung der Replikation auf. Das Wildtyp-Virus produzierte die höchsten p24 Ag-Mengen, gefolgt von den Vif-Varianten Y40H und K22E. Die Del-Vif-Viren zeigten die stärkste Inhibition und die geringsten p24 Ag-Mengen.

Die APOBEC-mRNA-Menge der drei PBMC-Kulturen korrelierte reziprok mit den p24 Ag-Menge der Virus-Kulturen (Abb. 3.14 A und B). Die PBMC-Kultur 1 mit den niedrigsten APOBEC-Mengen produzierte trotz geringer Anzahl an CD4+/CCR5+-Zellen (5,06 %, Abb. 3.13) die höchsten p24 Ag-Mengen. PBMC-Kultur 3 mit der höchsten Anzahl an HIV-infizierbaren Zellen (CD4+/CCR5+-Zellen 12,5 %, Abb. 3.13) und höchster APOBEC-Expression lieferte hingegen die geringsten p24 Ag-Mengen.

Somit ließ sich in einem zweiten, unabhängigen Zellkultursystem zeigen, dass APOBEC die Replikation Vif-defizienter HIV-Varianten hemmt.

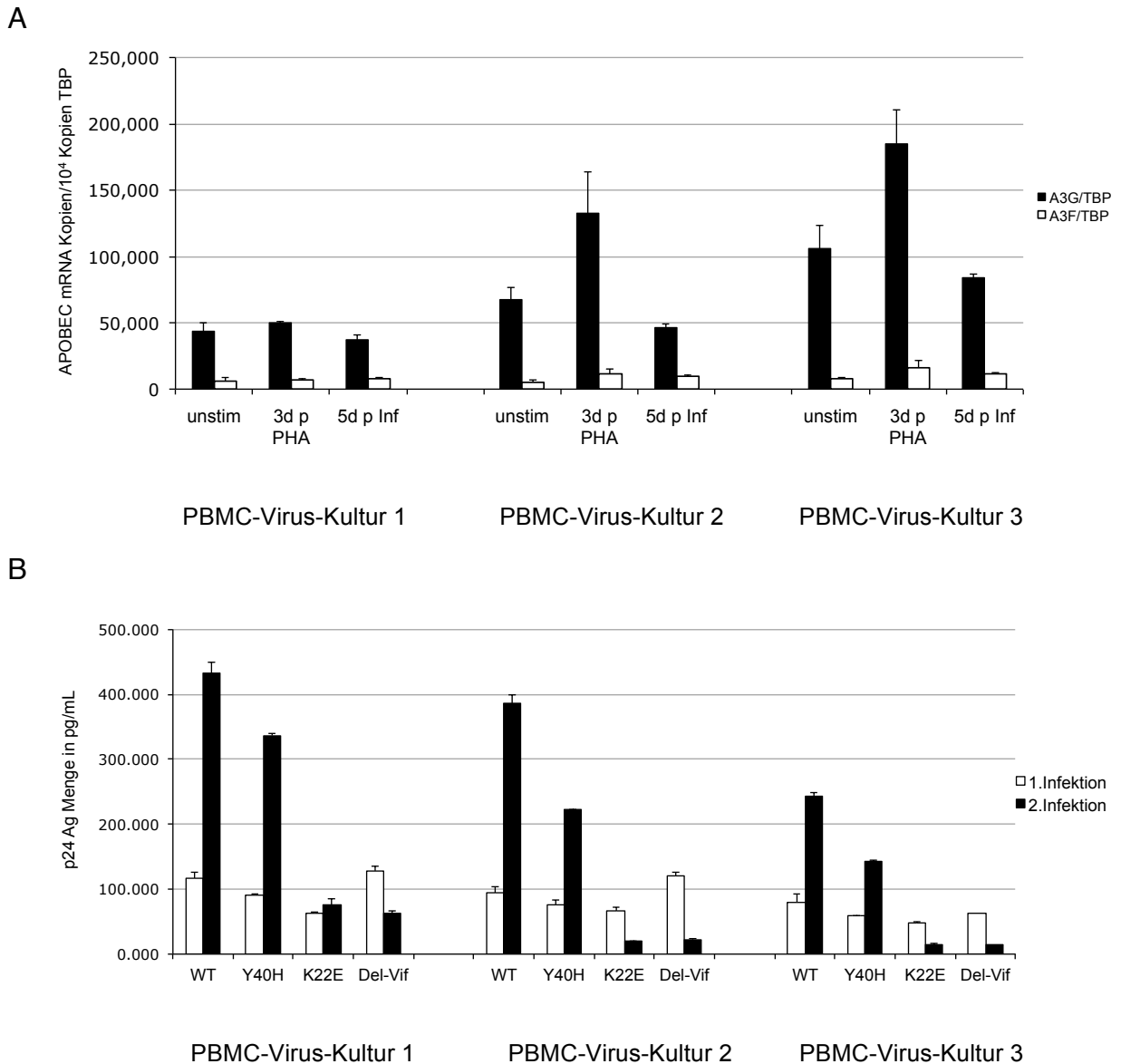


Abbildung 3.14: Der Einfluss von APOBEC auf verschiedene Vif-Virusvarianten in primären PBMC-Kulturen

A) APOBEC-mRNA-Mengen der isolierten PBMCs: unstimuliert, nach 3-tägiger Stimulation mit PHA und 5 Tage nach HIV-Infektion (Mittelwert der 4 Viruskulturen).

B) p24 Ag-Mengen in den PBMC-Kulturen 1, 2 und 3 nach 1. Infektion und Überinfektion (2. Infektion) der Vif-Virusvarianten WT, Vif-Variante Y40H, K22E und Del-Vif. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

3.2.4.3 Genomanalyse von in PBMC-Kulturen generierten Viruspopulationen

Da eine APOBEC-vermittelte Virusinhibition auch in PBMC-Virus-Kulturen zu beobachten war, erfolgte aus den unter 3.2.4.2 generierten Überständen der 2. Infektion eines repräsentativen Assays, analog zum induzierbaren Expressionssystem (vgl. 3.2.3.2), eine NGS-Analyse der Genombereiche *env* und *nef*. Dazu wurde die extrahierte RNA mittels One-Step-RT-PCR amplifiziert, aufgereinigt und für eine parallele NGS-Analyse äquimolar vermischt. Tabelle 3.7

zeigt eine Übersicht über die Qualitätscharakteristika der generierten Sequenzen. Pro Genbereich wurden dabei ca. 15.000 Einzelsequenzen synthetisiert, von denen im Durchschnitt 14.000 die Qualitätsstandards zur weiteren Auswertung erfüllten. Die PCR-Amplifikate enthielten durchschnittlich 280 unterschiedliche Varianten.

Tabelle 3.7: Qualitative und quantitative Analyse der mittels NGS generierten *env*-Sequenzen verschiedener PBMC-Virus-Kulturen

Übersicht über die mittels NGS generierte Anzahl von *env*-Varianten, Einzelsequenzen (Reads) und den Qualitätsstandards entsprechenden *env*-Sequenzen (Qualitative Reads), die für die Vorhersage des Tropismus verwendet wurden. Pro Virusvariante (WT, Y40H, K22E, Del-Vif) wurden die Inputpopulation und die Viruspopulationen nach Kultivierung in den 3 PBMC-Kulturen 1, 2 und 3 analysiert.

	Name	Varianten	Reads	Qualitative Reads
WT	Input	308	15093	13989
	PBMCs 1	307	15637	14838
	PBMCs 2	285	14907	14243
	PBMCs 3	287	15849	15230
Y40H	Input	384	30012	29228
	PBMCs 1	224	10494	10089
	PBMCs 2	234	10636	10160
	PBMCs 3	243	11572	11025
K22E	Input	264	16568	16245
	PBMCs 1	235	10293	9898
	PBMCs 2	314	17149	16385
	PBMCs 3	287	15780	15029
Del-Vif	Input	261	12961	12110
	PBMCs 1	245	11043	10713
	PBMCs 2	324	19848	18951
	PBMCs 3	223	9394	9162
	Mittelwert	277	14827	14206

In der NGS-Analyse der PBMC-Virus-Kulturen wurden 821 bp umfassende *env*- und 616 bp umfassende *nef*-Sequenzen generiert. Insgesamt wurden in dieser Analyse 209 APOBEC-Erkennungsmotive untersucht (Tab. 3.8). Der *env*-Bereich enthielt 105 APOBEC-Motive (59 A3F und 46 A3G), die analysierte *nef*-Region beinhaltete 104 APOBEC-Motive (56 A3F und 48 A3G). Somit wurden insgesamt die Effekte auf 115 A3F- und 94 A3G-Motive analysiert (Tab. 3.8).

Tabelle 3.8: Anzahl der A3F- und A3G-Erkennungsmotive in den untersuchten Genbereichen *env* und *nef* der PBMC-Virus-Kulturen

	APOBEC Motive		Gesamt
	A3F (GA)	A3G (GG)	
<i>env</i> -Region	59	46	105
<i>nef</i> -Region	56	48	104
	115	94	209

Analog zum induzierbaren System (vgl. 3.2.3.2) wurde der Tropismus aller Einzelsequenzen mit Hilfe des geno2pheno_[coreceptor]-Tools für NGS-Daten bei einem Cutoff der FPR von 10 % vorhergesagt und darauf basierend der prozentuale Anstieg von CXCR4-tropen Varianten errechnet (Abb. 3.15).

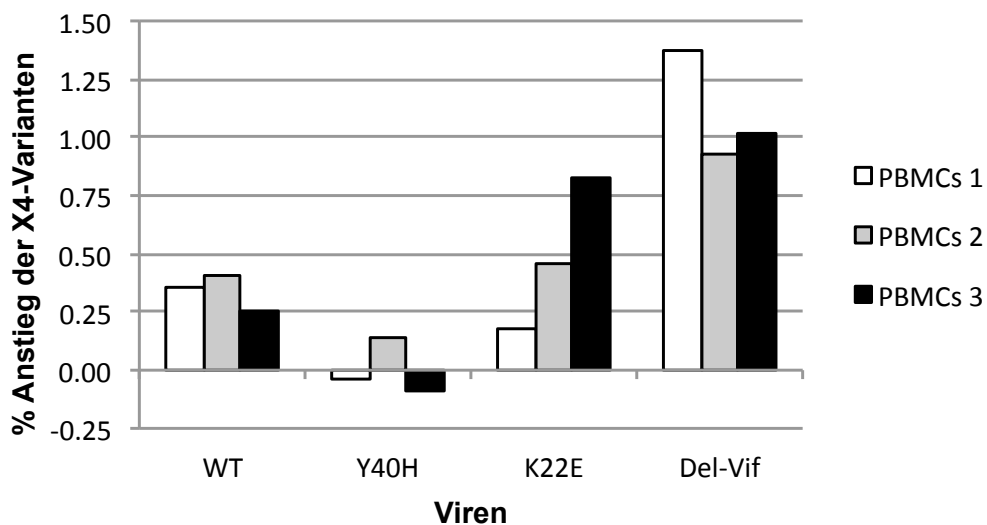


Abbildung 3.15: Anstieg CXCR4-troper Varianten in PBMC-Virus-Kulturen

Prozentualer Anstieg von CXCR4-tropen Viren in PBMC-Virus-Kulturen 10 Tage nach Infektion mit den Virusvarianten WT, Y40H, K22E und Del-Vif im Vergleich zum Inputvirus.

Ein Vergleich der prozentualen Anteile von X4-Varianten in den WT- und Y40H-Populationen mit keiner bzw. leichter Vif-Defizienz (Abb. 3.3) zeigte nur geringe Unterschiede zwischen den PBMC-Kulturen auf (Abb. 3.15; WT 0,26 % bis 0,35 %; Y40H -0,08 % bis 0,14 %). In den Viruspopulationen der K22E-Variante, die durch eine ausgeprägte Vif-Defizienz gekennzeichnet ist, konnte in der PBMC-Kultur 3 mit den höchsten APOBEC-Konzentrationen ein Anstieg auf 0,8 % der X4-Varianten verzeichnet werden (Abb. 3.15). Einen noch deutlicheren Anstieg von

X4-Varianten zeigten die Del-Vif-Populationen (vollständige Vif-Defizienz) in allen drei PBMC-Kulturen. PBMC-Kultur 1 mit der niedrigsten endogenen APOBEC-Menge zeigte mit 1,4 % den größten Anstieg an X4-Varianten in den analysierten Viruspopulationen (Abb. 3.15).

Somit konnte auch in PBMC-Virus-Kulturen gezeigt werden, dass sich mit zunehmender Vif-Defizienz und dem damit einhergehenden Anstieg der APOBEC-Aktivität der Anteil an X4-Varianten im Vergleich zur WT-Population erhöht.

3.2.4.4 Analyse der APOBEC-induzierten Sequenzmutationen in den PBMC-Virus-Kulturen

Die Analyse der APOBEC-induzierten Sequenzmutationen der V3-Region zeigte in den WT-Populationen (Abb. 3.16 A) an den meisten Positionen eine Reduktion des G/A Verhältnisses in allen 3 PBMC-Kulturen. Dieses Phänomen deutet stark auf eine Selektion der Viruspopulation hin, welche durch den Wechsel der HIV-Zielzellen von SupT1R5-Zellen (Inputpopulation) auf PBMCs bedingt ist. Die Y40H-Populationen aller drei PBMC-Kulturen (Abb. 3.16 B), die eine geringe Vif-Defizienz aufweisen, zeigen die stärksten G-zu-A Mutationen in den A3G-Erkennungsmotiven an Aminosäure 15 und 17 (durchschnittlich 0,31 % bzw. 0,49 %) und in einem A3F-Erkennungsmotiv an Aminosäure 29 (durchschnittlich 0,5 %). In der K22E-Population (Abb. 3.16 C) der PBMC-Kultur 1 und 3 sind ebenfalls die A3G-Erkennungsmotive an Aminosäure 15 und 17 am stärksten mutiert (durchschnittlich 0,5 % bzw. 0,65 %). PBMC-Virus-Kultur 2 zeigte kaum G-zu-A Mutationen. In den Del-Vif-Populationen (Abb. 3.16 D), die im Vergleich zu den anderen Populationen die meisten G-zu-A Mutationen aufwiesen, waren die Austausche vorwiegend an den A3F-Erkennungsmotiven der Aminosäuren 2, 9 und 25 lokalisiert. PBMC-Virus-Kultur 1 zeigte ebenfalls Mutationen an A3G-Motiven an den Aminosäuren 9, 15 und 17, PBMC-Virus-Kultur 2 hingegen nur an Aminosäure 15.

Somit zeigten sich G-zu-A Mutationen in der Y40H-PBMC-Kultur 3 an den Aminosäurepositionen 15, 17 und 29 und in allen Del-Vif-Populationen an den Positionen 2, 9, 15, 17 und 25. Trotz der geringen Häufigkeit der G-zu-A Mutationen könnten diese für den Anstieg von X4-Varianten nach Kultivierung auf den PBMC-Kulturen verantwortlich sein (vgl. Abb. 3.15).

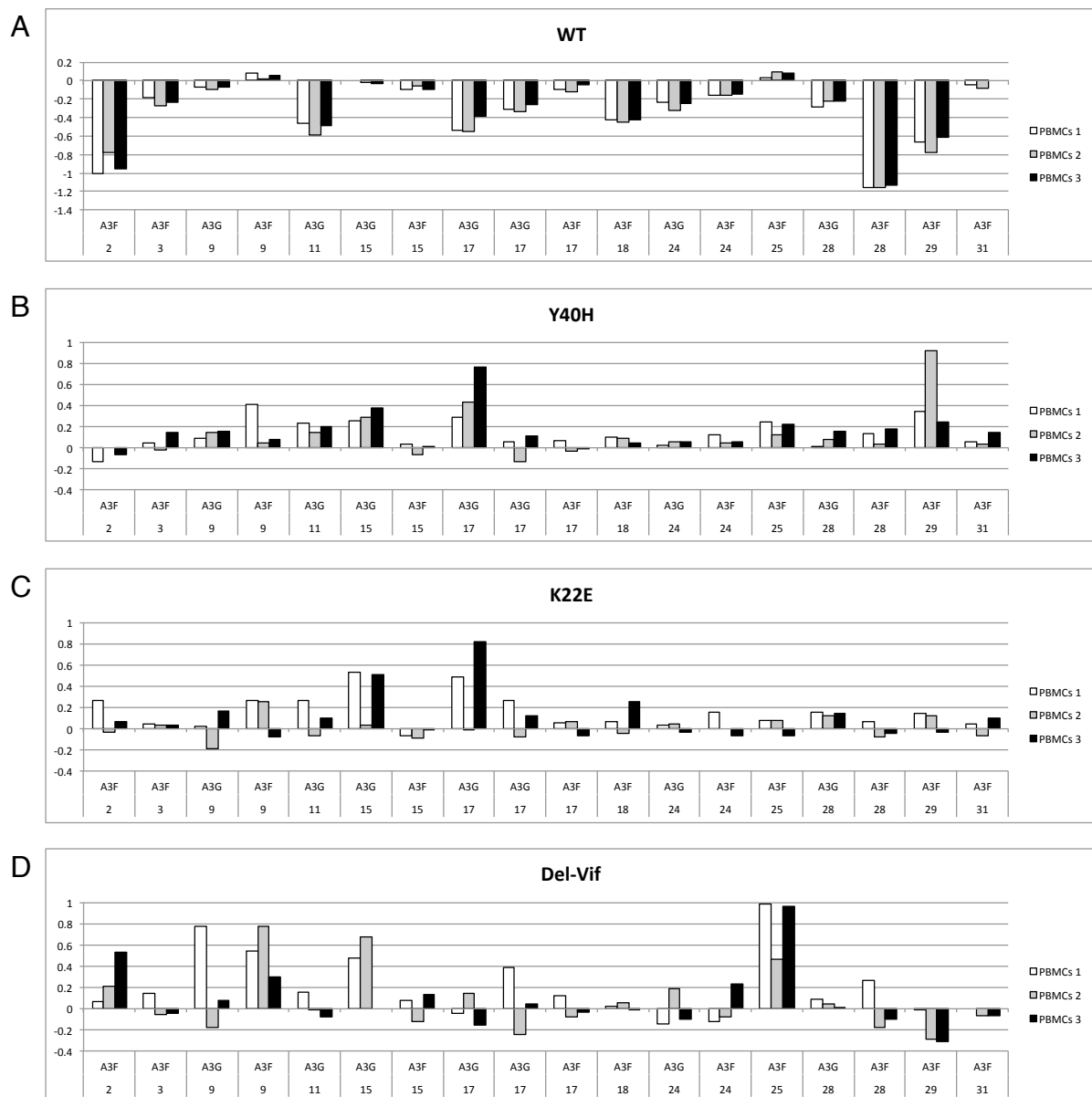


Abbildung 3.16: Analyse der G-zu-A Mutationen der V3-Region in den verschiedenen Viruspopulationen der PBMC-Virus-Kulturen

Prozentuale G-zu-A Mutationen an APOBEC-Erkennungsmotiven innerhalb der V3-Region. Die G-zu-A Mutationshäufigkeit der Vif-defizienten Viruspopulationen des WT-Virus (A), der Vif-Variante Y40H (B), der Vif-Variante K22E (C) und der Del-Vif-Variante (D) wurde nach Viruskultivierung auf den PBMC-Kulturen 1, 2 und 3 anhand der NGS-Sequenzen mit der der Inputpopulation abgeglichen.

3.2.4.5 Mutationsraten von A3G und A3F in den PBMC-Virus-Kulturen

Aufgrund der Koexistenz von A3G und A3F in den PBMC-Kulturen wurden die ermittelten G-zu-A Mutationsfrequenzen der NGS-Daten zur Kalkulation der Mutationsraten (% G-zu-A Mutation/Position) verwendet. Dazu wurden die prozentualen Anteile aller G-zu-A Mutationen summiert und durch die Anzahl der Motive des jeweiligen Genbereichs dividiert. Dies ermöglichte einen Vergleich der Mutationsraten nach Motiv (A3G und A3F) und nach HIV-Region (*env* und *nef*) (Tab. 3.9 A).

Der Vif-kompetente Wildtyp zeigte unabhängig von Motiv und Region die niedrigsten (grün) und die Vif-Deletionsvariante Del-Vif die größten (rot) Mutationsraten (Tab. 3.9 A). Alle Vif-defizienten Viren Y40H, K22E und Del-Vif wiesen im Vergleich zum Inputvirus höhere Mutationsraten unabhängig von Motiv und Region auf. Mit Ausnahme der Mutationsrate der Y40H Variante in der *env*-Genregion waren alle Anstiege der gemittelten Mutationsraten signifikant (Tab. 3.9, zweiseitiger T-Test für ungepaarte Stichproben).

Vergleicht man die Mutationsraten nach Motiv (A3G und A3F) und Region (*env* und *nef*), unabhängig von der Vif-Defizienz der Viren, so wiesen die A3G-Motive und die *nef*-Region höhere Mutationsraten auf (Tab. 3.9 B). Assoziiert man das Motiv mit der Region, zeigen sich in den A3G-Motiven der *env*- und *nef*-Region höhere Mutationsraten als in den A3F-Motiven. Somit werden die Mutationsraten maßgeblich durch die Aktivität der APOBEC-Proteine, weniger durch die HIV-Region bestimmt.

Aufgrund der unterschiedlichen endogenen APOBEC-mRNA-Konzentrationen in den PBMC-Kulturen (vgl. Abb. 3.14 und Tab. 3.9 C) erfolgte ein Vergleich der Mutationsraten nach Motiv und Region unter Berücksichtigung der APOBEC-Level (Tab. 3.9 C). Im Vergleich der drei PBMC-Kulturen zeigten sich die höchsten Mutationsraten überwiegend in der PBMC-Virus-Kultur 1, in welcher geringe APOBEC-mRNA-Mengen gemessen wurden (Abb. 3.14). Die niedrigsten Mutationsraten wurden in der PBMC-Virus-Kultur 2 mit intermediären APOBEC-mRNA-Mengen beobachtet.

Der Vergleich der Mutationsraten in den PBMC-Kulturen in Abhängigkeit von der Vif-Defizienz der Virusvarianten zeigt, dass die Ausprägung der Mutationsrate durch die Wechselwirkung zwischen APOBEC-Menge und Vif-Aktivität bestimmt wird und bei optimaler APOBEC-Aktivität mutationssteigernd wirkt. Unabhängig von Motiv und Region entstanden die höchsten Mutationsraten des Wildtyp-Virus (Vif-kompetent) und der gering defizienten Vif-Variante Y40H unter den erhöhten APOBEC-Mengen der PBMC-Kultur 3. Die höchsten Mutationsraten der stärker Vif-defizienten Variante K22E und der Deletionsvariante Del-Vif entstanden im Gegensatz dazu unter den geringen APOBEC-Mengen der PBMC-Kultur 1.

Somit lässt sich in den PBMC-Virus-Kulturen über die Vif-APOBEC-Interaktion eine optimale APOBEC-Menge bestimmen, bei der die APOBEC-Aktivität nicht durch Hypermutation in einer

Blockade der HIV-Replikation führt, sondern unter steter Replikation die Mutationsrate steigt. Aufgrund der APOBEC-mRNA-Mengen, die fünf Tage nach HIV-Infektion in den oben genannten PBMC-Virus-Kulturen gemessen wurden (Abb. 3.14 A), liegt diese zwischen 34.000 und 82.000 mRNA-Kopien für A3G bzw. zwischen 7.000 und 12.000 mRNA-Kopien für A3F in dieser PBMC-Virus-Analyse.

Insgesamt erzeugten die geringen APOBEC-Mengen der PBMC-Virus-Kultur 1 die größten und die intermediären APOBEC-Mengen der PBMC-Virus-Kultur 2 die geringsten Mutationsraten. Gegenüber der Mutationsrate des Input-Virus waren all diese Steigerungen der Mutationsraten signifikant.

Tabelle 3.9: Mutationsraten der PBMC-Virus-Kulturen analysiert nach Motiv, Region und Virus

A) Vergleich der Mutationsraten nach Motiv, Region und Vif-Defizienz der Viren (vertikale Richtung). Die Mutationsraten wurden Werte-abhängig markiert: dunkelgrün (kleinster Wert) < hellgrün < gelb < orange < rot (größter Wert).

B) Vif-Defizienz-unabhängiger Vergleich der Mutationsraten nach Motiv und Region

C) Vergleich der Mutationsraten zwischen Input und den 3 PBMC-Virus-Kulturen (horizontale Richtung)

a) p-Wert wurde zwischen der jeweiligen PBMC-Virus-Kultur und dem Input berechnet.

b) p-Wert bezieht sich auf den Mittelwert der Mutationsraten aller 3 PBMC-Virus-Kulturen gegenüber dem Input oder WT.

c) p-Wert zwischen den jeweiligen Regionen oder Motiven

A

Motiv	Region	Virus	PBMC-Virus-Kulturen				Mittelwert % (p-Wert) ^b	WT vs:
			Input %	PBMC-Virus- Kultur 1 % (p-Wert) ^a	PBMC-Virus- Kultur 2 % (p-Wert) ^a	PBMC-Virus- Kultur 3 % (p-Wert) ^a		
A3F		WT	0.35	0.33 (0.7271)	0.30 (0.1662)	0.35 (0.9464)	0.33 (0.4911)	WT vs:
A3F		Y40H	0.24	0.36 (0.0002)	0.31 (0.0139)	0.35 (0.0000)	0.34 (0.0001)	(0.4303)
A3F		K22E	0.25	0.38 (0.0000)	0.32 (0.0092)	0.33 (0.0159)	0.34 (0.0005)	(0.0164)
A3F		Del-Vif	0.32	0.68 (0.0000)	0.38 (0.0960)	0.41 (0.0078)	0.49 (0.0001)	(0.0000)
A3G		WT	0.45	0.35 (0.0057)	0.40 (0.8919)	0.40 (0.2054)	0.38 (0.1629)	WT vs:
A3G		Y40H	0.44	0.49 (0.0975)	0.57 (0.0107)	0.64 (0.0008)	0.57 (0.0029)	(0.0000)
A3G		K22E	0.33	0.69 (0.0000)	0.74 (0.0005)	0.67 (0.0003)	0.70 (0.0001)	(0.0000)
A3G		Del-Vif	0.44	0.86 (0.0000)	0.68 (0.0081)	0.67 (0.0007)	0.74 (0.0000)	(0.0000)
ENV		WT	0.36	0.31 (0.2012)	0.33 (0.8625)	0.33 (0.4503)	0.32 (0.5805)	WT vs:
ENV		Y40H	0.35	0.37 (0.3292)	0.36 (0.4301)	0.42 (0.0343)	0.38 (0.0976)	(0.0262)
ENV		K22E	0.25	0.45 (0.0000)	0.31 (0.0039)	0.42 (0.0001)	0.39 (0.0000)	(0.0459)
ENV		Del-Vif	0.30	0.76 (0.0000)	0.41 (0.0018)	0.51 (0.0000)	0.56 (0.0000)	(0.0000)
NEF		WT	0.43	0.37 (0.1207)	0.36 (0.0861)	0.41 (0.6652)	0.38 (0.0976)	WT vs:
NEF		Y40H	0.31	0.47 (0.0000)	0.50 (0.0001)	0.55 (0.0000)	0.51 (0.0000)	(0.0001)
NEF		K22E	0.33	0.59 (0.0000)	0.71 (0.0004)	0.55 (0.0087)	0.61 (0.0007)	(0.0000)
NEF		Del-Vif	0.45	0.76 (0.0000)	0.62 (0.0384)	0.55 (0.0812)	0.65 (0.0026)	(0.0000)
WT			0.39	0.34 (0.0571)	0.34 (0.0902)	0.37 (0.4129)	0.35 (0.0571)	WT vs:
Y40H			0.33	0.42 (0.0055)	0.43 (0.0076)	0.48 (0.0001)	0.44 (0.0002)	(0.0000)
K22E			0.29	0.52 (0.0000)	0.51 (0.0001)	0.48 (0.0000)	0.50 (0.0000)	(0.0000)
Del-Vif			0.37	0.76 (0.0000)	0.52 (0.0021)	0.53 (0.0000)	0.60 (0.0000)	(0.0000)

B

A3F	ENV		0.27	0.42 (0.0000)	0.28 (0.5440)	0.33 (0.0017)	0.35 (0.0008)	ENV/NEF
A3F	NEF		0.31	0.46 (0.0000)	0.38 (0.0107)	0.39 (0.0021)	0.41 (0.0000)	(0.0004) ^c
A3G	ENV		0.37	0.54 (0.0000)	0.44 (0.0387)	0.53 (0.0001)	0.50 (0.0000)	ENV/NEF
A3G	NEF		0.46	0.65 (0.0001)	0.75 (0.0001)	0.66 (0.0004)	0.69 (0.0001)	(0.0000) ^c
A3F			0.29	0.44 (0.0000)	0.33 (0.0190)	0.36 (0.0000)	0.38 (0.0000)	A3F/A3G
A3G			0.41	0.59 (0.0000)	0.60 (0.0000)	0.60 (0.0000)	0.60 (0.0000)	(0.0000) ^c
ENV			0.31	0.47 (0.0000)	0.35 (0.0475)	0.42 (0.0000)	0.41 (0.0000)	ENV/NEF
NEF			0.38	0.55 (0.0000)	0.55 (0.0000)	0.52 (0.0000)	0.54 (0.0000)	(0.0000) ^c

C

			PBMC-Virus-Kulturen			
Motiv	Region	Virus	Input %	PBMC-Virus-Kultur 1 % (p-Wert) ^a	PBMC-Virus-Kultur 2 % (p-Wert) ^a	PBMC-Virus-Kultur 3 % (p-Wert) ^a
A3F	ENV		0.27	0.42 (0.0000)	0.28 (0.5440)	0.33 (0.0017)
A3F	NEF		0.31	0.46 (0.0000)	0.38 (0.0107)	0.39 (0.0021)
A3G	ENV		0.37	0.54 (0.0000)	0.44 (0.0387)	0.53 (0.0001)
A3G	NEF		0.46	0.65 (0.0001)	0.75 (0.0001)	0.66 (0.0004)
A3F			0.29	0.44 (0.0000)	0.33 (0.0190)	0.36 (0.0000)
A3G			0.41	0.59 (0.0000)	0.60 (0.0000)	0.60 (0.0000)
ENV			0.31	0.47 (0.0000)	0.35 (0.0475)	0.42 (0.0000)
NEF			0.38	0.55 (0.0000)	0.55 (0.0000)	0.52 (0.0000)
WT			0.39	0.34 (0.0571)	0.34 (0.0902)	0.37 (0.4129)
Y40H			0.33	0.42 (0.0055)	0.43 (0.0076)	0.48 (0.0001)
K22E			0.29	0.52 (0.0000)	0.51 (0.0001)	0.48 (0.0000)
Del-Vif			0.37	0.76 (0.0000)	0.52 (0.0021)	0.53 (0.0000)
gesamt			0.34	0.51 (0.0000)	0.45 (0.0000)	0.47 (0.0000)
mRNA-Kopien	A3G	-		50.000	130.000	160.000
	A3F	-		6.500	11.000	90.000
	Menge	kein		gering	intermediär	erhöht

4 Diskussion

Die Infektion mit HIV ist bis zum heutigen Tage nicht heilbar, eine antiretrovirale Kombinationstherapie kann jedoch eine langfristige Reduktion der HI-Viruslast bewirken und die dauerhafte Immunaktivierung bis zur völligen Zerstörung des Immunsystems verhindern (Lampe et al., 2003; Hearps et al., 2011). Nur 2-5 % der HIV-Infizierten, als Long-Term-Non-Progressors (LTNP) bezeichnet, können die HIV-Infektion ohne antiretrovirale Therapie kontrollieren (Levy, 2009; Poropatich et al., 2011). Die Erforschung der erfolgreichen Immunkontrolle ist somit ein wichtiger Schritt zur Entwicklung effektiver Vakzine und neuer wirksamer Substanzen oder Immuntherapien. Dabei spielt vor allem das Verständnis von Wechselwirkungen zwischen HIV und den verschiedenen Wirtszell-Faktoren, wie HLA oder Komponenten des angeborenen Immunsystems, eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit werden insbesondere die antiviralen Faktoren A3G und A3F, die als Bestandteil des angeborenen Immunsystems retrovirale Infektionen inhibieren, in ihrer möglichen Wirkung auf den Tropismus von HIV untersucht. Dabei wird nicht nur die Wirkung von APOBEC, sondern auch die des Antagonisten Vif analysiert, und die Auswirkungen der APOBEC-Vif-Wechselwirkung auf HIV in unterschiedlichen Zellkultursystemen geprüft.

Statistische Analyse von V3-Sequenzen mit definiertem Tropismus

Die Triplets GGN und GAN der neutral oder negativ geladenen Aminosäuren Asp, Glu und Gly werden durch eine G-zu-A Mutation in die Triplets AGR und AAR überführt. Diese kodieren für die positiv geladenen Aminosäuren Arg und Lys, die verstärkt in CXCR4-tropen Viren detektiert werden können. Im Gegensatz dazu findet man in CCR5-tropen Viren häufiger neutrale oder negativ geladene Aminosäuren. A3G und A3F können diese G-zu-A Mutationen bewirken und somit einen Switch von CCR5- zu CXCR4-tropen Viren begünstigen. Die sogenannte 11/24/25-Regel (Cardozo et al., 2007), die den Korezeptorgebrauch von HIV-1 aufgrund der Ladung der Aminosäuren an den Positionen 11 und 24/25 vorhersagt, beinhaltet diesen Wechsel von negativ geladenen zu positiv geladenen Aminosäuren. Begründet liegt diese Regel wahrscheinlich im unterschiedlichen elektrostatischen Potential der V3-Bindungsstellen des positiv-geladenen CCR5-Rezeptors bzw. des negativeren CXCR4-Rezeptors (Kalinina et al., 2013).

Übereinstimmend mit der 11/24/25-Regel bestätigte die statistische Analyse der cross-sektionalen Datensätze HIV-GRADE und Los Alamos die Aussagekraft der Korezeptor-relevanten Positionen 11, 22, 24 und 25 (Delobel et al., 2007; Raymond et al., 2008), da an diesen bezüglich Triplettkodierung und Aminosäurecharakteristika die stärksten Unterschiede zwischen CCR5- und CXCR4-tropen Viren gefunden werden konnten.

Das in beiden Datensätzen häufigste Triplett an Position 24, GGA, enthält ein Zielmotiv für A3G und A3F, wurde aber bisher nicht als A3G/A3F-Hotspot beschrieben. Für Position 25 sind A3G-assoziierte G-zu-A Mutationen beschrieben worden (Wood et al., 2009). Da diese beiden Aminosäuren innerhalb bekannter CTL-Epitope (SVG Epitope Maps, <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/maps.html>) liegen, könnten diese Tropismus-relevanten Mutationen gleichzeitig auch bei der Umgehung der Immunantwort eine Rolle spielen.

Im Gegensatz zur 11/24/25-Regel berücksichtigen bioinformatische Interpretationssysteme die gesamte V3-Region und können die Relevanz anderer Aminosäurepositionen erkennen. Position 22 wurde als eine mit dem Tropismus von HIV-1 assoziierte Position beschrieben (Dybowski et al., 2010; Pramanik et al., 2011). Die G-zu-A Substitution erfolgt an dieser Position nicht im bekannten GG- oder GA-Kontext, sondern im minimal APOBEC3G/F-assoziierten GC-Dinukleotid (Knoepfel et al., 2008; Kim et al., 2014).

Eine G-zu-A Mutation in dem an Position 11 häufig vorkommenden Triplett AGT (Ser) führt zum Triplett AAT (Asn), das aber in dieser Analyse an Position 11 nicht detektiert wurde. Die beobachtete Nukleotidsubstitution von AGT (Ser) zu AGG oder AGA (Arg) zwischen den R5- und X4-Sequenzen an Position 11 folgt somit anderen, nicht durch APOBEC induzierten Mutationsmechanismen.

Entsprechend unserer Hypothese enthielten die R5-Sequenzen an Aminosäure 24 und 25 verstärkt Triplets mit APOBEC-Motiven, die in den analysierten X4-Sequenzen häufig mutiert sind und einen Wechsel von negativ zu positiv geladenen Aminosäuren bewirken. Dieses Phänomen wiederholt sich in der Analyse der Häufigkeiten der Triplets GAN, GGN, AGR und AAR in der gesamten V3-Region und spricht somit für die Hypothese einer Beteiligung von APOBEC an der Bildung von X4-Viren.

Die Korrelationsanalyse der allgemeinen Nukleotid-Substitutionshäufigkeit bestätigte übereinstimmend mit anderen Publikationen im Kontext Vif-abhängiger APOBEC-Aktivität die G/A-Substitution als häufigste Nukleotid-Substitution (Knoepfel et al., 2008; Kim et al., 2014). Allerdings zeigen Experimente im zellfreien System (Boyer et al., 2007) und in permissiven Zellen auch ohne die Anwesenheit von APOBEC (O'Neil et al., 2002) eine zweimal häufigere G-zu-A als C-zu-T Substitution (Podlutzky et al., 1998; Gout et al., 2013). Als Ursache vermutet man das ungleiche Vorliegen von dTTP und dCTP während der Reversen Transkription in diesen Systemen, deren Verhältnis (dTTP/dCTP) zwischen 2 und 10 variieren (Mathews et al., 1992; Martinez et al., 1995; Vartanian et al., 1997). Aufgrund der Tatsache, dass R5- und X4-Viren diesem Effekt gleichermaßen ausgesetzt sind, wurde diese Möglichkeit als Ursache für die G/A Dominanz in unserer Korrelationsanalyse ausgeschlossen.

Die Analyse der longitudinalen Daten bot den Vorteil, Tropismus-assoziierte G-zu-A Mutationswege anhand von Probenserien oder -paaren aus jeweils einem Patienten direkt nachzuweisen und darüber die mögliche Evolution zu X4-Varianten zu verfolgen. Einige der in

dieser Arbeit beobachteten G-zu-A Mutationen (G11S, G24E, G24R, D24R, G24N, G25K, E25K, D25K) spiegeln die Ergebnisse der Evolutionsstudien von CXCR4- aus CCR5-tropen Populationen (R11K, G24E, G24R, E25K und D25K) wider (Bunnik et al., 2011; Poon et al., 2012). Ein Korezeptorswitch wird dabei als schrittweiser mutationsanhäufender Prozess (pathway) beschrieben, der durch das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Virusvarianten gekennzeichnet ist. Dies ist in der Sequenzanalyse der longitudinalen Daten mittels Sanger-Sequenzierung durch Ambiguitäten an mehreren Nukleotidpositionen erkennbar. Über hochauflösende Sequenzierverfahren wurde das Zeitintervall, das X4-Viren brauchen, um sich von der ersten relevanten X4-Variante bis zu einer Population von etwa 20 % durchzusetzen, auf ca. 10 Monate bestimmt (Poon et al., 2012). Erst diese 20 % sind aufgrund der Sensitivitätsgrenze der Sanger-Sequenzierung als Ambiguitäten ersichtlich und zeigen eine mixed-trope Viruspopulation an.

Die statistische Analyse bestärkte somit die Hypothese, dass APOBEC3G/F, durch ihre Fähigkeiten G-zu-A Mutationen zu generieren, an der Entstehung CXCR4-troper Varianten beteiligt sind. Die Analyse der cross-sektionalen und longitudinalen Daten war Motivation, die Effekte von A3F und A3G in kontrollierten Zellkultursystemen detailliert zu untersuchen.

Experimentelle Analyse

Das aus unseren statistischen Sequenzanalysen hervorgehende Modell postulierte eine Aktivität von APOBEC3G/F als Trigger für den Korezeptorswitch (Heger et al., 2012). Eine Überexpression von APOBEC3G/F kann zu letaler Hypermutation der proviralen DNA führen und somit zur Blockade der HIV-Replikation (Goila-Gaur et al., 2008). Um aber die Entstehung CXCR4-troper Varianten nicht proviral, sondern in einem replizierenden System nachzuweisen, wurde der mutagene Effekt, der sich durch eine geringe APOBEC-Expression ergibt, untersucht. Dazu wurden zwei Zellkultursysteme genutzt, ein induzierbares System (TetOn) und PBMC-Virus-Kulturen, die unterschiedliche APOBEC-Level exprimieren.

Um A3G- bzw. A3F-Vif-Effekte getrennt analysieren zu können, wurde sowohl ein A3G- als auch ein A3F-induzierbares Genexpressionssystem (TetOn) stabil in SupT1R5-Zellen transfiziert. Dieses TetOn-Genexpressionssystem verfügt nach Herstellerangaben über niedrige Basalexpressionsmengen und hohe Tet-induzierte Expressionsraten. Da APOBEC abhängig von der intrazellulären Expressionsmenge in die Viren verpackt wird (Goila-Gaur et al., 2008), bot das verwendete TetOn-System die Möglichkeit die APOBEC-Expression im entscheidenden niedrigen Konzentrationsbereich zu regulieren. Im Gegensatz zum TetOff-System, bei dem das Einwirken von Tetrazyklin zur Transkriptionsrepression führt, werden im TetOn-System durch die präzise Tetrazyklin-gesteuerte Aktivierung längere Inkubationszeiten vermieden. Durch die Generierung von Tet-induzierbaren, APOBEC-exprimierenden und HIV-infizierbaren Zelllinien konnte der Einfluss kontrollierter APOBEC-Aktivität (A3F/A3G) durch die Kultivierung diverser

Vif-Varianten in diesen Zellkulturen analysiert werden.

Das PBMC-Virus-System hat im Gegensatz zum induzierbaren TetOn-System hinsichtlich der APOBEC-Expressionsmengen und Replikationseigenschaften von HIV einen engeren in vivo Bezug. Viele Studien zur APOBEC-Aktivität und Mutationshäufigkeit erfolgten hauptsächlich in T-Zelllinien, teilweise mit exogenem A3G/A3F (Harris et al., 2003; Lecossier et al., 2003; Mangeat et al., 2003; Mariani et al., 2003; Zhang et al., 2003; Wiegand et al., 2004). Dabei zeigt exogenes APOBEC, das durch die Transfektion von A3G/A3F in epithelialen Zellen erzeugt wird, eine höhere Aktivität als endogenes APOBEC aus primären Zellen oder T-Zelllinien (Thielen et al., 2007). Auch gut etablierte HIV-infizierbare T-Zelllinien wie H9 oder CEM sind für unsere Untersuchungen ungeeignet, da sie nur Infektionen mit CXCR4-tropen, nicht aber mit CCR5-tropen Viren erlauben.

In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass die in dieser Arbeit verwendeten Vif-Varianten (K22E, Y40H und E45G) unterschiedliche neutralisierende Effekte auf die APOBEC-Aktivität und somit indirekt auf die Mutationsfrequenz von HIV haben (Simon et al., 2005; Knoepfel et al., 2008; Mulder et al., 2008). Während die K22E- und E45G-Varianten im Zeitraum der akuten Infektion isoliert wurden, stammte die Y40H-Variante aus einem Non-Progressor, der mehr als 20 Jahre lang keine Krankheitssymptome aufwies (Simon et al., 2003; Simon et al., 2005). Eine Datenbank-Analyse der AS 22 des Vif-Gens der Subtyp B-Population zeigte eine Vielzahl von Polymorphismen an dieser Position auf. Neben Lysin (K) (81,4 %) und Arginin (N) (13,6 %) konnten auch Histidin (H) (2,8 %) sowie weitere AS detektiert werden (2,2 %) (Yebra et al., 2011). Für die beiden Vif-Varianten K22H und K22E wurde eine partielle Vif-Defizienz beschrieben, die mit einer gesteigerten APOBEC-Aktivität assoziiert ist (Simon et al., 2005; Dang et al., 2009).

Die basalen A3G/A3F-Expressionsmengen der stabil transfizierten SupT1R5-Zellen zeigten relativ hohe APOBEC-Konzentrationen. Eine Vergleichsstudie verschiedener induzierbarer Expressionssysteme identifizierte das TetOn-System als ein System mit relativ hohen basalen Expressionsmengen (Meyer-Ficca et al., 2004). Durch Induktion stiegen die APOBEC-Mengen um den Faktor 4.8 und zeigten damit vergleichbare Induktionsraten zum transient transfizierten TetOn-System (3.7-fache Induktionsrate) (Meyer-Ficca et al., 2004). Die basalen Expressionsmengen beruhen zum Teil auf mit Tetrazyklin verunreinigtem FBS (Fetal Bovine Serum), welches 10%ig dem Kulturmedium zugesetzt wird. Auf die Verwendung von speziellem Tetrazyklin-freiem FBS (Tet System Approved FBS der Firma Clontech) wurde verzichtet, da sich in anderen Studien zwar eine 1.4-fache Reduktion der basalen Expression verzeichnen ließ, die aber auch zu einer 1.5-fachen Reduktion des induzierten Expressionslevels führte (Meyer-Ficca et al., 2004).

Die Induktion mit Dox führte zu APOBEC-Expressionsraten, die im Vergleich zu endogenen APOBEC-Mengen der naiven und stimulierten PBMC-Kulturen für A3G 2 bis 3.5-fach reduziert

und für A3F bis 2-fach erhöht waren. Aufgrund der Annahme, dass geringe APOBEC-Aktivitäten die Evolution CXCR4-troper Varianten fördern, sollten gerade die reduzierten Expressionsmengen in Interaktion mit den Vif-defizienten HIV-Varianten dazu dienen, die Auswirkungen auf die Evolution von HIV zu analysieren. Verschiedene andere Arbeitsgruppen zeigten bereits, dass hohe Mengen von A3G, aufgrund seines GG-Erkennungsmotives im TGG (Trp) Triplet, häufiger Stoppmutationen generieren als die von A3F. Zusätzlich manifestiert sich die höhere antivirale Aktivität von A3G bei Vif-Defizienz eher in einer kompletten Blockade der HIV-Replikation als in einer Steigerung der Diversität durch erhöhte Mutationsraten (Knoepfel et al., 2008; Browne et al., 2009; Armitage et al., 2012). Im Gegensatz dazu induzieren selbst 4-fach höhere Mengen von A3F nur ein Viertel der durch A3G-induzierten G-zu-A Mutationen und vermitteln eine geringere Restriktion von HIV (Mbisa et al., 2010). Nachfolgende Experimente unter basalen Expressionsmengen von A3G und A3F bestätigten die Replikationsfähigkeit der CXCR5-tropen Vif-defizienten Viren K22E und Del-Vif in den stabil transfizierten APOBEC-exprimierenden SupT1R5-Zellen.

Während die A3G-Proteinexpression in den induzierbaren A3G-SupT1R5-Zellen im Western Blot bestätigt werden konnte, war die Western Blot-Analyse der A3F-Expression nicht erfolgreich. Weder in PBMC-Extrakten noch in pcDNA3.1/APOBEC3F-transfizierten 293T-Zellen konnte mittels Western Blot-Analyse A3F spezifisch nachgewiesen werden, sodass die Ursache vermutlich auf den A3F-Antikörper zurückzuführen ist. Eine Detektion anhand des im pcDNA4.1-Vektor enthaltenen c-myc-Peptids konnte, aufgrund einer Leserasterverschiebung durch die Insertion des cDNA-Fragments, nicht erfolgen. Dennoch wurden in den A3F-SupT1R5-Zellen APOBEC-spezifische Effekte beobachtet.

Refsland et al. zeigten bereits, dass ansteigende APOBEC3G/F-mRNA-Mengen mit ansteigenden Proteinmengen dieser APOBEC-Proteine assoziiert sind (Refsland et al., 2010). Allerdings können auch Proteinexpressionsmengen in Western Blot-Analysen aufgrund unbekannter Epitop-Affinitäten nicht direkt miteinander verglichen werden (Chaipan et al., 2013). Die Menge an nachweisbarem Protein lässt zudem kaum Rückschlüsse auf den Aktivitätszustand (Steady-State) der APOBEC-Proteine innerhalb der Zelle zu, der durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren wie z.B. effektive Virus-Inkorporation, Cytidin-Deaminase-Aktivität und Cytidin-Deaminase-unabhängige antivirale Aktivität beeinflusst wird (Chaipan et al., 2013). Der Aktivitätszustand in der Zelle äußert sich in einer variablen Permissivität der Zellen. So untersuchten Han et al. (2008) eine semipermissive Zelllinie, die zwar hohe Mengen APOBEC exprimiert, jedoch Vif-defiziente Viren in ihrer Replikation nicht inhibiert. Eine Behandlung dieser Zellen mit RNase A rekrutierte APOBEC aus den hochmolekularen (HMM, high molecular mass) antiviral-inaktiven Ribonukleoprotein-Komplexen in die aktiven LMM-Komplexe (LMM, low molecular mass). Vif-defiziente Varianten wurden jedoch nur partiell inhibiert (Han et al., 2008).

Die Bestimmung der endogenen APOBEC-mRNA-Konzentrationen der primären PBMC-Kulturen zeigte übereinstimmend mit anderen Publikationen vergleichbare, jedoch individuell unterschiedliche A3G- und A3F-Mengen (Stopak et al., 2003; Refsland et al., 2010). Die Bestimmung der CD4/CCR5-doppeltpositiven Zellen identifizierte vergleichbare Anteile HIV-infizierbarer Zellen in den primären PBMC-Kulturen in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Mack et al., 1999). Durch die unterschiedlichen APOBEC-Mengen waren sie sehr gut als primäre Zellkultur-Systeme zur Untersuchung des mutagenen Einflusses von APOBEC einsetzbar.

Fünf Tage nach HIV-Infektion konnte in den PBMC-Kulturen mit WT-Virus genauso wie in den Del-Vif-Kulturen eine Reduktion der A3G/A3F-Mengen beobachtet werden. Da diese Reduktion sowohl nach Infektion mit dem Vif-kompetenten Wildtyp als auch bei den Vif-defizienten Varianten auftrat, ist eine Vif-Beteiligung ausgeschlossen. Aufgrund der höheren A3G-Expressionen in HIV-negativen Individuen im Vergleich zu HIV-Infizierten wird vermutet, dass die HIV-Infektion die A3G-Transkription herunterreguliert (Cho et al., 2006; Reddy et al., 2010). Allerdings fand man in chronisch infizierten, nicht-therapierten HIV-Patienten höhere Mengen von A3G im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und Patienten unter antiretroviraler Therapie (Vazquez-Perez et al., 2009; Mous et al., 2012).

Der Mechanismus, der diese Reduktion von A3G/A3F nach Infektion bewirkt, ist zwar noch nicht entschlüsselt, allerdings interagiert HIV mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen und Faktoren, welche die APOBEC-Expression modulieren könnten. In der *HIV-1 Human Interaction Database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sind derzeit ca. 12.800 HIV-1 Protein-Interaktionen mit 3180 humanen Proteinen und 1.300 Interaktionen mit 1.250 Genen während der Replikation dokumentiert. Allein die Bindung von gp120 an die Chemokinrezeptoren CCR5 bzw. CXCR4 zeigte eine transkriptionelle Änderung von 699 Genen, zusätzlich zu 587 spezifisch CCR5-assoziierten Modulationen (Cicala et al., 2006), welche diese Reduktion der A3G/A3F-Menge in infizierten Zellen bewirken könnten.

Die Infektion der induzierbaren APOBEC-exprimierenden Zellen mit den verschiedenen Vif-defizienten HIV-Varianten Del-Vif, K22E, Y40H, E45G und dem Wildtyp-Virus zeigte APOBEC-abhängige Inhibitions-Charakteristika. Da sich die HIV-restriktive Aktivität APOBECs erst nach Inkorporation ins Virion und damit während der Reversen Transkription in den neuen Zielzellen entfaltet (Sheehy et al., 2002), konnte im ersten Infektionszyklus kaum eine Reduktion der p24 Ag-Menge gegenüber APOBEC-negativen Zellen (6TR) registriert werden. Die p24 Ag-Mengen des ersten Infektionszyklus dienen daher als Replikations- und Inputkontrolle. Im zweiten Infektionszyklus erzeugten basale und induzierte APOBEC-Mengen eine Vif-abhängige Inhibition der p24 Ag-Produktion, welche als Maßstab der Virusreplikation diene.

Verglichen mit anderen Publikationen zeigten die partiell Vif-defizienten Varianten K22E, die unter A3G-Expression ähnlich stark inhibiert wurde wie die Vif-Deletionsvariante Del-Vif, bzw.

E45G, die nur gering inhibiert wurde, übereinstimmende Restriktions-Charakteristika (Simon et al., 2005; Mulder et al., 2008). Die starke Restriktion der Vif-Variante E45G sowie die unveränderte Replikation der Vif-Varianten Y40H und K22E unterscheiden sich von beschriebenen Neutralisationsaktivitäten dieser Vif-Varianten (Simon et al., 2005). Diese wurden anhand der Infektiosität von viralen Partikeln bestimmt, die unter Kotransfektion von A3F und Vif in epithelialen Zellen generiert wurden.

Die Infektion der PBMC-Kulturen mit den unterschiedlich Vif-defizienten Viren resultierte in APOBEC-abhängigen HIV-Restriktionen, die mit anderen in vitro-PBMC-Experimenten und dem induzierbaren System vergleichbar waren (Mulder et al., 2008). Neben Deaminase-abhängigen Effekten kann die HIV-Restriktion auch durch Deaminase-unabhängige Mechanismen vermittelt werden. Diese beruhen auf der Inhibition essentieller Replikationsprozesse, wie der Reversen Transkription, der Elongation viraler Transkripte oder des DNA-Strang-Transfers während der Integration (Guo et al., 2007; Li et al., 2007; Mbisa et al., 2007; Yang et al., 2007).

Aufgrund der beobachteten Restriktion wurde der mutagene Einfluss von APOBEC auf den HIV-Tropismus untersucht. Dazu wurde der V3-Bereich der unter APOBEC-Expression kultivierten Viren mittels NGS analysiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden bezüglich ihres Tropismus charakterisiert und die G-zu-A Mutationsfrequenzen in den APOBEC-Motiven analysiert.

Obwohl die Mutationsanalyse der APOBEC-Motive in der WT-Population starke G-zu-A Mutationsfrequenzen zeigte, führten diese nicht zu einem Anstieg der CXCR4-tropen Varianten. Im Gegensatz dazu zeigten die Vif-defizienten Viruspopulationen einen Anstieg der X4-Varianten auf bis zu 3.6 %, trotz einer geringeren Häufigkeit der G-zu-A Mutationen.

Die starke G-zu-A Mutationsfrequenz der WT-Population kann auf der geringen Anzahl der NGS-Reads beruhen, wodurch einzelne G-zu-A Mutationen überrepräsentiert sind. Da die G-zu-A Mutationen vorwiegend an nicht-Tropismus-relevanten Positionen (AS 17) auftraten, zeigte sich keine Zunahme der X4-Varianten (Goudsmit et al., 1988; Palker et al., 1988).

In der K22E-Population steigerten basale und induzierte A3G-Mengen die Anteile der X4-Varianten bis auf 3.3 %. Die Ursache für diesen Anstieg lässt sich in der Mutationsanalyse der V3-Region nicht eindeutig erkennen. Möglicherweise entstanden die ursächlichen, von `geno2pheno[coreceptor]` bewerteten Mutationen nicht an den untersuchten APOBEC-Motiven.

Retrograde Evolutionsstudien auf der Grundlage von NGS-Daten zeigten vielfältige Mutationswege zum X4-Tropismus (Bunnik et al., 2011). So erscheint oft zuerst an Position 25 eine positiv geladene Aminosäure, meist über E25K, und später tritt eine Mutation im A3G-Motiv an Aminosäure 24 auf. Auch andere Evolutionswege zum X4-Tropismus wurden beschrieben, so z.B. V20F und T22A ohne Änderung der Position 24/25 (Bunnik et al., 2011). Dies spricht für die Einbeziehung des gesamten V3-Bereichs zur Vorhersage des Tropismus, wie sie das Interpretationssystem `geno2pheno[coreceptor]` durchführt.

Parallel zum Anstieg der X4-Varianten in den Del-Vif-Populationen unter ansteigender A3F-Expression konnte in der motivbezogenen Analyse eine graduelle Zunahme der G-zu-A Mutationen an Position 25 detektiert werden, die als APOBEC-beeinflusste Position identifiziert wurde (Wood et al., 2009). Damit zeigte sich im induzierbaren System eine starke Relevanz des A3F-Motivs an Position 25 für die Entstehung von X4-Varianten.

Analog zum induzierbaren System konnten nach Viruskultivierung in den PBMC-Kulturen erhöhte Anteile von X4-Viren in den stärker Vif-defizienten Populationen beobachtet werden. Der Anstieg war zwar nicht so ausgeprägt wie im induzierbaren System, dafür aber in den Del-Vif-Populationen aller PBMC-Kulturen detektierbar. Die Mutationsanalyse der V3-Region zeigte in der WT-Population zunächst eine äquivalente Reduktion des G-zu-A Verhältnisses in allen drei PBMC-Virus-Kulturen, die auf eine Selektion der Viruspopulation hindeutet. Diese kann durch die in der PBMC-Kultur enthaltenen Immunzellen wie Monozyten, Natürliche Killerzellen oder CD8+T-Zellen vermittelt werden, die nach Aktivierung zytotoxische Zytokine sezernieren und so den Zelltod HIV-infizierter Zellen induzieren (Milstein et al., 2011; Regner et al., 2011).

Die Mutationsanalysen zeigten in den Vif-defizienten Viruspopulationen G-zu-A Mutationen an den A3F-Motiven der Positionen 2, 9 und 25 und an den A3G-Motiven der Positionen 15 und 17. Die G-zu-A Mutationen im A3F-Motiv an den Positionen 2 und 9 sind stille Mutationen, die keine Aminosäureänderung nach sich ziehen und somit keine Auswirkung auf die Klassifizierung der V3-Sequenzen haben. Die G-zu-A Mutationen an den Positionen 15 und 17, die Bestandteil des konservierten GPGR-Motivs sind, haben ebenfalls keine X4-Relevanz (Goudsmit et al., 1988; Palker et al., 1988). An Position 29 führt die G-zu-A Substitution zu der Mutation D29N. Diese wurde in Kombination mit einer Arginin-Insertion zwischen Aminosäure 11 und 12 nur im Zusammenhang mit einer Zunahme des dualtropen Korezeptorgebrauchs (CCR5- und CXCR4-Gebrauch) beschrieben (Tsuchiya et al., 2013). Somit scheint neben der gesamten V3-AS-Komposition hauptsächlich die G-zu-A Mutation im A3F-Motiv an Position 25 für den Anstieg an X4-klassifizierten Varianten verantwortlich zu sein.

Die grundsätzlich eher geringen G-zu-A Mutationsfrequenzen im induzierbaren und im PBMC-Virus-System beruhen wahrscheinlich auf einer funktionellen Selektion. Aufgrund der langen Zeit der Viruskultivierung (8 Tage) kann bei einem durchschnittlichen Replikationsprozess von ca. 1,8 Tagen (Rodrigo et al., 1999) von bis zu 4 Replikationszyklen in diesem Zeitraum ausgegangen werden. Aufgrund der Analyse des freien Virus und nicht der proviralen DNA wurden nur APOBEC-vermittelte G-zu-A Mutationen identifiziert, die auch eine Replikation erlauben. Da eine Evolution von R5 zu X4 nicht durch eine einzelne Aminosäureänderung bedingt ist, sondern ein monatelanger Prozess, der neben vielfältigen funktionellen Selektionen auch dem Selektionsdruck des Immunsystems unterliegt, können diese G-zu-A Mutationen nur als Trigger für die Entstehung CXCR4-troper Varianten angesehen werden (Wood et al., 2009; Bunnik et al., 2011; Poon et al., 2012; Hedskog et al., 2013; Sede et al., 2014).

Um den Einfluss der APOBEC-Vif-Wechselwirkung auf die Mutationsrate (% G-zu-A Mutation/Position) zu untersuchen, wurden die Mutationsfrequenzen der APOBEC-Motive in den mittels NGS-Analyse generierten *env*- und *nef*-Sequenzen bestimmt.

Die im induzierbaren System unter A3F-Expression ermittelten Mutationsraten stiegen mit zunehmender Vif-Defizienz. Im Gegensatz dazu konnte in den A3G-vermittelten Mutationsraten kein oder nur selten ein Anstieg mit Vif-Defizienz assoziiert werden. Obwohl eine Inhibition der Replikation unter APOBEC zu beobachten war, sind die Deaminase-abhängigen Effekte möglicherweise nicht detektierbar, da sie nur in der proviralen DNA der Zellen auftreten. Die Transkription dieser mutierten Virusgenome führt zu Infektions- und Replikations-inkompetenten Viren, die nicht in der freien Viruspopulation nachweisbar sind (Sato et al., 2010). Unter Verwendung eines Zellkultursystems mit A3G und Vif-Deletionsvarianten beobachteten Russell et al. (2009a), dass die Frequenz der Hypermuation am höchsten in der proviralen DNA, geringer in der zellulären viralen RNA und am niedrigsten in der Virion-assoziierten RNA war. Übereinstimmend dazu zeigten sich bei HIV-Infizierten unter antiretroviraler Therapie in der integrierten proviralen DNA ruhender CD4-Zellen durchschnittlich 9 % hypermutierte Virusgenome, die aber nicht im Plasma dieser Patienten nachweisbar waren (Kieffer et al., 2005).

Die Koexistenz der APOBEC-Proteine A3F und A3G in den PBMC-Kulturen ermöglichte den Vergleich der Mutationsraten nach APOBEC-Motiv (A3G und A3F) und HIV-Region (*env* und *nef*). Übereinstimmend mit anderen Publikationen zeigten die analysierten Viruspopulationen mit Zunahme der Vif-Defizienz und damit unter Verminderung der APOBEC-Neutralisationsaktivität ansteigende Mutationsraten (Knoepfel et al., 2008; Mulder et al., 2008). Die grundsätzlich stärkere mutagene Aktivität von A3G im Vergleich zu A3F zeigte sich in höheren Mutationsraten in den A3G-Motiven (Chaipan et al., 2013; Kim et al., 2014). Die längere APOBEC-Exposition der *nef*-Region im Vergleich zu *env* spiegelte sich in höheren Mutationsraten der in *nef* lokalisierten APOBEC-Motive wider (Yu et al., 2004a). Allerdings beeinflusst die Deaminase-Aktivität die Mutationsraten stärker als die APOBEC-Expositionsdauer und damit die Lokalisation im HIV-Genom, welches sich durch die höheren Mutationsraten der A3G-Motive in *env* und *nef* erschließt. Im Gegensatz zu Studien, die die Mutationsraten auf der Basis proviraler DNA untersuchten und unter hohen APOBEC-Mengen auch hohe Mutationsraten beobachteten, zeigten sich in den hier analysierten Virusgenomen die höchsten Mutationsraten bei geringen APOBEC-Mengen (PBMC-Kultur 1) (Knoepfel et al., 2008; Kim et al., 2014). Ausschlaggebend hierfür ist die Analyse der freien Viren, bei denen sich eine zu starke Mutationsrate eher replikationsinhibierend auswirkt (Russell et al., 2009a; Sato et al., 2010).

Die Mutationsanalysen von Mulder und Kollegen zeigten bei unterschiedlich Vif-defizienten Viren vergleichbare Assoziationen zwischen Vif-Defizienz, Replikationsfähigkeit und

Mutationsrate (Mulder et al., 2008). In dieser Studie waren die häufigsten G-zu-A Mutationen nicht mit der stärksten Vif-Defizienz assoziiert, sondern mit partieller Vif-Defizienz (K22E) (Mulder et al., 2008). In replikativen Systemen entstehen die höchsten Mutationsfrequenzen somit nicht zwingend bei hoher APOBEC-Expression, sondern erfordern gleichzeitig eine fortdauernde Replikation, wie sie häufig bei partiell Vif-defizienten Varianten anzutreffen ist. Die klinische Relevanz dieses Phänomens zeigt sich in der Studie von Fourati et al., in welcher die partiell Vif-defiziente Variante K22H 10-mal häufiger in Patienten mit Therapieversagen durch die Entstehung Resistenz-assoziiierter Mutationen detektiert werden konnte als in Therapie-Naiven (Dang et al., 2009; Fourati et al., 2010).

Der Einfluss des APOBEC-Vif Verhältnisses auf die Mutationsrate zeigte sich in den PBMC-Virus-Kulturen beim Vergleich der Mutationsraten unter Berücksichtigung der APOBEC-Menge und Vif-Defizienz. Der Vif-kompetente Wildtyp und die gering Vif-defiziente Variante Y40H, deren Replikation am wenigsten inhibiert wurde, zeigten die höchsten Mutationsraten unter hohen APOBEC-Mengen. Die stärker Vif-defiziente Variante K22E und die Deletionsvariante Del-Vif wurden 4-fach stärker inhibiert (Reduktion der p24 Ag-Menge gegenüber dem WT) und mutierten am stärksten unter geringen APOBEC-Mengen. Somit bestätigen die Ergebnisse, dass hohe APOBEC-Mengen nicht immer auch hohe Mutationsraten induzieren, sondern dass das Verhältnis zwischen Vif-Defizienz und APOBEC-Aktivität für die Steigerung der Mutationsrate in replizierenden Systemen ausschlaggebend ist (Abb. 4.1).

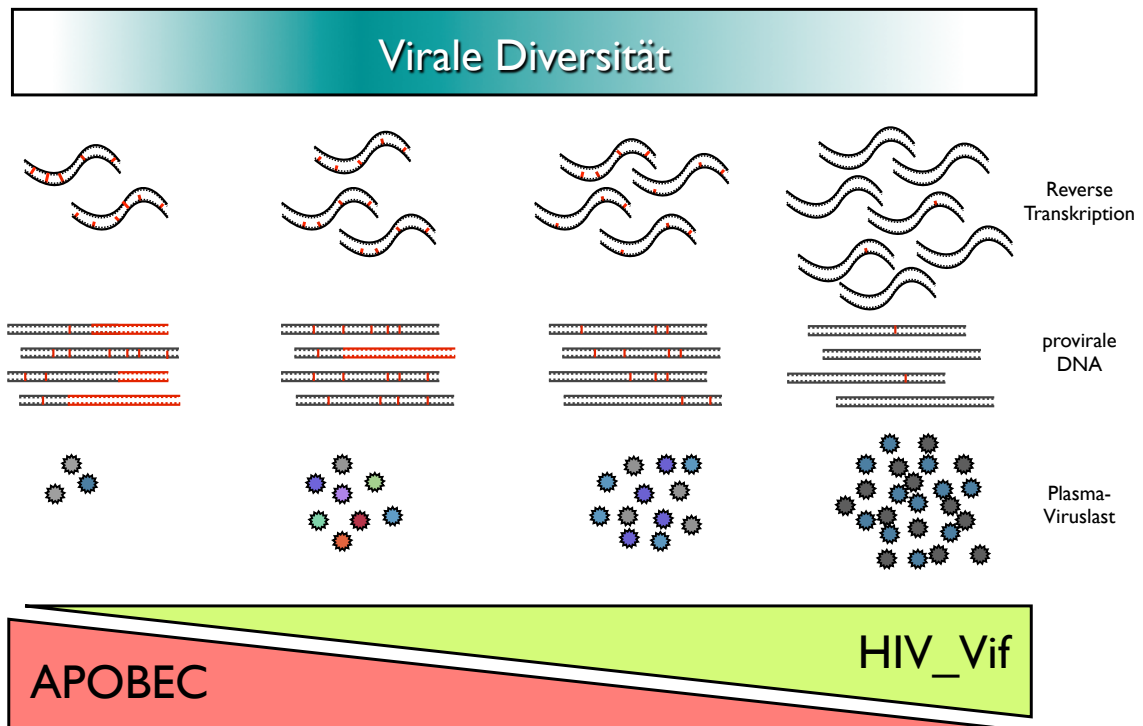


Abb. 4.1: Modell - Einfluss des APOBEC-Vif-Verhältnisses auf die Replikationsfähigkeit und Mutationsrate von HIV

Je höher die APOBEC-Aktivität in einer Zelle (rotes Dreieck), umso größer ist die G-zu-A Mutationsrate und umso mehr Mutationen (rot) werden während der Reversen Transkription in das virale Genom eingebracht. Stoppmutationen führen zum Abbruch der Translation; Mutationen, die zu einer Änderung der kodierten Aminosäure führen, zur letalen Mutagenese oder Verstärkung der viralen Diversität. Rekombinationsereignisse während der Reversen Transkription vermindern die nachteilige Wirkung von Mutationen und steigern die Virusvariabilität. Die Erhöhung der Mutationsrate führt eine homogene, anpassungsschwache Viruspopulation durch einen Bereich der maximalen Variabilität mit vielfältiger Anpassungsfähigkeit bis hin zur fast vollständigen Restriktion durch letale Hypermutation (von rechts nach links). Adaptiert nach (Munk et al., 2012).

Die Abhängigkeit zwischen Replikationsfähigkeit und Mutationsrate verdeutlicht sich im Gleichgewicht zwischen APOBEC und Vif (Abb. 4.1). Vif-kompetente Viren neutralisieren die mutagene Aktivität von APOBEC und erhalten die Integrität der Viruspopulation (rechts). Partielle Vif-defiziente Varianten ermöglichen, unter Einbeziehung APOBEC-vermittelter Mutationen, eine Steigerung der Mutationsrate. Diese verstärkt die virale Diversität und erlaubt dem Virus, sich wechselnden Umwelteinflüssen anzupassen (Mitte). Eine weitere Steigerung der G-zu-A Mutationsrate aufgrund fehlender Neutralisationsaktivität Vif-defizienter Virusvarianten führt durch Hypermutation zu einer letalen Mutagenese des viralen Genoms. Durch die Inhibition der Reversen Transkription vermindert sich die Diversität und es kommt zu einer fast vollständigen Restriktion der HIV-Replikation (links).

Die Dynamik der HIV-Evolution spiegelt die Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirtsorganismus wider. Zum einen nutzt HIV die Replikationsmaschinerie und macht sie sich zu eigen, auf der anderen Seite generiert das angeborene wie auch das adaptive Immunsystem

eine Vielzahl von Abwehrmechanismen, denen das Virus durch immer neue Varianten zu entkommen versucht. Zelluläre Restriktionsfaktoren wie APOBEC, TRIM5 α , Tetherin und SAMHD1 sollen die Replikation von Viren verhindern, werden aber durch die akzessorischen Proteine von HIV umgangen (Malim et al., 2012). Seit der Verfügbarkeit der antiviralen Therapie kommt mit dem erfolgreichen Einsatz hochwirksamer antiviraler Medikamente ein weiterer Selektionsdruck hinzu (Gulick et al., 1997; Hammer et al., 1997).

Aufgrund der hohen Fehlerrate der Reversen Transkriptase verfügt HIV über ein hohes Maß an Variabilität, die es unter Einbeziehung der Restriktionsfaktoren A3G und A3F über die Interaktion mit dem viralen Protein Vif noch steigern kann. Dabei nutzt HIV die viral-restriktive Fähigkeit der APOBEC-Proteine Mutationen im viralen Genom zu generieren, um auf wechselnden Selektionsdruck aus der Umwelt zu reagieren. Unter APOBEC-Einwirkung entwickeln sich Resistenz-assoziierte Mutationen (RAMs) unter Medikamenten-Selektionsdruck im Kontext von APOBEC-Erkennungsmotiven schneller, und selbst in der proviralen DNA HIV-Infizierter lassen sich APOBEC-assoziierte RAMs bei Therapie-Naiven identifizieren (Mulder et al., 2008; Fourati et al., 2010; Fourati et al., 2012; Kim et al., 2014). Rekombinationsereignisse zwischen hypermutierten und Wildtyp-Genomen erhöhen weiter die virale Diversität und resultieren in replikationskompetenten resistenten Viren (Knoepfel et al., 2008).

APOBEC-assoziierte Mutationen innerhalb bekannter CTL-Epitope reduzieren eine Erkennung und damit Aktivierung HIV-spezifischer CD8-T-Zellen. Das A3G-Motive beinhaltende Triplett GGG kommt innerhalb immun-dominanter CTL-Epitope sechs-mal häufiger vor als außerhalb dieser Epitope, wodurch HIV schnell einer immunologischen Restriktion entgehen kann (Monajemi et al., 2014). Neutralisierende Antikörper zwingen HIV ebenfalls, sich der Restriktion des humoralen Immunsystems durch eine hohe Mutationsfrequenz im *env*-Bereich zu entziehen (Richman et al., 2003; Wei et al., 2003).

Zusätzlich zum immunologischen Kontrollverlust führt eine hohe Mutationsrate innerhalb der *env*-Region von HIV zu einer großen Diversität und kann in einem Wechsel des Zelltropismus resultieren. Aus der homogenen CCR5-tropen Viruspopulation während der Primärinfektion entsteht durch Mutation eine Vielzahl an CCR5- und auch CXCR4-tropen Varianten. Wie in dieser Arbeit gezeigt, steigert APOBEC das Entstehen CXCR4-troper Varianten. Obwohl beide Tropismus-Varianten im Patienten koexistieren, sind R5-Viren die dominante Viruspopulation, was auf zell-spezifische und immunologische Vorteile dieser Tropismusvariante schließen lässt. Insbesondere Monozyten und Makrophagen, die das Hauptvirusreservoir R5-troper Virusvarianten während der Infektion darstellen (Wahl et al., 1997), können aufgrund ihrer längeren Lebensdauer und damit stärkeren Virusverbreitung (Gordon et al., 2002; Locher et al., 2005; Jones et al., 2006) den zell-spezifischen Selektionsdruck begründen.

Ein immunologischer Vorteil liegt in der selektiven X4-Restriktion Virus-spezifischer CD8 T-Zellen begründet. In koinfizierten (R5 und X4) Affen dominierten nach der Entstehung Virus-

spezifischer CD8⁺-Zellen die CCR5-tropen Varianten. Eine Antikörper-vermittelte Depletion dieser CD8⁺-T-Zellen ermöglichte aber ein Wiederaufkommen CXCR4-troper Viren (Harouse et al., 2003).

Ein weiterer Unterschied zwischen R5- und X4-Viren zeigt sich in der N-Glykosylierungsfrequenz. Während R5-Viren eine stärkere N-Glykosylierung in gp120 zeigen, die bei diesen sowohl eine Steigerung der Infektiosität als auch eine Abschirmung gegenüber neutralisierenden Antikörpern bewirkt, sind X4-Viren durch die geringere Anzahl schützender Glykosylierungsstellen der humoralen Restriktion neutralisierender Antikörper stärker ausgesetzt (Polzer et al., 2002; Nabatov et al., 2004a; Kalinina et al., 2013). Die Auslöschung solcher neutralisierenden B-Zellklone wurde im Verlauf der HIV-Infektion beobachtet und kann das nachfolgende Vorherrschen von X4-Viren aufgrund fehlender Immunkontrolle erklären (Schreiber et al., 1996).

Retrograde Evolutionsstudien zeigen, dass sich die Primärinfektion aus wenigen viralen Partikeln etabliert und durch immunologische und fitnessbedingte Selektion zur dominanten Primärpopulation entwickelt (Hedskog et al., 2013). Ausgehend von dieser, führt das schrittweise Auftreten weiterer Mutationen zur Evolution von X4-Varianten, die sich durchschnittlich 10 Monate nach dem Erscheinen der ersten relevanten X4-Variante in einem Korezeptorswitch manifestieren können (Salemi et al., 2007; Bunnik et al., 2011; Poon et al., 2012). Allerdings ist bis zum heutigen Zeitpunkt trotz intensiver Forschung nicht geklärt, zu welchem Zeitpunkt minore X4-Varianten zur vorherrschenden Viruspopulation heranwachsen.

Diese Arbeit identifizierte die G-zu-A Substitution als bedeutendes Unterscheidungsmerkmal zwischen R5- und X4-Sequenzen durch eine statistische Analyse cross-sektionaler und longitudinaler Datensätze. Diese G-zu-A Substitutionen entstehen häufig in den APOBEC-Erkennungsmotiven GG bzw. GA an Tropismus-relevanten Positionen der V3-Region, sodass APOBEC als einflussnehmender Faktor auf die Entstehung von X4-Varianten vermutet wurde. Zur experimentellen Überprüfung wurden induzierbare APOBEC-exprimierende Zelllinien hergestellt, mit deren Hilfe der mutagene Einfluss schwacher A3F- bzw. A3G-Aktivität auf replizierende CCR5-trope Vif-Varianten untersucht werden konnte. Bestätigt durch primäre PBMC-Kulturen wurde anhand kontrollierter APOBEC-Vif-Interaktion die mutagene Wirkung schwacher APOBEC-Aktivität als möglicher Mechanismus für die Entstehung von CXCR4-tropen HI-Virusvarianten identifiziert. Auch in zukünftigen Forschungsvorhaben können die neu etablierten Zellkultur-Systeme zur Analyse des APOBEC-Einflusses auf andere Genomregionen von HIV oder auch im Hinblick auf die Entstehung Resistenz-assoziiierter Mutationen von neuen Medikamentenklassen verwendet werden.

5 Literaturverzeichnis

- Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A and Martin MA. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol.*; **59**:284-91.
- Akari H, Sakuragi J, Takebe Y, Tomonaga K, Kawamura M, Fukasawa M, Miura T, et al. 1992. Biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 mutants in human peripheral blood mononuclear cells. *Arch Virol*; **123**:157-67.
- Alce TM and Popik W. 2004. APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem*; **279**:34083-6.
- Alizon M, Wain-Hobson S, Montagnier L and Sonigo P. 1986. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell.*; **46**:63-74.
- Alkhatib G, Ahuja SS, Light D, Mummidi S, Berger EA and Ahuja SK. 1997. CC chemokine receptor 5-mediated signaling and HIV-1 Co-receptor activity share common structural determinants. Critical residues in the third extracellular loop support HIV-1 fusion. *J Biol Chem*; **272**:19771-6.
- Archer J, Braverman MS, Taillon BE, Desany B, James I, Harrigan PR, Lewis M, et al. 2009. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS.*; **23**:1209-18.
- Armitage AE, Deforche K, Chang CH, Wee E, Kramer B, Welch JJ, Gerstoft J, et al. 2012. APOBEC3G-induced hypermutation of human immunodeficiency virus type-1 is typically a discrete "all or nothing" phenomenon. *PLoS Genet*; **8**:e1002550. .
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, et al. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*; **220**:868-71.
- Beale RC, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Harris RS, Rada C and Neuberger MS. 2004. Comparison of the differential context-dependence of DNA deamination by APOBEC enzymes: correlation with mutation spectra in vivo. *J Mol Biol.*; **337**:585-96.
- Berger EA, Murphy PM and Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*; **17**:657-700.
- Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Davidson NO, Cho SJ and Malim MH. 2004. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol.*; **14**:1392-6.
- Bishop KN, Verma M, Kim EY, Wolinsky SM and Malim MH. 2008. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog.*; **4**:e1000231. .
- Blanc V and Davidson NO. 2010. APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*; **2**:594-602.
- Borman AM, Quillent C, Charneau P, Dauguet C and Clavel F. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J Virol.*; **69**:2058-67.

- Bour S and Strebel K. 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect.*; **5**:1029-39.
- Boyer PL, Stenbak CR, Hoberman D, Linial ML and Hughes SH. 2007. In vitro fidelity of the prototype primate foamy virus (PFV) RT compared to HIV-1 RT. *Virology.*; **367**:253-64.
- Brandt SM, Mariani R, Holland AU, Hope TJ and Landau NR. 2002. Association of chemokine-mediated block to HIV entry with coreceptor internalization. *J Biol Chem*; **277**:17291-9.
- Broder CC and Berger EA. 1995. Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of human immunodeficiency virus type 1 tropism for CD4+ T-cell lines vs. primary macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **92**:9004-8.
- Browne EP, Allers C and Landau NR. 2009. Restriction of HIV-1 by APOBEC3G is cytidine deaminase-dependent. *Virology.*; **387**:313-21.
- Brumme ZL, Goodrich J, Mayer HB, Brumme CJ, Henrick BM, Wynhoven B, Asselin JJ, et al. 2005. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. *J Infect Dis.*; **192**:466-74.
- Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Montagnier L, Chamaret S, Gruet J, Barre-Sinoussi F, Geroldi D, et al. 1984. Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. *Science.*; **226**:453-6.
- Bunnik EM, Swenson LC, Edo-Matas D, Huang W, Dong W, Frantzell A, Petropoulos CJ, et al. 2011. Detection of inferred CCR5- and CXCR4-using HIV-1 variants and evolutionary intermediates using ultra-deep pyrosequencing. *PLoS Pathog.*; **7**:e1002106.
- Burnett A and Spearman P. 2007. APOBEC3G multimers are recruited to the plasma membrane for packaging into human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles in an RNA-dependent process requiring the NC basic linker. *J Virol.*; **81**:5000-13.
- Cao J, Bergeron L, Helseth E, Thali M, Repke H and Sodroski J. 1993. Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *J Virol.*; **67**:2747-55.
- Cardozo T, Kimura T, Philpott S, Weiser B, Burger H and Zolla-Pazner S. 2007. Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res Hum Retroviruses.*; **23**:415-26.
- Cen S, Guo F, Niu M, Saadatmand J, Deflassieux J and Kleiman L. 2004. The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem*; **279**:33177-84.
- Chaipan C, Smith JL, Hu WS and Pathak VK. 2013. APOBEC3G restricts HIV-1 to a greater extent than APOBEC3F and APOBEC3DE in human primary CD4+ T cells and macrophages. *J Virol.*; **87**:444-53.
- Chan DC, Fass D, Berger JM and Kim PS. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.*; **89**:263-73.
- Chen G, He Z, Wang T, Xu R and Yu XF. 2009. A patch of positively charged amino acids surrounding the human immunodeficiency virus type 1 Vif SLVx4Yx9Y motif influences its interaction with APOBEC3G. *J Virol.*; **83**:8674-82.

- Cheng-Mayer C, Shioda T and Levy JA. 1991. Host range, replicative, and cytopathic properties of human immunodeficiency virus type 1 are determined by very few amino acid changes in tat and gp120. *J Virol*; **65**:6931-41.
- Chiu YL and Greene WC. 2009. APOBEC3G: an intracellular centurion. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*; **364**:689-703.
- Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W and Greene WC. 2005. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature.*; **435**:108-14.
- Chiu YL, Witkowska HE, Hall SC, Santiago M, Soros VB, Esnault C, Heidmann T, et al. 2006. High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **103**:15588-9.
- Cho SJ, Drechsler H, Burke RC, Arens MQ, Powderly W and Davidson NO. 2006. APOBEC3F and APOBEC3G mRNA levels do not correlate with human immunodeficiency virus type 1 plasma viremia or CD4+ T-cell count. *J Virol.*; **80**:2069-72.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, et al. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.*; **85**:1135-48.
- Cicala C, Arthos J, Martinelli E, Censoplano N, Cruz CC, Chung E, Selig SM, et al. 2006. R5 and X4 HIV envelopes induce distinct gene expression profiles in primary peripheral blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **103**:3746-51.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Lusso P and Gallo RC. 1996. Response: Role of beta-Chemokines in Suppressing HIV Replication. *Science.*; **274**:1394-5.
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, et al. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science.*; **232**:697.
- Coffin JM. 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.*; **267**:483-9.
- Coffin JM HS, Varmus HE, editors. "Retroviruses." Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1997.
- Connor RI and Ho DD. 1994. Transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*; **10**:321-3.
- Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S and Landau NR. 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med.*; **185**:621-8.
- Coticello SG, Thomas CJ, Petersen-Mahrt SK and Neuberger MS. 2005. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol.*; **22**:367-77.
- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF and Weiss RA. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.*; **312**:763-7.

- Dang Y, Wang X, Zhou T, York IA and Zheng YH. 2009. Identification of a novel WxSLVK motif in the N terminus of human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus Vif that is critical for APOBEC3G and APOBEC3F neutralization. *J Virol.*; **83**:8544-52.
- Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, Barre-Sinoussi F, et al. 2007. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *J Clin Microbiol*; **45**:1572-80.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, et al. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.*; **381**:661-6.
- Doranz BJ, Grovit-Ferbas K, Sharron MP, Mao SH, Goetz MB, Daar ES, Doms RW, et al. 1997. A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J Exp Med*; **186**:1395-400.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, et al. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature.*; **381**:667-73.
- Dybowski JN, Heider D and Hoffmann D. 2010. Prediction of co-receptor usage of HIV-1 from genotype. *PLoS Comput Biol.*; **6**:e1000743.
- Esnault C, Heidmann O, Delebecque F, Dewannieux M, Ribet D, Hance AJ, Heidmann T, et al. 2005. APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature.*; **433**:430-3.
- Fan L and Peden K. 1992. Cell-free transmission of Vif mutants of HIV-1. *Virology.*; **190**:19-29.
- Fatkenheuer G, Pozniak AL, Johnson MA, Plettenberg A, Staszewski S, Hoepelman AI, Saag MS, et al. 2005. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat Med.*; **11**:1170-2.
- Fehrholz M, Kendl S, Prifert C, Weissbrich B, Lemon K, Rennick L, Duprex PW, et al. 2012. The innate antiviral factor APOBEC3G targets replication of measles, mumps and respiratory syncytial viruses. *J Gen Virol.*; **93**:565-76.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE and Berger EA. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.*; **272**:872-7.
- Feng Y and Chelico L. 2011. Intensity of deoxycytidine deamination of HIV-1 proviral DNA by the retroviral restriction factor APOBEC3G is mediated by the noncatalytic domain. *J Biol Chem.*; **286**:11415-26.
- Fenyo EM, Fiore J, Karlsson A, Albert J and Scarlatti G. 1994. Biological phenotypes of HIV-1 in pathogenesis and transmission. *Antibiot Chemother*; **46**:18-24.
- Fitzgibbon JE, Mazar S and Dubin DT. 1993. A new type of G→A hypermutation affecting human immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses.*; **9**:833-8.
- Flint OP, Noor MA, Hruz PW, Hylemon PB, Yarasheski K, Kotler DP, Parker RA, et al. 2009. The role of protease inhibitors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy: cellular mechanisms and clinical implications. *Toxicol Pathol.*; **37**:65-77.
- Forsman A and Weiss RA. 2008. Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol.*; **16**:555-60.

- Fouchier RA and Malim MH. 1999. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv Virus Res*; **52**:275-99.
- Fourati S, Malet I, Binka M, Boukobza S, Wirden M, Sayon S, Simon A, et al. 2010. Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals. *AIDS*; **24**:2313-21.
- Fourati S, Malet I, Lambert S, Soulie C, Wirden M, Flandre P, Fofana DB, et al. 2012. E138K and M184I mutations in HIV-1 reverse transcriptase coemerge as a result of APOBEC3 editing in the absence of drug exposure. *AIDS*; **26**:1619-24.
- Frankel AD and Young JA. 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*; **67**:1-25.
- Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine WA and Sodroski J. 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol*; **66**:6489-95.
- Gallaher WR. 1987. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell*; **50**:327-8.
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*; **224**:500-3.
- Garrett ED, Tiley LS and Cullen BR. 1991. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *J Virol*; **65**:1653-7.
- Gelderblom HR. 1991. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS*; **5**:617-37.
- Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G and Koch MA. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology*; **156**:171-6.
- Goila-Gaur R and Strebel K. 2008. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology*; **5**:51.
- Goncalves J, Korin Y, Zack J and Gabuzda D. 1996. Macrophage defences against respiratory tract infections. *J Virol*; **70**:8701-9.
- Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC, Clements JE, Narayan O and Gilden RV. 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science*; **227**:173-7.
- Gordon SB and Read RC. 2002. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *Br Med Bull*; **61**:45-61.
- Gossen M and Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **89**:5547-51.

- Goudsmit J, Debouck C, Meloen RH, Smit L, Bakker M, Asher DM, Wolff AV, et al. 1988. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **85**:4478-82.
- Gout JF, Thomas WK, Smith Z, Okamoto K and Lynch M. 2013. Large-scale detection of in vivo transcription errors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **110**:18584-9.
- Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, Richman DD, et al. 1997. The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA³Lys annealing to viral RNA. *N Engl J Med.*; **337**:734-9.
- Guo F, Cen S, Niu M, Yang Y, Gorelick RJ and Kleiman L. 2007. The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA³Lys annealing to viral RNA. *J Virol.*; **81**:11322-31.
- Guy B, Kieny MP, Riviere Y, Le Peuch C, Dott K, Girard M, Montagnier L, et al. 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature.*; **330**:266-9.
- Hache G, Liddament MT and Harris RS. 2005. The retroviral hypermutation specificity of APOBEC3F and APOBEC3G is governed by the C-terminal DNA cytosine deaminase domain. *J Biol Chem.*; **280**:10920-4.
- Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJ, Jr., et al. 1997. A controlled trial of two nucleoside analogues plus zidovudine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med.*; **337**:725-33.
- Han Y, Wang X, Dang Y and Zheng YH. 2008. APOBEC3G and APOBEC3F require an endogenous cofactor to block HIV-1 replication. *PLoS Pathog.*; **4**:e1000095.
- Harouse JM, Buckner C, Gettie A, Fuller R, Bohm R, Blanchard J and Cheng-Mayer C. 2003. CD8+ T cell-mediated CXCR4 chemokine receptor 4-simian/human immunodeficiency virus suppression in dually infected rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **100**:10977-82.
- Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, et al. 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell.*; **113**:803-9.
- He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO and Landau NR. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol.*; **69**:6705-11.
- Hearps AC, Angelovich TA, Jaworowski A, Mills J, Landay AL and Crowe SM. 2011. HIV infection and aging of the innate immune system. *Sex Health.*; **8**:453-64.
- Hedskog C, Brodin J, Heddini A, Bratt G, Albert J and Mild M. 2013. Longitudinal ultradeep characterization of HIV type 1 R5 and X4 subpopulations in patients followed from primary infection to coreceptor switch. *AIDS Res Hum Retroviruses.*; **29**:1237-44.
- Heger E, Thielen A, Gilles R, Obermeier M, Lengauer T, Kaiser R and Trapp S. 2012. APOBEC3G/F as one possible driving force for co-receptor switch of the human immunodeficiency virus-1. *Med Microbiol Immunol.*; **201**:7-16.

- Henderson LE, Bowers MA, Sowder RC, 2nd, Serabyn SA, Johnson DG, Bess JW, Jr., Arthur LO, et al. 1992. Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J Virol.*; **66**:1856-65.
- Henriet S, Mercenne G, Bernacchi S, Paillart JC and Marquet R. 2009. Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiol Mol Biol Rev.*; **73**:211-32.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM and Markowitz M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.*; **373**:123-6.
- Huthoff H and Malim MH. 2007. Identification of amino acid residues in APOBEC3G required for regulation by human immunodeficiency virus type 1 Vif and Virion encapsidation. *J Virol.*; **81**:3807-15.
- Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J and Navaratnam N. 2002. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics.*; **79**:285-96.
- Jones G and Power C. 2006. Regulation of neural cell survival by HIV-1 infection. *Neurobiol Dis.*; **21**:1-17.
- Kalinina OV, Pfeifer N and Lengauer T. 2013. Modelling binding between CCR5 and CXCR4 receptors and their ligands suggests the surface electrostatic potential of the co-receptor to be a key player in the HIV-1 tropism. *Retrovirology.*; **10**:130.
- Kammula EC, Motter J, Gorgels A, Jonas E, Hoffmann S and Willbold D. 2012. Brain transcriptome-wide screen for HIV-1 Nef protein interaction partners reveals various membrane-associated proteins. *PLoS One*; **7**:e51578.
- Kao SY, Calman AF, Luciw PA and Peterlin BM. 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature.*; **330**:489-93.
- Khan MA, Aberham C, Kao S, Akari H, Gorelick R, Bour S and Strebel K. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol.*; **75**:7252-65.
- Kieffer TL, Kwon P, Nettles RE, Han Y, Ray SC and Siliciano RF. 2005. G-->A hypermutation in protease and reverse transcriptase regions of human immunodeficiency virus type 1 residing in resting CD4+ T cells in vivo. *J Virol.*; **79**:1975-80.
- Kim EY, Lorenzo-Redondo R, Little SJ, Chung YS, Phalora PK, Maljkovic Berry I, Archer J, et al. 2014. Human APOBEC3 induced mutation of human immunodeficiency virus type-1 contributes to adaptation and evolution in natural infection. *PLoS Pathog.*; **10**:e1004281.
- Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, Sata T, et al. 2007. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res*; **35**:2955-64.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, et al. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature.*; **312**:767-8.

- Knoepfel SA, Salisch NC, Huelsmann PM, Rauch P, Walter H and Metzner KJ. 2008. Comparison of G-to-A mutation frequencies induced by APOBEC3 proteins in H9 cells and peripheral blood mononuclear cells in the context of impaired processivities of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase variants. *J Virol.*; **82**:6536-45.
- Koito A and Ikeda T. 2011. Intrinsic restriction activity by AID/APOBEC family of enzymes against the mobility of retroelements. *Mob Genet Elements.*; **1**:197-202.
- Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, et al. 1993. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med.*; **118**:681-8.
- Koot M, Vos AH, Keet RP, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG, Coutinho RA, et al. 1992. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS*; **6**:49-54.
- Kowalski M, Potz J, Basiripour L, Dorfman T, Goh WC, Terwilliger E, Dayton A, et al. 1987. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science.*; **237**:1351-5.
- Kuiken CL, Zwart G, Baan E, Coutinho RA, van den Hoek JA and Goudsmit J. 1993. Increasing antigenic and genetic diversity of the V3 variable domain of the human immunodeficiency virus envelope protein in the course of the AIDS epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **90**:9061-5.
- Kupfer B, Kaiser R, Rockstroh JK, Matz B and Schneeweis KE. 1998. Role of HIV-1 phenotype in viral pathogenesis and its relation to viral load and CD4+ T-cell count. *J Med Virol.*; **56**:259-63.
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J and Hendrickson WA. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.*; **393**:648-59.
- Lampe FC, Johnson MA, Lipman M, Loveday C, Youle M, Ransom D, Sabin CA, et al. 2003. Viral breakthrough after suppression with highly active antiretroviral therapy: experience from 233 individuals with viral loads of less than 50 copies/ml followed for up to 4 years. *AIDS.*; **17**:768-70.
- Larijani M and Martin A. 2012. The biochemistry of activation-induced deaminase and its physiological functions. *Semin Immunol.*; **24**:255-63.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.*; **23**:2947-8. Epub 007 Sep 10.
- Lasky LA, Nakamura G, Smith DH, Fennie C, Shimasaki C, Patzer E, Berman P, et al. 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell.*; **50**:975-85.
- Le Rouzic E and Benichou S. 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology.*; **2**:11.
- Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F and Hance AJ. 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science.*; **300**:1112.

- Lei YC, Hao YH, Zhang ZM, Tian YJ, Wang BJ, Yang Y, Zhao XP, et al. 2006. Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol.*; **12**:4492-7.
- Lengauer T and Sing T. 2006. Bioinformatics-assisted anti-HIV therapy. *Nat Rev Microbiol.*; **4**:790-7.
- Levy JA. 2009. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS.*; **23**:147-60.
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM and Oshiro LS. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.*; **225**:840-2.
- Li XY, Guo F, Zhang L, Kleiman L and Cen S. 2007. APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem.*; **282**:32065-74.
- Liao HX, Bonsignori M, Alam SM, McLellan JS, Tomaras GD, Moody MA, Kozink DM, et al. 2013. Vaccine induction of antibodies against a structurally heterogeneous site of immune pressure within HIV-1 envelope protein variable regions 1 and 2. *Immunity.*; **38**:176-86.
- Liao W, Hong SH, Chan BH, Rudolph FB, Clark SC and Chan L. 1999. APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. *Biochem Biophys Res Commun.*; **260**:398-404.
- Liddament MT, Brown WL, Schumacher AJ and Harris RS. 2004. APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol.*; **14**:1385-91.
- Locher CP, Witt SA, Kassel R, Dowell NL, Fujimura S and Levy JA. 2005. Differential effects of R5 and X4 human immunodeficiency virus type 1 infection on CD4+ cell proliferation and activation. *J Gen Virol.*; **86**:1171-9.
- Low AJ, Dong W, Chan D, Sing T, Swanstrom R, Jensen M, Pillai S, et al. 2007. Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS.*; **21**:F17-24.
- Lusso P, Cocchi F, Balotta C, Markham PD, Louie A, Farci P, Pal R, et al. 1995. Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J Virol.*; **69**:3712-20.
- Mack M, Bruhl H, Gruber R, Jaeger C, Cihak J, Eiter V, Plachy J, et al. 1999. Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis. *Arthritis Rheum.*; **42**:981-8.
- Malim MH and Bieniasz PD. 2012. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med.*; **2**:a006940.
- Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV and Cullen BR. 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature.*; **338**:254-7.

- Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L and Trono D. 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature.*; **424**:99-103.
- Mansky LM and Temin HM. 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol.*; **69**:5087-94.
- Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, Munk C, et al. 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell.*; **114**:21-31.
- Marin M, Rose KM, Kozak SL and Kabat D. 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med.*; **9**:1398-403.
- Martinez MA, Sala M, Vartanian JP and Wain-Hobson S. 1995. Reverse transcriptase and substrate dependence of the RNA hypermutagenesis reaction. *Nucleic Acids Res.*; **23**:2573-8.
- Mathews CK and Ji J. 1992. DNA precursor asymmetries, replication fidelity, and variable genome evolution. *Bioessays.*; **14**:295-301.
- Mbisa JL, Barr R, Thomas JA, Vandegraaff N, Dorweiler IJ, Svarovskaia ES, Brown WL, et al. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *J Virol.*; **81**:7099-110.
- Mbisa JL, Bu W and Pathak VK. 2010. APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *J Virol.*; **84**:5250-9.
- McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR and Weissman IL. 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell.*; **53**:55-67.
- Means RE, Matthews T, Hoxie JA, Malim MH, Kodama T and Desrosiers RC. 2001. Ability of the V3 loop of simian immunodeficiency virus to serve as a target for antibody-mediated neutralization: correlation of neutralization sensitivity, growth in macrophages, and decreased dependence on CD4. *J Virol.*; **75**:3903-15.
- Mehle A, Thomas ER, Rajendran KS and Gabuzda D. 2006. A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection. *J Biol Chem*; **281**:17259-65.
- Melby T, Despirito M, Demasi R, Heilek-Snyder G, Greenberg ML and Graham N. 2006. HIV-1 coreceptor use in triple-class treatment-experienced patients: baseline prevalence, correlates, and relationship to enfuvirtide response. *J Infect Dis.*; **194**:238-46.
- Mercenne G, Bernacchi S, Richer D, Bec G, Henriët S, Paillart JC and Marquet R. 2010. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res.*; **38**:633-46.
- Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Kaiser H, Brack AR, Kandolf R and Kupper JH. 2004. Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. *Anal Biochem.*; **334**:9-19.

- Michaels FH, Hattori N, Gallo RC and Franchini G. 1993. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vif protein is located in the cytoplasm of infected cells and its effect on viral replication is equivalent in HIV-2. *AIDS Res Hum Retroviruses.*; **9**:1025-30.
- Miedema F, Meyaard L, Koot M, Klein MR, Roos MT, Groenink M, Fouchier RA, et al. 1994. Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol Rev*; **140**:35-72.
- Miller MD, Farnet CM and Bushman FD. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol.*; **71**:5382-90.
- Milstein O, Hagin D, Lask A, Reich-Zeliger S, Shezen E, Ophir E, Eidelstein Y, et al. 2011. CTLs respond with activation and granule secretion when serving as targets for T-cell recognition. *Blood.*; **117**:1042-52.
- Modrow S and Falke D. 1997. Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford.:391-406.
- Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F and Wolf H. 1987. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol.*; **61**:570-8.
- Monajemi M, Woodworth CF, Zipperlen K, Gallant M, Grant MD and Larijani M. 2014. Positioning of APOBEC3G/F mutational hotspots in the human immunodeficiency virus genome favors reduced recognition by CD8+ T cells. *PLoS One.*; **9**:e93428.
- Mous K, Jennes W, Camara M, Seydi M, Daneau G, Mboup S, Kestens L, et al. 2012. Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a Senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals. *PLoS One*; **7**:e33934.
- Moyle GJ, Wildfire A, Mandalia S, Mayer H, Goodrich J, Whitcomb J and Gazzard BG. 2005. Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *J Infect Dis.*; **191**:866-72.
- Muckenfuss H, Hamdorf M, Held U, Perkovic M, Lower J, Cichutek K, Flory E, et al. 2006. APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J Biol Chem.*; **281**:22161-72.
- Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA and Capon DJ. 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature.*; **313**:450-8.
- Muesing MA, Smith DH and Capon DJ. 1987. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell.*; **48**:691-701.
- Mulder LC, Harari A and Simon V. 2008. Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **105**:5501-6.
- Munk C, Jensen BE, Zielonka J, Haussinger D and Kamp C. 2012. Running loose or getting lost: how HIV-1 counters and capitalizes on APOBEC3-induced mutagenesis through its Vif protein. *Viruses.*; **4**:3132-61.

- Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO and Honjo T. 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem.*; **274**:18470-6.
- Nabatov AA, Masharsky AE, Verevochkin SV, Emelyanov AV and Kozlov AP. 2004a. Host-dependent serum specificity to the V3 domain of HIV-1. *Scand J Immunol.*; **60**:471-6.
- Nabatov AA, Pollakis G, Linnemann T, Kliphuis A, Chalaby MI and Paxton WA. 2004b. Intrapatient alterations in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V1V2 and V3 regions differentially modulate coreceptor usage, virus inhibition by CC/CXC chemokines, soluble CD4, and the b12 and 2G12 monoclonal antibodies. *J Virol.*; **78**:524-30.
- Neher RA and Leitner T. 2010. Recombination rate and selection strength in HIV intra-patient evolution. *PLoS Comput Biol.*; **6**:e1000660.
- Newman EN, Holmes RK, Craig HM, Klein KC, Lingappa JR, Malim MH and Sheehy AM. 2005. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol.*; **15**:166-70.
- O'Neil PK, Sun G, Yu H, Ron Y, Dougherty JP and Preston BD. 2002. Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis. *J Biol Chem.*; **277**:38053-61.
- Olshevsky U, Helseth E, Furman C, Li J, Haseltine W and Sodroski J. 1990. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J Virol.*; **64**:5701-7.
- Ott DE. 2008. Cellular proteins detected in HIV-1. *Rev Med Virol.*; **18**:159-75.
- Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, et al. 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.*; **338**:853-60.
- Palker TJ, Clark ME, Langlois AJ, Matthews TJ, Weinhold KJ, Randall RR, Bolognesi DP, et al. 1988. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **85**:1932-6.
- Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, Halvas EK, Bixby CJ, Bazmi H, Rock D, et al. 2005. Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J Clin Microbiol.*; **43**:406-13.
- Paprotka T, Venkatachari NJ, Chaipan C, Burdick R, Delviks-Frankenberry KA, Hu WS and Pathak VK. 2010. Inhibition of xenotropic murine leukemia virus-related virus by APOBEC3 proteins and antiviral drugs. *J Virol.*; **84**:5719-29.
- Peliska JA and Benkovic SJ. 1992. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science.*; **258**:1112-8.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM and Ho DD. 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.*; **271**:1582-6.

- Perez LG, O'Donnell MA and Stephens EB. 1992. The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *J Virol.*; **66**:4134-43.
- Peterlin BM and Trono D. 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol.*; **3**:97-107.
- Philpott S, Weiser B, Anastos K, Kitchen CM, Robison E, Meyer WA, 3rd, Sacks HS, et al. 2001. Preferential suppression of CXCR4-specific strains of HIV-1 by antiviral therapy. *J Clin Invest.*; **107**:431-8.
- Podlutzky A, Osterholm AM, Hou SM, Hofmaier A and Lambert B. 1998. Spectrum of point mutations in the coding region of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (hprt) gene in human T-lymphocytes in vivo. *Carcinogenesis.*; **19**:557-66.
- Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Meyer B, Muller H, Krausslich HG and Schreiber M. 2001. Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology.*; **11**:11-9.
- Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H and Schreiber M. 2002. The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology.*; **304**:70-80.
- Poon AF, Swenson LC, Bunnik EM, Edo-Matas D, Schuitemaker H, van 't Wout AB and Harrigan PR. 2012. Reconstructing the dynamics of HIV evolution within hosts from serial deep sequence data. *PLoS Comput Biol.*; **8**:e1002753.
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E and Gallo RC. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.*; **224**:497-500.
- Poropatich K and Sullivan DJ, Jr. 2011. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J Gen Virol.*; **92**:247-68.
- Pramanik L, Fried U, Clevestig P and Ehrnst A. 2011. Charged amino acid patterns of coreceptor use in the major subtypes of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol.*; **92**:1917-22.
- Preston BD, Poiesz BJ and Loeb LA. 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science.*; **242**:1168-71.
- Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, Sandres-Saune K, Cuzin L, et al. 2008. Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS.*; **22**:F11-6.
- Reddy K, Winkler CA, Werner L, Mlisana K, Abdool Karim SS and Ndung'u T. 2010. APOBEC3G expression is dysregulated in primary HIV-1 infection and polymorphic variants influence CD4+ T-cell counts and plasma viral load. *AIDS.*; **24**:195-204.
- Refsland EW, Stenglein MD, Shindo K, Albin JS, Brown WL and Harris RS. 2010. Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res.*; **38**:4274-84.

- Regner M, Pavlinovic L, Young N and Mullbacher A. 2011. In vivo elimination of MHC-I-deficient lymphocytes by activated natural killer cells is independent of granzymes A and B. *PLoS One*; **6**:e23252.
- Reuter S, Oette M, Sichtig N, Kaiser R, Balduin M, Jensen B and Haussinger D. 2011. Changes in the HIV-1 mutational profile before first-line HAART in the RESINA cohort. *J Med Virol.*; **83**:187-95.
- Rhee SS and Marsh JW. 1994. HIV-1 Nef activity in murine T cells. CD4 modulation and positive enhancement. *J Immunol.*; **152**:5128-34.
- Richman DD, Wrin T, Little SJ and Petropoulos CJ. 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **100**:4144-9.
- Roberts JD, Bebenek K and Kunkel TA. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science.*; **242**:1171-3.
- Rodrigo AG, Shpaer EG, Delwart EL, Iversen AK, Gallo MV, Brojatsch J, Hirsch MS, et al. 1999. Coalescent estimates of HIV-1 generation time in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **96**:2187-91.
- Rogozin IB, Basu MK, Jordan IK, Pavlov YI and Koonin EV. 2005. APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle.*; **4**:1281-5.
- Rolland M, Edlefsen PT, Larsen BB, Tovanabuttra S, Sanders-Buell E, Hertz T, deCamp AC, et al. 2012. Increased HIV-1 vaccine efficacy against viruses with genetic signatures in Env V2. *Nature.*; **490**:417-20.
- Roos MT, Miedema F, Koot M, Tersmette M, Schaasberg WP, Coutinho RA and Schellekens PT. 1995. T cell function in vitro is an independent progression marker for AIDS in human immunodeficiency virus-infected asymptomatic subjects. *J Infect Dis*; **171**:531-6.
- Rose JD, Rhea AM, Weber J and Quinones-Mateu ME. 2009. Current tests to evaluate HIV-1 coreceptor tropism. *Curr Opin HIV AIDS.*; **4**:136-42.
- Rosen CA and Pavlakis GN. 1990. Tat and Rev: positive regulators of HIV gene expression. *AIDS.*; **4**:A51.
- Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, Robbins GK, et al. 2000. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature.*; **407**:523-6.
- Rozera G, Abbate I, Giombini E, Castagna A, De Luca A, Ceccherini-Silberstein F, Cozzi Lepri A, et al. 2014. Evolution of HIV-1 tropism at quasispecies level after 5 years of combination antiretroviral therapy in patients always suppressed or experiencing episodes of virological failure. *J Antimicrob Chemother*; **69**:3085-94.
- Russell RA, Moore MD, Hu WS and Pathak VK. 2009a. APOBEC3G induces a hypermutation gradient: purifying selection at multiple steps during HIV-1 replication results in levels of G-to-A mutations that are high in DNA, intermediate in cellular viral RNA, and low in virion RNA. *Retrovirology.*; **6**:6-16.

- Russell RA, Smith J, Barr R, Bhattacharyya D and Pathak VK. 2009b. Distinct domains within APOBEC3G and APOBEC3F interact with separate regions of human immunodeficiency virus type 1 Vif. *J Virol.*; **83**:1992-2003.
- Russell RA, Wiegand HL, Moore MD, Schafer A, McClure MO and Cullen BR. 2005. Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol.*; **79**:8724-31.
- Salemi M, Burkhardt BR, Gray RR, Ghaffari G, Sleasman JW and Goodenow MM. 2007. Phylodynamics of HIV-1 in lymphoid and non-lymphoid tissues reveals a central role for the thymus in emergence of CXCR4-using quasispecies. *PLoS One.*; **2**:e950.
- Saliou A, Delobel P, Dubois M, Nicot F, Raymond S, Calvez V, Masquelier B, et al. 2011. Concordance between two phenotypic assays and ultradeep pyrosequencing for determining HIV-1 tropism. *Antimicrob Agents Chemother.*; **55**:2831-6. doi: 10.1128/AAC.00091-11. Epub 2011 Apr 4.
- Samson M, Edinger AL, Stordeur P, Rucker J, Verhasselt V, Sharron M, Govaerts C, et al. 1998. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol*; **28**:1689-700.
- Sasada A, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Kobayashi M, Abudu A, Hishizawa M, Imada K, et al. 2005. APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology.*; **2**:32.
- Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohmichi M, Ito M, et al. 2010. Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J Virol.*; **84**:9546-56.
- Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, Fredriksson R, Colognesi C, Deng HK, Malnati MS, et al. 1997. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med*; **3**:1259-65.
- Schlecht HP, Schellhorn S, Dezube BJ and Jacobson JM. 2008. New approaches in the treatment of HIV/AIDS - focus on maraviroc and other CCR5 antagonists. *Ther Clin Risk Manag.*; **4**:473-85.
- Schneweis KE, Kleim JP, Bailly E, Niese D, Wagner N and Brackmann HH. 1990. Graded cytopathogenicity of the human immunodeficiency virus (HIV) in the course of HIV infection. *Med Microbiol Immunol*; **179**:193-203.
- Schreiber M, Wachsmuth C, Muller H, Hagen C, Schmitz H and van Lunzen J. 1996. Loss of antibody reactivity directed against the V3 domain of certain human immunodeficiency virus type 1 variants during disease progression. *J Gen Virol.*; **77**:2403-14.
- Schrofelbauer B, Chen D and Landau NR. 2004. A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc Natl Acad Sci U S A*; **101**:3927-32.
- Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, et al. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytopathogenic to T-cell-tropic virus population. *J Virol*; **66**:1354-60.

- Schulze T, Nawrath M and Moelling K. 1991. Cleavage of the HIV-1 p66 reverse transcriptase/RNase H by the p9 protease in vitro generates active p15 RNase H. *Arch Virol*; **118**:179-88.
- Schumacher AJ, Hache G, Macduff DA, Brown WL and Harris RS. 2008. The DNA deaminase activity of human APOBEC3G is required for Ty1, MusD, and human immunodeficiency virus type 1 restriction. *J Virol.*; **82**:2652-60.
- Schuurman R, Demeter L, Reichelderfer P, Tijnagel J, de Groot T and Boucher C. 1999. Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Clin Microbiol.*; **37**:2291-6.
- Scott J, Wallis SC, Pease RJ, Knott TJ and Powell L. 1988. Apolipoprotein B: a novel mechanism for deriving two proteins from one gene. *Agents Actions Suppl*; **26**:27-51.
- Sede MM, Moretti FA, Laufer NL, Jones LR and Quarleri JF. 2014. HIV-1 tropism dynamics and phylogenetic analysis from longitudinal ultra-deep sequencing data of CCR5- and CXCR4-using variants. *PLoS One.*; **9**:e102857.
- Sena-Esteves M, Saeki Y, Camp SM, Chiocca EA and Breakefield XO. 1999. Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons. *J Virol.*; **73**:10426-39.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD and Malim MH. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.*; **418**:646-50.
- Sheehy AM, Gaddis NC and Malim MH. 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med*; **9**:1404-7.
- Shindo K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Abudu A, Fukunaga K and Uchiyama T. 2003. The enzymatic activity of CEM15/Apobec-3G is essential for the regulation of the infectivity of HIV-1 virion but not a sole determinant of its antiviral activity. *J Biol Chem.*; **278**:44412-6.
- Sierra S, Kaiser R, Thielen A and Lengauer T. 2007. Genotypic coreceptor analysis. *Eur J Med Res.*; **12**:453-62.
- Sierra S, Kupfer B and Kaiser R. 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol.*; **34**:233-44. .
- Simmons G, Reeves JD, McKnight A, Dejucq N, Hibbitts S, Power CA, Aarons E, et al. 1998. CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *J Virol.*; **72**:8453-7.
- Simon JH, Miller DL, Fouchier RA and Malim MH. 1998. Virion incorporation of human immunodeficiency virus type-1 Vif is determined by intracellular expression level and may not be necessary for function. *Virology.*; **248**:182-7.
- Simon V, Padte N, Murray D, Vanderhoeven J, Wrin T, Parkin N, Di Mascio M, et al. 2003. Infectivity and replication capacity of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants isolated during primary infection. *J Virol.*; **77**:7736-45.
- Simon V, Zennou V, Murray D, Huang Y, Ho DD and Bieniasz PD. 2005. Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/3F and a potential role in HIV-1 diversification. *PLoS Pathog.*; **1**:e6.

- Siu KK, Sultana A, Azimi FC and Lee JE. 2013. Structural determinants of HIV-1 Vif susceptibility and DNA binding in APOBEC3F. *Nat Commun*; **4**:2593.
- Smith SD, Trueworthy RC, Klopovich PM, Vats TS and Snodgrass W. 1984. Management of children with isolated testicular leukemia. *Cancer*; **54**:2854-8.
- Song C, Sutton L, Johnson ME, D'Aquila RT and Donahue JP. 2012. Signals in APOBEC3F N-terminal and C-terminal deaminase domains each contribute to encapsidation in HIV-1 virions and are both required for HIV-1 restriction. *J Biol Chem*; **287**:16965-74.
- Soros VB, Yonemoto W and Greene WC. 2007. Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog*; **3**:e15.
- Sova P and Volsky DJ. 1993. Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*; **67**:6322-6.
- Srinivasan A, York D, Jannoun-Nasr R, Kalyanaraman S, Swan D, Benson J, Bohan C, et al. 1989. Generation of hybrid human immunodeficiency virus by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **86**:6388-92.
- Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, et al. 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell*; **45**:637-48.
- Stenglein MD, Matsuo H and Harris RS. 2008. Two regions within the amino-terminal half of APOBEC3G cooperate to determine cytoplasmic localization. *J Virol*; **82**:9591-9.
- Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W and Greene WC. 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell*; **12**:591-601.
- Stopak KS, Chiu YL, Kropp J, Grant RM and Greene WC. 2007. Distinct patterns of cytokine regulation of APOBEC3G expression and activity in primary lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Biol Chem*; **282**:3539-46.
- Suen W, Spiro TG, Sowers LC and Fresco JR. 1999. Identification by UV resonance Raman spectroscopy of an imino tautomer of 5-hydroxy-2'-deoxycytidine, a powerful base analog transition mutagen with a much higher unfavored tautomer frequency than that of the natural residue 2'-deoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96**:4500-5.
- Suspene R, Rusniok C, Vartanian JP and Wain-Hobson S. 2006. Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. *Nucleic Acids Res*; **34**:4677-84.
- Suspene R, Sommer P, Henry M, Ferris S, Guetard D, Pochet S, Chester A, et al. 2004. APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res*; **32**:2421-9.
- Teng B, Burant CF and Davidson NO. 1993. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science*; **260**:1816-9.

- Thali M, Moore JP, Furman C, Charles M, Ho DD, Robinson J and Sodroski J. 1993. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol.*; **67**:3978-88.
- Thielen A and Lengauer T. 2012. Geno2pheno[454]: a Web server for the prediction of HIV-1 coreceptor usage from next-generation sequencing data. *Intervirology*; **55**:113-7. doi: 10.1159/000332002. Epub 2012 Jan 24.
- Thielen BK, Klein KC, Walker LW, Rieck M, Buckner JH, Tomblinson GW and Lingappa JR. 2007. T cells contain an RNase-insensitive inhibitor of APOBEC3G deaminase activity. *PLoS Pathog.*; **3**:1320-34.
- Tsuchiya K, Ode H, Hayashida T, Kakizawa J, Sato H, Oka S and Gatanaga H. 2013. Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region confer CXCR4-tropism. *Sci Rep*; **3**:2389.
- van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, Albrecht-van Lent N, Scherpbier HJ, Veenstra J, Boer K, et al. 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J Clin Invest.*; **94**:2060-7.
- Vandekerckhove LP, Wensing AM, Kaiser R, Brun-Vezinet F, Clotet B, De Luca A, Dressler S, et al. 2011. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect Dis.*; **11**:394-407.
- Vartanian JP, Plikat U, Henry M, Mahieux R, Guillemot L, Meyerhans A and Wain-Hobson S. 1997. HIV genetic variation is directed and restricted by DNA precursor availability. *J Mol Biol.*; **270**:139-51.
- Vazquez-Perez JA, Ormsby CE, Hernandez-Juan R, Torres KJ and Reyes-Teran G. 2009. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology.*; **6**:23.
- Villegas P. 1998. Titration of biological suspensions. In *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by Swayne, D. E., Glisson, J. R., Jackwood, M. W., Pearson, J. E. & Reed, W. M.; Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists.*; **4th edn**:248-54.
- von Schwedler U, Song J, Aiken C and Trono D. 1993. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol.*; **67**:4945-55.
- Vonica A, Rosa A, Arduini BL and Brivanlou AH. 2011. APOBEC2, a selective inhibitor of TGFbeta signaling, regulates left-right axis specification during early embryogenesis. *Dev Biol.*; **350**:13-23.
- Wahl SM and Orenstein JM. 1997. Immune stimulation and HIV-1 viral replication. *J Leukoc Biol.*; **62**:67-71.
- Wang X, Dolan PT, Dang Y and Zheng YH. 2007. Biochemical differentiation of APOBEC3F and APOBEC3G proteins associated with HIV-1 life cycle. *J Biol Chem.*; **282**:1585-94.
- Weber J. 2001. The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br Med Bull*; **58**:61-72.

- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, et al. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature.*; **422**:307-12.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emimi EA, Deutsch P, Lifson JD, et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.*; **373**:117-22.
- Weissenhorn W, Wharton SA, Calder LJ, Earl PL, Moss B, Aliprandis E, Skehel JJ, et al. 1996. The ectodomain of HIV-1 env subunit gp41 forms a soluble, alpha-helical, rod-like oligomer in the absence of gp120 and the N-terminal fusion peptide. *EMBO J.*; **15**:1507-14.
- Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, James IT, Jenkins TM, et al. 2006. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol.*; **80**:4909-20.
- Whitcomb JM and Hughes SH. 1992. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annu Rev Cell Biol*; **8**:275-306.
- Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP and Cullen BR. 2004. A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J.*; **23**:2451-8.
- Wilkin TJ, Su Z, Kuritzkes DR, Hughes M, Flexner C, Gross R, Coakley E, et al. 2007. HIV type 1 chemokine coreceptor use among antiretroviral-experienced patients screened for a clinical trial of a CCR5 inhibitor: AIDS Clinical Trial Group A5211. *Clin Infect Dis.*; **44**:591-5.
- Wissing S, Montano M, Garcia-Perez JL, Moran JV and Greene WC. 2011. Endogenous APOBEC3B restricts LINE-1 retrotransposition in transformed cells and human embryonic stem cells. *J Biol Chem.*; **286**:36427-37.
- Wood N, Bhattacharya T, Keele BF, Giorgi E, Liu M, Gaschen B, Daniels M, et al. 2009. HIV evolution in early infection: selection pressures, patterns of insertion and deletion, and the impact of APOBEC. *PLoS Pathog.*; **5**:e1000414. doi: 10.1371/journal.ppat.. Epub 2009 May 8.
- Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, et al. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature.*; **384**:179-83.
- Wu Y. 2004. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology.*; **1**:13.
- Wurtzer S, Goubard A, Mammano F, Saragosti S, Lecossier D, Hance AJ and Clavel F. 2006. Functional central polypurine tract provides downstream protection of the human immunodeficiency virus type 1 genome from editing by APOBEC3G and APOBEC3B. *J Virol.*; **80**:3679-83.
- Xiao L, Owen SM, Goldman I, Lal AA, deJong JJ, Goudsmit J and Lal RB. 1998. CCR5 coreceptor usage of non-syncytium-inducing primary HIV-1 is independent of phylogenetically distinct global HIV-1 isolates: delineation of consensus motif in the V3 domain that predicts CCR-5 usage. *Virology*; **240**:83-92.

- Xu S, Huang X, Xu H and Zhang C. 2007. Improved prediction of coreceptor usage and phenotype of HIV-1 based on combined features of V3 loop sequence using random forest. *J Microbiol*; **45**:441-6.
- Yang H, Wang J, Jia X, McNatt MW, Zang T, Pan B, Meng W, et al. 2010. Structural insight into the mechanisms of enveloped virus tethering by tetherin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **107**:18428-32.
- Yang Y, Guo F, Cen S and Kleiman L. 2007. Inhibition of initiation of reverse transcription in HIV-1 by human APOBEC3F. *Virology*; **365**:92-100.
- Yebra G and Holguin A. 2011. Mutation Vif-22H, which allows HIV-1 to use the APOBEC3G hypermutation to develop resistance, could appear more quickly in certain non-B variants. *J Antimicrob Chemother*; **66**:941-2.
- Youle M. 2007. Overview of boosted protease inhibitors in treatment-experienced HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*; **60**:1195-205.
- Yu Q, Konig R, Pillai S, Chiles K, Kearney M, Palmer S, Richman D, et al. 2004a. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol*; **11**:435-42.
- Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P and Yu XF. 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*; **302**:1056-60.
- Yu Y, Xiao Z, Ehrlich ES, Yu X and Yu XF. 2004b. Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev*; **18**:2867-72.
- Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC and Gao L. 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*; **424**:94-8.
- Zhang W, Chen G, Niewiadomska AM, Xu R and Yu XF. 2008. Distinct determinants in HIV-1 Vif and human APOBEC3 proteins are required for the suppression of diverse host antiviral proteins. *PLoS One*; **3**:e3963.
- Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA and Ho DD. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science*; **261**:1179-81.

6 Zusammenfassung

Bei der Infektion von Zielzellen bindet HIV außer an CD4 auch die Korezeptoren CCR5 oder CXCR4, weshalb die Viren in CCR5- (R5) und CXCR4-trope Viren (X4) eingeteilt werden. Während CCR5-trope Viruspopulationen in frühen Stadien der Infektion dominieren, können diese später von CXCR4-tropen Varianten verdrängt werden. Die genauen Mechanismen, die zum Entstehen von X4-Viren führen, sind bislang noch ungeklärt. Infizierte Zellen exprimieren eine Vielzahl von Restriktionsfaktoren, um die Replikation von Viren zu verhindern. Die zellulären Restriktionsfaktoren APOBEC3G und APOBEC3F besitzen eine Cytidin-Deaminase-Aktivität, durch die G-zu-A Mutationen im proviralen HIV-Genom während der Reversen Transkription entstehen. Bei uneingeschränkter Aktivität führt APOBEC zu einer letalen Hypermuation des viralen Genoms. HIV schützt sich vor der antiviralen Aktivität APOBECs durch das akzessorische Protein Vif. Als Gegenspieler von APOBEC ist Vif in der Lage, dessen Aktivität durch Induktion der 26S proteasomalen Degradation zu neutralisieren. Schwache APOBEC-Aktivitäten, wie sie bei Vif-defizienten Varianten entstehen können, erhöhen die Variabilität von HIV. In dieser Arbeit wurde der mutagene Einfluss APOBECs und die modulierende Wirkung von Vif in seiner Auswirkung auf den Tropismus von HIV untersucht. Sequenzen von HIV mit definiertem Tropismus wurden zunächst auf APOBEC-spezifische Sequenzunterschiede hin analysiert. Die Analyse von 1553 V3-Sequenzen, der Tropismus-determinierenden Region, zeigte eine höhere Anzahl von APOBEC-Motiven in R5- als in X4-Sequenzen. Zusätzlich konnten, vorwiegend an Korezeptor-relevanten Positionen, Unterschiede in den kodierenden Triplets der R5- und X4-Viren detektiert werden, die auf APOBEC-induzierte G-zu-A Mutationen zurückgeführt werden können. Ein Vergleich der Nukleotid-Substitutionen zwischen R5- und X4-Sequenzen zeigte die G-zu-A Substitution als häufigste Nukleotid-Substitution an. Auch in den longitudinalen Sequenzdaten konnte ein beginnender Tropismuswechsel von R5 zu X4 mit der Zunahme der G-zu-A Mutationen in APOBEC-Erkennungsmotiven in Verbindung gebracht werden. Diese Daten unterstützen die Hypothese einer Beteiligung der APOBEC-Proteine A3G und A3F als mutationsfördernde Faktoren bei der Entstehung von X4-Varianten und somit am Korezeptorswitch.

Diese Hypothese wurde anhand von zwei Zellkultursystemen überprüft. Dazu wurden Tet-induzierbare A3F- bzw. A3G-Expressionssysteme generiert, die die unabhängige Analyse des mutagenen Einflusses von A3G bzw. A3F auf verschiedene HIV-Vif-Varianten ermöglichten. Durch die Verwendung von PBMC-Kulturen mit unterschiedlichen endogenen APOBEC-Konzentrationen konnte die additive Wirkung von A3G und A3F auf HIV analysiert werden. In beiden Systemen wurde die Replikation des Vif-kompetenten Wildtyps nicht beeinflusst. Die Replikation der Vif-defizienten Varianten wurde dagegen, in Abhängigkeit von der APOBEC-

Menge und der Neutralisationsfähigkeit von Vif unterschiedlich stark inhibiert. Mittels hochauflösender Sequenzanalyse (next generation sequencing) des V3-Bereichs konnten Unterschiede in den G-zu-A Mutationsfrequenzen der nachfolgenden Virusgenerationen beobachtet und mit den APOBEC-Aktivitäten assoziiert werden. In beiden Zellkultursystemen offenbarten Tropismus-Vorhersagesysteme eine Zunahme an X4-Varianten in den stärker Vif-defizienten Viruspopulationen. Dieser Anstieg der X4-Varianten konnte mit einer Zunahme der G-zu-A Mutationsfrequenz im A3F-Motiv an Position 25 assoziiert werden. Basierend auf den G-zu-A Mutationshäufigkeiten pro APOBEC-Motiv wurden Mutationsraten ermittelt, die einen Vif-abhängigen Anstieg zeigten und somit die APOBEC-Vif-Interaktionen widerspiegeln. Ein Vergleich der Mutationsraten nach APOBEC-Motiv und HIV-Region bestätigte die höhere mutagene Aktivität von A3G gegenüber A3F ebenso wie die Auswirkung der APOBEC-Expositionsdauer während der Reversen Transkription. *Nef* ist während der reversen Transkription der mutagenen APOBEC-Aktivität länger ausgesetzt als *env* und zeigt auch eine höhere Mutationsrate als *env*. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit durch kontrollierte APOBEC-Vif-Interaktionen der mutagene Einfluss der APOBEC-Proteine auf HIV gezeigt und als möglicher Mechanismus für die Entstehung CXCR4-troper HI-Virusvarianten identifiziert werden.

7 Abstract

HIV infects its target cells by binding to CD4 and either CCR5 or CXCR4 as coreceptors. Accordingly, two classes of virus have been defined on the basis of their coreceptor preference, CCR5-tropic (R5) and CXCR4-tropic (X4) viruses. While R5 tropic viruses dominate at early stages of infection, they are outgrown by X4 viruses during later stages. The molecular mechanisms leading to the emergence of X4-viruses are not understood so far. Infected cells express a number of restriction factors to control viral replication. The cellular restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F carry cytidine deaminase activity resulting in G to A transitions in newly generated proviral DNA. Unrestricted APOBEC activity leads to a lethal hypermutation of the viral genomes. The HIV accessory protein Vif counteracts the antiviral activity of APOBEC by mediating its degradation in the 26S proteasome. Restricted APOBEC activities, as induced by Vif variants can increase HIV variability. In this study, the mutagenic impact of APOBEC and the modulating effect of Vif on the tropism of HIV was examined. Previously established sequences from viruses with known tropism were analysed at first with respect to APOBEC-specific differences. The analysis of 1553 sequences corresponding to the V3 region, the main determinant of tropism, revealed a higher number of APOBEC motifs in R5 versus X4 sequences. Additionally, we found differences in the coding triplets between R5 and X4 viruses at coreceptor relevant positions, which could be attributed to APOBEC-induced mutations. A comparison of the nucleotide substitutions between R5 and X4 sequences identified G-to-A substitutions as the most common substitutions. In the longitudinal sequence data, G-to-A mutations at APOBEC recognition motifs could be associated with the onset of tropism switch confirming the findings of the cross-sectional data. Taken together, these results support the hypothesis that A3G and A3F are involved in the coreceptor switch by promoting the emergence of X4 variants during the course of infection. This hypothesis was then tested experimentally in two cell culture systems. For this purpose, Tet-inducible cell culture systems expressing A3F and A3G, respectively, were generated. Upon infection with various HIV Vif variants, A3G- or A3F-induced mutation patterns in the V3 region of the newly produced virus generation could be analysed precisely. In contrast, PBMC cultures with different endogenous APOBEC levels enabled the analysis of the additive effect of A3G and A3F on HIV. While replication of the Vif-competent wild-type virus was not altered in both systems, the replication of Vif-deficient variants was inhibited depending on the APOBEC expression level and the neutralization activity of Vif. Using high-resolution sequence analysis (next generation sequencing) of the V3 region, differences in the G-to-A mutation frequencies of the subsequent virus population could be observed and associated with the APOBEC activities depending on Vif-deficiency. In both cell culture systems, an increase of X4

variants in the more Vif-deficient virus populations was calculated via coreceptor prediction tools. The X4-increment may be ascribed to the frequent G-to-A mutations in the A3F motif at position 25. Mutation rates calculated by the G-to-A mutation frequencies per motif increase in a Vif-dependent manner and reflected the effects of the APOBEC-Vif interaction in PBMC-virus cultures. Mutation rates analysed with respect to APOBEC motif and HIV region confirmed the higher mutagenic activity of A3G versus A3F as well as the impact of APOBEC-exposure during reverse transcription. This was evident by a higher mutation rate in *nef* compared to the *env* region, as *nef* is exposed longer to APOBEC activity during reverse transcription. In summary, defined APOBEC-Vif interaction shows the mutagenic effect of APOBEC proteins on HIV and reveals APOBEC-mediated G-to-A mutation as a possible mechanism for the emergence of CXCR4-tropic HIV variants.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
A3F	APOBEC3F
A3G	APOBEC3G
aa	"amino acid", Aminosäure
Abb.	Abbildung
AID	"activation induced deaminase"
AIDS	"acquired immunodeficiency syndrome“, Erworbenes Immundefizienz-Syndrom
APC	Allophycocyanin
APOBEC	"apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide(-like)"
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
ca.	circa
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD	"cluster of differentiation"
cDNA	"complementary DNA", komplementäre DNA
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4,
d	"days", Tage
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DC	dendritische Zelle
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	"et alii", und andere
F	"forward"
FACS	"fluorescence activated cell sorting"
FBS	"Fetal Bovine Serum", fetales Kälberserum
G	Guanosin
g	Erdschwerebeschleunigung
h	"hour", Stunde(n)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRP	"horseradish peroxidase", Meerrettichperoxidase

HTLV	humanes T-lymphotropes Virus
IgG	Immunglobulin G, Gammaglobulin
kb	Kilobasenpaar(e)
lat.	lateinisch
LB	Luria-Bertani
log	dekadischer Logarithmus
LTR	"long terminal repeat"
M	mol/L
m	Milli, 10^{-3}
min	Minute
MuV	Mumps-Virus
n	Nano, 10^{-9}
N-Terminus	Amino-Terminus
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	"open reading frame", offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	"Phosphate Buffered Saline", Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
R	"reverse"
R5	CCR5
RAM	Resistenz-assoziierte Mutation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	"rounds per minute", Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Reverse Transkriptase
SDS	"sodium dodecyl sulfate", Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SIV	"simian immunodeficiency virus", Affen-Immundefizienz-Virus
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	TATA-box Binding Protein
TBS	"Tris Buffered Saline", Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tetR	Tetrazyklinrepressor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	"Unit", Einheit der Enzymaktivität
ÜN	über Nacht, 16 Stunden
UNAIDS	"Joint United Nations Programme on HIV/AIDS", Gemeinsames Programm der Vereinten Nationen zu HIV/AIDS
UPL	Universal probe library
v	Volumen

vgl.	vergleiche
VSV	vesikuläres Stomatitis Virus
w	"weight", Gewicht
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X4	CXCR4
XMRV	Humanes exogenes Gammaretrovirus
z. B.	zum Beispiel
μ	Mikro, 10 ⁻⁶

Internationale Abkürzungen für Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparaginsäure	Asp	D	Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

9 Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth und Herrn Prof. Dr. Einhard Schierenberg danke ich für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln zu vertreten.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H. Pfister bedanke ich mich für die Betreuung dieser Promotion und die hilfreichen und anregenden Diskussionen, die das Vollenden dieser Arbeit ermöglichten.

Besonders herzlich möchte ich Herrn Dr. Rolf Kaiser danken, für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, die fachlichen Diskussionen, seine hilfreichen Ratschläge, sein Zu-einem-stehen und vor allem sein soziales Bewußtsein.

Dank möchte ich all meinen derzeitigen und ehemaligen Laborkollegen aussprechen, die durch wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft für eine schöne, lustige, aufregende gemeinsame Zeit sorgten: Veronica Di Cristanziano, Melanie Balduin, Dörte Hammerschmidt, Ramona Gilles, Elena Knops, Nadine Lübke, Claudia Müller, Maria Neumann-Fraune, Saleta Sierra-Aragon, Anna Sikorski, Eugen Schülter, Finja Schweitzer und Steffi Taute.

Nadine, dir ein extra riesen Dankeschön für die mühevollen, nicht endenwollende Arbeit des Korrekturlesens und Entwirrens meiner maßlos überfüllten und manchmal auch sinnfreien Satzgefüge.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für die herzliche Atmosphäre und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft, besonders Martin Hufbauer, Christine Herwartz, Baki Akgül, Thomas Müller, Steffi Silling, Gerti Steger, Martins Ichue, Dirk Wessler und den Mädels aus der Sero und PCR.

Ein großes Dankeschön sende ich nach Kaiserslautern an Martin Däumer und besonders an Alex Thielen, der vor allem die Auswertung der NGS-Daten durch seine stete Hilfsbereitschaft in allen statistischen Fragestellungen zum Gelingen führte.

Hauke, auch an dich ein dickes Danke, für ausschweifende und nicht endende Diskussionen, spontane Einfälle und dafür, dass ich dich immer einfach anrufen kann, wenn's mal nicht weitergeht.

Lieben Dank an meine Freundinnen Sibylle, Christel, Doro für ihre Unterstützung, bestärkende, aufmunternde Worte und ablenkende Zockabende ;-) - ebenfalls an Alex, Kerstin und noch ganz viele andere Menschen für spontanes Kinder-Wegorganisieren und Rücksichtnahme vor allem in der letzten Phase.

Meiner Mama, meinem Papa und meinen beiden Geschwistern und der ganzen Familie möchte ich ganz besonders herzlich für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung und Bestätigung über die vielen Jahre bedanken, ohne die diese Arbeit so viel schwerer gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Peter und meinen beiden Söhnen William und Lennart, die in all der Zeit keine Sinnlosigkeit aufkommen ließen, immer zu mir stehen und mich mit ihrer Liebe tragen.

10 Erklärung

"Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von der unten angegebenen Teilpublikation – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth betreut worden."

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Heger E, Thielen A, Gilles R, Obermeier M, Lengauer T, Kaiser R and Trapp S. 2012 **APOBEC3G/F as one possible driving force for co-receptor switch of the human immunodeficiency virus-1.** *Med Microbiol Immunol.*; **201**:7-16.

Köln, den 1. Dezember 2014

_____ (Eva Heger)