

Virologie Bachelor- und Master-Kurs 2013

HIV-1

Lehrbuch von Studenten für Studenten



HIV-1 Lehrbuch von Studenten für Studenten

Virologie Bachelor- und Master-Kurs WS2013, Leiter: Dr. J. Bodem, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg, 2013

-[online] eISBN: 978-3-923959-90-7
URN: urn:nbn:de:bvb:20-opus-78980

Dieses Dokument wird bereitgestellt durch den Online-Publikationsservice der Universität Würzburg. <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/volltexte/2013/7898/>

Herausgeber: Dr. Jochen Bodem, Institut für Virologie und Immunbiologie, Versbacher Str. 7, 97080 Würzburg, Email: Jochen.Bodem@vim.uni-wuerzburg.de

Die einzelnen Autoren sind selbst verantwortlich für ihr Kapitel.

Umschlagfoto: Fabian Gauch Kuchen: Christian Schenk



An diesem Buch haben mitgewirkt:

Stefanie Bock, Fabian Gauch,
Yannick Giernat, Frank Hille-
brand, Darja Kozlova, Lisa
Linck, Rebecca Moschall, Mar-
kus Sauer, Christian Schenk,
Kristina Ulrich und Jochen
Bodem

Vorwort

Die HIV-Replikation in 9 Kapitel

Am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg haben wir in den letzten Jahren ein sehr anspruchsvolles Modulsystem für das Fach Virologie im Bereich der Biologie Bachelor- und Master-Ausbildung entwickelt.

Dieses Buch ist entstanden als Versuch die Lehre für Bachelor- und Masterstudenten zu verbessern. Mir war ein vermehrtes auf „Kurzzeitgedächtnis“-lernen seit der Einführung der Bachelor- und Master-Abschlüsse aufgefallen, denn all die Vorlesungs- und Seminarstunden waren von wenig anhaltendem Lernerfolg begleitet. Im ersten Schritt hatte ich deshalb versucht auch die Lehre für die Biologiestudenten problemorientiert zu gestalten. Dies hatte zwar eine größere Motivation zur Folge - jedoch blieb ein lange anhaltender Lernerfolg trotzdem aus.

Dieses Buch stellt nun einen neuen Versuch dar, anhaltendes Wissen zu vermitteln und dabei die Begeisterung der Studenten für das Fach Virologie zu wecken. Jeder Student hatte hier die Aufgabe einen Abschnitt des HIV-Replikationszykluses darzustellen. Dabei sollte das Niveau der Beiträge an den Stand der Forschung heran führen und gleichzeitig verständlich dargestellt sein. Im ersten Schritt hat jeder Teilnehmer seine Stoffsammlung den anderen Studenten vorgestellt. Danach wurde gemeinsam eine Ausrichtung des Kapitels beschlossen. Diese Auswahl wurde von den beteiligten Studenten selbst getroffen, so dass dieses Buch als ein wirklich gemeinsames studentisches Werk gesehen werden kann. Jedes Kapitel wurde von einem Studenten geschrieben, so dass jedes Kapitel auch seinen eigenen Schreibstil hat. Die Kapitel wurden anschließend auf sachliche Fehler geprüft. Ich denke, dass vorliegende Ergebnis spricht für sich und die Autoren.

Leider sind drei Studenten vorzeitig aus dem Projekt ausgeschieden. Dies hinterließ Lücken, die wir nicht so leicht schließen konnten. Wir möchten uns deshalb besonders bei Rebecca Moschall und Frank Hillebrand bedanken, die den Text für ein Kapitel zur Verfügung gestellt haben, obwohl sie nicht am Projekt beteiligt waren.

Die Autoren dieses Buches würden sich wünschen, dass sich mehr Gruppen finden, um Lehrbücher selbst zu erstellen und kostenlos zur Verfügung zu stellen. Auch freuen wir uns über Textkorrekturen und Ergänzungen, die das Buch besser und übersichtlicher machen.

Ich möchte mich bei allen beteiligten Studenten bedanken und hoffe, dass es auch ihnen Spaß gemacht hat an diesem Buch mitzuwirken.

Würzburg 2013,

Jochen Bodem

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Pathogenese & Epidemiologie	8	Kapitel 2: Bindung an die Zelle und Viruseintritt	31
Pathogenese	10	Einleitung	32
Einleitung	10	Pathophysiologie der Infektion	32
Das HI-Virion	10	Immunzellen	33
Übertragung & Infektion	11	Zellrezeptoren	34
Verlauf der Infektion	11	HIV-1-Tropismus	35
Der HIV-Patient – Ein Überblick	12	Virale Eintrittskomponenten	35
Mutter-Kind-Transmission	12	Eintritt in die Zelle	36
HIV-Diagnostik	13	Rolle der Dendritischen Zellen in der HIV-1-Infektion	36
AIDS: Opportunistische Infektionen	13	HIV-1 und Makrophagen	37
Bakteriell verursachte opp. Infekt.	14	Makropinocytose	38
Virale opportunistische Infektionen	16	Fragen	39
Von Parasiten verursachte opp. Infekt.	19	Antworten	39
Von Pilzen verursachte opp. Infekt.	20	Klausurfragen	40
Entwicklung der HIV-1 Pathogenität	21	Literatur	40
Epidemiologie	22	Kapitel 3: Uncoating, reverse Transkription und Integration	42
Der Ursprung von HIV-1 im Kurzüberblick	22	Einleitung	43
HIV-/AIDS-Epidemie in Deutschland im Jahr 2011	23	Uncoating	43
Gruppe der heterosexuellen Neuinfektionen	24	Die Reverse Transkriptase	44
Gruppe der homosexuellen Neuinfektionen	24	Ablauf der reversen Transkription	44
Gruppe der Neuinfektionen infolge von intravenösem Drogenkonsum	24	tRNA ^{Lys3} als Primer der reversen Transkription	45
Gruppe der Neuinfektionen infolge von Mutter-Kind-Transmissionen	24	Struktur und Funktion der Domänen der reversen Transkriptase	46
Gruppe der Neuinfektionen mit unbekanntem Infektionsweg	25	Zelluläre regulatorische Faktoren der reversen Transkription	47
HIV-/AIDS-Epidemie global im Jahr 2011	25	Reverse Transkription als antivirales Target	47
Die Zahlen zur globalen Epidemie	25	Import in den Zellkern	48
Ziele der UNAIDS bis 2015	26	Der zellulärer Kernimport	49
Mögliche Realisierung der Ziele der UNAIDS	26		
Literatur	27		

Integration in das Wirtsgenom	49	Alternatives Spleißen	72
Struktur der Integrase	49	Intrinsische Stärke der Spleißstellen	72
Ablauf des Integrationsprozesses	50	SR-Proteine	73
LEDGF als regulatorischer Faktor bei der Integration in mitotische Zellen	50	hnRNP-Proteine	75
Inhibition der Autointegration	51	Mechanismen der SR- und hRNP-Protein vermittelten Spleißregulation	76
Fragen	51	Alternatives Spleißen bei HIV	76
Antworten	52	Die 2-kb Klasse der HIV-1 mRNAs	77
Klausurfragen	52	Die 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs	78
Literatur	53	Die 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs	79
Kapitel 4: Transkription	55	Polyadenylierung	80
Einleitung	56	Zelluläre Polyadenylierung	80
Aufbau und Funktion des LTR-Promotors	56	Retrovirale Polyadenylierung	81
RNA-Polymeres II und zelluläre Transkriptionsinitiation	57	RNA-Export	82
Elongation des HIV-Provirus	58	Grundlagen des RNA Exports	82
Struktur und Interaktion von Tat und TAR	59	Tap/NXF1-abhängiger mRNA Export	82
Rekrutierung von P-TEFb durch Tat	60	RNA Export durch das Exportin Crm1	84
Das 7SK-sRnNP: ein zellulärer Vorratsspeicher für P-TEFb	61	Crm1-vermittelter Export von U snRNAs	84
Struktur des CDK9/CyclinT1/Tat-Komplexes	61	Crm1-vermittelter Export bei ribosomalen RNAs	84
Posttranslationale Modifikationen von Tat	62	Crm-1 abhängiger RNA Export bei HIV	84
<i>Chromatin Remodeling</i> am LTR-Promoter	63	Klausurfragen	85
Fragen	64	Literatur	85
Antworten	65	Kapitel 6: Intrazelluläres Trafficking	92
Klausurfragen	66	Einleitung	93
Literatur	66	Der Transport der viralen RNAs	94
Kapitel 5: Posttranskription und RNA Export	69	Gespleißte virale RNAs	94
Grundlagen der co- und posttranskriptionellen Prozessierung bei Retroviren	70	Teil- und nicht gespleißte RNAs	95
Spleißen	71	Genomische RNA	95
Posttranskriptionelles Spleißen zellulärer prä-mRNAs	71	Synthese retroviraler Proteine	95
Die Spleißreaktion	71	Gag und Gag-Pol Translation und Transport	96
		Das virale Strukturprotein Gag	96
		Translation des Gag-Pol-Fusionsproteins	96

Der Weg durch das Zytoplasma	97	Apoptose	124
Bindung und Verankerung an der Plasmamembran	98	Effekte auf Transkription und intrazelluläre Signalweiterleitung	125
Die viralen Oberflächenmoleküle	98	Molekularer Aufbau und Struktur	125
Env-Translation, Modifikation und Prozessierung	98	Literatur	126
Regulatorische HIV-1 Proteine	99	Kapitel 9: Die antiretrovirale Therapie	129
Das akzessorische virale Protein U (Vpu)	99	Einleitung	131
Vpr – ein virales Protein mit vielen Funktionen	100	Erforderliche Kriterien für eine HIV-1 Therapie	131
Das ESCRT-Netzwerk und seine Rolle bei der viralen Knospung	101	Notwendige Untersuchungen des Patienten	131
Die native zelluläre Funktion des ESCRT-Netzwerkes	101	Behandlungsindikation	131
Rekrutierung und Umfunktionierung des ESCRT-Netzwerkes durch das HI-Virus	103	Symptomatische Patienten <350 CD4+ cells/mm ³	132
Literatur	104	Asymptomatische Patienten	132
Kapitel 7: Virus assembly und Budding	106	CD4-Zellzahl zwischen 350-500/mm ³	132
Viruszusammenbau und -Freisetzung	107	CD4-Zellzahl >500 cells/mm ³	132
HIV-1 Assembly	107	Viruslast	132
Membran-Mikrodomänen	109	HIV-assoziierte Nephropathie (HIVAN)	133
Env Inkorporation und Env Verteilung	109	Chronische Hepatitis B und C	133
MPMV Assembly	110	Weitere Kriterien	133
Budding und Freisetzung	112	Zusammenfassung	133
Struktur unreifer Viren	113	Die HIV-Therapie	133
Alternative Freisetzungswege	114	Ziel der Therapie	133
Zelluläre Restriktionsfaktoren	115	Entwicklung der Therapie	134
CD 317	115	Antivirale Medikamente	134
ISG-15	116	Reverse Transkriptase-Inhibitoren	135
Fragen	116	Nukleosidische/nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren	135
Antworten	116	Wirkungsweise	135
Literatur	117	Nebenwirkungen	135
Kapitel 8: HIV-1 Nef	119	Resistenzen	136
Einleitung	120		
Rezeptor Modulation	121		
T Zell Migration	123		

Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptaseinhibitoren (NNRTIs)	136
Wirkungsweise	136
Nebenwirkungen	137
Resistenzen	137
Protease-Inhibitoren	137
Wirkungsweise	137
Nebenwirkungen	138
Resistenzen	138
Entry-Inhibitoren	139
Attachment-Inhibitoren	139
Wirkungsweise	139
Resistenzen	139
Fusions-Inhibitoren	139
Wirkungsweise	139
Resistenzen	140
Korezeptor-Inhibitoren	140
Wirkungsweise	110
CCR5-Antagonisten	140
CXCR4-Antagonisten	141
Integrase Inhibitoren	142
Wirkungsweise	142
Raltegravir	143
Elivitegravir	143
Die Wahl der richtigen Medikamente	144
Erste ART bei Erwachsenen	144
Zweite ART bei Erwachsenen	144
Fragen	144
Antworten	144
Klausurfragen	145
Literatur	145

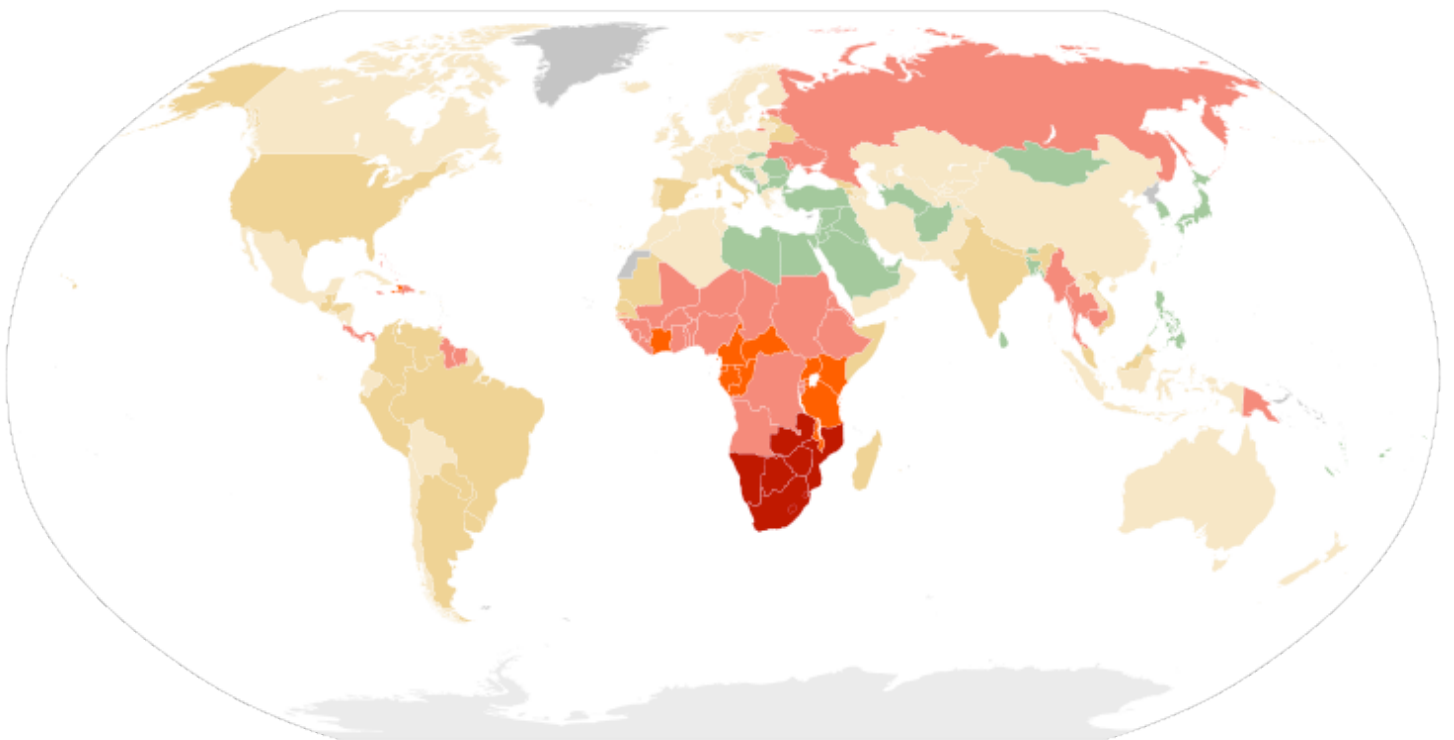
Abkürzungsverzeichnis

151

1

Pathogenese & Epidemiologie

Fabian Gauch



Inhaltsverzeichnis

Pathogenese	10	Epidemiologie	22
Einleitung	10	Der Ursprung von HIV-1 im Kurzüberblick	22
Das HI-Virion	10	HIV-/AIDS-Epidemie in Deutschland im Jahr 2011	23
Übertragung & Infektion	11	Gruppe der heterosexuellen Neuinfektionen	24
Verlauf der Infektion	11	Gruppe der homosexuellen Neuinfektionen	24
Der HIV-Patient – Ein Überblick	12	Gruppe der Neuinfektionen infolge von intravenösem Drogenkonsum	24
Mutter-Kind-Transmission	12	Gruppe der Neuinfektionen infolge von Mutter-Kind-Transmissionen	24
HIV-Diagnostik	13	Gruppe der Neuinfektionen mit unbekanntem Infektionsweg	25
AIDS: Opportunistische Infektionen	13	HIV-/AIDS-Epidemie global im Jahr 2011	25
Bakteriell verursachte opp. Infekt.	14	Die Zahlen zur globalen Epidemie	25
Virale opportunistische Infektionen	16	Ziele der UNAIDS bis 2015	26
Von Parasiten verursachte opp. Infekt.	19	Mögliche Realisierung der Ziele der UNAIDS	26
Von Pilzen verursachte opp. Infekt.	20	Literatur	27
Entwicklung der HIV-1 Pathogenität	21		

Abbildung auf der Vorderseite:

HIV-Prävalenz bei Personen im Alter von 15-49 Jahren, weltweit (Stand: 2005): grau: keine Daten, grün: < 0,1%, gelb: 0,1%-0,5%, dunkelgelb: 0,5%-1%, rosa: 1%-5%, orange: 5%-15%, rot: 15%-50%.
Quelle http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ee/AIDS_and_HIV_prevalence.svg

Pathogenese

Einleitung

Das Humane-Immundefizienz-Virus (HIV) ist ein komplexes *Retrovirus* (Familie) aus der Unterfamilie der *Orthoretrovirinae* und der Gattung der *Lentiviren*. Das Genom von HIV besteht aus einem Homodimer zweier (+)-Strang-mRNAs, die der Polarität einer mRNA entsprechen. Es hat eine ungefähre Größe von 12 Kilobasen (kb) (Modrow, Falke et al. 2010). HIV löst die Immunschwäche AIDS („acquired immunodeficiency syndrome“) aus, die 1981 zum ersten Mal beschrieben worden ist (Flint, Enquist et al. 2009a). Es gibt zwei Taxa von HI-Viren: HIV-1 und HIV-2. In diesem Buch wird ausschließlich HIV-1 behandelt. HIV-1 lässt sich, aufgrund eines Unterschiedes in der Nukleotidsequenz, in zwei häufig auftretende Hauptgruppen *M* („major“) und *O* („outliners“) unterteilen. Des Weiteren lässt sich die Gruppe *M*, die am häufigsten bei HIV-infizierten Menschen auftritt, in die Subtypen *A*, *B*, *C*, *D*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J* und *K* gliedern. Jeder Subtyp ist für eine geographische Region in der Welt charakteristisch. Global am stärksten treten die Subtypen *C* (51%), *A* (30%), *B* (10%) und *D* (4%) auf. Die HIV-Forschung befasst sich überwiegend mit Viren des Subtyps *B*. Grund hierfür ist, dass Subtyp *B* in der hochentwickelten und damit forschungsstarken westlichen Welt (Nordamerika & Europa) vorherrschend ist (Flint, Enquist et al. 2009b).

Das HI-Virion

Ein einzelner Viruspartikel, der sich außerhalb von Zellen befindet, wird als Virion bezeichnet. Ein HI-Virion setzt sich aus Proteinstrukturen zusammen, die aus deren Vorläufern, den Polyproteinen, entstehen. Retrovirale Polyproteine werden durch die Gene *gag* („group specific antigen“), *pol* („polymerase“) und *env* („envelope glycoprotein“) codiert. Als komplexes Retrovirus exprimiert HIV noch weitere regulatorische Proteine, die durch die Gene *rev* („regulator of virion expression“), *tat* („trans-activator of transcription“), *nef* („negative regulatory factor“), *vpu* („viral protein u“), *vif* („viral

infectivity factor“) und *vpr* („viral protein r“) codiert werden (Bell & Lever, 2012). Auf die komplexen retroviralen Gene und deren Produkte wird in den nachfolgenden Kapiteln detailliert eingegangen.

Das HI-Virion besteht aus einer Hülle, die sich aus einer Doppellipidschicht und einer Matrix zusammensetzt (Abb. 1.1). Auf der Oberfläche befinden sich das Glykoprotein (gp) 120 (Oberflächeneinheit) und gp41 (Transmembraneinheit). Letzteres ist in die Lipiddoppelschicht eingebettet. Im Inneren des HI-Virions befindet sich das Capsid. Neben dem Erbgut, den beiden dicht mit Nucleocapsiden gepackten (+)-mRNA-Strängen, enthält es die für die Virusreplikation wichtigen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) (Flint, Enquist et al. 2009a).

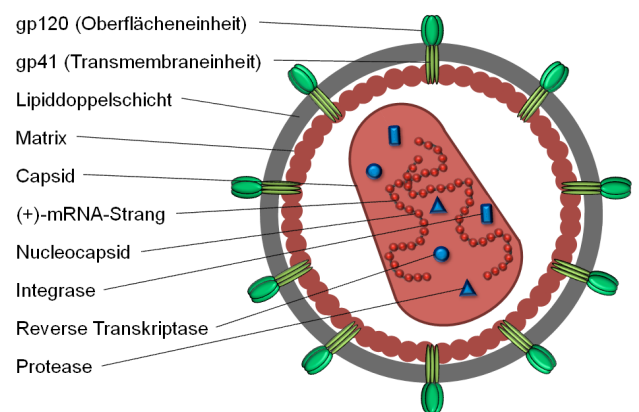


Abbildung 1.1: HI-Virion. Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung eines reifen HI-Virions (beschriftet). Die Protease kann sich auch außerhalb des Capsids befinden (hier nicht dargestellt). *gag*: rot, *pol*: blau, *env*: grün.

Codiert werden die Oberflächenproteine gp120 und gp41 durch *env*, die retroviralen Enzyme RT, IN sowie PR durch *pol* und die Matrix (p17), das Capsid (p24), die Nucleocapside (p7) sowie zwei Spacer-Proteine p2 und p1 durch *gag*. *gag* codiert dabei in erster Linie für das Vorläuferprotein Pr55Gag und *pol* für Pr160GagPol. Letztendlich werden die Vorläuferproteine durch die PR in die reifen Polyproteine gespalten. Das Vorläuferprotein von *env*, gp160, wird im Gegensatz zu den Vorläuferproteinen von *gag* und *pol* durch eine zelluläre Protease in die reifen Proteine gp120 und gp41 gespalten (Freed, 2001).

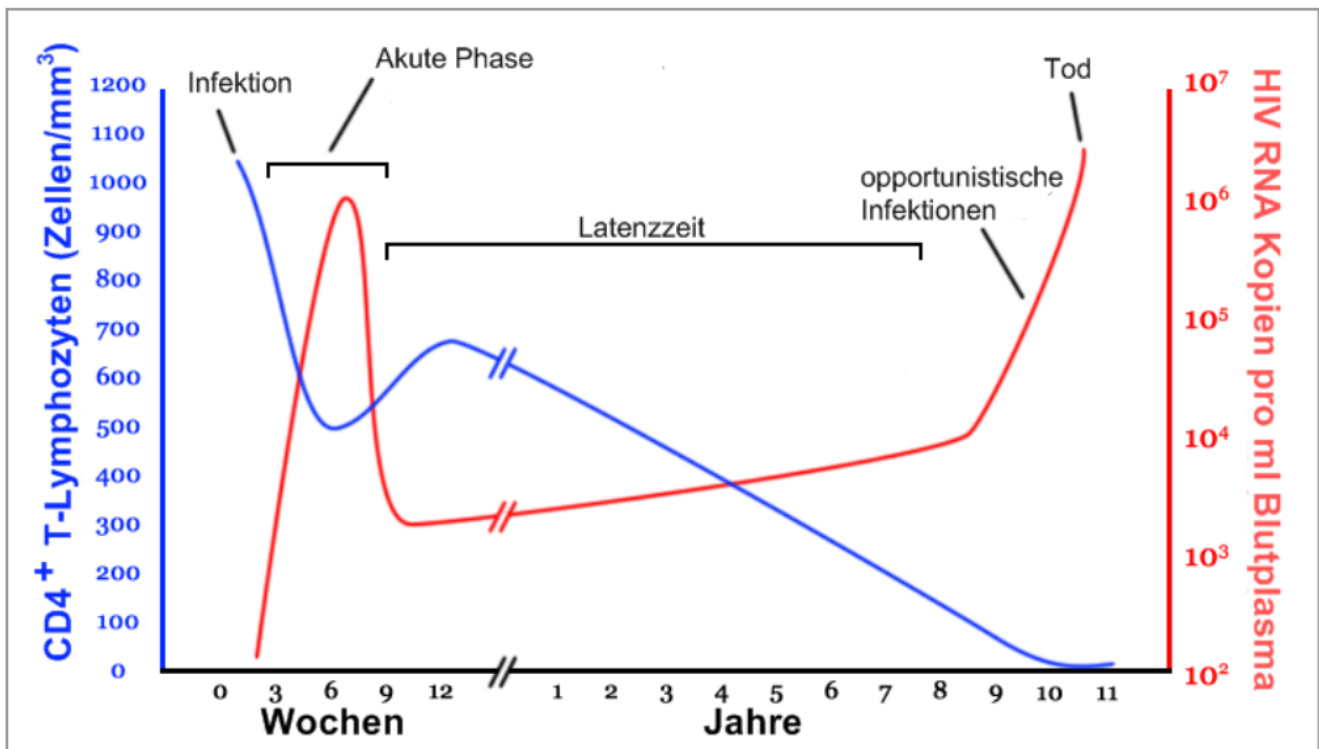


Abbildung 1.2: Verlauf der HIV-Infektion. Darstellung in Abhängigkeit der CD4⁺-T-Lymphozyten (blaue Kurve) und der HIV-RNA-Kopien pro mL Blutplasma (rote Kurve) (nach <http://de.wikipedia.org: „HIV“>).

HIV: Übertragung & Infektion

Das HI-Virus kann via Blut, Sperma, Vaginalflüssigkeit und perinatal (auch über die Muttermilch) übertragen werden. Nachdem die Viren in das Lymph- bzw. Blutsystem eingedrungen sind, verbreiten sie sich im gesamten Organismus (Flint, Enquist et al. 2009b).

HIV befällt die für die Immunabwehr wichtigen CD4⁺-Lymphozyten, in erster Linie die CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen. Die Oberflächenproteine des HI-Virus, gp120 und gp41, interagieren mit dem CD4-Rezeptor und den Corezeptoren der Wirtszellen (-> Kapitel 2: „Bindung an die Zelle und Viruseintritt“). Auf diesem Weg kommt es zur Fusion von HIV und der Zellmembran. Daraufhin kann sich das Virus mit Hilfe des Replikationsapparats der Wirtszelle replizieren. Die Wirtszellen können dabei zerstört werden (Modrow, Falke et al. 2010). Ferner persistiert das HI-Virus in Makrophagen und Dendritischen Zellen (Flint, Enquist et al. 2009b).

Verlauf der Infektion

In den ersten Wochen einer HIV-Infektion treten grippeartige Symptome auf, die jedoch bald wieder abklingen. Diese Phase zu Beginn der Infektion wird als akute Phase bezeichnet und geht mit einem starken Anstieg an HIV-RNA-Kopien pro mL Blutplasma im Körper eines Infizierten einher (Virämie). Infolgedessen werden 30% bis 50% aller CD4⁺ T-Zellen zerstört. Nachfolgend werden durch die körpereigene Immunantwort zusätzlich CD4⁺ T-Zellen produziert, sodass deren Population vorübergehend wieder leicht zunimmt. Im weiteren Verlauf geht die HIV-Infektion in eine latente Phase über, die auch als asymptomatische Phase bezeichnet wird (Abb. 1.2). Sie kann von wenigen Monaten bis zu vielen Jahren andauern. Während dieser Zeit nimmt die Zahl der für die Immunabwehr wichtigen CD4⁺ T-Lymphozyten kontinuierlich, um ungefähr 60000 Zellen/mL im Jahr, ab. Das führt zu einer Degeneration des wirtseigenen Immunsystems, deren Voranschreiten sich nach der Anzahl der im Organismus befindlichen Viren

bzw. HIV-RNA-Kopien pro mL Blutplasma (nach der ersten Immunantwort) richtet (Abb. 1.2). Je mehr Viren zu diesem Zeitpunkt, der auch als „virologic set point“ bezeichnet wird, vorhanden sind, desto schneller verläuft die Degeneration des Immunsystems. In der Endphase der HIV-Infektion sind weniger als 200 CD4⁺ T-Zellen pro μ L Blutplasma vorhanden. Diese Phase wird auch als symptomatische Phase bezeichnet, da es, aufgrund des in seiner Funktion stark eingeschränkten Immunsystems, zu tödlich verlaufenden opportunistischen Infektionen kommen kann. Dieser lebensbedrohliche Zustand wird als AIDS bezeichnet (Flint, Enquist et al. 2009b).

Der HIV-Patient – Ein Überblick

Liegt der „virologic set point“ eines HIV-Patienten bei 100000 HIV-Kopien pro mL Blutplasma ist, statistisch gesehen, mit der Manifestation von opportunistischen Erkrankungen innerhalb der nächsten zwei Jahre zu rechnen. Dagegen tritt bei einem Patienten mit weniger als 1000 HIV-Kopien pro mL Blutplasma selbst nach 12 Jahren noch keine AIDS-definierende Erkrankung auf. Neben der HI-Viruslast sind die Werte der CD4⁺-Zellen für den Verlauf der HIV-Infektion bzw. die Manifestation von opportunistischen Erkrankungen ausschlaggebend. Tatsache ist, dass opportunistische Erkrankungen bei einem Wert von unter 200 CD4⁺-Zellen pro μ L Blutplasma signifikant zunehmen (O'Brien et al, 1996). Zum Vergleich: Die Normwerte von CD4⁺-Zellen liegen bei Erwachsenen zwischen 435 und 1600 Zellen/ μ L (absolut gesehen) bzw. 31 – 60% der Lymphozyten (relativ gesehen). Opportunistischen Erkrankungen können aber schon bei höheren bzw. erst bei niedrigeren Werten als 200 CD4⁺-Zellen/ μ L auftreten. Je nach Geschwindigkeit der CD4⁺-Zell-Eliminierung kann man HIV-Patienten in drei Risikogruppen einteilen, die die Krankheitsprogression beschreiben: In Gruppe 1, der Hochrisikogruppe, werden Patienten mit einer Abnahme von 100 CD4⁺-Zellen/ μ L innerhalb von 6 Monaten eingeordnet, in Gruppe 2 Patienten mit moderatem Risiko, d.h. mit einer Abnahme von 20-50 CD4⁺-Zellen/ μ L pro Jahr und letztendlich in Gruppe 3 Patienten mit

geringem Risiko, d.h. mit einer Abnahme von weniger als 20 CD4⁺-Zellen/ μ L pro Jahr (Stein et al, 1997). Von all diesen Faktoren wird der medizinische Ablauf der ART abhängig gemacht. So erhält der HIV-/AIDS-Patient eine individuelle und bestmögliche ärztliche Behandlung. Dennoch wird eine vollständige Heilung von HIV, trotz umfangreicher Forschung, gegenwärtig sowie zukünftig nicht möglich sein. Dies liegt hauptsächlich daran, dass das HIV-Genom zum festen Bestandteil der wirtseigenen CD4⁺-Zell-DNA wird. Eine exhaustive Rekonvaleszenz kann folglich nur durch eine Gentherapie erfolgen (nach aktuellem Stand der Forschung). Allerdings birgt diese Art der Behandlung enorme, nicht überschaubare Risiken und ist somit gegenwärtig wie auch in der nahen Zukunft nicht am Patienten anwendbar.

Mutter-Kind-Transmission

Um eine Übertragung von HIV von einer HIV-positiven Mutter auf ihr Kind zu verhindern, ist eine durchgehende ART während der Schwangerschaft essentiell. Die ART stellt heutzutage kein nennenswertes Risiko mehr für das ungeborene Kind dar, welches im Verhältnis zu einer möglichen HIV-Infektion steht (Agangi et al, 2005). Mittels der ART konnte die Mutter-Kind-Transmission von HIV in Europa von 15% im Jahr 1990 (Connor et al, 1994) auf heute unter 2% gesenkt werden (Townsend et al, 2008). In aller Regel besteht das größte Risiko einer Übertragung von der Mutter auf ihr Kind direkt bei der Geburt. In nahezu allen Fällen kommt es in der späten Phase der Schwangerschaft bzw. bei der Entbindung zu einer HIV-Mutter-Kind-Transmission. Um das Risiko möglichst gering zu halten, ist eine kontrollierte Geburt mittels eines Kaiserschnitts, am besten geeignet. Außerdem muss bei der Geburt sichergestellt sein, dass die Mutter weniger als 1000 HIV-RNA-Kopien pro mL Blutplasma aufweist. Des Weiteren sollte nach der Geburt immer eine Postexpositionsprophylaxe beim Neugeborenen durchgeführt werden. Wird standardgemäß beim Neugeborenen ein HIV-Test durchgeführt, muss eine PCR als Testmethode zum Einsatz kommen (Nachweis von viraler RNA), da sich maternale HIV-Antikörper im

Organismus des Neugeborenen befinden. Diese könnten zu einem Falsch-Positiven HIV-Testergebnis führen. Nach der Geburt ist das Stillen des Kindes durch seine HIV-positiven Mutter nicht erlaubt, da sonst die akute Gefahr einer perinatalen HIV-Transmission besteht.

HIV-Diagnostik

(1) Hoch sensitiver „Combostat“ bzw. HIV-Tests der 4. Generation:

- Ausgangsmaterial: Blutplasma
- Gleichzeitiger Nachweis von HIV-spezifischen Antikörpern (AKs) und dem HIV-Antigen p24; Sensitiv und kostengünstig
- Nachweis von Antigen und Antikörpern gegen alle HIV-Typen, HIV-Gruppen und HIV-Subtypen
- Methode: Antikörpernachweis mit ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) bzw. MEIA („Microparticle Enzyme Immunoassay“); Bestätigungstest mit Westernblot-(Immunoblot-)Analyse bzw. Line-Blot; Weiterer Bestätigungstest mit RT-PCR, falls das Ergebnis nicht eindeutig ist; Bestätigungstest nach 2-3 Wochen
- Allgemein: Ein HIV-Suchtest soll sehr sensitiv, ein Bestätigungstest sehr spezifisch sein

(2) Schnelltest der Gegenwart:

- Ausgangsmaterial: Vollblut und, je nach Test, auch Urin oder Speichel
- Nicht sensitiv; Bestätigungstest (Westernblot) in jedem Fall notwendig
- p24-Antigen kann nicht nachgewiesen werden
- Dient nur zur Orientierung; Hoch sensitiver „Combostat“ muss nachgeholt werden
- Häufig falsch-negative Test bei akuter HIV-Infektion

(3) Zukünftige Schnelltests (de la Rica & Stevens, 2012):

- Plasmonischer ELISA-Test (mit Blutserum) auf das HIV-Antigen p24

- Grundprinzip: Wenn der Marker (p24) in der Probe vorhanden ist, führt dies zur Bildung von Goldpartikeln, die aggregieren und eine blaue Färbung auslösen

- Auswertung des Ergebnisses erfolgt mit bloßem Auge, ähnlich wie bei einem Schwangerschaftsschnelltest. Richtig-positive Ergebnisse selbst dann, wie die Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze liegt (Referenz: Goldstandard Nucleinsäure-basierter Test)

Nachzulesen in: „Nature nanotechnology“ 2012, Volume 7, Issue 12

HIV-/AIDS-Beratungsstellen

- Prävention: www.machsmitt.de, www.iwwit.de
- Beratung und Hilfe: www.aidshilfe.de/ru, www.aidsberatung.de, www.bzga.de/service/beratungsstellen/aids sowie lokale Gesundheitsämter und Selbsthilfegruppen;
- Internationale Surveillance: <http://www.unaids.org/en/>

AIDS: Opportunistische Infektionen

Opportunistische Infektionen können durch Erreger wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten ausgelöst werden, wenn die Immunabwehr eines Organismus geschwächt ist (Abb. 1.3). Sie treten infolge einer durch HIV ausgelösten Immunschwäche (AIDS) auf. Häufig wird aus einer latenten bzw. persistierenden Infektion eine opportunistische Infektion. In einem gesunden Organismus mit funktionierendem Immunsystem kommt es dagegen zu keinem Ausbruch von opportunistischen Krankheiten (Flint, Enquist et al. 2009b).

Die Behandlung von opportunistischen Infektionen erfolgt in erster Linie mittels einer ART. Ihr Ziel ist es, die RNA-Kopien des HI-Virus pro mL Blutplasma so niedrig wie erreichbar und die Zahl der CD4⁺- Zellen/ µL so hoch

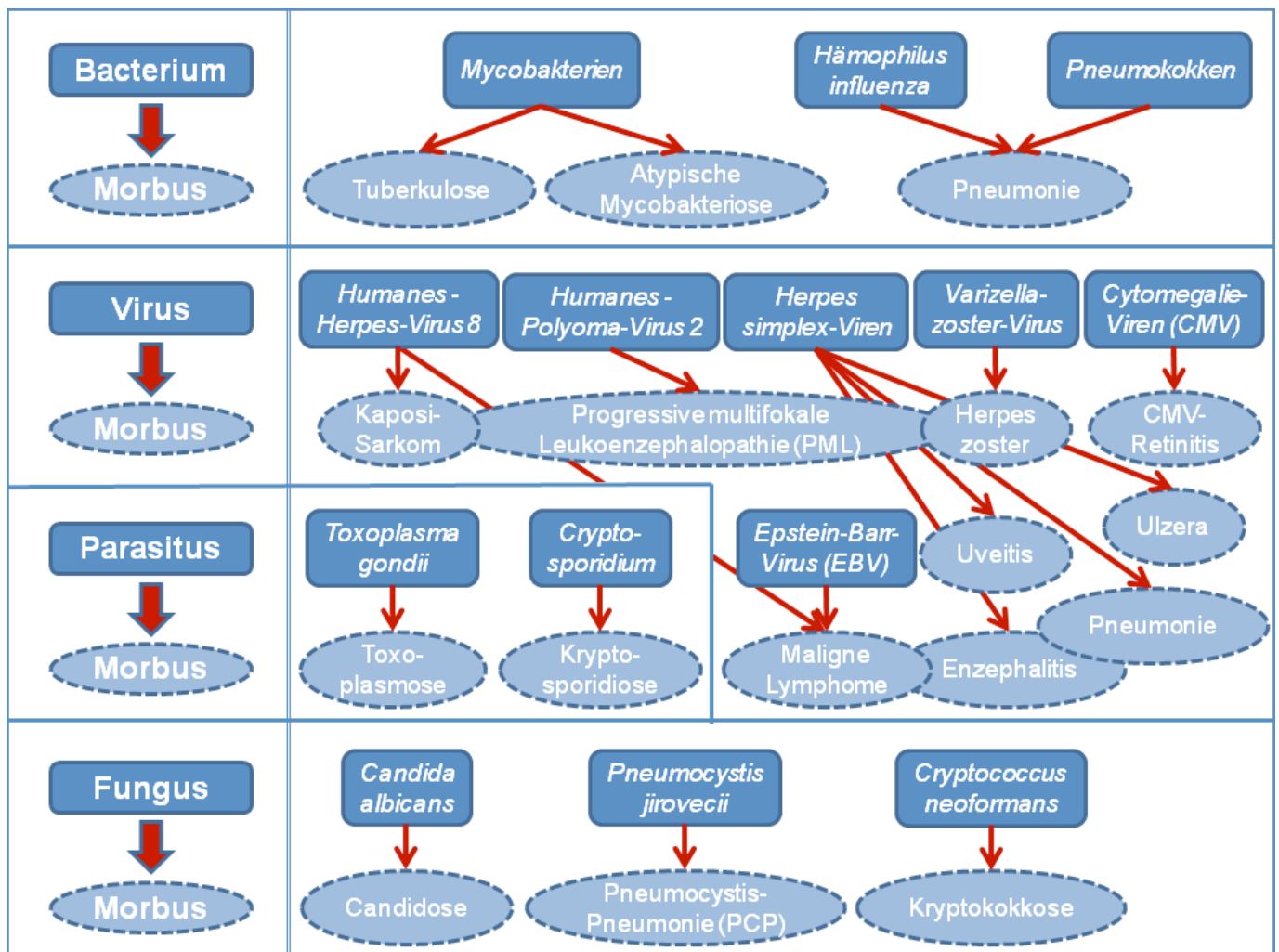


Abbildung 1.3: Übersicht über eine Auswahl von opportunistische Erkrankungen, wie sie in der Folge einer HIV-Infektion auftreten können. Getrennte Darstellung nach Erregertyp.

wie möglich zu halten. Für jede opportunistische Erkrankung gibt es, im Falle einer entsprechenden Symptomatik, zusätzlich zur ART eine spezielle Therapie, die jedoch nicht in allen Fällen zu einer Verbesserung des Gesundheitszustandes oder zu einer Genesung führen kann.

Im Folgenden wird auf eine Auswahl von opportunistischen Infektionen bzw. Erkrankungen näher eingegangen.

Bakterielle opportunistische Infektionen

Tuberkulose

Die Tuberkulose (TB) ist eine bakterielle Infektionskrankheit, die durch verschiedene Arten der *Mycobakterien* übertragen wird. Sie befällt vorwiegend die Lunge (pulmonale TB), wo Nekrosen verursacht werden, die Symptome wie Husten, Atemnot und z.T. hohes Fieber auslösen können. Die Diagnose kann mikrobiologisch, immunologisch und radiologisch erfolgen. TB kann unabhängig von der Anzahl der CD4⁺-Zellen auftreten (Ackah et al, 1995). Dennoch gibt es einen Zusammenhang zwischen einer TB- und HIV-Infektion, die die TB zu einer AIDS-definie-

renden Erkrankung macht. So ist bei HIV-Patienten mit weit fortgeschrittenem Immundefekt, d.h. weniger als 200 CD4⁺-Zellen pro μL Blutplasma (AIDS), ein signifikanter Anstieg an TB-Infektionen festzustellen (Van Rie et al, 2011). Zudem tritt bei AIDS-Patienten häufig eine extrapulmonale TB auf, bei der annähernd jedes Organ betroffen sein kann.

Viele HIV/AIDS-Erkrankte haben eine Tuberkulose-Coinfektion. So sind in der Sub-Sahara Region (in Afrika), fast 80% der HIV-Infizierten an TB erkrankt (WHO, 2012). Insgesamt gesehen gehen weltweit 13% aller TB-Erkrankungen auf HIV-infizierte Personen zurück (WHO, 2012).

Als Prophylaxe einer TB-Erkrankung, die auf eine HIV-Infektion folgen könnte, dient eine ART. Diese lässt das Risiko einer TB-Erkrankung um bis zu 65 % sinken (WHO, 2012). Gerade in Afrika, wo die TB-Prävalenz (Anzahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehenden Infektionen) besonders hoch ist, ist somit eine flächendeckende medizinische Versorgung von HIV-Infizierten im Rahmen einer ART essentiell. Liegt eine TB-Erkrankung vor, so ist diese mit einer sechsmonatigen TB-Standardtherapie aufwendig aber in den meisten Fällen erfolgreich zu behandeln. Eine HIV-Coinfektion hat keine negativen Auswirkungen auf eine TB-Therapie. (Burman & Jones, 2001).

Atypische Mykobakteriose

Ebenfalls in Zusammenhang mit einer *Mycobakterien*-Infektion steht die Atypische Mykobakteriose. Hier ist der Erreger das *Mycobacterium avium complex* (MAC). Es kommt quasi ubiquitär, z.B. in verunreinigter Nahrung oder in Trinkwasser vor. Das Krankheitsbild ist relativ unspezifisch und kann durch Gewichtsabnahme, Fieber und Durchfall, aber auch aus Lymphknoten-Abszessen definiert werden. Lebensbedrohlich wird die Infektion, wenn sie zum Wasting-Syndrom (starke und unkontrollierte Gewichtsabnahme), z.B. infolge von schwerem Durchfall, führt. Eine MAC-Infektion kann sich allerdings erst bei einem Wert von unter 50 CD4⁺-Zellen/ μL Blutplasma manifestieren (Horsburgh, 1999). Vor zwei Jahrzehnten eine MAC-Infektion bei bis zu 40 % aller AIDS-Patienten auf-

getreten (Nightingale et al, 1992). Heutzutage ist dies, insbesondere in den Ländern der westlichen Welt, eine Seltenheit, was nicht zuletzt an der Effizienz der ART liegt (Karakousis et al, 2004). Die Behandlung einer MAC-Infektion ist, von der Diagnose an, relativ komplex und sollte neben einer ART durchgeführt werden. Eine Regeneration der Patienten ist schwierig, aber möglich, sofern ein Wert von über 100 CD4⁺- Zellen/ μL (Immunrekonstruktion) erreicht wird (Aberg et al, 1998).

Bakterielle Pneumonien

Bakterielle Pneumonien (Lungenentzündungen) sind zunächst keine charakteristischen opportunistischen Erkrankungen, da sie unabhängig vom Zustand des Immunstatus, d.h. auch bei einem Wert von deutlich über 200 CD4⁺- Zellen/ μL Blutplasma, auftreten können. Was bakteriellen Pneumonien als opportunistische Erkrankungen kennzeichnet, ist die Häufigkeit ihres zeitlichen Auftretens und die Art der pneumonieauslösenden Erreger. Bei HIV-Infizierten sind das zumeist Pneumokokken *Haemophilus influenzae*. So genannte AIDS-definierte Pneumonien liegen nur dann vor, wenn sie akut sind sowie innerhalb eines Jahres mehrfach auftreten. Sie müssen sowohl radiologisch als auch kulturell (*in vitro* im Labor) nachgewiesen werden.

Bei einer niedrigen Anzahl an CD4⁺- Zellen/ μL treten vermehrt schwere Verläufe auf (Madeddu et al, 2010). Die überwiegenden Symptome sind hohes Fieber und blutiger Husten, sowie schwere Atmung. Die Behandlung kann ambulant erfolgen. Sie sollte aber stationär durchgeführt werden, wenn der Immunstatus schlecht ist, d.h. wenn weniger als 200 CD4⁺- Zellen/ μL vorhanden sind (Madeddu et al, 2010). Insbesondere für HIV-Infizierte, unabhängig von ihrem Immunstatus, wird eine Prophylaxe in Form einer Pneumovax[®]-Impfung empfohlen. Diese schützt vor den meisten Bakterien, die eine Pneumonie auslösen können und wirkt sich zudem, im Falle einer bakteriellen Infektion, positiv auf den Krankheitsverlauf aus (Imaz et al, 2009). Im Allgemeinen gibt es bei der Behandlung von bakteriellen Pneumonien keinen Unterschied zwischen HIV-positiven und HIV-negativen Patienten.

Virale opportunistische Infektionen

Kaposi-Sarkom

Das Kaposi-Sarkom (KS) ist eine bei HIV-Infizierten sehr häufig vorkommende Tumorerkrankung und dadurch eine der wichtigsten AIDS-definierenden Erkrankungen. Durch das gehäufte Auftreten von Kaposi-Sarkomen bei jungen Männern zu Beginn der Achtzigerjahre des letzten Jahrhunderts kam es zur Erstbeschreibung von AIDS und zur Entdeckung des HI-Virus. Ursprünglich ist das KS nur bei Männern älteren Jahrgangs mit entsprechender genetischer Veranlagung aufgetreten.

Bei der Erkrankung entstehen in erster Linie dunkel-braune Tumore auf Haut und Schleimhaut, aber auch in Lymphknoten oder inneren Organen kann es zu einem Tumorwachstum kommen.

Mit dem KS wird das Humane Herpesvirus 8 (HHV-8) in direkte Verbindung gebracht, da HHV8 immer im Tumorgewebe nachweisbar ist. Es lässt sich gar ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Tumore und der Viruslast von HHV-8 darstellen (Laney et al, 2007). HHV8 wird zumeist über Speichel (Pauk et al, 2000) sowie sexuell und durch Blut übertragen. In manchen Regionen liegt die HHV-8-Durchseuchungsrate bei über 50%.

Charakteristisch ist, dass fast ausschließlich Männer erkranken und dass die Erkrankung meist unabhängig vom Immunstatus des HIV-Patienten ist. So wiesen in einer US-amerikanischen Studie 29% aller KS-Erkrankten einen Wert von über 300 CD4⁺- Zellen/ μ L Blutplasma auf (Krown et al, 2008). Zu Beginn der AIDS-Epidemie war das KS noch eine der am weitest verbreiteten opportunistischen Erkrankungen. Gegenwärtig beträgt ihr Anteil nur noch ein Zehntel dessen (Grabar et al, 2006).

Eine Behandlung der Sarkome ist aufwendig und gleicht der anderer Krebserkrankungen. Eine vollständige Heilung ist nahezu ausgeschlossen. Allerdings lässt sich einer Verschlechterung des Zustandes mit einer gezielten Therapie gut entgegenwirken.

Progressive Multifokale Leukenzephalopathie

Der Erreger der Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie (PML) ist das weltweit verbreitete JC-Virus (JCV), auch Humanes Polyomavirus 2 genannt. Es löst eine schwere Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) aus, die zu dessen Entmarkung führt. Das Virus persistiert in Nieren und Knochen solange es durch die zelluläre Immunantwort unterdrückt wird. Bei einer Immunschwäche kommt es zu der Reaktivierung einer latenten JCV-Infektion. Bei einer Manifestation der Erkrankung wandert das JC-Virus mit den Leukozyten in das ZNS, wo es die Oligodendrozyten befällt. Diese sind für die Bildung der Markscheiden zuständig und sterben, wegen des Virusbefalls, ab. Daraufhin kommt es zur multifokalen Demyelinisierung, wobei überwiegend die weiße, zum Teil aber auch die graue Hirnsubstanz abgebaut wird.

Die PML tritt in 75% aller Fälle bei stark Immunsupprimierten mit einem Wert von unter 100 CD4⁺- Zellen/ μ L Blutplasma auf. In seltenen Fällen (5-10%) kann sich die PML bei Patienten mit einem Wert von über 200 CD4⁺- Zellen/ μ L manifestieren. Insgesamt gesehen ist sie, nach der zerebralen Toxoplasmose, die am zweithäufigst auftretende neurologische opportunistische Erkrankung bei AIDS. (Antinori et al, 2001).

Die Prognose im Falle einer PML fällt mäßig bis schlecht aus. Ohne ART liegt die maximale Lebenserwartung zwischen drei und sechs Monaten. Die Patienten sind vor dem Eintritt des Todes über Wochen bettlägerig und sterben zumeist an sekundären Komplikationen. Heutzutage, wo eine ART die Regel ist, hat die Mortalität leicht abgenommen. So konnte in einer französischen Studie mit 1427 PML-Patienten eine Steigerung des Ein-Jahresüberlebens von 19,8% (vor 1996) auf 54,1% (1996-2004) ermittelt werden (Gasnault J, 2008). Dennoch kann die hoch effiziente ART dem endgültigen Krankheitsverlauf nicht entgegenwirken. Deswegen zählt die PML zu den opportunistischen Erkrankungen mit sehr hoher Mortalität.

Herpes zoster

Herpes Zoster ist eine Erkrankung der Nerven, die umgangssprachlich als Gürtelrose bezeichnet wird. Sie wird durch das *Varizella-Zoster Virus* (VZV) verursacht, das in erster Linie der Auslöser von Windpocken ist. Es wird auch als Humanes-Herpesvirus 3 bezeichnet. Nach einer Erstinfektion (zumeist Tröpfcheninfektion), die die Windpocken-Erkrankung verursacht, persistieren die Viren in den Spinalganglien. Bei einer Immunsuppression wird das VZV nicht mehr reprimiert, sodass es zum Ausbruch der Gürtelrose kommt. Bei HIV-Patienten tritt diese gehäuft und unabhängig vom Immunstatus auf. Dennoch gilt: Je stärker geschwächt das Immunsystem ist, desto mehr Organe können von der Gürtelrose betroffen sein. So werden nicht nur Dermatome, sondern auch Seh- und Hörnerven, sowie in schlimmen Fällen die Hirnnerven befallen. Die Diagnose ist, anhand der sich auf der Haut bildenden herpetiformen Bläschen, einfach zu stellen. Eine schnelle ambulante Behandlung verspricht eine gute Heilungschance (Blank et al, 2012).

CMV-Retinitis

Die CMV-Retinitis ist eine durch Cytomegalie-Viren (CMV) verursachte Entzündung der Netzhaut (Retinitis), die zur Netzhautablösung und damit zur Erblindung führen kann. Die Durchseuchungsrate von CMV liegt in Deutschland zwischen 50 und 70%. Bei einem Immundefekt können sich die persistierenden Viren reaktivieren. Dies geschieht nur bei stark immunsupprimierten Patienten mit einem Wert von unter 50 CD4⁺- Zellen/μL Blutplasma. Noch vor wenigen Jahren sind bis zu 30% der CMV-Erkrankten erblindet. Häufig handelte es sich dabei um „Late-Presenter“ (Jacobson et al, 2000). Deswegen ist eine frühzeitige Diagnose (bei den ersten Anzeichen einer „Sehschwäche“) von einem Facharzt zu stellen. Dies geschieht durch Funduskopie. Die anschließende Behandlung hat das Ziel, unter allen Umständen den Verlust des Augenlichts zu verhindern. Heutzutage stellt dies, bei intensiver Therapie, kein medizinisches Problem mehr dar, sofern die CMV-Retinitis nicht schon weit fortgeschritten

ist. Ein infolge der CMV-Erkrankung entstandener Sehschaden ist irreversibel.

Ulzera, Uveitis, Enzephalitis & Pneumonie

Sowohl Ulzera (Geschwüre), Uveitis (Entzündung der mittleren Augenhaut), Enzephalopathie (krankhafte Veränderung im ZNS) und Pneumonie (Lungen-entzündung) können als opportunistische Erkrankungen durch das *Herpes simplex*-Virus (HSV) infolge von AIDS auftreten. Das HSV wird auch als Humanes-Herpesvirus 2 (HHV-2) bezeichnet. Es gibt zwei HSV-Spezies: HSV-1, das in der Regel die *Herpes labialis* (Ausschlag im Lippenbereich) verursacht, und HSV-2, das zu *Herpes genitalis* (Ausschlag im Genitalbereich) führt. Die Übertragung der Viren findet über die Schleimhäute statt. Nach einer Infektion persistiert HSV zunächst in den Ganglienzellen. Infolgedessen kann es, bei einer Immunschwäche, jederzeit zum Ausbruch der Krankheit kommen. HSV-Infektionen sind weit verbreitet. Dabei nimmt die Prävalenz (Anzahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehenden Infektionen) mit dem Alter zu. So liegt die Durchseuchungsrate von HSV-1 bei Erwachsenen in Deutschland bei 78% und von HSV-2 bei 13,6% (gemessen in Thüringen). Global gesehen ist die Durchseuchungsrate in einigen Ländern noch höher (Sauerbrei et al, 2011; CDC, 2010).

Für die opportunistischen Erkrankungen bei HIV-Infizierten ist häufig HSV-2 verantwortlich. Dadurch treten viele der Erkrankungen, z.B. die Bildung von Geschwüren (Ulzera), im Genitalbereich auf. Die Behandlung von HSV ist schwierig und in Kombination mit HIV medizinisch äußerst komplex (Zolopa et al, 2009; Heng et al, 1994). Der Behandlungserfolg ist vom Einzelfall, d.h. vom Krankheitsbild und Zustand des jeweiligen Patienten, abhängig.

Maligne Lymphome

Das Epstein-Barr-Virus (EBV), auch als Humanes-Herpesvirus 4 (HHV-4) bekannt, ist ein Virus, das nach der Infektion im menschlichen Körper persistiert. Es löst bei seiner Reaktivierung, z.B. infolge einer Immunschwäche, die

Bildung verschiedener Arten von malignen Lymphomen aus. Maligne Lymphome sind bösartige Erkrankungen des Lymphatischen Systems. Bei ihrer Untersuchung konnte in vielen Proben das Epstein-Barr-Virus nachgewiesen werden. Eine EBV-Virämie gilt als Risikofaktor (Leruez-Ville et al, 2012). Es wird angenommen, dass EBV einer der Hauptverursacher der malignen Lymphome ist. Ebenfalls maligne Lymphome löst HHV-8 aus. Nichtsdestotrotz stellt HHV-8, in Bezug auf maligne Lymphome, keinen derartigen Risikofaktor wie das Epstein-Barr-Virus dar. Die Durchseuchungsrate von EBV, das überwiegend durch Kontaktinfektionen (z.B. über Speichel) übertragen wird, ist sehr hoch. So liegt sie bei (erwachsenen) HIV-Infizierten bei annähernd 100% (Luchsinger et al, 2010). EBV ist der Auslöser zweier Arten von Lymphomen: Hodgkin-Lymphome (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Treten am Patienten angeschwollene Lymphknoten auf, so kann, mittels einer PET- (Positronen-Emissions-Tomographie) oder besser einer PET/CT-Untersuchung, die entsprechende Diagnose gestellt werden.

Ohne Behandlung führen maligne Lymphome binnen weniger Monaten zum Tod. Selbst unter intensiver medizinischer Versorgung ist die Lebenserwartung relativ gering, hat sich aber im Vergleich zu Beginn der AIDS-Epidemie verbessert (Levine et al, 2000). Maligne Lymphome sind somit eine der am häufigsten auftretenden Todesursachen bei AIDS-Patienten. In einer Studie aus Frankreich sind 24% aller AIDS-Patienten an malignen Lymphomen verstorben. Das bedeutet, dass mehr AIDS-Patienten an malignen Lymphomen gestorben sind, als bei der PCP und PML zusammen (Morlat P, 2010).

HIV-Infizierte haben ein stark erhöhtes Risiko besonderes aggressive Arten von schnell wachsenden malignen Lymphomen zu entwickeln. Dazu gehören die hoch malignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome, die AIDS-definierend sind. Darunter sind zum einen Burkitt-Lymphome, die in 30-40% der Fälle auftreten, und diffus großzellige B-Zell-Lymphome (40-60%). Sie entstehen größtenteils schon bei AIDS-Patienten mit gutem Immunstatus. Man geht deshalb davon aus, dass die chronische B-Zell-Stimu-

lation infolge einer HIV-Infektion (Regidor et al, 2011) und die Anzahl an HI-Viren im Blut (HIV-Virämie) (Zoufaly et al, 2009) die Ursachen für besonders aggressive Lymphome sind.

Des Weiteren haben HIV-Patienten ein um 5- bis 15-fach erhöhtes Risiko Hodgkin-Lymphome zu entwickeln (Morbus Hodgkin). Im Unterschied zu NHL bestehen HL überwiegend aus reaktiven Entzündungszellen, u.a. T-Lymphozyten, und nur zu einem sehr geringen Prozentsatz aus malignen Zellen. Eine Abnahme an CD4⁺-Zellen trotz einer gleichbleibenden HIV-Virämie weist auf Morbus Hodgkin hin (Bohlius et al, 2011). Im Vergleich zu HL bei HIV-negativen Patienten sind HIV-positive, mit wenigen Ausnahmen, immer mit EBV coinfiziert. Die Diagnose von Morbus Hodgkin gleicht der von NHL. Eine Heilung ist bei intensiver medizinischer Behandlung, im Gegensatz zum NHL, wahrscheinlich, wenn Morbus Hodgkin nicht schon weit fortgeschritten ist (Berenguer et al, 2008).

Hepatitis B (HBV)-Coinfektion

Eine Coinfektion von HBV und HIV kommt relativ häufig vor. So sind allein in der Europäischen Union ungefähr 9% aller HIV-Patienten zusätzlich an einer chronischen Hepatitis erkrankt (Konopnicki et al, 2005). Ein Grund für das gehäufte Auftreten von HBV/HIV-Coinfektionen ist, dass der Übertragungsweg der beiden Viren identisch ist (sexuelle Übertragung). Das besondere Risiko einer Coinfektion liegt darin, dass die Wahrscheinlichkeit der Manifestation einer chronischen Hepatitis fünfmal so hoch bei HIV-positiven, wie bei HIV-negativen Patienten ist. Begünstigt wird dies vermutlich durch das (infolge von HIV) supprimierte Immunsystem (Bodsworth et al, 1991). Zusätzlich wird der chronische Verlauf einer Hepatitis durch die HIV-Infektion im Allgemeinen verschlimmert. So steigt die Mortalitätsrate, insbesondere infolge von Lebererkrankungen („wie sie bei chronischen Hepatitiden regelmäßig auftreten,) um den Faktor 15 (Thio et al, 2002). Gerade bei HIV-Infizierten muss davon ausgegangen werden, dass HBV ein Leben lang im Körper der Be-

troffenen persistiert, was ein zusätzliches Risiko für schwere Verläufe darstellt.

Der Verlauf einer HBV-Erkrankung ist direkt abhängig von dem Immunzustand des Patienten. So steigt die Gefahr einer Reaktivierung des HB-Virus bei zunehmender Immunsuppression signifikant an (Soriano et al, 2005). Des Weiteren wurden ein Anstieg der Mortalität und eine Zunahme von opportunistischen Erkrankungen infolge der HBV/HIV-Coinfektion beschrieben (Chun et al, 2012).

Hepatitis C (HBC)-Coinfektion

Im Verlauf einer HIV-Infektion kann es zu einer Hepatitis C-Coinfektion kommen. Ursächlich dafür ist das geschwächte Immunsystem des HIV-Patienten. Zudem ist das Risiko einer Coinfektion von HIV und HCV aufgrund des gleichen Transmissionswegs der beiden Viren relativ hoch. In Deutschland haben sich 15% aller HIV-Infizierten zusätzlich mit HCV infiziert. In den USA betrifft dies sogar 30% der HIV-Infizierten, was in etwa 240000 der US-amerikanischen HIV-Patienten entspricht (Rockstroh et al, 2005). Gegenwärtig nimmt die HCV-Prävalenz in Europa, insbesondere aufgrund intensiver Versorgung von Drogenabhängigen, ab.

Gewöhnlich erfolgt eine HCV-Infektion bzw. Coinfektion über den intravenösen Weg (Transmissionsrisiko >2%). Seltener durch sexuelle Transmission (Risiko <1%). Bedingt wird dies durch die hohe Infektiosität von Hepatitis C-Viren bei Blut-Blut-Kontakten. Diesbezüglich ist sie bis zu 10 Mal so hoch wie die Infektiosität von HIV. Infolgedessen sind Empfänger von Blutprodukten und Personen, die intravenös Drogen konsumieren, besonders gefährdet.

Durch die Immunsuppression infolge der HIV-Infektion wird der Verlauf der HCV-Infektion beschleunigt. So halbiert sich die Zeit, nach der es zu Leberversagen kommen kann, von 40 auf 20 Jahre (Benhamou et al, 1999). Das Voranschreiten der Leberzirrhose, die durch HCV verursacht wird, kann nicht durch eine ART

gestoppt werden. Lediglich das Risiko eines ungünstigen Verlaufs von HCV kann durch eine frühzeitig begonnene ART minimiert werden (Rockstroh, 2006). Findet eine Immunrekonstruktion des Patienten infolge einer ART statt, kann ein Leberversagen zudem hinausgezögert werden (Pineda et al, 2007). In einigen Fällen kommt es durch die ART zu leberschädigenden Nebenwirkungen, infolge deren die ART ausgesetzt werden muss. Dennoch bringt die ART insgesamt gesehen mehr Vorteile, die die möglichen schweren Nebenwirkungen zunächst vernachlässigbar machen. (Rockstroh, 2009)

Von Parasiten verursachte opportunistische Infektionen

Toxoplasmose

Verursacht wird die Toxoplasmose durch den Parasit *Toxoplasma gondii*. Die Durchseuchungsrate liegt, je nach Region, bei bis zu 90%. Damit ist die Toxoplasmose eine weit verbreitete latente Infektion, die bei funktionierendem Immunsystem ohne erkennbare Folgen bzw. Beschwerden verläuft. Dagegen tritt bei Immunsupprimierten, wie AIDS-Patienten, eine schwere und komplexe Erkrankung auf: Die zerebrale Toxoplasmose. Sie ist heutzutage einer der häufigsten auftretenden neurologischen Erkrankungen bei HIV-Infizierten und das, obwohl die Anzahl der Neuinfektionen seit den 90-iger Jahren auf weniger als 25% gesunken ist (Abgrall et al, 2001). *Toxoplasma gondii* weist eine starke Affinität zum ZNS auf. Zu Beginn der Erkrankung treten daher Sensibilitätsstörungen oder Sprachprobleme auf (Porter & Sande, 1992). Je nachdem kann es auch zu Krampfanfällen kommen. Je weiter die Erkrankung voranschreitet, desto größer werden die neurologischen Ausfälle.

Eine Toxoplasmose tritt im Normalfall nur bei AIDS-Patienten mit einem Wert von unter 100 CD4⁺- Zellen/ μ L Blutplasma auf. Kommt es bei diesen Patienten zu charakteristischen Symptomen, sollte eine Craniale Computertomographie (CCT) oder besser eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt werden, um die Herden der Toxoplasmosen und die dadurch verursachten Enzephalo-

pathien im Gehirn sichtbar machen zu können. Um falsch-positive Diagnosen definitiv auszuschließen, ist zudem eine Serologie notwendig. Ungefähr 97% der Patienten weisen nämlich entsprechende IgG-Antikörper auf (Derouin et al, 1996).

Ist die Diagnose eindeutig, muss sofort mit einer Behandlung begonnen werden. Dennoch sind die Chancen einer Rekonvaleszenz eher verhalten. Zwar ist die 5-Jahres-Überlebensrate (im Vergleich zu den Jahren 1990 bis 1993) von ehemals 7% auf ca. 78% (1997) angestiegen. Dennoch ist das Sterberisiko weiterhin relativ hoch. Das liegt u.a. daran, dass die Diagnose der Toxoplasmose bei HIV-Infizierten häufig erst mit der Diagnose von HIV gestellt wird (in bis zu 49% aller Fälle). Da die HIV-Erkrankung bis zu diesem Zeitpunkt nicht diagnostiziert wurde, fand keine Therapie in Form einer ART statt, was die Chancen einer Verbesserung des Gesundheitszustandes zusätzlich vermindert (Hoffmann et al, 2007).

Kryptosporidiose

Die Kryptosporidiose wird durch das Protozoon *Cryptosporidium parvum* ausgelöst. Die Symptome sind Übelkeit, Erbrechen und wässriger Durchfall. Dabei kann der Durchfall so stark sein, dass es zum Tod des Patienten, u.a. durch Elektrolytverlust, kommt. Übertragen wird der Erreger durch Tiere (Zoonose) und über verunreinigte Nahrungsmittel. Ebenso wie die bakteriellen Pneumonien kann die Kryptosporidiose auch bei Menschen ohne Immundefekt auftreten (Chen et al, 2002). So sind Kryptosporidien weltweit für einen Großteil der Durchfallerkrankungen verantwortlich. AIDS-definierend ist erst der chronische Verlauf der Kryptosporidiose, der bei einem Wert von unter 50 CD4⁺- Zellen/μL Blutplasma auftritt. Manifestiert wird dieser, wie zuvor erwähnt, durch Wasser- und Elektrolytverlust. Bei HIV-Patienten mit einem Wert von über 200 CD4⁺- Zellen/μL klingt die Kryptosporidiose nach wenigen Tagen von selbst ab. Eine Rekonvaleszenz ist im Falle einer komplexen Therapie und ggf. stationären Behandlung wahrscheinlich, dennoch nicht in allen Fällen möglich (Abubakar et al, 2007).

Von Pilzen verursachte opportunistische Infektionen

Candidose

Die Candidose ist eine bei HIV-Infizierten häufig auftretende Infektionskrankheit, die durch hefebildende Pilze der *Candida*-Spezies verursacht wird. Von diesen lösen allerdings nur 20, meist *Candida albicans*, eine Candidose aus. Die Diagnose ist eindeutig: Im Mund- und Rachenraum, seltener auch auf der Zunge und in der Speiseröhre, finden sich weiße, abstreifbare Belege. In wenigen Fällen sind die Mund- und Rachenschleimhäute nur schwach gerötet (atypische Candidose). Zu einer sicheren Diagnose kann auch ein Abstrich genommen und mikrobiologisch untersucht werden. Candidosen können unabhängig vom Immunstatus des Patienten auftreten. Es gibt eine Vielzahl an Behandlungsmöglichkeiten, sodass eine Heilung selbst bei schlechtem Immunstatus sehr wahrscheinlich ist.

Pneumocystis-Pneumonie (PCP)

Die PCP, häufig auch als interstitielle Pneumonie bezeichnet, galt lange Zeit als von Protozoen verursachte Erkrankung. Doch Ende der Achtzigerjahre des letzten Jahrhunderts wurde entdeckt, dass es sich bei dem Auslöser um einen Pilz handelt, dem vor einigen Jahren der Name *Pneumocystis jirovecii* zugewiesen wurde (Edman et al, 1988) (Thomas & Limper, 2004). Nicht zuletzt dieses Irrtums wegen starben zur Beginn der AIDS-Epidemie viele Patienten an der PCP. Heutzutage ist eine Erkrankung eher selten, tritt aber häufig bei HIV-Infizierten auf, die keine ART bekommen.

Es kann erst zu einer PCP-Infektion kommen, wenn weniger als 250 CD4⁺- Zellen/μL Blutplasma vorhanden sind. Gerade bei den so genannten „Late-Presentern“ (gleichzeitige HIV- und AIDS-Diagnose) ist die PCP mit 35% die am zahlreichsten auftretende opportunistische Erkrankung (Mussini et al, 2008). Die Symptome sind Reizhusten und eine schwere Atmung unter Belastung (Belastungsdyspnoe). Gewissheit bringt das Röntgen bzw. ein HR-CT („High Resolution Computed Tomography“) der Lunge. Dabei kann die „Verpilzung“ der Lunge sichtbar gemacht

werden. Zur Abgrenzung von einer bakteriellen Pneumonie ist eine eindeutige Diagnose wichtig.

Die Prognose ist gut, sofern nach schneller korrekter Diagnose sofort mit der Therapie begonnen wird. Viele Patienten sind zu diesem Zeitpunkt bereits beatmungspflichtig. Dies bedeutet, dass die PCP weit fortgeschritten ist und die Chancen einer Heilung sehr gering sind (Walzer et al, 2008). Damit gehen auch heute noch viele AIDS-Todesfälle auf eine PCP zurück.

Kryptokokkose

Die Kryptokokkose ist eine lebensbedrohliche Infektionserkrankung, die durch den Hefepilz *Cryptococcus neoformans* ausgelöst wird. Sie ist eine der wichtigsten AIDS-definierenden Erkrankungen, u. a. weil sie nahezu ausschließlich in Folge einer schweren Immunschwäche auftritt. In einer Fallsammlung von 114 Patienten aus Deutschland (Weitzel A, 1999) haben diese bei der Manifestation der Kryptokokkose-Erkrankung im Median eine sehr geringe Konzentration von 30 CD4⁺- Zellen/ μ L Blutplasma. Im Allgemeinen tritt die Erkrankung bei 87% der HIV-Patienten erst ab einem Wert von weniger als 100 CD4⁺- Zellen/ μ L auf.

Die Übertragung *Cryptococcus neoformans* findet überwiegend durch die Inhalation von kontaminiertem Vogelkot statt. Von der Lunge gelangt der Erreger in ungefähr 80% aller Fälle über das Blut- bzw. Lymphsystem in das ZNS. Daraus ergeben sich die Symptome: Zunächst Kopfschmerzen und Fieber und bereits nach wenigen Tagen neurologische Störungen, die sich in Seh-, Hör-, und Gangproblemen äußern können. Seltener, bei ca. 20% aller Kryptokokken-Infektionen, bei denen ausschließlich ein Befall der Lunge vorliegt, tritt eine atypische Pneumonie auf.

Bei den ersten Anzeichen einer Kryptokokkose muss sofort mit einer Therapie begonnen werden. Die Behandlung erfolgt in der Regel stationär. Zu Beginn muss ein Antigentest durchgeführt werden. Im Falle eines positiven Tests ist, bei Befall der Lunge, ein HR-CT derselben und, bei Befall des ZNS, ein MRT des Gehirns notwen-

dig. In der Lunge sind kleine Herde, sowohl verstreut als auch scharf abgegrenzt sichtbar. Im Gegensatz dazu sind im Gehirn häufig keine eindeutigen Merkmale, wie z.B. Enzephalopathien zu sehen. Lediglich ein erhöhter Hirndruck ist zu messen. Gewissheit bringt hier eine Liquorpunktion. Die Mortalitätsrate ist, insbesondere in den ersten Wochen der Infektion, relativ hoch. Im Vergleich zu den letzten Jahrzehnten hat sich die Prognose insgesamt aber verbessert. So lag die Mortalität früher bei 64/100 Personenjahren, während sie gegenwärtig auf 15 gesunden ist (Lortholary et al, 2006).

Entwicklung der HIV-1 Pathogenität

Die Pathogenese von HIV lässt sich einerseits mit der Anzahl der HIV-RNA-Kopien pro mL Blutplasma, also der Zahl der Viren im Blut (Virämie), andererseits mit der Zahl der CD4⁺-Zellen/ μ L Blutplasma darstellen (-> 1.4: „Verlauf der Infektion“). Beide Faktoren wurden als prognostische Marker in einer Metaanalyse festgelegt. Dabei wurde die Entwicklung der Pathogenität des HIV Subtyps B aus 32 HIV-Studien aus den Jahren 1984-2010 untersucht (Herbeck et al, 2012). Es wurden zehn Studien zur Analyse der Entwicklung der CD4⁺-Zellen und acht zur Analyse der Entwicklung der Viruslast ausgewählt. Die Dauer der herangezogenen Studien betrug im Mittelwert 17 Jahre. In der Untersuchung wurde eine Zunahme der Viruskopien und eine Abnahme an CD4⁺-Zellen als Zunahme der Pathogenität gesehen, während eine Abnahme der Viruskopien und eine Zunahme der CD4⁺-Zellen als Abnahme der Pathogenität gewertet wurde. Als Vergleichswert für die Anzahl der Viruskopien wurde aus den jeweiligen Studien der „virologic set point“ herangezogen.

Die Ergebnisse der Metaanalyse von seroinzidenten Kohorten zeigen eine deutliche Tendenz zur Zunahme der Pathogenität. So ist es in den letzten 30 Jahren zu einer Abnahme der CD4⁺-Zellen um 180 Zellen/ μ L und zu einer Zunahme der Viruslast um 0,54 log₁₀ RNA-Kopien/mL gekommen. Das entspricht einer Entwicklung der CD4⁺-Zellen von -6,01 Zellen/ μ L und einer Viruslast von +0,018 log₁₀ RNA-Kopien/mL pro Jahr. Damit hat auch

über die Jahre der „virologic set point“ zugenommen, was zu einer Verschärfung der AIDS-Epidemie führt. Des Weiteren kommt es bei einem Anstieg des „virologic set point“ von $0,5 \log_{10}$ RNA-Kopien/mL in kürzeren Zeitabständen (durchschnittlich 3 Jahre früher) zur Manifestation von AIDS. Selbst bei nicht seroinzidenten Kohorten ist eine identische Entwicklung zu beobachten, wenn auch nicht so ausgeprägt. Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich die Pathogenität von HIV seit Beginn der globalen HIV-/AIDS-Epidemie verstärkt hat.

Die aus der Metaanalyse gewonnenen Ergebnisse decken sich mit der Annahme der Evolution von HIV im menschlichen Organismus. So ist davon auszugehen, dass sich das HI-Virus über die Zeit an die Veränderungen seiner Umwelt, wie sie z.B. durch die ART ausgelöst werden, angepasst hat. Es findet gewissermaßen durch die ART eine Verstärkung der Pathogenität von HIV bzw. eine Selektion auf besonders pathogene Eigenschaften des HI-Virus statt, die nur durch die Entwicklung von neuen Medikamenten bzw. eine Verbesserung der antiretroviraler Mittel kontrolliert werden kann. Es muss sozusagen eine Coevolution der antiretroviralen Behandlung stattfinden, damit auch zukünftig der Krankheitsverlauf von HIV zum Positiven hin reguliert werden kann.

Epidemiologie

Der Ursprung von HIV-1 im Kurzüberblick

Durch die Zoonose von SIV (*Simian immunodeficiency virus*) vom Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes* auf den Menschen (*Homo sapiens*) ist HIV entstanden. Vermutlich ist SIV durch den Verzehr von infiziertem Affenfleisch bzw. Affenorganen in den menschlichen Organismus gelangt. In Abb. 1.4 ist der Ursprung von HIV-1 stark vereinfacht dargestellt.

Das SI-Virus ist, nach aktuellen Berechnungen, mindestens 32000 Jahre alt (Worobey et al, 2010). Sofern die Menschen mit Affen Kontakt hatten, waren sie innerhalb der Jahrtausende SIV ständig ausgesetzt. Zudem änderte sich mit der Zeit das Verhalten der Menschen, sodass der

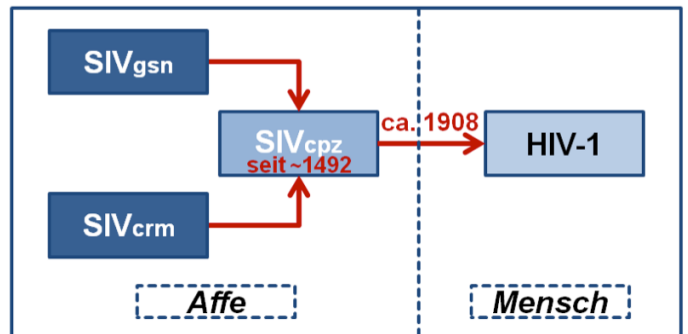


Abbildung 4.1: Übersicht über die Entstehung von HIV-1. SIV_{gsn} und SIV_{crm} sind die Vorfahren von SIV_{cpz}. Zoonosen von SIV_{cpz} des Schimpansen *Pan troglodytes troglodytes* führte zu HIV-1.

Kontakt zwischen den Spezies und damit der Kontakt zu diesem Virus immer enger geworden ist. Ein Angelpunkt dürfte um 1950 gewesen sein. Zu diesem Zeitpunkt hat die Benutzung unsteriler Injektionsnadeln enorm zugenommen, wodurch es zu unzähligen SIV-Übertragungen zwischen den Menschen gekommen ist (Marx et al, 2001). Bei dieser Gegebenheit wird, durch multiple genetische Übertragungen, höchstwahrscheinlich HIV-2 entstanden sein. Da der Ursprung von HIV-1 wesentlich früher liegt, kann der direkte Kontakt von SIV mit dem Menschen nicht die einzige Ursache bei der Entstehung von HIV sein. In erster Linie ist eine Vielzahl an genetischen Mutationen des SI-Virus für die Entstehung des humanpathogene HI-Virus verantwortlich. Inwiefern verschiedene Faktoren schlussendlich zur Entwicklung von HIV und damit zu einer weltweiten Epidemie geführt haben ist derzeit wissenschaftlich ungeklärt. Wissenschaftlich bewiesen scheint, dass es multiple Übergänge von SIV auf den Menschen gegeben haben muss und sich so die diversen Hauptgruppen von HIV ausgebildet haben.

Das SI-Virus ist, nach aktuellen Berechnungen, mindestens 32000 Jahre alt (Worobey et al, 2010). Sofern die Menschen mit Affen Kontakt hatten, waren sie innerhalb der Jahrtausende SIV ständig ausgesetzt. Zudem änderte sich mit der Zeit das Verhalten der Menschen, sodass der Kontakt zwischen den Spezies und damit der Kontakt zu diesem Virus immer enger geworden ist. Ein Angelpunkt dürfte um 1950 gewesen sein. Zu diesem Zeitpunkt hat

die Benutzung unsteriler Injektionsnadeln enorm zugenommen, wodurch es zu unzähligen SIV-Übertragungen zwischen den Menschen gekommen ist (Marx et al, 2001). Bei dieser Gegebenheit wird, durch multiple genetische Übertragungen, höchstwahrscheinlich HIV-2 entstanden sein. Da der Ursprung von HIV-1 wesentlich früher liegt, kann der direkte Kontakt von SIV mit dem Menschen nicht die einzige Ursache bei der Entstehung von HIV sein. In erster Linie ist eine Vielzahl an genetischen Mutationen des SI-Virus für die Entstehung des humanpathogene HI-Virus verantwortlich. Inwiefern verschiedene Faktoren schlussendlich zur Entwicklung von HIV und damit zu einer weltweiten Epidemie geführt haben ist derzeit wissenschaftlich ungeklärt. Wissenschaftlich bewiesen scheint, dass es multiple Übergänge von SIV auf den Menschen gegeben haben muss und sich so die diversen Hauptgruppen von HIV ausgebildet haben.

Durch die statistische „time of most recent common ancestor“-Methode (tMRCA) (Korber et al, 2000) kann der letzte gemeinsame Vorfahre berechnet und somit ein ungefähres Ursprungsjahr von HIV und dessen Hauptgruppen bestimmt werden. Dazu werden zunächst virale Sequenzen analysiert. Im Anschluss wird, anhand von Nucleotidveränderungen, eine „molecular clock“ kalibriert. Mithilfe dieser mathematischen Methode kann der Ursprung der Hauptgruppe *M* auf ungefähr 1908 (1884-1924) und der Ursprung der Hauptgruppe *O* ungefähr auf 1920 (1890-1940) datiert werden. Dabei liegt der Ausgangspunkt der HIV-1 Hauptgruppe *M*, die sich als erste ausgebildet hat, im Südosten von Kamerun. Überraschenderweise findet sich die SIV-Linie, die als Ursprung der HIV-1 Hauptgruppe *O* gilt, in Gorillas, die möglicherweise als SIV_{cpz}-Zwischenwirt zwischen Schimpanse und Mensch fungiert haben. Der SIV_{cpz}-Ursprung, also der des direkten Vorfahren von HIV, geht vermutlich auf das Jahr 1492 (1266-1685) zurück (Wertheim & Worobey, 2009).

HIV-/AIDS-Epidemie in Deutschland im Jahr 2011

Eine HIV-Infektion ist in Deutschland per Gesetz (IfSG § 7 Abs. 3 Nr. 2) meldepflichtig. In erster Linie ist das diag-

nostizierende Labor dazu verpflichtet einen positiven HIV-Befund an das Robert Koch Institut (RKI), eine zentrale Überwachungs- und Forschungseinrichtung, die dem Bundesministerium für Gesundheit untersteht, zu melden. Die Meldung erfolgt anonymisiert und muss, neben dem ersten Buchstaben des Vor- und Nachnamens, u.a. das Geschlecht, den Geburtsmonat und das Geburtsjahr sowie den Landkreis des Hauptwohnsitzes und den wahrscheinlichen Infektionsraum und das Infektionsgebiet enthalten. Es obliegt den behandelnden Ärzten fehlende Angaben auf dem amtlichen Meldebogen zu ergänzen und diesen anschließend direkt an das RKI zu übermitteln. Aus den so gewonnenen Daten sowie allgemeinen Studien erstellt das RKI einen Überblick über die HIV-Infektionen und AIDS-Erkrankungen in Deutschland. Dabei ist das Ziel die epidemiologische Überwachung (Surveillance) von HIV, darunter die Bestimmung der HIV-Inzidenz (Anzahl der HIV-Neuinfektionen pro Zeiteinheit) und der HIV-Prävalenz (Anzahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehenden HIV-Infektionen). Zu beachten ist, dass die Anzahl der Neuinfektionen nicht ohne weiteres mit der HIV-Inzidenz gleichgesetzt werden kann, da vom Zeitpunkt der Infektion bis zu deren Diagnose Jahre vergehen können. AIDS-Erkrankungen sowie AIDS-Todesfälle können von den behandelnden Ärzten freiwillig und anonym an das RKI gesendet werden.

Bei der Überwachung von HIV-/AIDS-Epidemie wird nach dem Übertragungsweg differenziert. Die Einteilung erfolgt nach heterosexuellem Übertragungsweg (HET), nach Männer die Sex mit Männern haben (MSM), nach Personen, die intravenös Drogen konsumieren (IVD), nach Kindern, die sich bei ihrer Mutter infizieren (PPI) und nach Personen, bei denen der Übertragungsweg unbekannt ist oder bei denen keine Angaben dazu vorliegen (unb./k.A.). Mit Abstand entstammen die meisten HIV-Infizierten in Deutschland, ungefähr 59000, aus der MSM-Gruppe. Dies entspricht fast 81% aller HIV-positiven in Deutschland wohnhaften Bürgerinnen und Bürgern.

In der gesamten Bundesrepublik Deutschland (BRD) leben derzeit ungefähr 73000 HIV-positive Menschen.

Für das Jahr 2011 wurden 2889 HIV-Neuinfektionen gemeldet. Das entspricht einem Rückgang von 1,7% im Vergleich zum Vorjahr. Knapp 52000 HIV-Patienten befinden sich in antiretroviraler Behandlung. Dessen ungeachtet sind 2011 ca. 1000 HIV-Patienten neu an AIDS erkrankt. Im gleichen Jahr sind ungefähr 500 AIDS-Patienten verstorben. Damit ist die Zahl der Todesfälle in Deutschland seit Beginn der AIDS-Epidemie auf 27000 gestiegen (RKI, 2012).

Gruppe der heterosexuellen Neuinfektionen

Die HIV-Neuinfektionen haben sich, aufgrund einer Neudefinition dieser Gruppe, um 10% erhöht (von 493 auf 544 Fälle). Nach der neuen Definition werden sowohl die in Deutschland, als auch die im Ausland erworbenen HIV-Infektionen zur HET-Gruppe gezählt. Von den Neuinfizierten stammten 30% aus Deutschland und 63% aus dem Ausland. Bei 7% waren keine Angaben vorhanden. Von den aus Deutschland stammenden Neuinfizierten haben sich 29% im Ausland angesteckt. Von denen aus dem Ausland stammenden haben sich 23% in Deutschland infiziert und 47% in Subsahara-Afrika. Im Endeffekt haben sich 60% der Personen der HET-Gruppe im Ausland mit HIV infiziert. Die HIV-Inzidenz ist in den letzten Jahren durch alle Altersschichten nahezu unverändert geblieben (RKI, 2012).

Gruppe der homosexuellen Neuinfektionen

Im Jahr 2011 haben sich 1574 Personen dieser Gruppe neu mit HIV-1 infiziert. Im Vergleich zum Vorjahr sind dies 7% weniger. 76% der Neuinfizierten stammen aus Deutschland, 14% aus dem Ausland und bei 10% lagen keine Angaben vor. Auffallend ist, dass sich mindestens 69% der Neuinfizierten mit Migrationshintergrund erst in Deutschland angesteckt haben. Insgesamt haben sich 90% aller Personen aus der MSM-Gruppe in Deutschland infiziert. Wie schon geschrieben, werden die meisten HIV-Infektionen in Deutschland aus der MSM-Gruppe gemeldet. So sind, für das Jahr 2010 gesehen, 68% der HIV-Neuinfektionen dieser Gruppe zuzuordnen. Dagegen ist die HIV-Inzidenz zwischen 2010 und 2011 nur noch in der

Altersgruppe der 25-29 Jährigen und den über 50-Jährigen leicht angestiegen. Bei den anderen Altersgruppen war sie leicht rückläufig oder stabil. Insgesamt geht seit dem Jahr 2008 die HIV-Inzidenz zurück. Dafür ist vermutlich die bessere sexuelle Aufklärung bezüglich Infektionskrankheiten, sowie eine schnellere HIV-Diagnose verantwortlich. So gibt es heutzutage deutlich weniger HIV-Infizierte, die ohne Kenntnis ihrer HIV-Infektion leben (RKI, 2012).

Gruppe der Neuinfektionen infolge von intravenösem Drogenkonsum

Die Anzahl an HIV-Neuinfizierten aus dieser Gruppe ist sehr gering. So wurden 2011 nur 90 Fälle in der BRD gemeldet. Das ist der niedrigste Wert seit Beginn der Erfassung im Jahr 1993 und entspricht im Vergleich zum Vorjahr einem Rückgang von 6%. Dabei stammen 43% der Neuinfizierten aus Deutschland und 38% aus dem Ausland. Eine Schwankung der HIV-Inzidenz lässt sich, aufgrund der wenigen Fälle, nicht sicher feststellen. Für die geringe Anzahl an HIV-/AIDS-Fällen in der IVD-Gruppe ist die intensive Versorgung von Drogenabhängigen verantwortlich, die neben einer Therapiemöglichkeit, den Abhängigen zudem ungebrauchte, sterilen Spritzennadeln zur Verfügung stellt. Damit wird die Wiederverwendung alter Kanülen, insbesondere die von potentiell HIV-infizierten Drittpersonen, minimiert. Somit spielen Neuinfizierte aus dieser Gruppe bei der HIV-/AIDS-Epidemie in Deutschland kaum noch eine Rolle (RKI, 2012).

Gruppe der Neuinfektionen infolge von Mutter-Kind-Transmissionen

2011 wurden 15 Fälle einer Mutter-Kind-Transmission von HIV in der BRD gezählt. Das sind 5 weniger als im Vorjahr. Von den 15 neuinfizierten Kindern wurden sechs in Deutschland und neun im Ausland zur Welt gebracht. Bei den in Deutschland geborenen Kindern wurde den Müttern in zwei Fällen kein HIV-Test angeboten, in zwei Fällen war die Infektion der Mutter vor der Geburt bekannt und in einem Fall wurde ein HIV-Test der Mutter vor der Geburt durchgeführt. Diese hatte zum Zeitpunkt

des Tests allerdings noch keine spezifischen Antikörper im Blut, sodass es zu einem falsch-negativen Testergebnis gekommen ist. Insgesamt gesehen spielt die PPI-Gruppe in Bezug auf die HIV-/AIDS-Epidemie in Deutschland kaum eine Rolle (RKI, 2012).

Gruppe der Neuinfektionen mit unbekanntem Infektionsweg bzw. dazu fehlenden Angaben

In diese Gruppe werden wahrscheinlich in vielen Fällen HIV-Neuinfizierte der MSM-Gruppe eingeordnet, weil häufig bei neuinfizierten Männer die Angabe zum sexuellen Übertragungsweg fehlt. Erfolgen von den HIV-Neuinfizierten keine Angaben dazu, so können die behandelnden Ärzte auch keine Einteilung des sexuellen Übertragungswegs vornehmen. Im Jahr 2011 sind 665 neuinfizierte Personen der unb./k.A.-Gruppe zuzuordnen. Das entspricht, im Vergleich zum Vorjahr, einer Zunahme von 5%. 53% der Personen stammen aus Deutschland, 19% aus dem Ausland und bei 28% fehlte die Angabe eines Herkunftslandes. Es ist davon auszugehen, dass sich die Mehrzahl der Personen der unb./k.A.-Gruppe in Deutschland infiziert hat (RKI, 2012).

Für eine gute HIV-Surveillance ist es unabdingbar, dass von allen Ärzten in allen Fällen konkrete Angaben gemacht werden, wie sie das RKI fordert. Somit ließe sich in Zukunft auch die Anzahl der Personen in dieser Gruppe minimieren bzw. die Neuinfizierten in eine konkrete Gruppe einordnen.

HIV-/AIDS-Epidemie global im Jahr 2011

Die HIV-Surveillance der globalen HIV-/AIDS-Epidemie fällt in den Zuständigkeitsbereich der UN-Organisation UNAIDS, die die Daten von den jeweiligen UN-Mitgliedsländern erhalten. Die UNAIDS wurde 1996 gegründet.

Im Jahr 2012 haben 186 Länder weltweit ihre HIV-/AIDS-Daten weitergegeben. Das entspricht 96% aller UN-Mitgliedsstaaten. Die UNAIDS erstellt daraus einen globalen HIV-/AIDS-Bericht und setzt Ziele, mit denen die AIDS-Epidemie in den nächsten Jahren eingedämmt werden könnte (-> 2.3.3: „Ziele der UNAIDS bis 2015“).

Zahlen zur globalen Epidemie

Auf der ganzen Welt lebten im Jahr 2011 ungefähr 34 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion. Dies entspricht ca. 0,8% der gesamten Weltbevölkerung. Davon sind 0,3% männlichen und 0,5% weiblichen Geschlechts. Damit gibt es weltweit deutlich mehr HIV-infizierte Frauen als Männer. Gerade in den Entwicklungsländern, wo die HIV-Prävalenz und die HIV-Inzidenz am größten sind, ist der Anteil an HIV-positiven Frauen außerordentlich hoch. Dies stellt ein großes Risiko dar, da sich viele Kinder dort, zwecks der mangelnden medizinischen Versorgung, bereits bei der Geburt mit HIV infizieren. In den Industrieländern überwiegt dagegen der Anteil an männlichen HIV-Infizierten.

Die von HIV am stärksten betroffene Region ist Subsahara-Afrika, wo allein 69% aller HIV-positiven Menschen, dies sind fast 35 Millionen, leben. Mit großem Abstand folgt auf dem zweiten Platz Asien. Dort leben 5 Millionen HIV-Infizierte. Auf den nachfolgenden Plätzen kommen die Karibik und Osteuropa. Insgesamt haben sich 2011 ca. 2,5 Millionen Menschen neu mit HIV infiziert. Den stärksten Anstieg der HIV-Inzidenz, gemessen von 2001-2011, weisen Bangladesch (Asien), Georgien (Osteuropa/Asien), Guinea-Bissau (Afrika), Indonesien (Asien), Kasachstan (Osteuropa/Asien), Kirgizstan (Asien), Philippinen (Asien), Moldawien (Osteuropa) und Sri Lanka (Asien), auf. Im Gegensatz dazu sind die Zahlen der Neuinfektionen in Afrika in den letzten Jahren kontinuierlich zurückgegangen. Trotz alledem infizieren sich weltweit gesehen die meisten Menschen in Afrika (s. Abb. Titelblatt). So wurden 71% aller HIV-Neuinfektionen aus Subsahara-Afrika gemeldet. Das entspricht ungefähr 1,8 Millionen Fällen.

Weltweit sind im Jahr 2011 1,7 Millionen Menschen an AIDS gestorben, was im Vergleich zu 2005 einer Abnahme von 24% entspricht. Allerdings werden diese Zahlen durch eine starke Zunahme an AIDS-Toten in einigen Ländern relativiert. Obwohl in Subsahara-Afrika 2011 32% weniger an AIDS verstorbene Menschen zu vermelden waren, stammen allein 70% aller AIDS-bedingten Todes-

fälle aus dieser Region. Dennoch ist insgesamt ein rückläufiger Trend in der Entwicklung zu sehen, was insbesondere auf den Erfolg der ART zurückzuführen ist. Demgemäß sind durch die ART seit 1995 14 Millionen Menschenleben in Ländern mit niedrigem bis mittlerem Einkommen gerettet worden. Davon stammen allein 9 Millionen aus Subsahara-Afrika (UNAIDS, 2012).

Ziele der UNAIDS bis 2015

Um die HIV-/AIDS-Epidemie einigermaßen bewältigen zu können und eine weitere Ausbreitung einzudämmen, hat die UNAIDS zehn spezifische Ziele für 2015 ausgearbeitet, die von den einzelnen Mitgliedsstaaten unverbindlich umgesetzt werden können. (UNAIDS, 2012).

Die 10 Ziele der UNAIDS (bis 2015):

- (1) Reduzierung der sexuellen HIV-Übertragung um 50 Prozent.
- (2) Reduzierung der HIV-Übertragung zwischen Drogenabhängigen (IVD) um 50%.
- (3) Verhinderung neuer HIV-Infektionen von Kindern und Reduzierung der AIDS-Todesfälle von Müttern.
- (4) Bereitstellung der ART für 15 Millionen Menschen.
- (5) Reduzierung der Tuberkulose-Toten in Zusammenhang mit einer HIV-Infektion um 50%.
- (6) Aufstellung von finanziellen Mitteln für Länder mit niedrigem und mittlerem Einkommen zur Bekämpfung von HIV/AIDS in der Höhe von 22 bis 24 Milliarden US-Dollar.
- (7) Verhinderung der Diskriminierung aufgrund des Geschlechts. Schutz von Frauen und Mädchen vor sexuellem Missbrauch und Gewalt sowie sexuelle Aufklärung zur Prävention einer HIV-Infektion.
- (8) Verhinderung der Stigmatisierung und Diskriminierung von HIV-/AIDS-Erkrankten durch die Politik bzw. durch die Verabschiedung entsprechender Gesetze.

(9) Verhinderung der Repressionen von HIV-positiven Menschen, z.B. Reisefreiheit statt Einreiseverbote.

(10) Integration der HIV-/AIDS-Versorgung in globale Gesundheits- und Entwicklungsprojekte

Mögliche Realisierung der Ziele der UNAIDS

Die sexuelle Übertragung kann zum einen über die sexuelle Aufklärung, insbesondere in Afrika, eingedämmt werden. Die Verwendung von Kondomen beim Sexualverkehr und das Vermeiden von vielen Sexualpartnern können ebenfalls dazu beitragen. Dies gilt besonders für die Gruppe der MSM und, im Hinblick auf die Kondom-Benutzung, für Prostituierte. Des Weiteren senkt eine Beschneidung der Männer nachweislich das Übertragungsrisiko von HIV vom Mann auf die Frau. Im Allgemeinen kann auch die Gleichberechtigung der Frau in der Gesellschaft, also die Veränderung sozialer Standards dazu beitragen. Gerade in Indien und Subsahara-Afrika sind sexuelle Vergewaltigungen von Frauen alltäglich und aufgrund ihrer niedrigen sozialen Stellung gesellschaftlich geduldet. Zur Vermeidung von Mutter-Kind-Transmissionen muss die Versorgung von schwangeren, HIV-positiven Frauen, besonders in den wenig entwickelten Ländern, enorm verbessert werden. So erreicht in diesen Ländern nur 30% der Frauen eine ART. Außerdem müssen ausreichend kostenlose HIV-Tests zur Verfügung gestellt und deren Akzeptanz von der lokalen Bevölkerung gefördert werden. Hinsichtlich der Übertragung zwischen IVDs hat die Bereitstellung von sterilen Kanülen sowie Drogentherapien höchste Priorität. Insgesamt gesehen steht die Versorgung der HIV-Infizierten mit antiretroviralen Mitteln an erster Stelle. Gerade in den Ländern mit niedrigen und mittleren Einkommen, wo gegenwärtig die meisten HIV-Infektionen und AIDS-Erkrankungen auftreten, muss im Hinblick auf die Finanzierung und die Verteilung der Medikamente in der Bevölkerung nachgebessert werden. Nicht zuletzt ist zu betonen, dass gerade eine Stigmatisierung und Diskriminierung von HIV-Infizierten im Angesicht der Verbreitung der AIDS-Epidemie enorm kontraproduktiv ist. Infolge von Diskriminierungen werden

HIV-Infektionen von den Betroffenen zumeist bewusst ignoriert oder verschwiegen. Somit kann keine ART stattfinden und die Ausbreitung von HIV kann nicht kontrolliert bzw. verhindert werden.

Werden die von der UNAIDS ausgearbeiteten Ziele durch die lokalen Regierungen der UN-Mitgliedsländer konsequent umgesetzt, so kann auch in den nächsten Jahren mit einer weltweit sinkenden HIV-Inzidenz gerechnet werden. Entgegen dem allgemeinen Trend steht die zunehmende Ausbreitung von HIV in einigen Entwicklungsländern der Welt. Hier muss mit allen Mitteln gegengesteuert werden. Ein erster Schritt dahin ist die finanzielle Unterstützung dieser Länder durch andere Staaten bzw. durch die UNAIDS sowie durch NGOs („non-governmental organizations“). Nicht zuletzt kann sich jeder Einzelne mit einer Spende beteiligen!

AIDS-Spendenempfänger (Links)

<http://www.aids-stiftung.de/>

<http://www.unicef.de/projekte/themen/aids/>

<http://www.aidshilfe.de/de/treffpunkt/aktiv-werden/spenden>

<http://www.sos-kinderdoerfer.de/wo-wir-helfen/hilfsprojekte/sos-gegen-aids/pages/default.aspx>

Literatur

CDC (2010) Seroprevalence of herpes simplex virus type 2 among persons aged 14-49 years. United States, 2005-2008. *MMWR* 59: 456-459

Aberg JA, Yajko DM, Jacobson MA (1998) Eradication of AIDS-related disseminated mycobacterium avium complex infection after 12 months of antimycobacterial therapy combined with highly active antiretroviral therapy. *JID* 178: 1446-1449

Abgrall S, Rabaud C, Costagliola D (2001) Incidence and risk factors for toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients before and during the highly active antiretroviral therapy era. *Clinical infectious diseases : an official publication of IDSA* 33: 1747-1755

Abubakar I, Aliyu SH, Arumugam C, Hunter PR, Usman NK (2007) Prevention and treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised patients. *CDSR (Online)*: CD004932

Ackah AN, Coulibaly D, Digbeu H, Diallo K, Vetter KM, Coulibaly IM, Greenberg AE, De Cock KM (1995) Response to treatment, mortality, and CD4 lymphocyte counts in HIV-infected persons with tuberculosis in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Lancet* 345: 607-610

Agangi A, Thorne C, Newell ML (2005) Increasing likelihood of further live births in HIV-infected women in recent years. *BJOG : IJGO* 112: 881-888

Antinori A, Ammassari A, Giancola ML, Cingolani A, Grisetti S, Murri R, Alba L, Ciancio B, Soldani F, Larussa D, Ippolito G, De Luca A (2001) Epidemiology and prognosis of AIDS - associated progressive multifocal leukoencephalopathy in the HAART era. *JNV* 7: 323-328

Bell NM, Lever AM (2012) HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol.* (2013) 21(3): 136-44

Berenguer J, Miralles P, Ribera JM, Rubio R, Valencia E, Mahillo B, Pintado V, Palacios R, Montes ML, Tellez MJ, La Cruz J, Torre-Cisneros J, Rodriguez-Arondo F, Sepulveda MA, Gutierrez F, Peralta G, Boix V (2008) Characteristics and outcome of AIDS-related Hodgkin lymphoma before and after the introduction of highly active antiretroviral therapy. *JAIDS* (1999) 47: 422-428

Blank LJ, Polydefkis MJ, Moore RD, Gebo KA (2012) Herpes zoster among persons living with HIV in the current antiretroviral therapy era. *JAIDS* (1999) 61: 203-207

Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, Charlotte F, Azria F, Coutellier A, Vidaud M, Bricaire F, Opolon P, Katlama C, Poynard T (1999) Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology* 30: 1054-1058

Bodsworth NJ, Cooper DA, Donovan B (1991) The influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the development of the hepatitis B virus carrier state. *JID* 163: 1138-1140

Bohlius J, Schmidlin K, Boue F, Fatkenheuer G, May M, Caro-Murillo AM, Mocroft A, Bonnet F, Clifford G, Papanizos V, Miro JM, Obel N, Prins M, Chene G, Egger M (2011) HIV-1-related Hodgkin lymphoma in the era of combination antiretroviral therapy: incidence and evolution of CD4(+) T-cell lymphocytes. *Blood* 117: 6100-6108

Burman WJ, Jones BE (2001) Treatment of HIV-related tuberculosis in the era of effective antiretroviral therapy. *AJRCCM* 164: 7-12

Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF (2002) Cryptosporidiosis. *N Engl J Med* 346: 1723-1731

- Chun HM, Roediger MP, Hullsiek KH, Thio CL, Agan BK, Bradley WP, Peel SA, Jagodzinski LL, Weintrob AC, Ganesan A, Wortmann G, Crum-Cianflone NF, Maguire JD, Landrum ML (2012) Hepatitis B virus coinfection negatively impacts HIV outcomes in HIV seroconverters. *JID* 205: 185-193
- Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, VanDyke R, Bey M, Shearer W, Jacobson RL, et al. (1994) Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 331: 1173-1180
- de la Rica R, Stevens MM (2012) Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nat. nanotechnol.* 7: 821-824
- Derouin F, Leport C, Pueyo S, Morlat P, LeTrillart B, Chene G, Ecobichon JL, Luft B, Aubertin J, Hafner R, Vilde JL, Salamon R (1996) Predictive value of *Toxoplasma gondii* antibody titres on the occurrence of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. ANRS 005/ACTG 154 Trial Group. *AIDS* 10: 1521-1527
- Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML (1988) Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nat.* 334: 519-522
- Flint SJ (2009a) *Principles of Virology*, 3. Auflage edn.: American Society for Microbiology, Vol. I
- Flint SJ (2009b) *Principles of Virology*, 3. Auflage edn.: American Society for Microbiology, Vol. II
- Freed EO (2001) HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* 26: 13-33
- Gasnault J LE, Bentata M, et al. (2008) Intracerebral penetrating ART are more efficient on survival of HIV+ patients with progressive multifocal leucoencephalopathy. *15th CROI*
- Grabar S, Weiss L, Costagliola D (2006) HIV infection in older patients in the HAART era. *JAC* 57: 4-7
- Heng MC, Heng SY, Allen SG (1994) Co-infection and synergy of human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus-1. *Lancet* 343: 255-258
- Herbeck JT, Muller V, Maust BS, Ledergerber B, Torti C, Di Giambenedetto S, Gras L, Gunthard HF, Jacobson LP, Mullins JI, Gottlieb GS (2012) Is the virulence of HIV changing? A meta-analysis of trends in prognostic markers of HIV disease progression and transmission. *AIDS* 26: 193-205
- Hoffmann C, Ernst M, Meyer P, Wolf E, Rosenkranz T, Plettenberg A, Stoehr A, Horst HA, Marienfeld K, Lange C (2007) Evolving characteristics of toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus-1: clinical course and *Toxoplasma gondii*-specific immune responses. *Clinical microbiology and infection : the official publication of ESCMID* 13: 510-515
- Horsburgh CR, Jr. (1999) The pathophysiology of disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in AIDS. *JID* 179 Suppl 3: S461-465
- Imaz A, Falco V, Penaranda M, Jordano Q, Martinez X, Nadal C, Curran A, Planes AM, Dalmau D, Ribera E, Riera M, Ruiz de Gopegui E, Pahissa A (2009) Impact of prior pneumococcal vaccination on clinical outcomes in HIV-infected adult patients hospitalized with invasive pneumococcal disease. *HIV medicine* 10: 356-363
- Jacobson MA, Stanley H, Holtzer C, Margolis TP, Cunningham ET (2000) Natural history and outcome of new AIDS-related cytomegalovirus retinitis diagnosed in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of IDSA* 30: 231-233
- Karakousis PC, Moore RD, Chaisson RE (2004) *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *The Lancet infectious diseases* 4: 557-565
- Konopnicki D, Mocroft A, de Wit S, Antunes F, Ledergerber B, Katlama C, Zilmer K, Vella S, Kirk O, Lundgren JD (2005) Hepatitis B and HIV: prevalence, AIDS progression, response to highly active antiretroviral therapy and increased mortality in the EuroSIDA cohort. *AIDS* 19: 593-601
- Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T (2000) Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288: 1789-1796
- Krown SE, Lee JY, Dittmer DP (2008) More on HIV-associated Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 358: 535-536; author reply 536
- Laney AS, Cannon MJ, Jaffe HW, Offermann MK, Ou CY, Radford KW, Patel MM, Spira TJ, Gunthel CJ, Pellett PE, Dollard SC (2007) Human herpesvirus 8 presence and viral load are associated with the progression of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS* 21: 1541-1545
- Leruez-Ville M, Seng R, Morand P, Boufassa F, Boue F, Deveau C, Rouzioux C, Goujard C, Seigneurin JM, Meyer L (2012) Blood Epstein-Barr virus DNA load and risk of progression to AIDS-related systemic B lymphoma. *HIV medicine* 13: 479-487
- Levine AM, Seneviratne L, Espina BM, Wohl AR, Tulpule A, Nathwani BN, Gill PS (2000) Evolving characteristics of AIDS-related lymphoma. *Blood* 96: 4084-4090
- Lortholary O, Poizat G, Zeller V, Neuville S, Boibieux A, Alvarez M, Dellamonica P, Botterel F, Dromer F, Chene G (2006) Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 20: 2183-2191

- Luchsinger V, Luzoro A, Martinez MJ (2010) [High seroprevalence of cytomegalovirus, herpes simplex type 1 virus and Epstein Barr virus infection among human immunodeficiency virus-infected adults]. *Revista medica de Chile* 138: 809-814
- Madeddu G, Laura Fiori M, Stella Mura M (2010) Bacterial community-acquired pneumonia in HIV-infected patients. *Current opinion in pulmonary medicine* 16: 201-207
- Marx PA, Alcabes PG, Drucker E (2001) Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. *Phil. Trans. B* 356: 911-920
- Modrow, S., et al. (2010). *Molekulare Virologie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Morlat P RC, Hénard S, et al. (2010) Evolution of the Causes of Death among HIV+ Patients between 2000 and 2010: Results of the French National Survey „ANRS EN20 Mortalité 2010“. *19th CROI 2012*
- Mussini C, Manzardo C, Johnson M, Monforte A, Uberti-Foppa C, Antinori A, Gill MJ, Sighinolfi L, Borghi V, Lazzarin A, Miro JM, Sabin C (2008) Patients presenting with AIDS in the HAART era: a collaborative cohort analysis. *AIDS* 22: 2461-2469
- Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX, Wynne BA (1992) Incidence of Mycobacterium avium-intracellulare complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *JID* 165: 1082-1085
- O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, Esinhart J, Hill A, Benoit S, Rubin M, Simberkoff MS, Hamilton JD (1996) Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N Engl J Med* 334: 426-431
- Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacker T, Celum C, Selke S, Corey L (2000) Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med* 343: 1369-1377
- Pineda JA, Garcia-Garcia JA, Aguilar-Guisado M, Rios-Villegas MJ, Ruiz-Morales J, Rivero A, del Valle J, Luque R, Rodriguez-Bano J, Gonzalez-Serrano M, Camacho A, Macias J, Grilo I, Gomez-Mateos JM, Grupo para el Estudio de las Hepatitis Viricas de la Sociedad Andaluza de Enfermedades I (2007) Clinical progression of hepatitis C virus-related chronic liver disease in human immunodeficiency virus-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. *Hepatology* 46: 622-630
- Porter SB, Sande MA (1992) Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 327: 1643-1648
- Regidor DL, Detels R, Breen EC, Widney DP, Jacobson LP, Palella F, Rinaldo CR, Bream JH, Martinez-Maza O (2011) Effect of highly active antiretroviral therapy on biomarkers of B-lymphocyte activation and inflammation. *AIDS* 25: 303-314
- RKI. (2012) *Epidemiologisches Bulletin*. Bundesministerium für Gesundheit (ed.). RKI, pp. 255-274.
- Rockstroh JK (2006) Influence of viral hepatitis on HIV infection. *Hepatology* 44: S25-27
- Rockstroh JK (2009) Hot topics in HIV and hepatitis coinfection: noninvasive diagnosis of liver disease, liver transplantation, and new drugs for treatment of hepatitis coinfection. *HIV clinical trials* 10: 110-115
- Rockstroh JK, Mocroft A, Soriano V, Tural C, Losso MH, Horban A, Kirk O, Phillips A, Ledergerber B, Lundgren J, Euro SSG (2005) Influence of hepatitis C virus infection on HIV-1 disease progression and response to highly active antiretroviral therapy. *JID* 192: 992-1002
- Sauerbrei A, Schmitt S, Scheper T, Brandstadt A, Saschenbrecker S, Motz M, Soutschek E, Wutzler P (2011) Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Thuringia, Germany, 1999 to 2006. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 16
- Soriano V, Puoti M, Bonacini M, Brook G, Cargnel A, Rockstroh J, Thio C, Benhamou Y (2005) Care of patients with chronic hepatitis B and HIV co-infection: recommendations from an HIV-HBV International Panel. *AIDS* 19: 221-240
- Stein DS, Lyles RH, Graham NM, Tassoni CJ, Margolick JB, Phair JP, Rinaldo C, Detels R, Saah A, Bilello J (1997) Predicting clinical progression or death in subjects with early-stage human immunodeficiency virus (HIV) infection: a comparative analysis of quantification of HIV RNA, soluble tumor necrosis factor type II receptors, neopterin, and beta2-microglobulin. Multicenter AIDS Cohort Study. *JID* 176: 1161-1167
- Thio CL, Seaberg EC, Skolasky R, Jr., Phair J, Visscher B, Munoz A, Thomas DL (2002) HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). *Lancet* 360: 1921-1926
- Thomas CF, Jr., Limper AH (2004) Pneumocystis pneumonia. *N Engl J Med* 350: 2487-2498
- Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, de Ruiter A, Lyall H, Tookey PA (2008) Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000-2006. *AIDS* 22: 973-981
- UNAIDS. (2012) *Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012*. United Nations (ed.). UNAIDS.

Van Rie A, Westreich D, Sanne I (2011) Tuberculosis in patients receiving antiretroviral treatment: incidence, risk factors, and prevention strategies. *JAIDS (1999)* 56: 349-355

Walzer PD, Evans HE, Copas AJ, Edwards SG, Grant AD, Miller RF (2008) Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985-2006. *Clinical infectious diseases : an official publication of IDSA* 46: 625-633

Weitzel A AK, Mertenskötter T, et al. (1999) Kryptokokkosen bei HIV-positiven Patienten in Deutschland - eine Auswertung 24 deutscher Zentren. *Brockmeyer NH et al*

Wertheim JO, Worobey M (2009) Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS computational biology* 5: e1000377

WHO. (2012) Global tuberculosis report 2012. United Nations (ed.), Geneva.

Worobey M, Telfer P, Souquiere S, Hunter M, Coleman CA, Metzger MJ, Reed P, Makuwa M, Hearn G, Honarvar S, Roques P, Apetrei C, Kazanji M, Marx PA (2010) Island biogeography reveals the deep history of SIV. *Science* 329: 1487

Zolopa A, Andersen J, Powderly W, Sanchez A, Sanne I, Suckow C, Hogg E, Komarow L (2009) Early antiretroviral therapy reduces AIDS progression/death in individuals with acute opportunistic infections: a multicenter randomized strategy trial. *PloS one* 4: e5575

Zoufaly A, Stellbrink HJ, Heiden MA, Kollan C, Hoffmann C, van Lunzen J, Hamouda O (2009) Cumulative HIV viremia during highly active antiretroviral therapy is a strong predictor of AIDS-related lymphoma. *JID* 200: 79-87

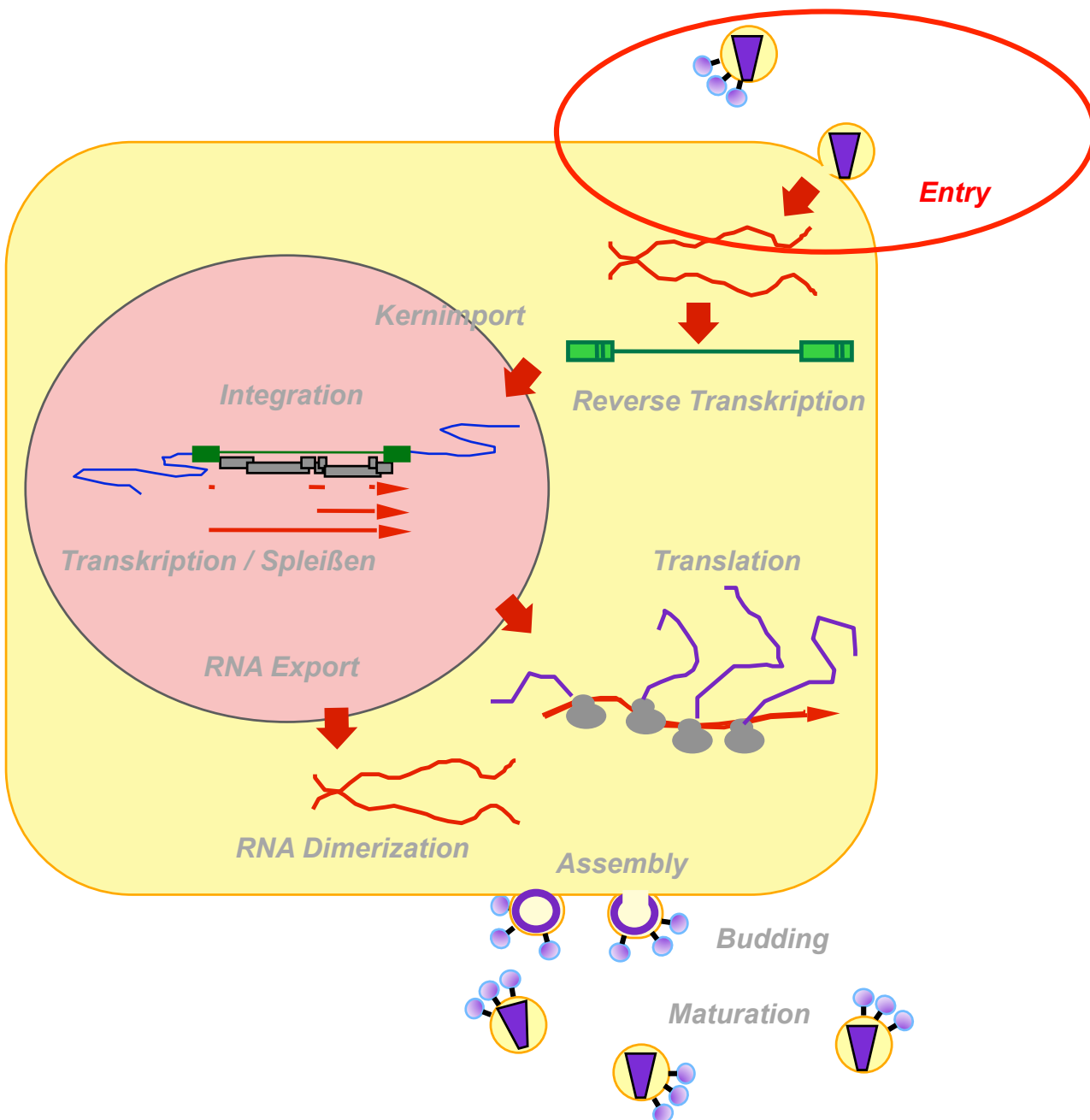
Graphik auf Seite 3 (Abbildung auf dem Titelblatt): http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ee/AIDS_and_HIV_prevalence.svg

Graphik auf Seite 7 (Abbildung 3): <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9e/HIV-timecourse-de.svg>

2

Bindung an die Zelle und Viruseintritt

Kristina Ulrich



Inhaltsverzeichnis

Einleitung	32
Pathophysiologie der Infektion	32
Immunzellen	33
Zellrezeptoren	34
HIV-1-Tropismus	35
Virale Eintrittskomponenten	35
Eintritt in die Zelle	36
Rolle der Dendritischen Zellen in der HIV-1-Infektion	36
HIV-1 und Makrophagen	37
Makropinocytose	38
Fragen	39
Antworten	39
Klausurfragen	40
Literatur	40

Einleitung

Der Replikationszyklus des HIV-1 beginnt mit der Bindung des „Envelope“ Proteins (Env) an bestimmte Oberflächenmoleküle der Wirtszelle. Durch Membranfusion dringt das Virus in die Wirtszelle ein, wo es entpackt wird, damit die Virus-RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden kann. Nur als DNA kann das Virusgenom in das Wirtsgenom integriert werden. Zelluläre Mechanismen exprimieren auf diese Weise virale Proteine, die sich zu einem neuen Virion formen, welches die Zelle verlässt und sich zum reifen HIV-1 entwickelt (Modrow, Falke et al. 2010).

Pathophysiologie der Infektion

HIV-1 ist in der Lage CD4+-Zellen zu infizieren. CD steht für „Cluster of Differentiation“ und stellt zell-typische Oberflächenproteine dar. Sie erfüllen unterschiedliche Aufgaben, wie z.B. Signalweiterleitung in das Zellinnere nach Bindung eines Liganden oder sind enzymatisch aktiv (Abbas, Lichtman et al. 2012). Zu den CD4-exprimierenden Zellen gehören T-Helferzellen, Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) (Pope, Betjes et al. 1994). T-Helferzellen haben die Aufgabe das angeborene und adaptive Immunsystem bei der Immunantwort miteinander zu vernetzen. Makrophagen nehmen Pathogene auf und verdauen sie im Zellinneren. Die wichtigste Aufgabe der DC's ist die Antigenpräsentation an T- und B- Zellen. Die Aufgaben der von HIV-1 infizierten CD4-positiven Immunzellen (siehe Kasten: Immunzellen) machen deutlich, warum das Virus eine Immunschwäche, besser bekannt als AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), verursacht (Abbas, Lichtman et al. 2012).

HIV-1 wird, je nach Übertragungsweg, von DC's, die sich in der Mukosa befinden, aufgenommen und in die sekundären Lymphorgane transportiert. Dort kann das Virus über Zell-Zell-Kontakt andere Zellen infizieren. Dies erfolgt über sogenannte Chemokinrezeptoren, die auf Wirtszellen exprimiert werden (Pope, Betjes et al. 1994).

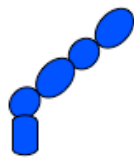
Immunzellen

T-Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems und entstehen im Knochenmark aus einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle. Unreife T-Lymphozyten wandern aus dem Knochenmark in den Thymus, in welchem sie als Thymozyten bezeichnet werden, und reifen dort heran. Thymozyten durchlaufen vier doppelnegative Stadien, in denen sie weder CD4 noch CD8 exprimieren (CD4- und CD8-). Im weiteren Verlauf entwickeln sie sich zu doppelpositiven Thymozyten (CD4+ und CD8+) und reifen weiter heran, bis sie entweder CD4 oder CD8 exprimieren. Ab dem Reifungsstadium im Thymus entwickeln sie zudem einen $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor (TCR). T-Zellen, die diesen TCR-Typ haben, werden als $\alpha\beta$ -T-Zellen bezeichnet. Zusätzlich existieren $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, welche den $\gamma\delta$ -TCR auf ihrer Oberfläche exprimieren. Sie sind vor allem in der Mukosa des Darms zu finden und stellen die erste Immunabwehr des Menschen nach der Geburt dar. Nach der Reifung wandern die naiven T-Zellen aus dem Thymus in die Peripherie. Nach Aktivierung durch ein Antigen, differenzieren naive T-Zellen zu induzierten regulatorischen T-Zellen, Effektorzellen und Gedächtniszellen aus. Sie unterscheiden sich untereinander in der Oberflächenmolekülexpression und Cytokin- und Chemokinsekretion. Einen weiteren Zelltyp der T-Zell Linie stellen Natürliche Killer-T-Zellen (NKT) dar. Sie exprimieren die Oberflächenmoleküle CD3 (typisch für T-Zellen) und NK1.1 (typisch für Natürliche Killer-Zellen). Im Zusammenhang mit HIV-1 sind CD4+-T-Helferzellen von besonderem Interesse. Diese T-Zell-Population differenziert nach Präsentation eines Antigens auf MHC-II-Molekülen durch Antigenpräsentierende Zellen, wie den DC's und Makrophagen, zu folliculären T-Helferzellen (TFH), T1-Helferzellen (TH1), T2-Helferzellen (TH2), T17-Helferzellen (TH17) und induzierten Regulatorischen T-Helferzellen (TiReg). TFH-Zellen induzieren die sogenannte Keimzentrum-Reaktion, welche die Differenzierung von B-Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Plasmazellen initiiert. TH1-Zellen stellen die Abwehr gegen Viren und Bakterien dar. Sie aktivieren Makrophagen, welche ihrerseits wie TFH-

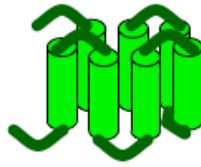
Zellen B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen. TH2-Zellen spielen bei Befall durch Helminthen (Würmer) eine große Rolle. Sie stimulieren B-Zellen zur Produktion von Immunoglobulin-E (IgE). Dieser Antikörper bindet an Helminthen und gleichzeitig an Eosinophile, welche dadurch Substanzen sezernieren, die den Wurm töten. TH17-Zellen vermitteln die Abwehr gegen Pilze und Bakterien durch Rekrutierung von Neutrophilen. Sie nehmen den Erreger auf und machen ihn durch Verdauen unschädlich. Damit die Immunreaktion adäquat verläuft, bedarf es TiReg-Zellen. Sie regulieren die Inflammation, indem sie Effektorzellen inhibieren.

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie entstehen im Knochenmark, welches sie als Monozyten verlassen. Zirkulierende Monozyten wandern in umliegendes Gewebe ein und werden dort von bestimmten Wachstumsfaktoren oder stimulatorischen Molekülen aktiviert, wodurch sie zu Makrophagen heranreifen. Je nach Gewebe haben reife Makrophagen spezielle Bezeichnungen erhalten. So heißen Makrophagen im zentralen Nervensystem Mikroglia, in der Leber Kupffer'sche Zellen und im Knochen Osteoklasten. Makrophagen sind in der Lage Erreger zu internalisieren und ihre Antigene auf MHC-Molekülen den T- und B-Lymphozyten zu zeigen und sie so zu aktivieren. Sie werden von TH1-Zellen zur Sekretion proinflammatorischer Cytokine stimuliert, welche Epithelzellen aktivieren. Das führt zur erhöhten Gefäßpermeabilität und Adhäsion für Leukozyten, sodass sie durch Cytokine und Chemokine aus Makrophagen zum Infektionsherd mobilisiert werden. Durch Aktivierung über Interleukin-13 (aus TH2-Zellen) sorgen Makrophagen für Wundheilungsprozesse und haben zudem einen anti-inflammatorischen Effekt.

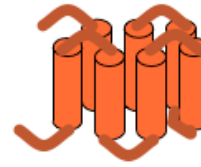
Dendritische Zellen (DC's) sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems. Sie entstehen aus einer myeloiden Vorläuferzelle, die sie mit Makrophagen gemeinsam haben, im Knochenmark. Man findet DC's in nahezu allen Organen. Den Großteil stellen konventionelle DC's dar (cDC's). Sie sind diejenigen DC's, die Pathogene aufnehmen und in



CD4



CCR5



CXCR4

Struktur	Vier Immunoglobulin-like Domänen	Transmembranprotein (7 Domänen) aus der Gruppe der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren;	
Funktion	Signal- und Adhäsionscorezeptor auf MHC-II-restringierten T-Helferzellen	Chemokinrezeptor für CCL3 (MIP1- α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES)	Chemokinrezeptor für CXCL12 (SDF-1)
Expression	T-Helferzellen, Makrophagen, Dendritische Zellen	Makrophagen, T-Helferzellen, T-Gedächtniszellen, unreife Dendritische Zellen, Granulozyten	naive aktivierte T-Helferzellen, Makrophagen, Dendritische Zellen, B-Zellen, Plasmazellen

Abbildung 2.1: Rezeptoren und Corezeptoren für HIV-1-Bindung (nach Esté, 2007).

sekundäre Lymphorgane (Milz, Lymphknoten) migrieren, um dort Antigene den T-Lymphozyten zu präsentieren (Satpathy, Wu et al. 2012). Eine weitere Population von DC's stellen die folliculären Dendritischen Zellen dar (fDC's). Sie befinden sich in Follikeln der sekundären Lymphorgane und sind für die Keimzentrum-Reaktion von großer Bedeutung. Im Gegensatz zu cDC's entwickeln sich fDC's aus einer mesenchymalen Vorläuferzelle. Sie nehmen Antigene im Komplex mit Antikörpern oder Komplementsystembestandteilen über Komplementrezeptoren auf und zeigen sie den B-Lymphozyten (van Nierop and de Groot 2002). cDC's durchlaufen nach Antigenaufnahme einen Reifungsprozess. Aus einer unreifen DC (iDC) wird eine reife DC (mDC), die sich untereinander in Oberflächenmolekülexpression und Funktion unterscheiden. Eine mDC ist nicht mehr in der Lage Antigene aufzunehmen. Ihre Spezialisierung liegt nun vielmehr in der effektiven Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung. Dazu

exprimiert sie mehr Corezeptoren und Adhäsionsmoleküle für T-Zellen und erhöht gleichzeitig die Halbwertszeit ihrer MHC-Moleküle. Das alles sorgt für eine optimale Antigenpräsentation (Murphy, Travers et al. 2009, Abbas, Lichtman et al. 2012, Satpathy, Wu et al. 2012).

Zellrezeptoren

Klatzmann und Kollegen konnten 1984 zum ersten Mal zeigen, dass HIV-1 bevorzugt CD4+-Zellen infiziert (Klatzmann, Barre-Sinoussi et al. 1984). Es blieb jedoch die Frage, warum das HIV-1 nach CD4-Transfektion in Mäusen dennoch nicht mit der Wirtszellmembran fusionieren konnte (Maddon, Dalgleish et al. 1986). Es mussten also weitere Faktoren beteiligt sein, sogenannte Corezeptoren. Einer der beiden Corezeptoren, CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4), wurde im Jahr 1995 von Feng und Kollegen entdeckt. Sie haben in vitro beobachtet, dass nur Zellen, die transient CD4 und CXCR4 exprimierten, mit transient HIV-1-Env expri-

mierenden Zellen fusionierten (Feng, Broder et al. 1996). Dennoch war nicht geklärt, warum nicht alle HIV-1-Isolate in der Lage waren mit Hilfe dieses Corezeptors Wirtszellen zu infizieren. Ein Jahr später wurde ein weiterer Corezeptor, CCR5 (CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5), identifiziert, als herausgefunden wurde, dass die Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5 die Membranfusion zwischen Virus und Wirtszelle, welche CCR5 exprimierte, verhindern konnten (Deng, Liu et al. 1996).

Die natürliche Funktion von CCR5 und CXCR4 ist die Leukozytenrekrutierung zum Infektionsherd. Sie binden unterschiedliche Chemokine, wodurch sich die Zelle entlang eines chemischen Gradienten durch den Organismus bewegen kann (Abb.2.1) (Abbas, Lichtman et al. 2012).

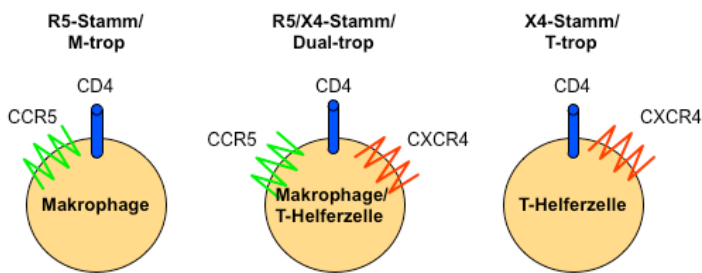


Abbildung 2.2 HIV-1-Tropismus. Abgebildet sind die Zielzellen mit den von HIV-1 genutzten Rezeptoren.

Einige Bevölkerungsgruppen weisen eine Mutation im CCR5-Gen auf. Personen, die homozygot für diese Mutation sind, besitzen eine Resistenz gegenüber R5-Isolaten. Sie können jedoch immer noch mit einem X4-Stamm infiziert werden. Bei der Mutation handelt es sich um eine Deletion von 32 Basenpaaren (CCR532) innerhalb des Gens. Dies führt zur Verschiebung des Leserrasters und zur Synthese eines nichtfunktionellen Proteins (Dean, Carrington et al. 1996). Diese Mutation hat in der europäischen Bevölkerung eine Allelfrequenz von 10% und wurde vermutlich vor knapp 3500 Jahren durch Variola major (Echte Pocken) positiv selektioniert (Galvani and Slatkin 2003). Die nichtfunktionelle Form des CCR5 soll zudem vor einem chronischen Verlauf der Hepatitis-B-Infektion schützen und zu einer Genesung führen (Thio, Astemborski et al. 2007).

HIV-1-Tropismus

Im Verlauf der Infektion ändert sich oft der Korezeptortropismus (Abb. 2.2). Im frühen Stadium dominiert der sogenannte R5-Stamm, der auch als M-trop bezeichnet wird. Er infiziert Makrophagen über CCR5. Im späteren Verlauf wird der R5-Stamm im Rahmen eines Tropismuswechsels vom X4-Stamm ersetzt. Letzterer wird auch als T-trop bezeichnet. Er infiziert T-Helferzellen über CXCR4. Das führt zur schnellen Abnahme von CD4-Zellen und letztendlich zu AIDS.

Zudem gibt es Stämme, die sowohl CCR5 als auch CXCR4 nutzen können. Sie werden als R5/X4- Stämme oder als Dual-trop bezeichnet. Man geht davon aus, dass sie einen Übergang zwischen dem R5- und X4-Stamm darstellen (Berger, Doms et al. 1998). Der Tropismus geht auf eine Zunahme der positiven Ladungen im sogenannten V3-loop zurück, der sich im Env-Protein befindet (siehe „Virale Eintrittskomponenten“). Der Grund dafür ist, dass HIV-1 mit einer kationischen V3-Aminosäurezusammensetzung bevorzugt an negativ geladene Heparansulfate auf der T-Zelloberfläche bindet (Hartley, Klasse et al. 2005).

Virale Eintrittskomponenten

Das essentielle Protein für die Bindung des Virus und den Eintritt in die Zielzelle, ist das Hüllprotein Env, welches vom env Gen kodiert wird (Abb.2.3 und Kapitel 6&7). Während des Replikationszyklus in einer Wirtszelle entsteht zunächst ein Vorläuferprodukt, das Glycoprotein gp160. Es wird anschließend im Endoplasmatischen Retikulum glykosyliert und im Golgi-Apparat von der Furin-like Protease in ein externes Glycoprotein (gp120) und ein Transmembranprotein (gp41) gespalten, die als nicht-kovalente Heterodimere zusammen bleiben (Klasse 2012). Das Besondere am gp120 sind neben fünf hochkonservierten Bereichen (C1-C5), seine fünf Variablen Domänen, die sogenannten variablen Loops (V1-V5) und ein Glykosylierungsmuster, das innerhalb der HIV-1-Isolate variiert. Dies macht es HIV-1 möglich dem Immunsystem zu entkommen, indem die Antikörper-

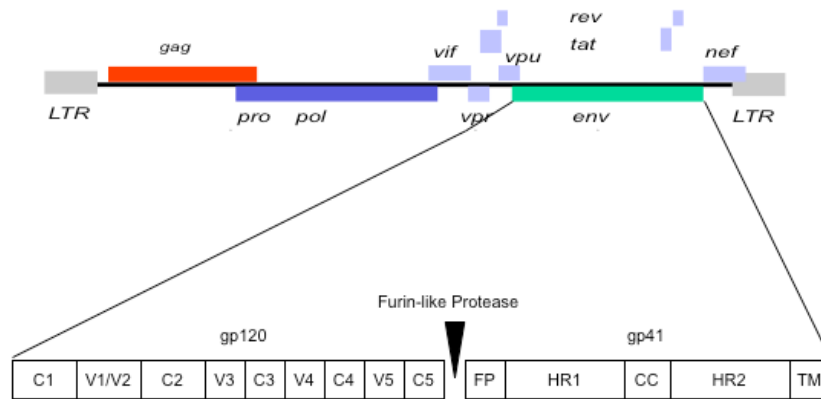


Abbildung 2.3 HIV-1 Glykoproteine. Die Synthese erfolgt aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein gp160 (hier nicht gezeigt), welches im Endoplasmatischen Retikulum von der Furin-like Protease in gp120 und gp41 gespalten wird.

bindung aufgrund von Mutationen in den variablen Loops und unterschiedlicher Glykosylierungsmuster gehemmt wird (Modrow, Falke et al. 2010).

Das gp41 besteht aus einer extrazellulären Ectodomäne (N-Terminus), einer Transmembrandomäne (TM) und einer intrazellulären Endodomäne (C-Terminus) (Gallagher, Ball et al. 1989, Kilby and Eron 2003). In der Ectodomäne befinden sich diejenigen Komponenten, die bei der Membranfusion die wichtigste Rolle spielen. (A) Das Fusionspeptid (FP), welches einen hydrophoben Kern, bestehend aus den Aminosäuren LFLGFL besitzt, inseriert dadurch in die Zellmembran. (B) Die Heptad-Repeats 1 und 2 (HR1, HR2). Sie verleihen dem gp41 eine Hairpin-Konfiguration und sorgen für die Formation des Sechs-Helix-Bündels während der Membranfusion. Durch Disulfidbrücken zwischen HR1 und HR2 ist gp41 nicht-kovalent an gp120 gebunden (Gallagher, Ball et al. 1989, Kilby and Eron 2003).

Eintritt in die Zelle

Der Eintritt des HIV-1 in die Wirtszelle ist pH-unabhängig und erfolgt in drei Schritten: Bindung des Virus an die Zelle, gefolgt von einer Interaktion mit Corezeptoren der Zelle und schlussendlich die Membranfusion (Abb. 2.4).

Die erste HIV-1-Zellinteraktion erfolgt über Env mit unspezifischen Oberflächenmolekülen wie Hapernsulfaten oder Integrinen. Env kommt auf diese Weise in

Rezeptornähe und bindet im ersten Schritt über die C3 Region des gp120-Trimers hoch-affin an das zelluläre CD4. Die Bindung löst eine Strukturänderung im gp120-Trimer aus, sodass die variablen Loops 1, 2 und 3 nach Außen gedreht und Bindungsstellen für den Corezeptor frei werden (Abb. 2.4). Zusätzlich entsteht zwischen V1/V2 und V3 ein sogenanntes Bridging-Sheet, das eine Formation aus 2 doppelsträngigen β -Faltblättern darstellt. Der N-Terminus des Corezeptors erreicht das Bridging-Sheet, sodass die Spitze des V3 und der zweite extrazelluläre Loop des Corezeptors (E2) nebeneinander stehen. Die Bindung an den Corezeptor lockert die nicht-kovalente Bindung zwischen gp120 und gp41 auf, worauf gp41 freigelegt wird. Das Fusionspeptid des gp41 wird in die Zellmembran als eine Art Anker inseriert und HR1 und HR2 falten sich zu einem Sechs-Helix-Bündel. Da HR2 nahe der Virusmembran und HR1 nahe der Zellmembran liegt, bringen sie beide Membranen in unmittelbare Nähe, sodass eine Fusionspore in der Zellmembran entsteht. Die Pore ist jedoch metastabil und es bedarf mehrerer Env-Trimere, die mit der Zellmembran interagieren, um eine stabile und effektive Membranfusion zu vollziehen (Kilby and Eron 2003, Melikyan 2008, Klasse 2012).

Rolle der DC's in der HIV-1-Infektion

DC's sind die Aktivatoren des adaptiven Immunsystems. Sie exprimieren CD4, CCR5 und CXCR4 auf ihrer Oberfläche, jedoch in geringerer Menge als T-Helferzellen oder Makrophagen. Interessant ist, dass HIV-1 haupt-

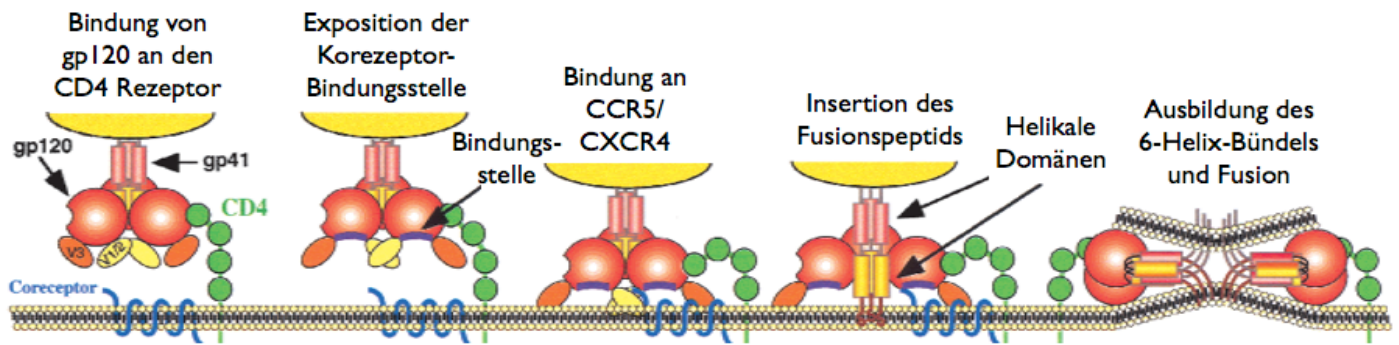


Abbildung 2.4 Viruseintritt. gp120 bindet an CD4. Dies hat die Exposition der Corezeptorbindungsstellen des gp120 zur Folge. Es kommt zur Ko-Rezeptorbindung und der Insertion des Fusionspeptids des gp41 in die Zellmembran. Es bildet sich ein 6-Helix-Bündel, welches in sich zusammenklappt, sodass die Membranen der Zelle und des Virus miteinander fusionieren (Doms and Tro- no 2000; genehmigt von Cold Spring Harbor Laboratory Press).

sächlich unreife DC's produktiv, aber weniger effektiv im Vergleich zu T-Helferzellen oder Makrophagen infizieren kann. Reife DC's stellen hingegen ein Reservoir für Viren dar und spielen daher bei der Latenzphase der Infektion eine Rolle.

Die Infektion der iDC's erfolgt, wenn HIV-1 an CD4 und je nach Stamm an den jeweiligen Corezeptor bindet. Das Virus repliziert, während die iDC in den Lymphknoten einwandert, sodass neue Viren T-Helferzellen infizieren können.

HIV-1 kann auch indirekt an Fc-Rezeptoren der iDC binden. Dies sind Oberflächenmoleküle, an welche Antikörper binden, die ihrerseits Pathogene gebunden haben. Das Virus wird auf diese Weise samt Antikörper internalisiert und abgebaut. Über Proteinprozessierung können Teile des abgebauten Virus als Antigene auf MHC-Komplexen (Major Histocompatibility Complex; siehe Kapitel „Nef-Rezeptor Modulation“) den naiven T- und B-Zellen präsentiert werden, worauf eine Immunantwort eingeleitet wird.

HIV-1 ist zudem in der Lage an „Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin“ (DC-SIGN) zu binden. Über diesen Weg wird es in einem Kompartiment mit niedrigem pH-Wert internalisiert, in welchem es dennoch infektiös bleibt, bis die DC in den Lymphknoten gelangt. Durch die DC-T-Zell-Interaktion gelangt das Virus an die Oberfläche und kann die T-Helferzelle infizieren (Fortis and Poli 2005).

HIV-1 und Makrophagen

Wenn man eine elektronenmikroskopische Aufnahme von der Interaktion zwischen HIV-1 und Makrophagen *in vitro* betrachtet, stellt man fest, dass HIV-1 nicht nur über den bereits oben besprochenen Rezeptor/Corezeptor-abhängigen Weg in die Zelle eindringt, sondern auch über die Endocytose, genauer gesagt, die Makropinocytose (siehe Kasten: Makropinocytose). Die Makropinocytose bedarf keiner Env-Zellrezeptor-Interaktion. Die Zelle umschließt das Virus durch eine Membranausstülpung und schleust es via Makropinosom in die Zelle ein. Da Makropinocytose, wenn kein Makropinosom-Recycling an der Plasmamembran stattfindet, mit der Fusion eines Lysosoms endet, werden viele aufgenommene Viren dadurch abgebaut und unschädlich gemacht. Die Makrophage kann auf diese Weise, ähnlich der DC, Teile des abgebauten Virus als Antigene auf MHC-Komplexen den naiven T- und B-Lymphozyten präsentieren, wodurch eine Immunantwort eingeleitet wird. Doch das Virus kann über den Env-vermittelten Eintrittsweg dem Makropinosom und dem lysosomalen Abbau entfliehen. Es nutzt dabei die Rezeptoren und Corezeptoren der Plasmamembran, die bei der Makropinosombildung ebenfalls eingestülpt wurden und interagiert mit ihnen wie bereits beschrieben. Es kommt zur Membranfusion und das Virus verlässt das Kompartiment, um seinen Replikationszyklus fortzuführen und die Makrophage so zu infizieren (Marechal, Prevost et al. 2001, Mercer and Helenius 2009).

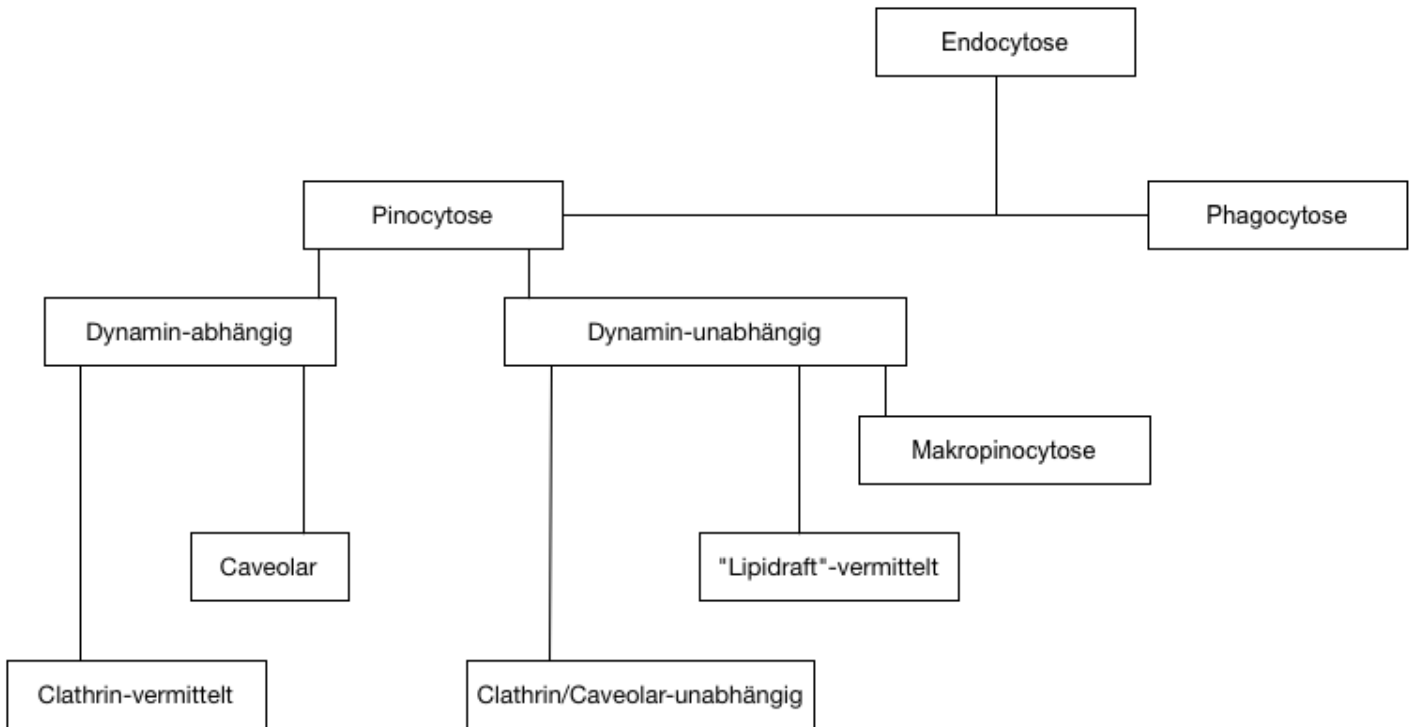


Abbildung 2.5: Endozytische Vorgänge und ihre Untergliederung.

Makropinocytose

Makropinocytose ist ein endocytotischer Vorgang, mit deren Hilfe extrazelluläre Partikel internalisiert werden können. Neben der Makropinocytose existiert eine ganze Reihe von endocytotischen Wegen (Abb. 2.5). Sie dienen zur Nährstoffaufnahme, Erregerinternalisierung und Fortbewegung. Die Makropinocytose wird von Signalen, die durch Bindung eines Wachstumsfaktors an einen Membranrezeptor ausgelöst werden, induziert. Dies hat eine Signalkaskade zur Folge, welche die Dynamik des Aktin-Filamentes verändert. Aktin ist ein globuläres Protein und kann als Monomer (G-Aktin) oder Polymer bzw. Filament (F-Aktin) vorliegen. Aktin-Filamente treten mit Myosin in Wechselwirkung und bilden so das Mikrofilament aus, welches kontraktile Eigenschaften besitzt. Diese werden vor allem in den Muskelzellen deutlich. In nicht-Muskelzellen ist es für die Kontraktion bestimmter Zellbereiche zuständig und sorgt für die Fortbewegung der Zelle.

Mit Hilfe des Aktins bildet die Zelle eine wellenförmige Ausstülpung der Plasmamembran aus, welche den extrazellulären Raum umschließt und ein Makropinosom bildet (Abb. 2.6). Diese großen und unförmigen Einschlüsse werden entlang der Mikrotubuli in das Zellinnere transportiert. Mikrotubuli sind röhrenförmige Konstrukte, welche aus α - und β -Tubulin, einem globulären Protein, bestehen. Sie haben die Aufgaben die äußere Zellform herzustellen, den Transport von Vesikeln zu manövrieren, die Zellorganellen zu positionieren und die Kernteilungsspindel aufzubauen.

In Makrophagen durchlaufen Makropinosome unterschiedliche Stadien: sie entwickeln sich zu „Early“-, dann zu „Late“-Endosomen und fusionieren schließlich mit Lysosomen. Diese besitzen einen hohen pH-Wert und beinhalten hydrolytische Enzyme. Ein Teil der Makropinosome wird wieder an der Plasmamembran recycelt.

Im Gegensatz zur Makropinocytose, wird die Phagocytose vom zu internalisierenden Partikel eingeleitet und

verleiht dem Phagosom seine Form. Das Partikel ist an einen Antikörper gebunden, welcher an einen Fc-Rezeptor auf der Zelle bindet. Der Komplex aus Partikel und Antikörper wird aufgenommen und fusioniert zuletzt mit einem Lysosom.

Der aufgenommene Komplex wird dadurch abgebaut (Pollard and Earnshaw 2007).

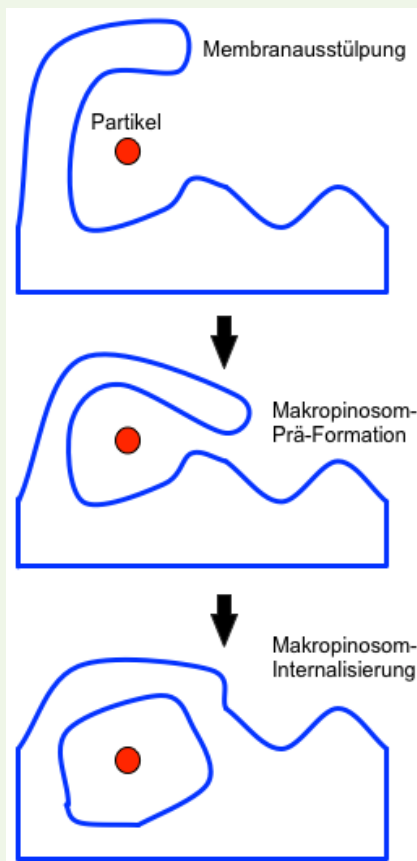


Abbildung 2.6: Aktinabhängige Makropinosombildung.

Fragen

1. Welche Zahl an CD4+ Zellen findet man bei einem gesunden Menschen und ab welcher Zahl beginnt die Therapie eines HIV-infizierten Patienten?

2. Welche Rolle spielt die Tyrosinkinase p56 lck beim Entry von HIV-1? Mit welchem Molekül interagiert diese an der Zellmembran? Welche Bedeutung hat dieses Molekül für Attachment und Entry von HIV-1?
3. Zu welcher Rezeptor-Gruppe gehören die Corezeptoren von HIV-1?
4. Was versteht man unter Tropismus? Welche Determinante entscheidet über den HIV-Tropismus? Nennen Sie zwei für HIV-1 bekannte Tropismen, die entsprechenden Determinanten und die Bezeichnung der Stämme.
5. Welchen HIV-Tropismus erwartet man zu Beginn einer Infektion, welchen in einer späteren Phase? Warum erfolgt ein Wechsel?
6. In welcher Form wird das HIV-1 Hüllprotein synthetisiert? Durch welches Enzym (Name, Enzymklasse, Herkunft) wird es gespalten? Welche Untereinheiten entstehen dabei? Welche Funktion übernimmt das Signalpeptid?
7. Welche Form von Modifikationen weist das Hüllprotein auf und warum ist diese wichtig?
8. Beschreiben Sie kurz den Entry-Mechanismus von T-tropen HI-Viren.
9. Nennen Sie zwei Entry-Inhibitoren und deren Nachteile.
10. Wodurch können Menschen eine Resistenz gegen HIV-Infektionen besitzen? Wo tritt dies (geographisch) besonders häufig auf?

Antworten

1. Gesund: 600-800 Zellen/ μl . Therapiebeginn in Europa: ab < 350 Zellen/ μl ; Afrika ab < 250 Zellen/ μl .
2. lck spielt für Attachment und Entry keine Rolle. Sie interagiert mit CD4, den Rezeptor für HIV-1.

3. Chemokin-Rezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen).
4. Tropismus: Fähigkeit eines Virus eine bestimmte Sorte von Zellen oder bestimmte Gewebe zu infizieren und sich dort zu vermehren. Die entscheidende Determinante ist (neben dem Rezeptor) der Corezeptor. M-trop: infizieren Makrophagen, Determinante CCR5 („R5 Stämme“). T-trop: infizieren T-Zellen, Determinante CXCR4 („X4 Stämme“).
5. Früh: M-trop; spät T-trop. Wechsel erfolgt, weil Makrophagen-Pool deletiert ist.
6. Synthese als gp160-Vorläuferprotein. Spaltung durch zelluläre Furin-like Proteasen. Untereinheiten: Signalpeptid (SP), surface subunit (SU), transmembrane subunit (TM) mit Fusionspeptid (FP). Funktion SP: Transportsignal zum ER.
7. Glykosylierungen dienen zur Variation des Hüllproteins, Wechsel im Glykosylierungsmuster werden von Antikörpern des Immunsystems schwerer erkannt (dient also der Immunevasion).
8. Bindung von SU an CD4; Konformationsänderung und Exposition der Corezeptor-Bindestelle. Bindung von SU an CXCR4; Konformationsänderung und Exposition des Fusionspeptides. FP inseriert in die Wirtszellmembran. Ausbildung der 6-Helix Bündel. Membranfusion.
9. Enfuvirtid (T20): sehr teuer, schlechte Handhabung (subkutane Injektion), Kühlungsbedarf, niedrige genetische Schwelle (Resistenzentwicklung bereits bei einer Mutation). Maraviroc: sehr teuer, lebertoxisch, Selektion auf T-trope HIV-1 Stämme.
10. CCR5 Mutation (Deletion von 32 bp); v.a. Skandinavien.

Klausurfragen

1. Beschreiben Sie den Entry-Prozess von HIV in die Zelle. Geben Sie dazu auch die Rezeptoren und Corezeptoren an.

Was bewirkt das Fusionspeptid und wie wirkt der Fusionsinhibitor T20. Was wird in das Zytoplasma freigesetzt?

2. Beschreiben Sie die retrovirale Pol- (siehe Kapitel 6) und Env-Expression. Wie wird die Menge von Pol und Env reguliert. Welche zellulären Prozesse sind für die Pol- und Env-Menge entscheidend? Geben Sie die viralen Faktoren für die Pol- und Env-Expression an (2. Mechanismen). Wie wird das Pol- und Env-Protein prozessiert?
3. Beschreiben Sie Experimente, um die genutzten Corezeptoren bei einem HIV-Isolat zu bestimmen.

Literatur

Abbas, A. K., et al. (2012). Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, Elsevier Saunders.

Dean, M., et al. (1996). "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study." *Science* 273(5283): 1856-1862.

Deng, H., et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." *Nature* 381(6584): 661-666.

Doms, R. W. and D. Trono (2000). "The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield." *Genes Dev* 14(21): 2677-2688.

Feng, Y., et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." *Science* 272(5263): 872-877.

Fortis, C. and G. Poli (2005). "Dendritic cells and natural killer cells in the pathogenesis of HIV infection." *Immunologic Research* 33(1): 1-21.

Gallagher, W. R., et al. (1989). "A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses." *AIDS Res Hum Retroviruses* 5(4): 431-440.

Galvani, A. P. and M. Slatkin (2003). "Evaluating plague and smallpox as historical selective pressures for the CCR5-Delta 32 HIV-resistance allele." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15276-15279.

Hartley, O., et al. (2005). "V3: HIV's switch-hitter." *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(2): 171-189.

Kilby, J. M. and J. J. Eron (2003). "Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry." *N Engl J Med* 348(22): 2228-2238.

Klasse, P. J. (2012). "The molecular basis of HIV entry." *Cell Microbiol* 14(8): 1183-1192.

Klatzmann, D., et al. (1984). "Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes." *Science* 225(4657): 59-63.

Maddon, P. J., et al. (1986). "The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain." *Cell* 47(3): 333-348.

Marechal, V., et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis." *J Virol* 75(22): 11166-11177.

Melikyan, G. B. (2008). "Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm." *Retrovirology* 5: 111.

Mercer, J. and A. Helenius (2009). "Virus entry by macropinocytosis." *Nat Cell Biol* 11(5): 510-520.

Modrow, S., et al. (2010). *Molekulare Virologie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

Murphy, K., et al. (2009). *Janeway Immunologie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

Pollard, T. D. and W. C. Earnshaw (2007). *Cell Biology*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.

Pope, M., et al. (1994). "Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1." *Cell* 78(3): 389-398.

Satpathy, A. T., et al. (2012). "Re(de)fining the dendritic cell lineage." *Nat Immunol* 13(12): 1145-1154.

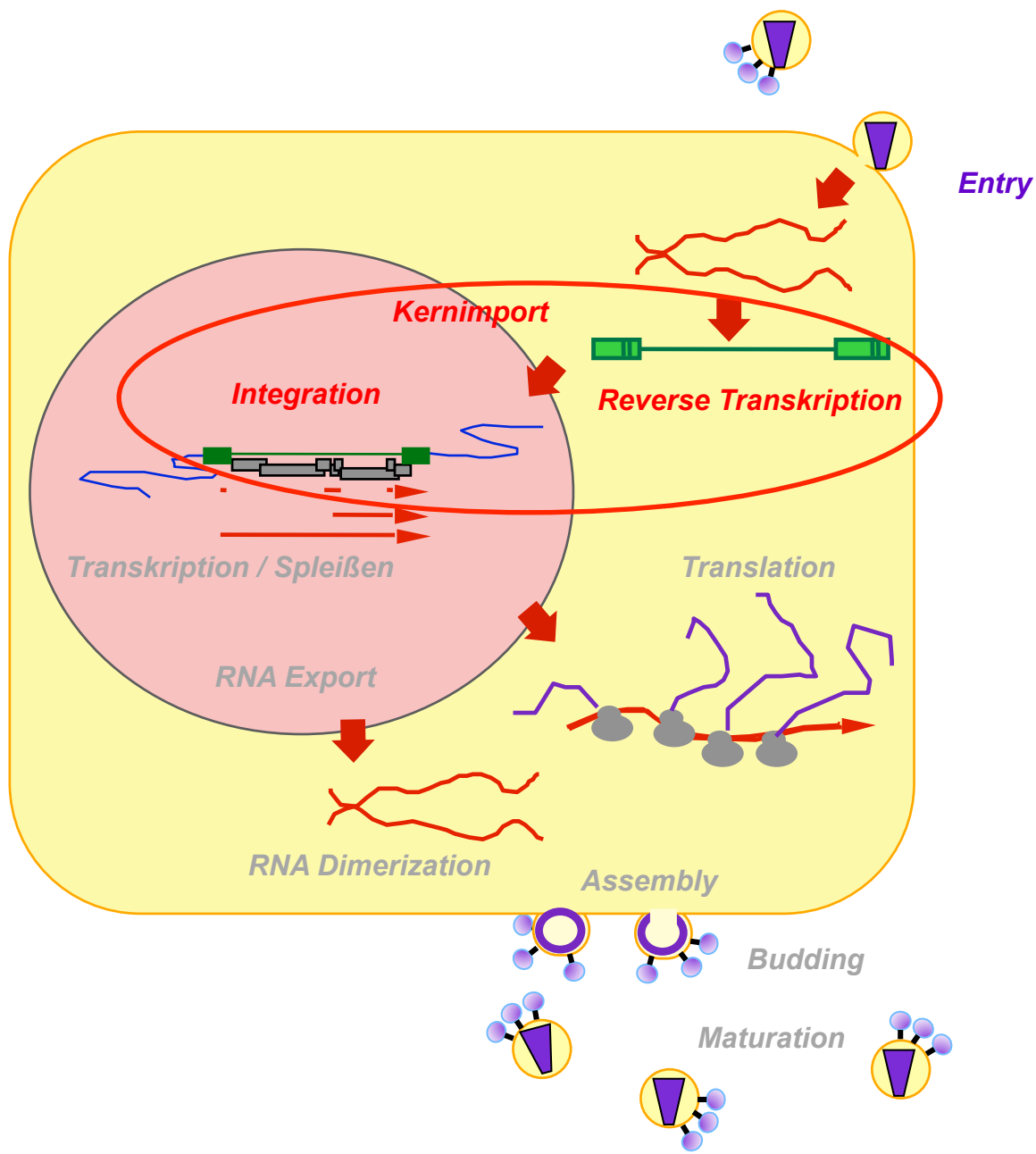
Thio, C. L., et al. (2007). "Genetic protection against hepatitis B virus conferred by CCR5Delta32: Evidence that CCR5 contributes to viral persistence." *J Virol* 81(2): 441-445.

van Nierop, K. and C. de Groot (2002). "Human follicular dendritic cells: function, origin and development." *Semin Immunol* 14(4): 251-257.

3

Uncoating, reverse Transkription und Integration

Christian Schenk



Inhaltsverzeichnis

Einleitung	43
Uncoating	43
Die Reverse Transkriptase	44
Ablauf der reversen Transkription	44
tRNA ^{Lys3} als Primer der reversen Transkription	45
Struktur und Funktion der Domänen der reversen Transkriptase	46
Zelluläre regulatorische Faktoren der reversen Transkription	47
Reverse Transkription als antivirales Target	47
Import in den Zellkern	48
Der zellulärer Kernimport	49
Integration in das Wirtsgenom	49
Struktur der Integrase	49
Ablauf des Integrationsprozesses	50
LEDGF als regulatorischer Faktor bei der Integration in mitotische Zellen	50
Inhibition der Autointegration	51
Fragen	51
Antworten	52
Klausurfragen	52
Literatur	53

Einleitung

In diesem Kapitel geht es um den Vorgang des Uncoating, bei dem das Virus seine Capsidhülle dissoziiert. Parallel dazu wird in der reversen Transkription aus dem doppelt vorliegenden RNA-Genom des Virus eine komplementäre DNA synthetisiert. Sind diese Vorgänge korrekt abgeschlossen liegt der Prä-Integrationskomplex vor, welcher nun über zelluläre Transportmechanismen in den Zellkern transportiert werden kann. Anschließend wird das komplementäre virale DNA-Genom in das Genom der Wirtszelle integriert.

Uncoating

Nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle (vgl. Kapitel 2) liegt nun der Capsid (CA) umhüllte RT-Komplex frei im Cytoplasma der Wirtszelle vor. Dieser Komplex enthält das doppelt vorliegende RNA-Genom des humanen Immundefizienz Virus 1 (HIV-1), welches mit Nucleocapsid-Proteinen (NC) besetzt ist. Desweiteren befindet sich innerhalb dieses Komplexes noch die reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN), das virale Protein R (Vpr) sowie diverse zelluläre Proteine (Miller *et al.*, 1997). Während des Transportes zum Zellkern dissoziieren die Hüllproteine des RT-Komplex. Der Transport von der Eintrittsstelle zu den Kernporen erfolgt entlang des Zytoskeletts der Zelle. Hierzu „kapert“ das Virus die zellulären Motorproteine. Myosin VI bewegt sich entlang von Aktinfilamenten und transportiert die Fracht in Richtung der Mikrotubuli. Die Mikrotubuli werden vom Mikrotubuliorganisierendem Zentrum (MTOC) nahe des Zellkerns gebildet, Aktinfilament hingegen sind in Membrannähe assoziiert. Die Fracht, in diesem Fall das Capsid wird im Schnittbereich des Aktins und der Mikrotubuli vom Myosin VI an das Motorprotein Dynein abgegeben. Dieses transportiert dann die Fracht entlang der Tubulinfilament in Richtung Zellkern (McDonald *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2009).

Beim entstehenden Prä-Integrationskomplex (PIC) fehlen die CA als Hülle. Der eigentliche Schritt der Dissoziation der CA geschieht über ein dreigeteiltes 5-alpha Motiv Protein (TRIM5 α). Dieses gehört ähnlich wie der Apolioprotein B Editing Komplex (APOBEC) zur angeborenen zellulären Immunität gegen Viren. Wird nun die CA-Hülle zu schnell oder zu langsam durch das zelluläre TRIM5 α abgebaut, kann es nicht zu einer erfolgreichen Infektion kommen. Die Stabilität der Capsidhülle ist demnach von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Infektion der Wirtszelle. Nur wenn die Stabilität der Capsidhülle exakt stimmt kann eine korrekte Umwandlung des Capsid umhüllten RT-Komplexes zum Prä-Intergrationskomplex stattfinden (Yang *et al*, 2013; Arhel, 2010)

Die reverse Transkriptase

Ablauf der reversen Transkription

Bei der Umwandlung zum Prä-Integrationskomplex wird neben der Dissoziation der CA-Hülle aus dem RNA-Genom durch reverse Transkription eine komplementäre DNA (cDNA) gebildet (Jayappa *et al*, 2012). Als Primer für die charakteristische Reaktion der Retroviren dient bei HIV-1 die transfer-Ribonukleinsäure Lysin 3 (tRNA^{Lys3}).

An der tRNA^{Lys3} kann die reverse Transkription beginnen. Diese wird durch die virale RT, eine RNA/DNA-abhängige DNA-Polymerase, durchgeführt. DNA Polymerasen können, anders als RNA-Polymerasen, nicht ohne Primersequenz mit der Polymerisation beginnen. Die Primer-Binding-Site (PBS) liegt kurz vor der U5 Region des 5' Long-Term-Repeats (LTR) (**Abb. 3.1**). So wird nun von der tRNA^{Lys3} aus in 3'-Richtung bis zum Ende der R-Region der 5'-Seite polymerisiert. Dort stoppt die RT und fällt vom RNA-Genom ab (**Abb. 3.1**). Da die zuletzt synthetisierte R-Region im Genom ein weiteres mal mit identischer Sequenz am 3' Ende vorkommt, kann die kurze bisher transkribierte Sequenz wieder anlagert werden (Minus-Strang-Transfer).

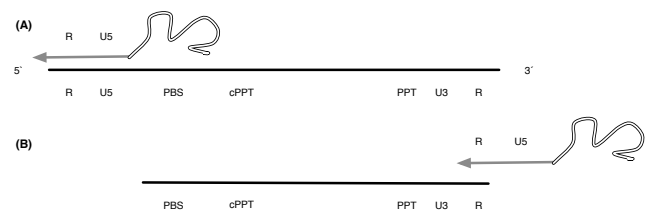


Abbildung 3.1: Ersten beiden Schritte der reversen Transkription bei Leuterin.

Die Minus-Strang DNA bindet mit der R-Region am 3'-Ende des RNA-Genoms, wohingegen die bereits synthetisierte U5-Region im Bereich des Poly(A)-Schwanzes des RNA-Templates ungebunden verbleibt (**Abb. 3.1B**). Dieser Schwanz wird im Laufe der Minus-Strang Elongation durch die RNaseH-Domäne (RH) der RT degradiert. Nun kann die RT wieder mit der Polymerisierung beginnen. Unterdessen wird durch die RH der RT das bereits synthetisierte 5'-Ende des RNA-Templates abgebaut. Der Minus-Strang-Transfer kann sowohl intra- wie auch intermolekular ablaufen, da das RNA-Genom von Retroviren im CA umhüllten RT-Komplex immer diploid vorliegt. Der Minus-Strang wird bis zur PBS synthetisiert und parallel der Rest des RNA-Templates durch die RH abgebaut. Der Polypurintrakt (PPT) nahe der U3 und der zentrale Polypurintrakt (cPPT) bleiben durch ihre RNase-stabilen Eigenschaften vor der Degradation geschützt und dienen der Gegenstrangsynthese als Primer. Von diesen Primern wird nun in 3'-Richtung des Plus-Stranges synthetisiert (**Abb. 3.2C/D**). Hier endet das DNA-Template erneut und die RT fällt vom Strang ab. Nach der Elongation bis zur PBS wird durch die RH der RT auch der RNA-Primer tRNA^{Lys3} abgespalten (**Abb. 3.2C**). Das Resultat sind zwei partiell homologe DNA-Einzelstränge, welche beide an den Enden eine PBS-Sequenz besitzen. Diese lagern sich nun intramolekular zusammen und bilden einen Ring, was als DNA-Flap bezeichnet wird (Plus-Strang-Transfer) (**Abb. 3.2E**). So kann nun das 5'-Ende des Minus-Stranges als Template für die Synthese des Plus-Stranges dienen. Wird nun die Lücke des Minus-Stranges

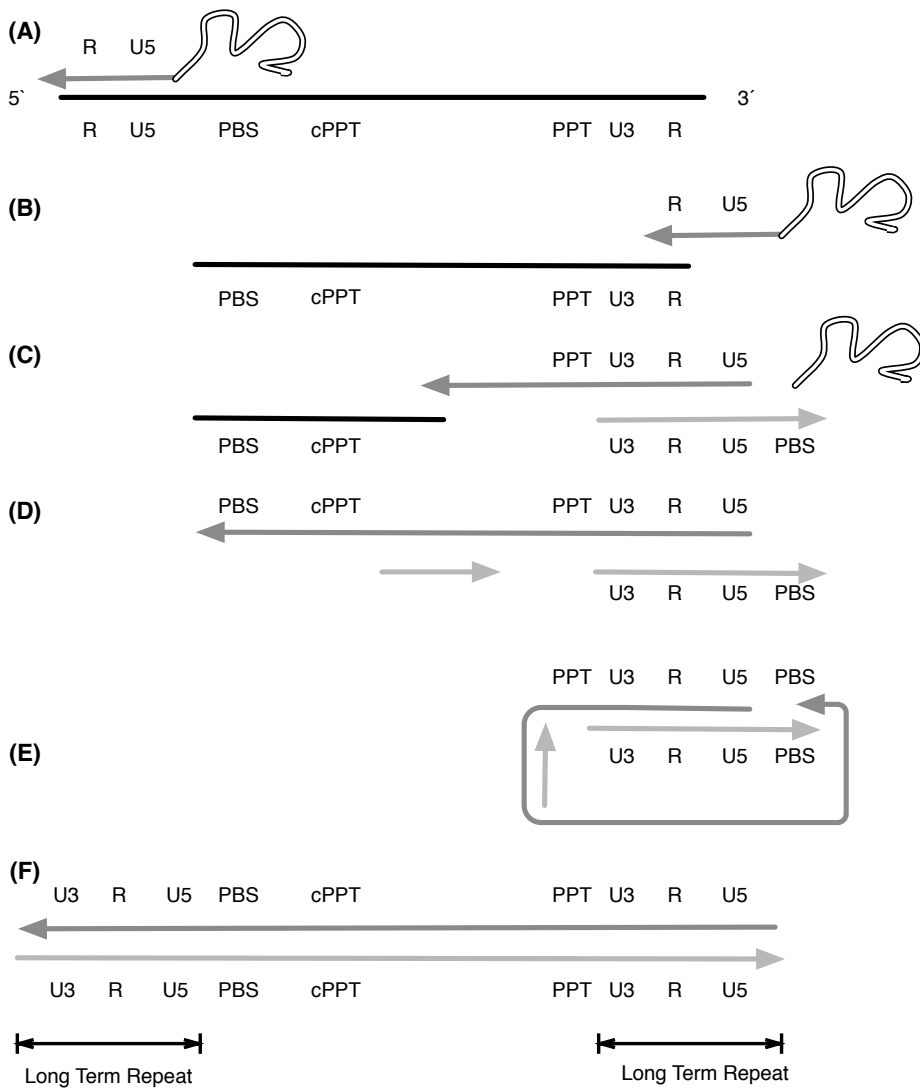


Abbildung 3.2: Schematischer Ablauf der reversen Transkription von Lentiviren.

(A) Die Umwandlung des einsträngigen RNA-Genoms in ein komplementäres doppelsträngiges DNA-Genom. Begonnen wird mit der Synthese des DNA Minusstranges an der PBS am 5'-Ende des RNA Genoms. **(B)** Beim Minusstrang-Stop wird die synthetisierte DNA zum 3'-Ende transferiert an der komplementären R-Region angelagert um so den Minusstrang komplett synthetisieren zu können. **(C und D)** Das transkribierte Template wird bis auf PPT und cPPT degradiert und diese beiden Sequenzen dienen nun als Primer für die Plusstrang Synthese. **(E)** Die homologen PBS Sequenzen des Plusstranges sowie des Minusstranges bilden einen Ring aus zur LTR Synthese. Desweiteren kann so der Plusstrang mit dem Minusstrang als Template synthetisiert werden. **(F)** Diese Struktur wird auch als DNA-Flap bezeichnet. Am Ende liegt ein komplett doppelsträngiges DNA-Genom vor mit wiederholenden Sequenzen an den Enden.

zwischen dem 5'- und dem 3'-Ende durch den vorliegenden Plus-Strang als Template von zellulären Ligasen geschlossen, so bildet sich ein geschlossener Kreis, welcher nicht mehr in das Wirtsgenom integriert werden kann. Diese cDNAs dienen nicht als Vorlage zur Transkription, so dass keine viralen Proteine exprimiert werden können. Im Normalfall entsteht sowohl am 5' wie auch am 3' Ende ein vollständiger und nukleotid-identischer Long-Term-Repeat (LTR) mit jeweils einer U3, R und U5 Region (**Abb. 3.2F**). Diese Abschnitte sind wichtig zur Integration in das Wirtsgenom, für die Transkription und Translation von viralen Proteinen (Kapitel 4) und der posttranskriptionellen Regulation durch z.B. Polyadenylierung und alternatives Spleißen (Kapitel 5).

tRNA^{Lys3} als Primer der reversen Transkription

Die tRNA^{Lys} gibt es in 3 Formen, da durch den redundanten genetischen Code die Aminosäure Lysin durch verschiedene Triplets gebildet werden kann. Für seine Primingfunktion ist dies allerdings nicht von Bedeutung, da die Region die in das virale RNA-Genom inseriert in allen Formen gleich ist. Dies ist der konservierte TΨC Arm der tRNA^{Lys}. Inkorporiert wird die tRNA durch eine Lysyl-tRNA^{Lys3} Synthetase (LsRS). Diese bindet die tRNA^{Lys3} und bewirkt durch Wechselwirkungen mit der Carboxyterminalen Domäne des Gag-Proteins sowie dem Pol-Polyprotein eine Konfirmationsänderung der Sekundärstruktur der tRNA^{Lys3}. In diese

Struktur kann der TΨC-Arm an die PBS der HIV-1-RNA rekrutiert werden (Kleiman *et al.*, 2010).

Struktur und Funktion der Domänen der reversen Transkriptase

Strukturell besteht die RT aus einem Heterodimer, der p66 sowie der p51 Untereinheiten, welche vom *pol*-Gen codiert werden (Abb. 3.3). Beide enthalten eine Polymerase-Domäne, während die p66-Untereinheit zusätzlich noch eine RH-Domäne besitzt (Abb. 3.3). Trotz ihres funktionellen katalytischem Zentrums besitzt die p51-Untereinheit nur eine stabilisierende Funktion auf die Struktur der RT, während die p66-Untereinheit sowohl die reverse Transkription wie auch die Degradation des viralen RNA Genoms übernimmt. Im Aufbau bildet die Polymerase-Domäne eine Finger-, Handfläche- und Daumenstruktur nach dem „rechte Hand Modell“ der Polymerase I aus *Escherichia coli* aus. Zusätzlich gibt es

noch eine Connection-Domäne, durch welche die beiden Untereinheiten p51 und p66 miteinander interagieren. Am anderen Ende der RNA/DNA-Eintrittsstelle liegt die RH-Domäne der p66-Untereinheit (Rodgers *et al.*, 1995). In Ausgangsposition sind Finger und Daumen nahe beieinander in der Quartärstruktur der RT. Zuerst öffnet sich die Daumen-Domäne durch Konformationsänderung und öffnet so eine Lücke in die das Matrizen-Genom eindringen kann. In dieser Form kommt auch das erste Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) zum Template und durch Umlagerung der Finger-Domäne wird ein enger Kontakt zwischen dNTP und Primer hergestellt, sodass im katalytischen Zentrum eine Phosphordiesterbindung zwischen der freien 3`OH-Stelle des Primers und dem ersten dNTP gebildet werden kann. Danach klappt die Finger-Domäne wieder zurück in die Ausgangsposition und ermöglicht es dem Diphosphatprodukt auszutreten und dem nächsten

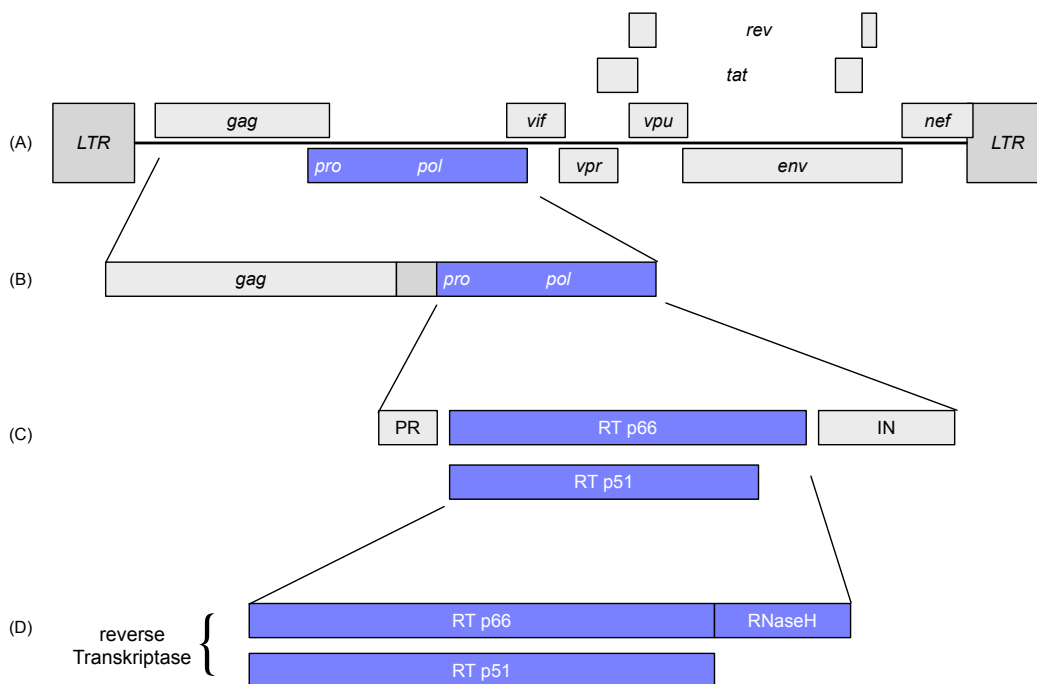


Abbildung 3.3: HIV-Genom. (A) Codiert ist die reverse Transkriptase innerhalb des viralen Genoms im *pol*-Gen. (B) Bei der Translation entsteht ein Gag/Pol-Vorläuferprotein. (C) Innerhalb dessen ist auch eine Protease codiert welche sich zuerst selbstprozessiert und dann das Vorläuferproteinprozessiert. (D) So entsteht aus dem *pol*-Gen die reverse Transkriptase aus den Untereinheiten p66 und p51, wobei p66 zusätzlich noch die RNaseH-Domäne besitzt.

dNTP an das Vorangegangene zu binden. Am Ende der Strangsynthese faltet sich die Daumen-Domäne wieder zurück in Ausgangsstellung und die RT ist wieder deaktiviert. Bei der Elongation wird in der katalytischen Domäne sowie bei der RH, wird das letzte freie 3'OH durch zweiwertige Metall-Ionen (meist Magnesiumchlorid) stabilisiert (Le Grice, 2012).

Zelluläre regulatorische Faktoren der reversen Transkription

Ein negativer regulatorischer Faktor in dieser Reaktion ist die dNTP Triphosphohydrolase SAM-Domäne und HD-Domäne enthaltendes Protein 1 (SAMHD1), welches in inaktiven Gruppe 4 positiven (CD4⁺) T-Lymphozyten (T-Zellen) stark exprimiert ist. Es führt durch seine Hydrolasefunktion zu einer geringeren dNTP Konzentration im Zytoplasma der Wirtszellen und damit zu einer quantitativ schlechteren RT-Reaktion. HIV-2 kann neben Vpr noch ein homologes Protein, das virale Protein X (Vpx) exprimieren. Vpx ist in der Lage die Konzentration von SAMHD1 durch protosomale Degeneration zu erniedrigen. So wird die Synthese der cDNA im Zytoplasma durch die RT-Reaktion begünstigt und der negative regulatorische Effekt von SAMHD1 erniedrigt. Patienten mit dem Aicardi-Goutières Syndrom leiden an einer Mutation im Locus von SAMHD1 und zeigen eine Anfälligkeit für HIV-2-Infektionen von inaktiven CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Menschen, da sie nicht in der Lage sind SAMHD1 in inaktiven CD4⁺ T-Zellen zu exprimieren. Die RT-Reaktion von HIV-1 wird ebenfalls durch SAMHD1 gehemmt. HIV-1 jedoch exprimiert keinen SAMHD1 Antagonisten. Somit kann das Virus auch nicht den negative Effekt von SAMHD1 auf die RT-Reaktion verhindern (Baldauf & Keppel *et al*, 2012).

Ein Faktor der zellulären Immunreaktion gegen Viren stellt die Cytosin-Deamination durch APOBEC dar. APOBEC Proteine sind ein zelluläres Faktoren, welche beim Assembly und Budding (Kapitel 8) in die neu hergestellten Viren durch Wechselwirkung mit Gag

verpackt werden. Wird eine Wirtszelle infiziert, so beeinflusst APOBEC die reverse Transkription des RNA-Genoms zur cDNA durch Desaminierung der Cytosine in der cDNA während der Minus-Strangsynthese. Die cDNA enthält dann Uracil statt Cytosin Nukleotide, was zu einer komplementären DNA Paarung mit Adenin anstatt Guanin führt (Cullen, 2006). Diese so eingeführte Hypermutation des viralen Genoms führt meist zum Angriff von Uracil-DNA-Glykosidase und zur Degradation des Genoms durch Endonucleasen. Wird das virale Genom trotzdem in das Wirtsgenom integriert, führt es durch die vielen Mutationen zu nicht-replikationskompetenten Viren. Dieser effektiven Immunreaktion entgeht das HI-Virus durch den viralen Infektiositätsfaktor (Vif). Vif ist assoziiert mit den zellulären Proteinen Cullin 5 (Cul5), Elongin B und C sowie Ring-Box Protein 1 (Rbx1). Dieser Komplex bildet eine E3 ubiquitin Ligase, welche APOBEC polyubiquitinyliert und so zu seiner Degradation durch zelluläre Proteosomen führt (Sawyer *et al*, 2004).

Reverse Transkription als antivirales Therapieangriffsziel

Die reverse Transkriptase war schon früh Ziel antiviraler Therapien. So wurden zum Beispiel durch Gabe von Nukleosid-Analogika ohne freies 3'OH-Ende die Elongation gestoppt. Als Beispiel für eine therapeutisch bei HIV-1 eingesetztes Nukleosid-Analogika ist Azydothymidin (AZT) (siehe Kapitel 9). Dieser wird durch eine zelluläre Kinase aktiviert, indem es zu AZT-5'triphosphat (AZTTP) phosphoryliert wird. Am 3'-Ende besitzt AZTTP eine Azidgruppe an der nicht weiter polymerisiert werden kann. AZT fällt aufgrund dieser Wirkweise in die Gruppe der Kettenterminatoren (siehe Kapitel 9). Auch wurden Stoffe verabreicht (Nicht-Nukleosid-Analogika), welche sich nahe dem aktiven Zentrum anlagerten, so die Konformation und damit Funktionalität der katalytischen Domäne veränderten. Allerdings ist HIV-1 durch das Fehlen einer Korrekturlesefähigkeit der RT einer hohen Mutationsrate ausgesetzt. Dies ermöglicht es unter dem Selektionsdruck einer HIV-Therapie schnell Resistenzmutatio-

nen zu akkumulieren. Diese Resistenzen beruhen auf der selektiven Verringerung der Affinität zu HIV-1 Medikamenten oder dem ATP-abhängigen Ausbau eingebauter Kettenterminatoren (siehe Kapitel 9).

Nomenklatur

Resistenz-assoziierte Mutationen (RAM) werden in der Literatur mit dem Buchstaben für die Aminosäure des Wildtyps, der Aminosäureposition in dem Enzym und mit der geänderten Aminosäure angegeben. So steht M184V für den Aminosäureaustausch von Methionin zu Valin an der Aminosäureposition 184.

In Versuchen wurden nach dem Eintritt des Virus RT-Inhibitoren zugegeben. Daraufhin wurde eine nicht dissoziierte Capsidhülle an den Poren des Zellkerns beobachtet. Entscheidend an dieser Stelle ist nicht die komplette reverse Transkription, sondern nur die Ausbildung des finalen DNA-Flap (Arhel *et al*, 2007). Die Umwandlung des Capsid zum PIC muss für einen erfolgreichen Kernimport vollständig ablaufen. Wichtig sind hierfür demnach die Stabilität der CA-Hülle sowie die korrekt durchgeführte Umwandlung vom RNA- in ein DNA-Genom.

Import in den Zellkern

Der PIC wird über Poren des Zellkerns (NPC) importiert. Einige Bestandteile wie die IN können mit den Nukleoporinen (NUPS) der NPC interagieren und so aktiv den Transport des PIC in den Zellkern veranlassen. Der Import kann außerdem über zelluläre Proteine ablaufen. Dabei interagieren Bestandteile des PIC mit Importinproteinen, welche dann NUPS-assoziiert den Import in den Zellkern auslösen. Ist die Fracht beim Zellkern angekommen, ist aus dem Capsidumhüllten RT-Komplex der PIC entstanden. NPC des Zellkerns sind komplexe, welche löslichen Molekülen den Import in den Zellkern erleichtert. Kleine lösliche Moleküle wie Ionen können auch durch passiven Transport in den Zellkern gelangen, da sie durch vereinfachte Diffusion durch den NPC gelangen. Größere Ionen und Moleküle, genau wie der PIC müssen aktiv in den Zellkern importiert werden.

Der genaue Vorgang des HIV PIC Imports ist noch nicht endgültig geklärt, jedoch ist klar, dass die IN eine wichtige Rolle spielt (Bouyac-Bertoia *et al*, 2001). Allerdings können auch andere Bestandteile des PIC einen Kernimport auslösen. So kann Vpr mit dem zellulären Importin- α (Imp α) interagieren und sowohl mit wie auch ohne zellulären Cofaktor Importin- β (Imp β) den Import des PIC auslösen (Gallay *et al*, 1996). Es wird angenommen, dass Vpr eine ähnliche Funktion erfüllen

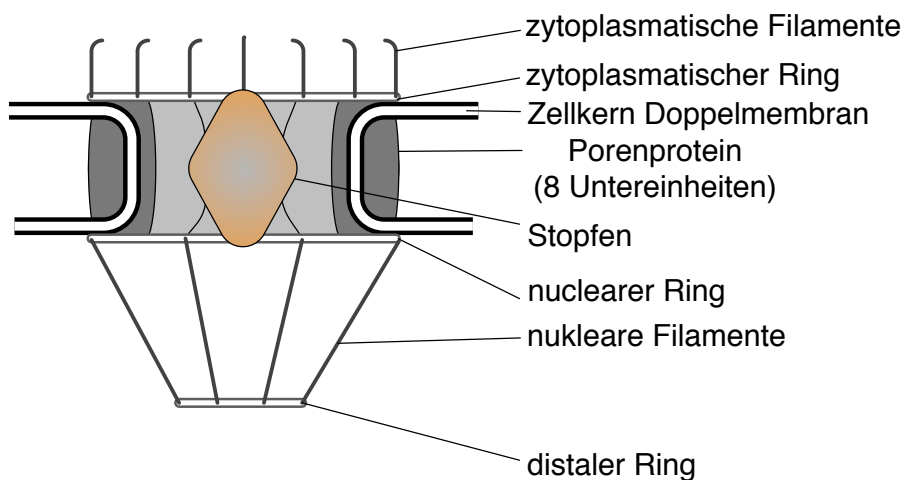


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung einer Kernpore

Der zelluläre Kernimport

Moleküle, welche in den Kern hinein transportiert werden sollen enthalten ein nucleares Lokalisationssignal (NLS) und wird von Importin- α (Imp α) erkannt und gebunden. Dieses rekrutiert danach Importin- β (Imp β) und lagert sich mit der Fracht an die zytoplasmatischen Filamente an. Dort wartet es bis sich ein Ran-Protein mit einem Granindiposphatrest (Ran-GDP) anlagert. Dieser Komplex wird nun durch die Kernpore transportiert und dissoziiert im Zellkern. Ran-GDP wird durch ein guaninspezifisches Exchangeprotein zu Ran-GTP. In dieser Form kann es nun als Exportinprotein wirken und Fracht mit cytoplasmatischem Lokalisationssignal transportieren. Im Cytoplasma wird Ran-GTP von der GTPase zu Ran-GDP hydrolysiert, sodass der Transportzyklus von vorne beginnen kann.

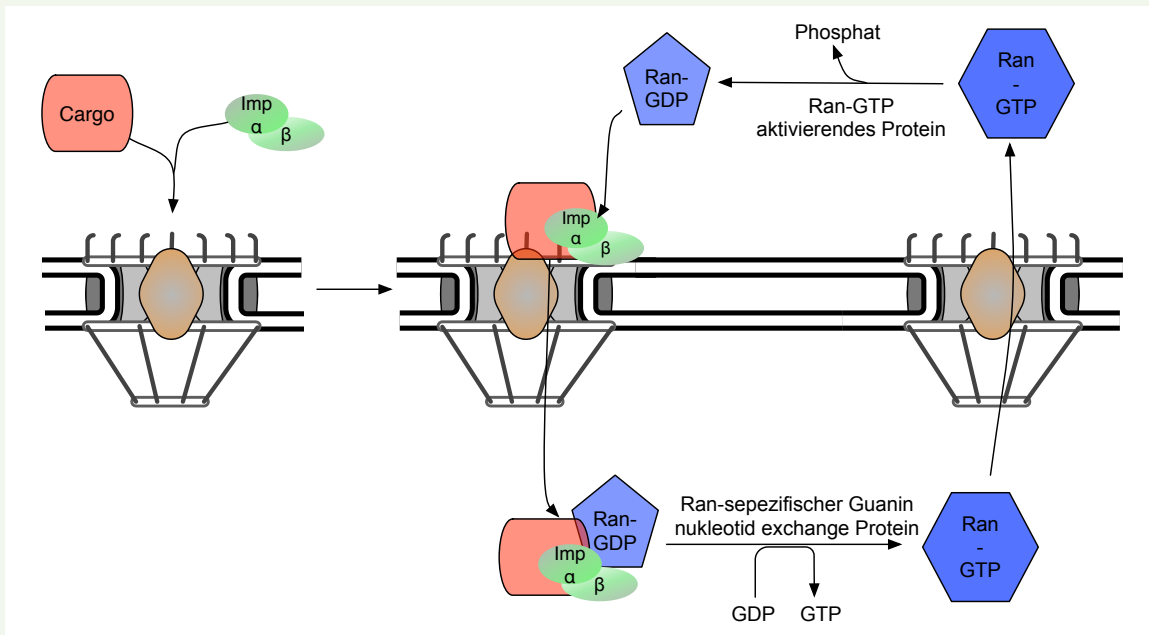


Abbildung 3.5: Zellulärer Kernimport über Imp α/β welches an die Fracht bindet und mit Ran-GDP importiert wird. Dort wird Ran-GDP zu Ran-GTP welches exportiert wird. Im Cytoplasma spaltet sich ein Phosphatrest ab und Ran-GDP ist für den nächsten Import bereit.

kann wie Imp β beim zellulären Import (Goldfarb *et al*, 2004). Die Bindung des Vpr am PIC erhöht die Affinität des Komplexes zu den NUPS (Bukrinsky & Adzhubei, 1999). Als Wichtigstes Karyopherin für den Import des PIC wird allerdings der Transportin-3 (TNPO3) vermittelte Import angesehen (Christ *et al*, 2008). TNPO3 gehört zur Familie der Importin- β Rezeptorproteine, welche normalerweise Serin-Arginin reiche Sequenzen erkennen. Die IN selbst enthält keine solche Sequenz, weshalb angenommen wird, dass die IN zuvor an Importin-7 (Imp7) bindet (Ao *et al*, 2007). So wird die Bindung IN-Imp7-TNPO3 ermöglicht.

Integration in das Wirtsgenom

Struktur der Integrase

Wichtigster Faktor für die Integration des viralen DNA-Genoms in das Wirtszellgenom ist das Protein IN, welches im *pol* Gen kodiert ist. Die IN ist ein 32kDa Protein aus 288 Aminosäuren mit drei funktionellen Domänen. Die Aminoterminal Domäne enthält ein konserviertes Zink-Bindemotiv, wodurch die Strukturen der Integraseuntereinheiten stabilisiert werden. Die katalytische Domäne leistet die enzymatische Funktion der IN sowie auch andere Funktionen. So befindet sich das Kern-Lokalisationssignal (KLS) ebenfalls in der katalytischen Domäne der IN. Die Carboxyterminale

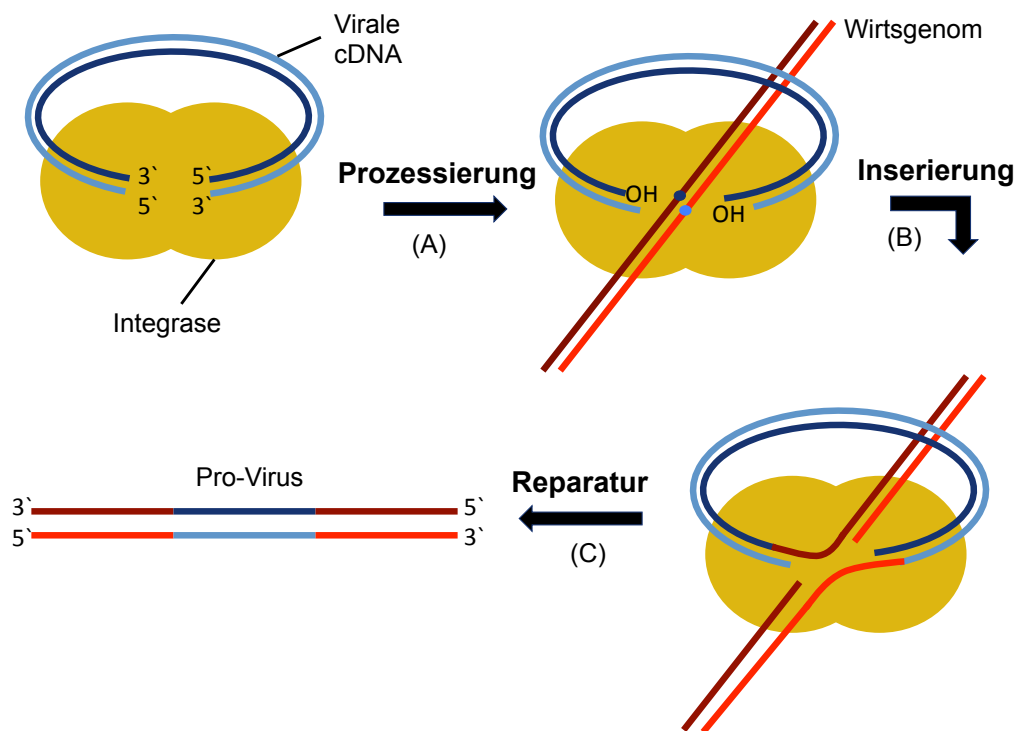


Abbildung 3.6: Vorgang der Integration der viralen cDNA (blau) in das Wirtsgenom (rot). (A) Die Integrase orientiert die beiden Enden der viralen cDNA im katalytischen Zentrum (B) und spaltet von den 3'-Enden zwei Nukleotide ab, um so freie OH-Enden zu erhalten. Die freie OH-Gruppe an den 3'-Enden greift nun im Wirtsgenom an und inseriert das 3'-Ende. (C) Die überhängenden 5'-Enden werden von zellulären Ligasen repariert und mit dem Wirtsgenom verbunden. Es entsteht das integrierte Pro-Virus.

Domäne besitzt eine unspezifische DNA-Bindfähigkeit (Ceccherini-Silberstein *et al.*, 2009).

Ablauf des Integrationsprozesses

Im ersten Schritt der Integration bindet die IN an die cDNA des Virus und orientiert die beiden Enden der LTR's in die katalytische Domäne. Bei der folgenden Prozessierung werden von den beiden 3'-Enden der LTR's zwei Nukleotide abgespalten, sodass jeweils ein freies 3'-OH Ende entsteht (Abb. 3.6A). Im nächsten Schritt verläuft das Wirtsgenom durch die IN, und die freien Elektronen des Sauerstoffs der Hydroxygruppe sorgen für eine direkte Veresterung der viralen DNA mit dem Wirtsgenom (Abb. 3.6B). Als Angriffspunkt im Wirtsgenom wird eine kurze palindromische Cytidin-Adenin Sequenz präferiert (Wu *et al.*, 2005). Sowohl bei dem Schritt der Prozessierung als auch der Integration werden in der katalytischen Domäne zweiwertige Metall-Ionen (Mn^{2+} oder Mg^{2+}) zur Stabilisierung der freien 3

'OH Enden benötigt. Die nun auf beiden Seiten noch überhängenden 5'-Enden des viralen Genoms werden von zellulären Ligasen repariert und an die Enden des Wirtsgenoms angefügt (Li *et al.*, 2006). Diese Form des integrierten viralen Genoms nennt sich Pro-Virus, da nun über zelluläre Enzyme virale Proteine exprimiert werden können (Abb 3.6C).

LEDGF als regulatorischer Faktor bei der Integration in Zellen

Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) dient dem Virus als Coaktivator. LEDGF gehört zur Familie der hepatoma-derived growth factor related Proteine. Diese Familie besitzt charakteristisch ein Aminoterminaler Pro-Trp-Trp-Pro Motiv (PWWP-Domäne), allerdings besitzt in dieser Familie nur LEDGF zusätzlich noch eine carboxyterminale Domäne mit Integraseaffinität (IBD) (Engelman & Cherepanov, 2008). In der Zelle ist LEDGF während des Zellzyklus am Chromatin assoziiert, wobei

die Affinität der DNA-bindenden Domäne nicht spezifisch für bestimmte Sequenzen ist. Somit ist LEDGF überall auf dem Genom lokalisiert. Die zelluläre Funktion von LEDGF ist bisher größtenteils unbekannt. Die Annahme, dass es an Stress und Hitzeshock regulierenden Stellen des Genoms assoziiert ist konnte noch nicht endgültig geklärt werden (Turlure *et al*, 2006; Singh *et al*, 2001). In Knockout Mäusen, welche kein LEDGF mehr besaßen, ließ sich jedoch beobachten, dass der PIC bei mitotischen Zellen größtenteils im Cytoplasma zu finden war (Llano *et al*, 2004; Maertens *et al*, 2003). Dies bedeutet, dass das zelluläre Protein LEDGF maßgeblich an der Chromatinbindung und damit an der Lokalisation der IN im Zellkern beteiligt ist. Des Weiteren verhindert die Bindung der IN an LEDGF die Ubiquitynylierung und somit die proteosomale Degradation der Integrase, welche zu dem Zeitpunkt mit der viralen cDNA assoziiert ist (Poeschla, 2008).

Inhibition der Autointegration

Bei der Autointegration werden die freien 3-OH Enden der cDNA nicht in das zelluläre Genom integriert, sondern in das virale Genom (Li *et al*, 1991). Das führt zu einer Schleife innerhalb der cDNA, wodurch diese nicht mehr in das zelluläre Genom integriert werden kann, ähnlich dem LTR-Ringschluss am Ende der RT-Reaktion. Der Auto-Integrationsmechanismus läuft dabei analog zur Integration in das zelluläre Genom ab. Ein zellulärer Faktor den HIV-1 benutzt um sich vor Autointegration zu schützen ist der cytoplasmatische ER-assoziierte SET-Komplex. Dieser besteht aus dem Histon-ähnlichen SET-Protein und drei unterschiedlichen DNasen (TREX1, APE1 und NM23-H1). In der Zelle reguliert dieser Komplex die freie DNA Menge im Cytoplasma und verhindert dadurch das fälschliche auslösen einer Interferonantwort (Yan *et al*, 2010). Viral interagiert der SET-Komplex mit dem PIC und baut falsch synthetisierte oder Autointegrierte RT-Produkte ab und bewahrt HIV-1 so vor den negativen Effekten einer Autointegration (Lee & Craigie, 1998). Werden einzelnen Bestandteile des SET-Komplexes ausgeknockt ist eine deutlich erhöhte

Autointegration zu beobachten. Da diese freie 3-OH Enden der cDNA benötigt ist auch die virale IN von entscheidender Bedeutung für einen erfolgreichen Schutz vor Autointegration (Yan *et al*, 2009).

Fragen

1. Wie wird die RT und die IN in HIV-1 synthetisiert und prozessiert? Wo und wann erfolgt die Prozessierung?
2. In welcher Form liegt die RT vor? Aus welchen Untereinheiten besteht sie? Welche enzymatischen Funktionen übernimmt sie?
3. Welche Veränderungen in der Struktur der RT treten während der Polymerisation auf? Welche chemischen Prozesse liegen der RT zu Grunde? (kurz beschreiben was passiert und wie sich dabei die Struktur verändert)
4. Welches Molekül dient als Primer während der Minus-Strang-Synthese? Woher stammt es und wie gelangt es in das HIV-1 Partikel?
5. Was sind NRTIs und NNRTIs? Wie unterscheiden sich die beiden RTIs voneinander?
6. Was versteht man unter einem Prä-Integrationskomplex? Wie entsteht er und woraus besteht er? Wie gelangt die vDNA in den Zellkern?
7. Wie wird die vDNA ins Wirtszellgenom integriert? Nenne die einzelnen Schritte der Rkt. Und erläutere nur den ersten Schritt genauer. Welches Enzym gewährleistet diese Rkt? Und in welcher Form liegt das Enzym bei der Rkt. Vor? Welches Endprodukt liegt anschließend vor? (vollständige Integration der vDNA?/flankierende Sequenz woher?)
8. Welche Vorgänge müssen korrekt abgeschlossen werden, dass ein erfolgreicher Import des Prä-Integrationskomplexes in den Zellkern stattfinden kann?
7. Wo integriert HIV-1? Gibt es bestimmte Bereiche oder Motive, die bevorzugt werden?

Antworten

1. Codiert sind die reverse Transkriptase und Integrase in *pol* des HIV-Genom. Pol wird als GagPol Polyprotein in neu synthetisierte Viren verpackt. Während der Reifung des Virus und vor Infektion einer neuen Wirtszelle wird aus dem Polyprotein die reverse Transkriptase und Integrase prozessiert durch die Protease welche selbst in *pol* codiert ist.

2. Die reverse Transkriptase ist ein Dimer, p66 und p51. Beide besitzen eine Finger-, Handflächen- und Daumen-Domäne. Die p66-Untereinheit besteht zusätzlich noch aus einer katalytischen Domäne und einer RNaseH-Domäne. Beide Untereinheiten sind durch eine Verbindungsdomäne verbunden. Enzymatische Funktion nimmt dabei die katalytische Domäne ein in der die Polymerisation stattfindet, sowie die RNaseH-Domäne in der das RNA-Template abgebaut wird.

3. Während der Polymerisation wird durch Bewegung der Finger-Domäne der Kontakt zwischen dem freien 3'-OH Ende und des desoxyribonukleotids (dNTPs) hergestellt. Dabei wird über eine Esterreaktion das freie dNTP angehängt. Beim öffnen der Finger-Domäne verlässt das Diphosphatprodukt die katalytische Domäne und ein neues dNTP kann verestert werden.

4. Als Primer der Minus-Strang Synthese dient die tRNA-Lys3. Diese wird durch die Lysyl-tRNA Transferase mit dem T Ψ C-Arm in die Primer-Binde-Stelle des viralen RNA-Genom inseriert.

5. Nukleosid-Analogika (NRTIs) sind Medikamente, welche für eine Kettenterminator bei der Polymerisation der reversen Transkriptase sorgen. Diese besitzen kein freies 3'-OH und beenden somit die Polymerisationsreaktion, weil keine weiteren Nukleotide angehängt werden können. Nicht-Nukleosid-Analogika (NNRTIs) sind Medikamente, welche nahe des aktiven Zentrums der reversen Transkriptase binden und so ihre Struktur beeinflussen. Dies unterdrückt die enzymatische Funktion der RT.

6. Der Prä-Integrationskomplex bildet sich aus dem Capsid während des Transports zum Zellkern. Zeitgleich des Transportes findet die reverse Transkription sowie die Dissoziation der Capsidhülle statt. Der Prä-Integrationskomplex enthält das doppelt vorliegende RNA-Genom, die reverse Transkriptase, Integrase und weitere virale und zelluläre Proteine. Importiert wird der PIC über Kernporen. Der Vorgang ist der selbe wie bei der zellulären Importierung und wird durch die Integrase vermittelt.

7. Integriert wird die vDNA durch die Integrase. Diese orientiert im ersten Schritt die beiden Enden der vDNA im aktiven Zentrum und spaltet zwei Nukleotide ab um eine freie 3'-OH Gruppe zu bekommen. In weiteren Schritten wird diese freie 3'-OH Gruppen in das Wirtsgenom inseriert und danach durch Ligasen die freien Stellen repariert.

8. Der Vorgang der reversen Transkription sowie des Uncoating müssen korrekt abgeschlossen sein um den PIC in den Zellkern importieren zu können.

9. Bevorzugt werden für die Integration des viralen DNA-Genoms palindromische Cytidin-Adenin Sequenzen.

Klausurfragen

1. Auf welchen Schritt in der HIV-Replikation nimmt eine Vif-Deletion Einfluss und was sind die mechanistischen Auswirkungen. Beschreiben Sie bitte die Wirkung von Vif auf zelluläre Faktoren (auf welche Proteine wirkt Vif?). Geben Sie auch die an der Vif-Funktion beteiligten zellulären Proteine an. (Bitte achten Sie darauf welche Prozesse in der Virus produzierenden Zelle und welche in der Zielzelle stattfinden und geben Sie dies immer an!)

2. Beschreiben Sie die Funktion der PBS und des PPT in der Reversen Transkription der Retroviren. Zeichnen Sie bitte dazu ein beschriftetes Schema, das die einzelnen Teilreaktionen beschreibt und geben Sie an welchen Primer HBV und die Retroviren verwenden. Wo findet die RT-Reaktion statt und zu welcher Enzymklasse gehört die RT?

3. Beschreiben Sie die Wirkung von Nukleosidischen-RT-Inhibitoren (NRTIs). Bitte geben Sie den Wirk- und die Resistenzmechanismen an.

4. Beschreiben Sie die Primer der HBV und HIV Reversen Transkription.

5. Beschreiben Sie die Unterschiede zwischen Acyclovir und einem NRTI aus der HIV-Therapie (z.B. AZT)?

Literatur

Ao Z, Huang G, Yao H, Xu Z, Labine M, Cochrane AW & Yao X (2007) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 integrase with cellular nuclear import receptor importin 7 and its impact on viral replication. *J. Biol. Chem.* **282**: 13456–13467

Arhel N (2010) Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* **7**: 96

Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prévost M-C, Allen TD & Charneau P (2007) HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J.* **26**: 3025–3037

Baldauf H-M, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M, Schenkova K, Ambiel I, Wabnitz G, Gramberg T, Panitz S, Flory E, Landau NR, Sertel S, Rutsch F, Lasitschka F, Kim B, König R, Fackler OT & Keppler OT (2012) SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat. Med.*

Bouyac-Bertoia M, Dvorin JD, Fouchier RA, Jenkins Y, Meyer BE, Wu LI, Emerman M & Malim MH (2001) HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol. Cell* **7**: 1025–1035

Boyer PL, Imamichi T, Sarafianos SG, Arnold E & Hughes SH (2004) Effects of the Delta67 complex of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on nucleoside analog excision. *J. Virol.* **78**: 9987–9997

Bukrinsky M & Adzhubei A (1999) Viral protein R of HIV-1. *Rev. Med. Virol.* **9**: 39–49

Ceccherini-Silberstein F, Malet I, D'Arrigo R, Antinori A, Marcelin A-G & Perno C-F (2009) Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation. *AIDS Rev* **11**: 17–29

Christ F, Thys W, De Rijck J, Gijsbers R, Albanese A, Arosio D, Emiliani S, Rain J-C, Benarous R, Cereseto A & Debyser

Z (2008) Transportin-SR2 imports HIV into the nucleus. *Curr. Biol.* **18**: 1192–1202

Cullen BR (2006) Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J. Virol.* **80**: 1067–1076

Engelman A & Cherepanov P (2008) The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog.* **4**: e1000046

Gallay P, Stitt V, Mundy C, Oettinger M & Trono D (1996) Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.* **70**: 1027–1032

Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT & Adam SA (2004) Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* **14**: 505–514

Jayappa KD, Ao Z & Yao X (2012) The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *Int J Biochem Mol Biol* **3**: 70–85

Kleiman L, Jones CP & Musier-Forsyth K (2010) Formation of the tRNALys packaging complex in HIV-1. *FEBS Lett.* **584**: 359–365

Le Grice SFJ (2012) Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase: 25 Years of Research, Drug Discovery, and Promise. *J. Biol. Chem.*

Lee MS & Craigie R (1998) A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 1528–1533

Li Y, Kappes JC, Conway JA, Price RW, Shaw GM & Hahn BH (1991) Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 cloned directly from uncultured human brain tissue: identification of replication-competent and -defective viral genomes. *J. Virol.* **65**: 3973–3985

Yan N, Cherepanov P, Daigle JE, Engelman A & Lieberman J (2009) The SET complex acts as a barrier to autointegration of HIV-1. *PLoS Pathog.* **5**: e1000327

Yan N, Regalado-Magdos AD, Stiggelbout B, Lee-Kirsch MA & Lieberman J (2010) The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat. Immunol.* **11**: 1005–1013

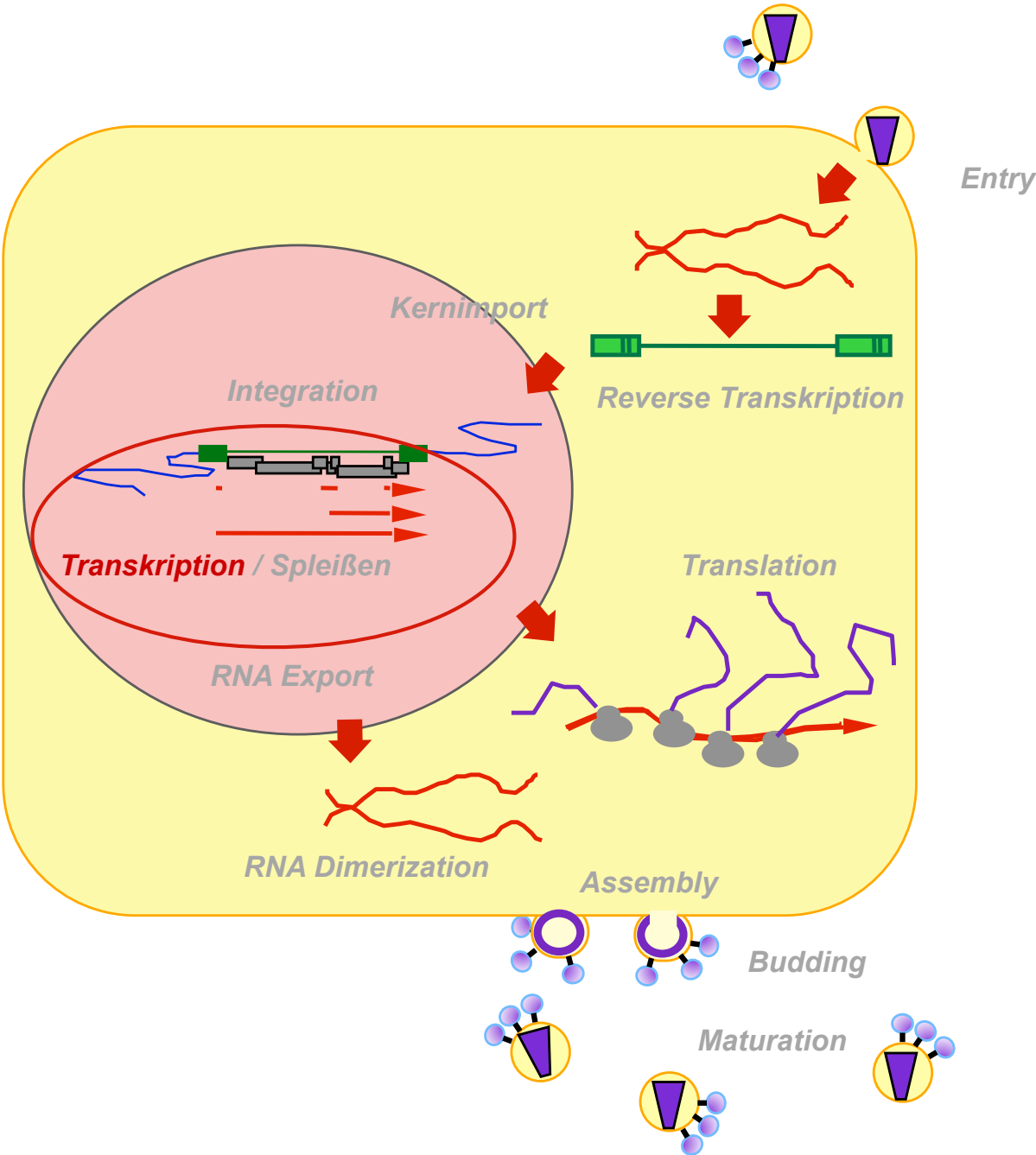
Li M, Mizuuchi M, Burke TR & Craigie R (2006) Retroviral DNA integration: reaction pathway and critical intermediates. *EMBO J.* **25**: 1295–1304

- Li Y, Kappes JC, Conway JA, Price RW, Shaw GM & Hahn BH (1991) Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 cloned directly from uncultured human brain tissue: identification of replication-competent and -defective viral genomes. *J. Virol.* **65**: 3973–3985
- Llano M, Vanegas M, Fregoso O, Saenz D, Chung S, Peretz M & Poeschla EM (2004) LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *J. Virol.* **78**: 9524–9537
- Maertens G, Cherepanov P, Pluymers W, Busschots K, De Clercq E, Debyser Z & Engelborghs Y (2003) LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 33528–33539
- McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M & Hope TJ (2002) Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* **159**: 441–452
- Miller MD, Farnet CM & Bushman FD (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.* **71**: 5382–5390
- Poeschla EM (2008) Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**: 1403–1424
- Rodgers DW, Gamblin SJ, Harris BA, Ray S, Culp JS, Hellmig B, Woolf DJ, Debouck C & Harrison SC (1995) The Structure of Unliganded Reverse Transcriptase from the Human Immunodeficiency Virus Type 1. In pp 1222–1226.
- Sawyer SL, Emerman M & Malik HS (2004) Ancient Adaptive Evolution of the Primate Antiviral DNA-Editing Enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol* **2**: e275
- Singh DP, Fatma N, Kimura A, Chylack LT & Shinohara T (2001) LEDGF binds to heat shock and stress-related element to activate the expression of stress-related genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**: 943–955
- Turlure F, Maertens G, Rahman S, Cherepanov P & Engelman A (2006) A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin in vivo. *Nucleic Acids Res.* **34**: 1653–1665
- Vaughan JC, Brandenburg B, Hogle JM & Zhuang X (2009) Rapid actin-dependent viral motility in live cells. *Biophys. J.* **97**: 1647–1656
- Watson-Jones D, Wald A, Celum C, Lingappa J, Weiss HA, Chagalucha J, Baisley K, Tanton C, Hayes RJ, Marshak JO, Gladden RG & Koelle DM (2010) Use of acyclovir for suppression of human immunodeficiency virus infection is not associated with genotypic evidence of herpes simplex virus type 2 resistance to acyclovir: analysis of specimens from three phase III trials. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 3496–3503
- Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM & Munroe DJ (2005) Weak palindromic consensus sequences are a common feature found at the integration target sites of many retroviruses. *J. Virol.* **79**: 5211–5214
- Yan N, Cherepanov P, Daigle JE, Engelman A & Lieberman J (2009) The SET complex acts as a barrier to autointegration of HIV-1. *PLoS Pathog.* **5**: e1000327
- Yan N, Regalado-Magdos AD, Stiggelbout B, Lee-Kirsch MA & Lieberman J (2010) The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat. Immunol.* **11**: 1005–1013
- Yang Y, Fricke T & Diaz-Griffero F (2013) Inhibition of Reverse Transcriptase Activity Increases Stability of the HIV-1 Core. *J. Virol.* **87**: 683–687

4

Transkription

Lisa Linck



Inhaltsverzeichnis

Einleitung	56
Aufbau und Funktion des LTR-Promotors	56
RNA-Polymeres II und zelluläre Transkriptionsinitiation	57
Elongation des HIV-Provirus	58
Struktur und Interaktion von Tat und TAR	59
Rekrutierung von P-TEFb durch Tat	60
Das 7SK-sRnNP: ein zellulärer Vorratsspeicher für P-TEFb	61
Struktur des CDK9/CyclinT1/Tat-Komplexes	61
Posttranslationale Modifikationen von Tat	62
<i>Chromatin Remodeling</i> am LTR-Promoter	63
Fragen	64
Antworten	65
Klausurfragen	66
Literatur	66

Transkription

Die Transkription ist ein essentieller Schritt im Infektionszyklus von HIV, da sie den Übergang des im Virusgenom verschlüsselten genetischen Codes zur mRNA darstellt und somit letztendlich auch die Voraussetzung zur Herstellung aller viralen Proteine ist.

Nach erfolgreicher Integration der proviralen HIV-DNA in die Wirts-DNA (siehe Kapitel 3), bedient sich das Virus der zellulären Transkriptionsmaschinerie für die Herstellung seiner mRNA, die als einzelnes Transkript sämtliche virale Proteine codiert.

Aufbau und Funktion des LTR-Promotors

Die provirale DNA besitzt eine, durch die reverse Transkription entstandene Promotorsequenz (siehe Kapitel 3), den sogenannten „Long Terminal Repeat“ (LTR) (siehe Abbildung 4.1), der sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende vorhanden ist und sich aus U3-, U5- und R-Region des viralen (+)-RNA-Genoms zusammensetzt. Beide LTRs können als Promotor fungieren, allerdings besitzt der 5'-LTR-Promotor eine deutlich höhere Transkriptionsaktivität (Klaver & Berkhout, 1994).

Der LTR-Promotor besteht im Wesentlichen aus einem regulatorischen Bereich, einem „Core-Enhancer“ und einem „Core“-Promotor. An den regulatorischen Bereich und den „Core-Enhancer“ binden spezifische Transkriptionsfaktoren, die die Transkription des HIV-Provirus begünstigen oder verhindern können.

Der „Core“-Promotor ist für die eigentliche Transkription von essentieller Bedeutung, da er von zellulären allgemeinen Initiationsfaktoren erkannt und von der RNA-Polymerase II (RPA II) abgelesen werden kann (siehe Kasten: RNA-Polymerase II und die Initiation der Transkription in der Zelle).

Neben der für die Initiation der Translation essentiellen *TATA*-Box enthält der „Core“-Promotor drei nahe hintereinander liegende Bindestellen für den zellulären Transkriptionsfaktor Sp1 (engl.: „specificity factor 1“), für dessen

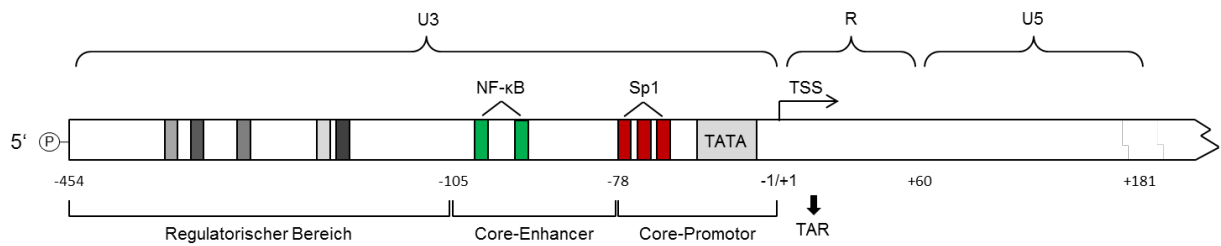


Abbildung 4.1: Aufbau des HIV 5'-LTR Promotors. Der HIV 5'-LTR Promotor besteht aus der U3-, der R- und der U5-Region des HIV-Genoms. Er enthält „upstream“ der Transkriptionsstartstelle (TSS) einen regulatorischen Bereich, sowie eine „Core-Enhancer“-Region, an die spezifische Transkriptionsfaktoren binden können. Zum Beispiel der zelluläre Faktor NF-κB, der die Transkription begünstigt. Der „Core“-Promotor enthält die für die Transkriptionsinitiation durch zelluläre Faktoren wichtige TATA-Box und eine Bindestelle für Sp1, ein zellulärer Faktor, der die Transkriptionseffizienz steigert. Die positiven bzw. negativen Zahlen zeigen die Entfernung der jeweiligen Bindestellen oder Bereiche von der Transkriptionsstartstelle in „downstream“- bzw. „upstream“-Richtung in Nucleotiden an. Der fettgedruckte Pfeil markiert die Position des für die von Tat vermittelte Steigerung der Elongationsrate wichtigen TAR-Elements.

Bindung *in vitro* eine Steigerung der Transkriptionseffizienz um das zehnfache gezeigt werden konnte (Jones *et al*, 1986). Vor (engl.: „upstream“) dem Core-Promotor befinden sich weitere zahlreiche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die die Transkription des HIV-Provirus steuern. Eine wichtige Rolle spielen zwei, im Bereich des „Core-Enhancer“ liegende Bindestellen für den nuklearen Faktor Kappa-B (NF-κB), einen zellulären Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle in der Immunantwort spielt und den Wirt vor viralen Infektionen schützen soll. HIV nutzt also ein vom Wirtsorganismus eigentlich für die Immunabwehr vorgesehenes System für seine eigene Vervielfältigung und Ausbreitung.

Versuche zeigen, dass HIV-1 Viren mit einer mutierten κB-„Enhancer“-Erkennungssequenz zwar noch Zellen infizieren, aber keine neuen Transkripte mehr herstellen können (Alcamí *et al*, 1995).

Ein Heterodimer aus den beiden NF-κB-Untereinheiten p50 (50kDa großes Protein) und RelA (von engl.: „v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A“) begünstigt die HIV-Transkriptions-Initiation durch Interaktion mit p300, einer Histon-Acetyltransferase, die durch Acetylierung von LTR-assoziiertem Chromatin der RNA-Polymerase II einen verbesserten Zugang zum Promotorbereich verschafft (siehe auch Unterkapitel 4.7). Weiterhin erhöht p50/RelA die Prozessivität der Polymerase durch die Rekrutierung des positiven Transkriptions-Elongations-Komplexes b (P-TEFb) an die C-Terminale Domäne (CTD) der RPA II, bevor genügend

virales Tat-Protein gebildet ist, das diese Funktion effizient übernimmt (siehe Unterkapitel 4.2) (Chan & Greene, 2012).

RNA-Polymerase II und zelluläre Transkriptionsinitiation

Die für die zelluläre Initiation der Transkription notwendigen Elemente sind der „Core“-Promotor, die RNA-Polymerase und allgemeine Transkriptionsfaktoren (engl.: „general transcription factors“; GTFs), die zusammen den so genannten Prä-Initiationskomplex bilden.

Der „Core“-Promotor ist ein cis-agierendes Sequenzelement auf dem DNA-„Template“, der sich 20-30 Nucleotide „upstream“ der Initiationsstelle (engl.: „transcription start site“; TSS), an der das erste mRNA-Nucleotid eingebaut wird, befindet. Er enthält die sogenannte TATA-Box, eine konservierte Sequenz aus spezifisch angeordneten Thymin- und Adenin-Nucleotiden. An diese TATA-Box bindet das TATA-Box bindende Protein (engl.: „TATA-box binding protein“; TBP), das eine Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID (d.h.: Transkriptionsfaktor D der Polymerase II) ist. An TBP sind weitere Untereinheiten von TFIID, sogenannte TBP-assoziierte Faktoren (engl.: „TBP associated factors“; TAFs), gebunden (Dikstein, 2002).

Die Assoziation von TBP an die DNA führt aufgrund seiner charakteristischen sattelartigen Form zu einer Verbiegung der Doppelhelix um etwa 90° und TBP

interkaliert zusätzlich mit aromatischen Resten in die DNA, um den Promotorbereich für die Transkription „aufzulockern“ (Elmlund *et al*, 2009). An TFIID binden weitere GTFs: TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIH und die RNA-Polymerase II.

Die RNA-Polymerase II (RPAII) besteht aus 2 α -, einer β - und einer β' -Untereinheit, die das sogenannte „Core“-Enzym bilden, das die katalytische Einheit enthält, sowie weiteren spezifischen und allgemeinen Proteinen (Cramer, 2002). In der C-terminalen Domäne der β' -Untereinheit (CTD), die über einen 90 Aminosäuren langen „linker“ mit dem Rest des „Core“-Enzyms verbunden ist, befindet sich eine Heptapeptid-Sequenz der Aminosäuren YSPTSPS, die sich speziesspezifisch bis zu 60 Mal wiederholt (im Menschen 52 „repeats“). Besonders wichtig sind die Serin-Reste jeweils an den Stellen 2 und 5, deren Phosphorylierung oder Dephosphorylierung diverse Funktionen im Laufe der Transkription steuert. Zum Beispiel ist es essentiell für die Assemblierung des Prä-Initiationskomplexes, dass die CTD der RPA II unphosphoryliert ist. Nach der Bindung der GTFs an den Promotor werden alle Serin-Reste an der Position 5 der Heptapeptid-„repeats“ von der Cyclin-abhängigen Kinase 7 (engl.: „cyclin dependent kinase 7“; CDK7), einer Untereinheit von TFIIH, phosphoryliert, was als Signal für den sogenannten „promoter-escape“ dient, d.h. den Start der eigentlichen Transkription mit dem Einbau der ersten Nucleotide in die neu entstehende mRNA erfolgt (Hsin & Manley, 2012).

Elongation des HIV-Provirus

Für die Vervielfältigung von HIV in der Wirtszelle und die Assemblierung von neuen Tochter-Virionen (siehe Kapitel 7) ist es essentiell, dass innerhalb eines begrenzten und relativ kurzen Infektionszyklusses möglichst viele virale Proteine hergestellt werden.

Allerdings ist die zelluläre RNA-Polymerase II für das virale mRNA-Transkript nicht elongationskompetent, das heißt, dass nur ca. 10% aller proviralen DNA-Sequenzen vollständig abgelesen werden. Nach der Initiation der

Transkription am LTR-Promoter von HIV durch zelluläre Proteine (siehe Kasten: RPA II und die Initiation der Transkription in der Zelle) synthetisiert die RPA II zunächst 59 Nucleotide der viralen mRNA, die sogenannte „transactivation responsive region“ (TAR), ein regulatorisches RNA-Element hinter (engl.: „downstream“) der Initiationsstelle (siehe Abbildung 4.2a). An dieses Strukturelement bindet der zelluläre negative Elongationsfaktor NELF (engl.: „negative elongation factor“), der aus den vier Untereinheiten A, B, C/D und E besteht, mit der Untereinheit NELF-E. NELF interagiert mit DSIF (engl.: „DRB sensitivity-inducing factor“), einem weiteren negativen Faktor, der aus den Untereinheiten Spt4 und Spt5 besteht und der die Elongation der mRNA durch die Polymerase inhibiert (Peterlin & Price, 2006). Durch die Bindung der negativen Faktoren DSIF und NELF wird die Polymerase unmittelbar nach der Synthese des TAR-Elements gestoppt (engl.: „promoter proximal pausing“).

Um sicherzustellen, dass alle HIV-Gene trotzdem komplett und in einer hohen Kopien Anzahl transkribiert werden, codiert HIV für ein eigenes Aktivatorprotein Tat (engl.: „trans-activator protein“), das die Transkription fördert (Kao *et al*, 1987). Tat ist ein für Lentiviren einzigartiger, sequenzspezifischer Transkriptionsaktivator, dessen Synthese zunächst in einer basalen Menge mit Hilfe von zellulären Proteinen gefördert wird und der nach dem Import in den Zellkern an das TAR-Element bindet.

Tat rekrutiert den zellulären positiven Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb), der sich aus Cyclin T und der Cyclin-abhängigen Kinase 9 (engl.: „cyclin dependent kinase 9“; CDK9) zusammensetzt, an das TAR-Element und somit in die Nähe der RPA II (siehe Abbildung 4.2b). CDK9 phosphoryliert NELF-E, wodurch NELF vom TAR-Element dissoziiert. Weiterhin phosphoryliert CDK9 die Spt5 Untereinheit von DSIF, die homolog zur CTD der Polymerase ist, sowie alle Serin-Reste an der Position 2 in der CTD der RPA II. Spt5 löst sich daraufhin vom Rest des DSIF-Komplexes und wird zum positiven Elongationsfaktor, der den Transkriptionskomplex stabilisiert.

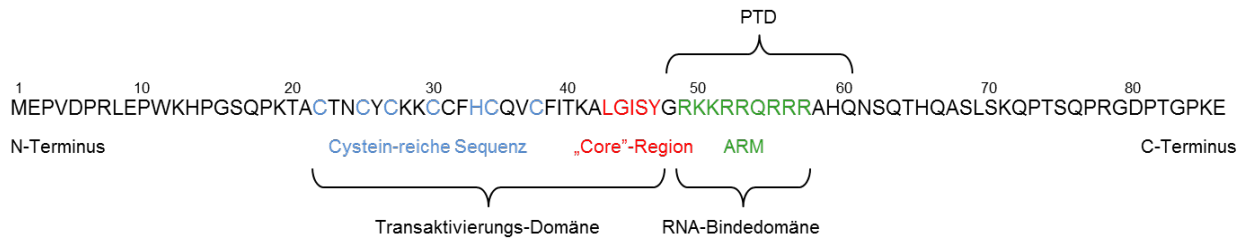


Abbildung 4.3: Das HIV-1 Tat Protein. Aminosäuresequenz des HIV-1 Tat. Cystein-reiche Sequenz, Core-Region und ARM sind konservierte Regionen in lentiviralen Tat-Proteinen. Die Transaktivierungsdomäne dient der Bindung an P-TEFb, die RNA-Bindedomäne bindet an das TAR-Element. Über die PTD („protein transduction Domäne“) kann extrazelluläres Tat in die Zelle aufgenommen werden.

Die Phosphorylierung der CDT dient als Signal, dass die Elongation der Transkription stattfinden kann (Karn & Stoltzfus, 2012).

Neben P-TEFb wurden weitere von Tat rekrutierte Faktoren identifiziert, die eine Rolle bei der Elongation spielen und die zusammen mit P-TEFb Superelongationskomplex (engl.: „super elongation complex“; SEC) genannt werden. Hierzu gehören der Elongationsfaktor ELL2 (engl.: RNA polymerase II elongation factor“) und die transkriptionellen Co-Aktivatoren AFF4, ENL und AF9 (He *et al*, 2010). ELL2 erhöht die Prozessivität der RPA II indem es hilft, die 3'-OH-Gruppen der naszierenden mRNA in der Nähe des katalytischen Zentrums anzuordnen (Shilatifard *et al*, 1997). AFF4 vermittelt in normalen Zellen die Bindung von ELL2 an den aktiven P-TEFb-Komplex und sorgt so dafür, dass das relativ kurzlebige ELL2 nicht vorzeitig proteasomal abgebaut wird. In HIV-1 infizierten Zellen übernimmt Tat diese Funktion. Für ENL und AF9 konnte *in vitro* ebenfalls eine Interaktion mit P-TEFb und Tat nachgewiesen werden, die genaue Funktion der beiden Proteine für die HIV-Transkription ist jedoch noch unklar (He *et al*, 2010).

Struktur und Interaktion von Tat und TAR

Der mit einer Größe von 8-11 kDa relativ kleine Transkriptionsfaktor Tat aus HIV-1 ist je nach Virus-Subtyp zwischen 86 und 101 Aminosäuren lang (siehe Abbildung 4.3). Tat enthält einige, auch zwischen verschiedenen Lentiviren konservierte Regionen, die für seine Funktion als transkriptioneller Aktivator essentiell sind.

Im N-Terminus befindet sich eine variable, Cystein-reiche Sequenz aus 20-50 Aminosäure-Resten und eine hochkonservierte „Core“-Region, die zusammen die sogenannte Transaktivierungsdomäne bilden.

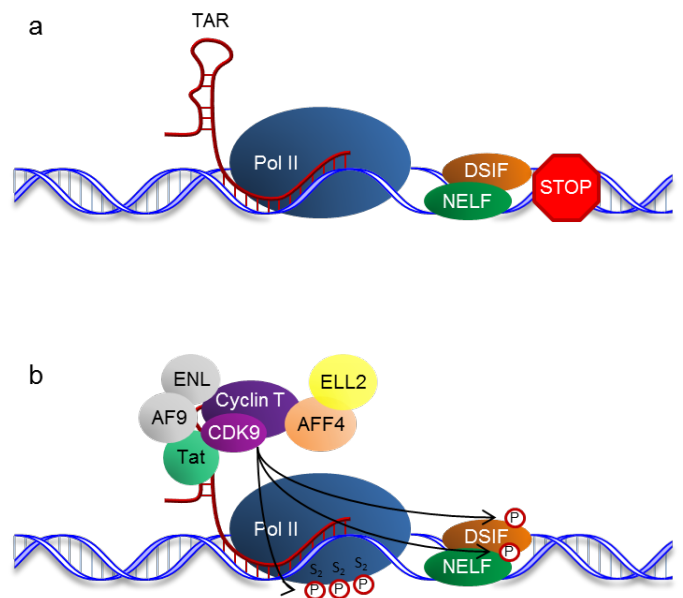


Abbildung 4.2: „Promoter proximal pausing“ und Förderung der Elongation durch Tat und SEC. **a** Die negativen Faktoren NELF und DSIF stoppen die transkribierende Polymerase nach der Synthese des TAR-Elements. **b** Das virale Protein Tat rekrutiert den P-TEFb Komplex, bestehend aus Cyclin T und CDK9, an das TAR-Element. CDK9 phosphoryliert (angezeigt durch „P“ und Pfeile) DSIF, NELF und alle Serin-Reste an der Position 2 (S₂) in der CTD der RPA II woraufhin die Transkription fortgesetzt werden kann. Die Elongation wird außerdem von den Komponenten des Superelongationskomplexes ELL2, AFF4, ENL und AF9 unterstützt.

Diese ist hauptsächlich für die Bindung von Tat an P-TEFb verantwortlich. C-terminal zur Transaktivierungsdomäne befindet sich ein Arginin-reiches Motiv (engl.: „arginine-rich motif“; ARM), das für Kernlokalisierung, Stabilität und die Bindung von Tat an die HIV-1 mRNA verant-

wortlich ist. Gebunden an das ARM finden sich auch viele regulatorische posttranslationale Modifikationen von Tat (siehe unten) (Ott *et al*, 2011).

Neben der intrazellulären Form existiert auch eine extrazelluläre Form von Tat, die von infizierten Zellen abgegeben werden kann. Mit Hilfe von basischen Aminosäure-Resten an den Positionen 48-60, die eine Domäne zur Proteinübertragung bilden (engl.: „protein transduction Domäne“; PTD), kann das sekretierte Tat an negativ geladene Heparansulfat-Proteoglycane in der extrazellulären Matrix binden und so in benachbarte Zellen aufgenommen werden (Romani *et al*, 2010).

In infizierten Zellen bindet Tat an das TAR-Element, eine reverse „Repeat“-Sequenz innerhalb der ersten 59 Nucleotide der neu transkribierten HIV-1 mRNA, die eine stabile Haarnadelschleifen-förmige Struktur ausbildet (siehe Abbildung 4.4) (Muesing, 1987; Roy *et al*, 1990b). Tat erkennt TAR über eine Pyrimidin-reiche Ausbuchtung, gebildet aus den Aminosäure-Resten U23, C24 und U25, die sich vier Basenpaare unterhalb der TAR-RNA-Schleife (Aminosäure-Reste 30-35) befindet (Roy *et al*, 1990a).

Die Interaktion von Tat ruft in TAR eine Konformationsänderung hervor, bei der ein Uracil-Rest an der Position 23 umklappt und durch einen Arginin-Rest des Tat-ARM ersetzt wird. Zusammen mit dem Basenpaar aus G26 und C39 bildet sich so eine Bindetasche für Tat in der TAR-RNA (Karn & Stoltzfus, 2012).

Rekrutierung von P-TEFb durch Tat

In HIV-infizierten Zellen, in denen mit zelleigenen Mechanismen bereits eine basale Menge des Transkriptionsaktivators Tat hergestellt wurde, vermittelt dieser an der Stelle von Brd4 (siehe Kasten: Das 7SK-snRNP: Ein zellulärer Vorratsspeicher für P-TEFb) die effiziente Entlassung von P-TEFb aus dem 7SK-snRNP-Komplex, um aktives CDK9 an die Stelle der pausierenden RNA-Polymerase II zu bringen (Yang *et al*, 2005).

Der Mechanismus der Rekrutierung von P-TEFb durch Tat ist noch weitgehend unbekannt, basiert aber vermut-

lich auf strukturellen und sequenziellen Gemeinsamkeiten zwischen dem 7SK-snRNP-Komplex und dem Komplex aus Tat, TAR und P-TEFb. Das P-TEFb-inhibierende Protein HEXIM1 bindet an eine Schleife unterhalb der Haarnadelschleife am 5'-Ende der 7SK-snRNA, ein RNA-Strukturmotiv, das der Tat-Bindestelle in der HIV-1 TAR-RNA sehr ähnlich ist (Muniz *et al*, 2010). HEXIM1 selbst besitzt in seiner 7SK-snRNA-Bindedomäne positiv geladene Reste, ähnlich der Tat-ARM (Yik *et al*, 2004). Dieser sehr ähnlich strukturierte Aufbau der Bindung legt nahe, dass Tat und HEXIM1 um die Bindung der 7SK-snRNA konkurrieren, wodurch Tat die Möglichkeit bekommt, den 7SK-snRNP-Komplex zu zerstören und den P-TEFb-Komplex freizusetzen (Muniz *et al*, 2010). Weiterhin interagiert Tat mit seiner N-terminalen Transaktivierungsdomäne mit derselben Domäne von Cyclin T, an die auch HEXIM1 bindet. Tat ist durch höhere Affinität für Cyclin T in der Lage mit dem inhibierenden Protein erfolgreich zu konkurrieren und so HEXIM1 vom P-TEFb-Komplex zu verdrängen (Barboric *et al*, 2007).

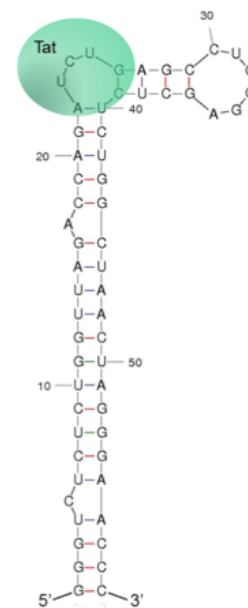


Abbildung 4.4: Struktur der TAR-RNA mit gebundenem Tat-Protein. Das virale Protein Tat bindet in HIV-1 infizierten Zellen an das TAR-Element, ein haarnadelschleifenförmiges Strukturelement innerhalb der ersten 59 Nucleotide der neu transkribierten HIV-1 mRNA (Struktur errechnet mit Mfold). Tat erkennt TAR über eine Pyrimidin-reiche Ausbuchtung aus den Resten U23, C24 und U25.

Das 7SK-snRNP: Ein zellulärer Vorratsspeicher für P-TEFb

Die katalytische Aktivität des positiven Transkriptions-elongationsfaktors b, der aus Cyclin T und CDK9 zusammengesetzt ist, wird im Zellkern durch eine Ribonucleoprotein (engl.: „small nuclear ribonucleo-protein particle“; snRNP), das sogenannte 7SK-snRNP, reguliert. Den RNA-Teil des 7SK-Ribonucleoprotein-Komplexes bildet die kleine, nichtkodierende 7SK-snRNA (engl.: „small nuclear RNA“), die von der RNA-Polymerase III transkribiert wird, hochstrukturiert und redundant ist (Murphy & Liegro, 1987) (siehe Abbildung 4.5).

An die 7SK-snRNA sind die Proteine HEXIM1(engl.: „hexamethylene bis-acetamide-inducible protein 1“) oder das homologe HEXIM2 (als Homodimer), LARP7 (engl.: „La ribonucleoprotein Domäne family, member 7“) und MePCE (engl.: „methylphosphate capping enzyme“) assoziiert.

Unter normalen Wachstumsbedingungen bindet der 7SK-snRNP-Komplex an CDK9 und Cyclin T und hält so mehr als die Hälfte des in der Zelle vorhandenen P-TEFb in einem katalytisch inaktiven Zustand (Zhou & Yik, 2006). Dabei dient die 7SK-snRNA als Grundgerüst, das die RNA-Bindedomäne von HEXIM1 bindet und dadurch die Bindung von HEXIM1 an P-TEFb vermittelt. Durch Interaktion mit HEXIM1 wird die Kinase-Aktivität von CDK9 gehemmt (Michels *et al*, 2004; Yik *et al*, 2003). MePCE und LARP7 sind für die Stabilität der 7SK-snRNA verantwortlich, da sie durch ihre Bindung einen exonucleolytischen Abbau der 7SK-snRNA verhindern. Das 7SK-spezifische „Capping“-Enzym MePCE bindet das 5'-Ende der 7SK-snRNA, während LARP7 an das 3'-Ende bindet. Durch Interaktion der beiden Proteine verliert MePCE seine „Capping“-Aktivität und ermöglicht so die Assemblierung eines stabilen LARP7/MePCE/7SK-snRNA-Komplexes (Xue *et al*, 2010). Unter Stressbedingungen dissoziiert der Komplex aus P-TEFb und dem 7SK-snRNP und stattdessen bindet Brd4 (engl.: „bromoDomäne-containing protein 4“) an CDK9 und Cyclin T. Brd4 vermittelt die Rekrutierung der beiden

Proteine an den zu transkribierenden DNA-Template und ist somit essentiell für die Funktion von P-TEFb als Elongationsfaktor (Yang *et al*, 2005).

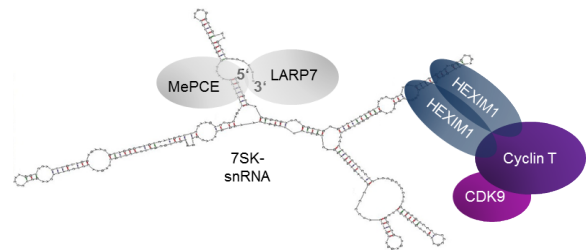


Abbildung 4.5: Das zelluläre 7SK-snRNP. Mit Hilfe des Programs Mfold errechnete Struktur der 7SK-snRNA. 3'- und 5'-Ende sind durch entsprechende Zahlen gekennzeichnet. MePCE und LARP7 (grau) binden die Enden der snRNA und schützen sie vor endonucleolytischem Abbau, während ein Homodimer aus HEXIM1 (blau) an eine Haarnadelstruktur in der Nähe des 5'-Endes bindet. HEXIM1 interagiert mit einem Komplex aus Cyclin T (violett) und CDK9 (magenta) und inhibiert die Kinase-Aktivität von CDK9.

Struktur des CDK9/CyclinT1/Tat-Komplexes

Cyclin-abhängige Kinasen (engl.: „cyclin dependent kinases“; CDKs) spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des eukaryotischen Zellzykluses. Sie sorgen für den korrekten zeitlichen Ablauf von Zellzyklusereignissen, wie DNA-Replikation oder Zellteilung, indem sie Wachstums-signale von verschiedenen Signalwegen entgegennehmen und durch Phosphorylierung anderer Enzyme weiterleiten. CDKs bilden Komplexe mit Cyclinen, durch deren Bindung sie aktiviert werden (Pavletich, 1999).

Die Cyclin-abhängige Kinase CDK9 des P-TEFb-Komplexes bindet an ein Cyclin (Cyc) der T-Familie, CycT1, CycT2a, CycT2b oder auch an CycK (Peng *et al*, 1998), wobei CycT1 als das Cyclin identifiziert wurde, das mit der Transaktivierungsdomäne von Tat aus HIV-1 interagieren kann (Wei *et al*, 1998).

Die Strukturen von CDK9 und CycT1 sind mit anderen, aus dem Zellzyklus bekannten CDKs und Cyclinen vergleichbar. CDK9 weist eine für Kinasen typische Faltung

auf, mit einem N-terminalen Flügel (proximal zu CycT1), der hauptsächlich aus β -Faltblättern zusammengesetzt ist und einem C-terminalen Flügel (distal zu CycT1), der vor allem aus α -Helices besteht (siehe Abbildung 4.6b). Außerdem besitzt CDK9 einen, alle CDKs kennzeichnenden „T-Loop“, dessen Threonin-Rest an der Stelle 186 autophosphoryliert werden kann, wodurch die katalytische Aktivität von CDK9 aktiviert wird.

CyclinT1 besitzt zwei für Cycline charakteristische „cyclin box“-Faltstrukturen, die beide hauptsächlich aus fünf großen α -Helices aufgebaut sind (Baumli *et al*, 2008). Die N-terminale „cyclin box“ interagiert mit CDK9. Downstream dieser Domäne befindet sich das 18 Aminosäuren lange „Tat/TAR recognition motif“ (TRM), mit dem CyclinT1 mit Tat interagieren kann und dadurch eine kooperative Bindung an TAR begünstigt (Garber *et al*, 1998).

Im Gegensatz zu der typischen Tertiärstruktur von CDK9 und CycT1 gibt es in der Struktur des CDK9/CycT1-Komplexes verglichen mit anderen, im Zellzyklus agierenden CDK/Cyc-Komplexen, wie zum Beispiel CDK2/CyclinA, einen entscheidenden Unterschied: CycT1 ist in seiner Orientierung zu CDK9 im Vergleich zur Bindung von CycA an CDK2 um 26° seitwärts verdreht, so dass die Interaktionsfläche zwischen den beiden Proteinen 40% kleiner ist als die des Schwesterkomplexes CDK2/CycA (Baumli *et al*, 2008).

Dies wird durch die Bindung von Tat ausgeglichen, das sich in die Spalte zwischen den beiden Proteinen legt und mit einer dadurch vergrößerten Interaktionsfläche für einen stabilen und aktiven P-TEFb-Komplex sorgt (siehe Abbildung 4.6c). In der hier gezeigten Kristallstruktur (Abbildung 4.6b, c) konnte nur der Teil von Tat aufgelöst werden, der an P-TEFb bindet (Aminosäuren 1-49) und der der Transaktivierungsdomäne mit der Cysteinreichen-Region und der „Core“-Region entspricht.

Das normalerweise ungefaltete Protein Tat nimmt bei der Bindung an CDK9/CycT1 eine gestreckte und strukturell perfekt passende Konformation an, um mit 37% seiner Oberfläche, (des in der Kristallstruktur gezeigten Anteils)

mit CDK9 und CycT1 zu interagieren. Dabei bindet es zu 88% an CyclinT1 und zu 12% an Cdk9. Die Summe an Interaktionsfläche zwischen Tat und CDK9/CycT1 ist doppelt so groß wie für durchschnittliche stabile Protein-Protein-Interaktionen (Tahirov *et al*, 2010).

Die Cystein-reiche Domäne von Tat bildet zusammen mit CyclinT1 zwei für einen derartigen Proteinkomplex einzigartige Zink-Finger (siehe Abbildung 4.6a), wobei das eine Zink-Atom intramolekular von Cys22, His33, Cys34 und Cys37 aus Tat und das andere Zink-Atom intermolekular von Cys25, Cys27 und Cys30 aus Tat und Cys261 aus CycT1 koordiniert wird.

Die Bindung des Zink-Fingers und der „Core“-Region von Tat führt in CyclinT1 zu einer Konformationsänderung, bei der sich ein Teil einer α -Helix entfaltet (in Abbildung 4.6b unterhalb des N-Terminus von Tat) und die C-Terminale Helix um $4,6^\circ$ nach außen klappt (in Abbildung 4.6b Helix oben links), um eine Oberfläche für die Bindung zu bilden. Zusätzlich rotiert die CDK9-Untereinheit um $8,5^\circ$ und der phosphorylierte T-loop kann mit Tat interagieren (Ott *et al*, 2011; Tahirov *et al*, 2010).

Posttranslationale Modifikationen von Tat

Tat und P-TEFb sind das Ziel zahlreicher posttranslati- onaler Modifikationen, durch die ihre Funktionen in der Zelle präzise reguliert werden können, da diese oftmals reversibel und sehr kurzlebig sind (Ott *et al*, 2011). Unter posttranslationalen Modifikationen versteht man eine Vielzahl von Proteinmodifikationen, bei denen kleine Moleküle wie Phosphate, Acetyl- oder Methylgruppen oder auch Ubiquitin an einzelne Aminosäuren eines fertig translatierten Proteins assoziieren. Diese Modifikationen können die enzymatische Aktivität ihres Zielproteins sowohl inhibieren als auch aktivieren.

Tat kann durch die Aktivität von Methyltransferasen inhibiert werden, die mehrere Methylgruppen entweder an Arginin- oder Lysin-Reste des Tat-Proteins anhängen und so in die Komplexbildung zwischen Tat, TAR und P-TEFb eingreifen können (Ott *et al*, 2011).

Ein Beispiel für eine solche Methyltransferase ist PRMT6 (engl.: „protein arginine N-methyltransferase 6“), die die Tat-ARM-Region spezifisch an den Aminosäure-Resten R52 und R53 methyliert. Dies führt zu einer geringeren Interaktion von Tat mit der TAR-RNA, da durch die Methylierungen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Guanidin-Gruppen der Arginin-Reste und der RNA unterbrochen werden. Dadurch wird die Bildung eines Tat/TAR/P-TEFb-Komplexes negativ beeinflusst und somit die Tat-abhängige Aktivierung der Transkription unterbunden. Die Tat-Methylierung durch PRMT6 stellt also eine Art angeborene zelluläre Immunantwort zur antiviralen Verteidigung des Wirtes dar (Xie *et al*, 2007).

Aktivierende Modifikationen von Tat betreffen das gesamte Protein vom N- bis zum C-Terminus und umfassen Phosphorylierung, nicht-proteolytische Poly-Ubiquitylierung, Acetylierung und Monomethylierung (Ott *et al*, 2011). also eine Art angeborene zelluläre Immunantwort zur antiviralen Verteidigung des Wirtes dar (Xie *et al*, 2007).

Ein Beispiel für eine aktivierende posttranslationale Modifikation von Tat ist die Acetylierung von Lys28 in der Cystein-reichen Sequenz, die zur Transaktivierungsdomäne gehört. Lys28 wird von PCAF (engl.: “P300/CBP-associated factor”), einer Histon-Acetyltransferase acetyliert (Kiernan *et al*, 1999). Die Lys28-Acetylierung erhöht die Interaktion von Tat mit dem Tat/TAR-Bindemotiv von CycT1 und stimuliert dadurch die Tat-abhängige Transkriptionselongation (D’Orso & Frankel, 2009).

Als Gegenspieler von PCAF kann die Deacetylase HDAC (engl.: „histone deacetylase 6“) Lys28 wieder deacetylieren und dadurch die Tat-vermittelte Transkription verhindern (Huo *et al*, 2011). Die Acetylierung von Tat an Lys28 ist also ein typisches Beispiel für eine reversible und präzise Regulation der Funktion von Tat in der Elongation.

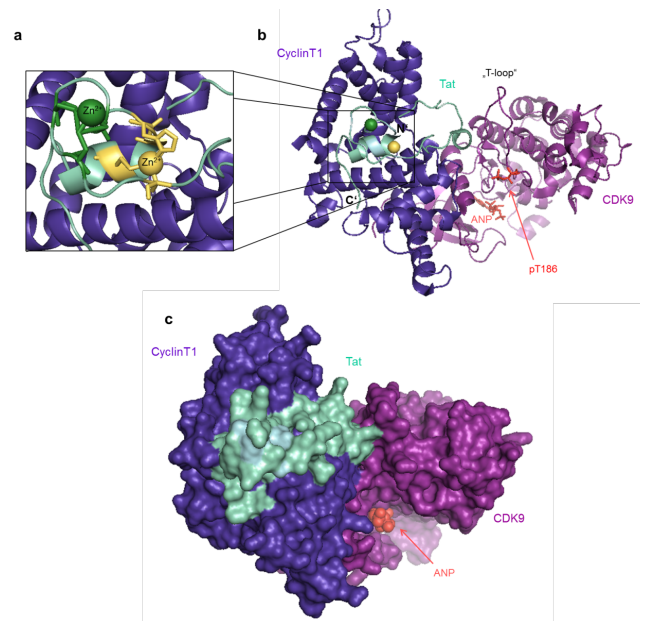


Abbildung 4.6: Kristallstruktur des CDK9/CycT1/Tat-Komplexes (PDB-Code: 3MIA) a Zink-Finger-Strukturmotiv: Die Zn-Atome werden koordiniert durch Cys22, His33, Cys34 und Cys37 aus Tat (gelb), sowie Cys25, Cys27, Cys30 aus Tat und Cys261(in Kristallstruktur nicht aufgelöst) aus CycT1 (grün). b Strukturmodell des Komplexes aus CDK9 (magenta), CycT1(violett) und Tat (türkis) in der aktiven Form. CDK9 ist an ein ATP-Analog (ANP=Phosphoaminophosphonsäure-Adenylat-Ester) gebunden und Thr186 im „T-loop“ ist phosphoryliert (pT186). N- und C-Terminus von Tat sind durch die entsprechenden Buchstaben (N' und C') dargestellt, zusätzlich sind die an Tat und CycT1 gebundenen Zn-Atome gezeigt (gelb und grün). c Oberflächenstruktur des Komplexes aus CDK9 (magenta), CycT1(violett) und Tat (türkis) in der aktiven Form, bei der CDK9 an ein ATP-Analog (ANP=Phosphoaminophosphonsäure-Adenylat-Ester) (rot) gebunden ist.

Chromatin Remodeling am LTR-Promotor

In Abwesenheit von Stimuli ist die Transkription des integrierten HIV-1-Provirus inaktiv und die infizierte Zelle, die ein eigentlich replikationskompetentes Virus trägt, verharrt in Latenz. Das liegt unter anderem daran, dass die

zelluläre DNA, in die das HIV-1-Provirus integriert, durch Nukleosomen verpackt ist und sich am 5'-LTR-Promotor eine von der Integrationsstelle unabhängige, hochgeordnete Chromatin-Struktur bildet. Diese besteht aus fünf Nukleosomen („nuc-0“ bis „nuc-4“), die die virale Genexpression durch Einschränkung des Zugangs der Transkriptionsmaschinerie zum LTR-Promoter regulieren. Dabei sitzt eines der Nukleosomen („nuc-1“) direkt „downstream“ der Transkriptionsstartstelle (zwischen den Nucleotiden -2 bis +140) und verhindert so die Initiation der Transkription (Easley *et al.*, 2010).

Nukleosomen bestehen aus einem oktameren Proteinkern aus Histon-Untereinheiten (je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4), die von DNA umwunden sind (Luger *et al.*, 2012). Der N-Terminus jedes Histons (engl.: „Histon tail“) kann durch posttranslationale Modifikationen verändert werden, wobei Histon-Acetyltransferasen (HATs) Histone acetylieren und Histon-Deacetylasen die Acetylgruppen wieder entfernen können (Easley *et al.*, 2010).

Der virale Transkriptionsaktivator Tat ist einer von vielen Faktoren, die dafür sorgen können, dass der LTR-Promoter für die Transkription zugänglich gemacht wird, indem er mit Histon-Acetyltransferasen interagiert. Zum Beispiel rekrutiert Tat den transkriptionellen Co-Aktivator p300 und das CREB-Bindeprotein CBP, das mit dem Promotor-bindenden Transkriptionsfaktor CREB (engl.: „cAMP-response element-binding protein-1“) interagiert, an den LTR-Promotor (Hottiger & Nabel, 1998). P300 und CBP besitzen beide Histon-Acetyltransferase-Aktivität und können außerdem mit weiteren HATs, wie zum Beispiel PCAF interagieren.

PCAF kann seinerseits Tat acetylieren und stimuliert dadurch die Tat-abhängige Transkriptionselongation (siehe oben). Die Rekrutierung von CBP/p300 und PCAF an den HIV-1 LTR-Promotor führt zu einer Histon-Hyperacetylierung, durch die sich die inhibierende Chromatin-Struktur auflöst (engl.: „chromatin remodeling“) und die Bindung der basalen Transkriptionsmaschinerie ermöglicht wird (Lusic *et al.*, 2003).

Neben den posttranslationalen Modifikationen von Histonen gibt es enzymatisch Komplexe, die Energie aus der Hydrolyse von ATP beziehen, um die Struktur von Chromatin aktiv zu verändern. Dazu gehört der SWI/SNF-Komplex, der zwei unterschiedliche Formen annehmen kann, BAF oder PBAF, die sich nur durch die Zusammensetzung einiger Untereinheiten unterscheiden. BAF und PBAF können Gene entweder aktivieren oder reprimieren und agieren in der Zelle als gegenseitige Antagonisten (Easley *et al.*, 2010)

Am LTR-Promotor eines integrierten HIV-1-Provirus verschiebt BAF unter ATP-Hydrolyse das Nukleosom „nuc-1“ in eine energetisch ungünstige Position, so dass es sich unmittelbar „downstream“ der Transkriptionsstartstelle befindet. Bei der Aktivierung des Promotors dissoziiert BAF und das Nukleosom nimmt wieder seine energetisch günstigere Position ein, bei der die TSS frei zugänglich ist. Nach seiner Expression interagiert Tat mit HATs, die sowohl die Histone am Promotor als auch Tat selbst acetylieren. Gleichzeitig fördert nun der andere SWI/SNF-Komplex, PBAF, der spezifisch mit acetyliertem Tat interagiert, aktiv die Transkriptions-Elongation, indem er unter ATP-Hydrolyse weitere „downstream“-Nukleosome verschiebt (Rafati *et al.*, 2011).

Fragen

1. Binden P-TEFb und Tat an dieselben Regionen in TAR? An welche?
2. Welche Modifikation durch Tat führen dazu, dass die Transkription elongiert wird?
3. Warum pausiert RPA II in Promoternähe und warum könnte das im Laufe zellulärer Transkription wichtig sein?
4. Wie sieht das Phosphorylierungsmuster der CTD von RPA II im Laufe der der Transkription aus? Welche Kinasen sind daran beteiligt?
5. Wie wird die Aktivität von P-TEFb in der Zelle reguliert und wie „umgeht“ Tat dies?

6. Durch welche Faktoren wird basale HIV Transkription gewährleistet? Wie werden diese Faktoren zum LTR Promoter rekrutiert?
7. Welche Modifikationen deaktivieren und aktivieren Tat früh bzw. später im Laufe der Transkription?
8. In welchen Zusammenhang stehen HIV Latenz bzw. Aktivierung und Chromatinremodelling?
9. Was ist der SEC? Was hat er mit basaler HIV Transkription zu tun?
10. Warum könnten Tat Inhibitoren in Kombination mit „konservativen“ Inhibitoren im Hinblick auf eine erfolgreiche Therapie wichtig sein? Was für Inhibitoren wären vorstellbar und warum sind die meisten mit zu vielen Nebenwirkungen verbunden?

Antworten

1. Nein, sie binden nicht an dieselbe Region. Tat binden an den Bulge-loop der sich im Stamm von TAR befindet, während P-TEFb an den Hairpinloop von TAR bindet.
2. Zunächst werden durch CDK9 die beiden negativ Elongationsfaktoren DSIF und NELF phosphoryliert. DSIF verbleibt gebunden an die Polymerase im Elongationskomplex während NELF aus dem pausierenden RPA II Komplex ausgelöst wird. Außerdem wird die CTD von RPA II an den Serin-2 phosphoryliert.
3. RPA II pausiert durch die Bindung der Faktoren DSIF und NELF. Letzterer Interagiert direkt mit der DNA. In dieser Pause ist es Faktoren, die zur Elongation und zur Prozessierung der mRNA wichtig sind, an die Polymerase zu binden.
4. Die Polymerasen im PIC sind hypophosphoryliert. Durch TFIIH bzw. seine CDK7 Komponente werden dann sie Serine-5 im CTD phosphoryliert. Später werden durch P-TEFb bzw. CDK9 auch die Serine-7 phosphoryliert. Gegen Ende der Transkription ist eine Verschiebung zu eher mehr Serin-2 Phosphorylierung zu beobachten. RPA II wird um recycelt werden zu können wieder dephosphoryliert.
5. P-TEFb ist in der Zelle sequestriert in den sg. 7SK snRNP. Obwohl der T-Loop von CDK9 phosphoryliert ist, d.h. die enzymatische Aktivität vorhanden ist, wird diese durch die Bindung an den 7SK snRNP verhindert. Der 7SK snRNP besteht aus neben der 7SK snRNA aus Faktoren, die sowohl die RNA vor Abbau schützen, als auch die Interaktion mit P-TEFb vermitteln. Tat hat eine höhere Affinität zu P-TEFb und kann es daher aus dem Komplex entfernen und es seinerseits zum LTR Promoter rekrutieren.
6. Der HIV Promoter selbst ist relativ stark, d.h. es findet häufig Transkriptionsinitiation statt. Allerdings wird die RPA II nicht elongationskompetent. Dazu wird die Prozessivität der RPA II einerseits über Rekrutierung von P-TEFb durch z.B. BRD4 oder Nfkb erhöht, andererseits wird auch der SEC über PAFc zum LTR Promoter rekrutiert.
7. Deaktivierung:
Oligomethylierungen an den Argininen 52/53 bzw. Lysin 51 (durch Histon Methyltransferasen)
-frühe Aktivierung:
Monomethylierung am Lysin 51 (p53 Ubiquitinligase)
Polyubiquitinylierung am Lysin 71 (Histon Methyltransferasen; in dem Zusammenhang auch Demethyhasen, welche z.B. R52/53 demethylieren)
Acetylierung am Lysin 28 (PCAF, diese Modifikation löst die Tat:TAR Interaktion, sodass der RPA II Elongationskomplex passieren kann; HDACs können diese Modifikation umkehren)
-späte Aktivierung:
Acetylierung an den Lysinen 52/51 (PCAF p300/CBP, dies führt zu Rekrutierung von SWI/SNF Chromatinremodelling Komplexen, die z.B. das nuc-1 entfernen, das sich dem elongierenden Komplex als nächstes „in den Weg stellen“ würde. SIRT1 (HDAC) deacetyliert Tat, sodass der Komplex dissoziiert und Tat recycelt werden kann.)

(Wie Methylierungen bzw. Demethylierungen und Ubiquitylierungen wirken ist noch weitgehend unbekannt. Ebenso ist noch nicht ganz geklärt, ob TAT tatsächlich zur späten Aktivierung beiträgt, oder zuvor (nach K28-Ac) abfällt).

8. Einige T Zellen fallen nach der Infektion mit HIV in Latenz. Auf Chromatinebene wird das durch Remodelling des nuc-1 erreicht, das durch den SWI/SNF Komplex BAF auf die TSS geschoben oder gezogen wird. Dadurch wird die Transkriptionsinitiation verhindert. Auf eine Aktivierung der Zelle hin, wird BAF von der LTR entfernt, das nuc-1 „rutscht“ wieder in Bereiche, die energetisch günstiger sind, d.h. vor oder hinter die TSS. Es findet nun regulär Initiation und Elongation statt. Durch das Tat-K28AC wird ein anderer SWI/SNF Komplex rekrutiert, PBAF, der nun bei der Überwindung der Nucleosomen hilft, die sich auf dem Weg von RPA II befinden.

9. Der SEC ist eine Multifaktorkomplex, der in der Zelle vorliegt und diverse Transkriptionsfaktoren enthält, wie ELL2. Über Faktoren wie PAFc wird des SEC zu Promotoren rekrutiert und kann die Prozessivität der Polymerase erhöhen. Dies geschieht auch für den HIV LTR Promoter. Tat rekrutiert hier den SEC neben P-TEFb und gewährleistet so, dass gleich mehrere Transkriptionsfaktoren an ein und dieselbe Polymerase binden.

10. Tat Inhibitoren könnten nahezu auf jeder Ebene der Regulation von Tat wirken. Z.B. kann die Interaktion zwischen TAT:TAR oder TAR:P-TEFb etc. verhindert werden. Es könnten aber auch zelluläre Faktoren inhibiert werden, wie Nfkb oder P-TEFb. Ebenso könnten man Modifikationen an Tat verhindern oder fördern, die es aktivieren bzw. deaktivieren. Das Problem bei solchen Inhibitoren ist, dass meist auch potente Transkriptionsfaktoren oder andere essentielle Faktoren der Zelle inhibiert werden, was zu starken Nebenwirkungen führt. Der Vorteil mit solch einem Inhibitor läge darin, dass nicht nur die Last an extrazellulären Partikeln vermindert werden könnte (z.B. NNRTI etc.), sondern die

Virusproduktion noch auf Ebene der Transkription verhindert werden könnte.

Klausurfragen

1. Beschreiben Sie den HIV Tat Wirkmechanismus?
2. Beschreiben Sie den Unterschied zwischen einfachen und komplexen Retroviren (nur ein Satz!).
3. Beschreiben Sie den Unterschied in der Transkription-regulation von einfachen und komplexen Retroviren und vergleichen Sie die Funktion eines retroviralen Transaktivators ihrer Wahl mit VP16.
4. Beschreiben Sie den Einfluss von NFkB auf die HIV Transkription. Differenzieren Sie nach Initiation, Elongation und Termination.
5. Beschreiben Sie den Unterschied in der Transkriptions-regulation von einfachen und komplexen Retroviren und vergleichen Sie die Funktion eines retroviralen Transaktivators ihrer Wahl mit VP16.

Literatur

- Alcamí J, Laín de Lera T, Folgueira L, Pedraza MA, Jacqué JM, Bachelerie F, Noriega AR, Hay RT, Harrich D, Gaynor RB (1995) Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J* **14**: 1552–60
- Barboric M, Yik JHN, Czudnochowski N, Yang Z, Chen R, Contreras X, Geyer M, Matija Peterlin B, Zhou Q (2007) Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res* **35**: 2003–12
- Baumli S, Lolli G, Lowe ED, Troiani S, Rusconi L, Bullock AN, Debreczeni JE, Knapp S, Johnson LN (2008) The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *EMBO J* **27**: 1907–18
- Chan JK, Greene WC (2012) Dynamic roles for NF-κB in HTLV-I and HIV-1 retroviral pathogenesis. *Immunol Rev* **246**: 286–310
- Cramer P (2002) Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 89–97
- Dikstein R (2011) The unexpected traits associated with core promoter elements. *Transcription* **2**: 201–6

- D'Orso I, Frankel AD (2009) Tat acetylation modulates assembly of a viral-host RNA-protein transcription complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 3101–6
- Easley R, Van Duyne R, Coley W, Guendel I, Dadgar S, Kehn-Hall K, Kashanchi F (2010) Chromatin dynamics associated with HIV-1 Tat-activated transcription. *Biochim Biophys Acta* **1799**: 275–85
- Elmlund H, Baraznenok V, Linder T, Szilagyi Z, Rofougaran R, Hofer A, Hebert H, Lindahl M, Gustafsson CM (2009) Cryo-EM reveals promoter DNA binding and conformational flexibility of the general transcription factor TFIID. *Structure* **17**: 1442–52
- Garber ME, Wei P, KewalRamani VN, Mayall TP, Herrmann CH, Rice AP, Littman DR, Jones KA (1998) The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes Dev* **12**: 3512–27
- He N, Liu M, Hsu J, Xue Y, Chou S, Burlingame A, Krogan NJ, Alber T, Zhou Q (2010) HIV-1 Tat and host AFF4 recruit two transcription elongation factors into a bifunctional complex for coordinated activation of HIV-1 transcription. *Mol Cell* **38**: 428–38
- Hottiger MO, Nabel GJ (1998) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat with the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *J Virol* **72**: 8252–6
- Hsin J-P, Manley JL (2012) The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* **26**: 2119–37
- Huo L, Li D, Sun X, Shi X, Karna P, Yang W, Liu M, Qiao W, Aneja R, Zhou J (2011) Regulation of Tat acetylation and transactivation activity by the microtubule-associated deacetylase HDAC6. *J Biol Chem* **286**: 9280–6
- Jones KA, Kadonaga JT, Luciw PA, Tjian R (1986) Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* **232**: 755–9
- Kao SY, Calman AF, Luciw PA, Peterlin BM (1987) Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* **330**: 489–93
- Karn J, Stoltzfus CM (2012) Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a006916
- Kiernan RE, Vanhulle C, Schiltz L, Adam E, Xiao H, Maudoux F, Calomme C, Burny A, Nakatani Y, Jeang KT, Benkirane M, Van Lint C (1999) HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J* **18**: 6106–18
- Klaver B, Berkhout B (1994) Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J Virol* **68**: 3830–3840
- Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ (2012) New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 436–47
- Lusic M, Marcello A, Cereseto A, Giacca M (2003) Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *EMBO J* **22**: 6550–61
- Michels AA, Li Q, Adamson TE, Nguyen VT, Sedore SC, Price JP, Price DH, Lania L, Bensaude O (2004) Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9 / cyclin T) inhibitor. *EMBO J* **23**: 2608–2619
- Muesing M (1987) Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell* **48**: 691–701
- Muniz L, Egloff S, Ughy B, Jády BE, Kiss T (2010) Controlling cellular P-TEFb activity by the HIV-1 transcriptional transactivator Tat. *PLoS Pathog* **6**: e1001152
- Murphy S, Liegro C Di (1987) In vitro transcription of the 7SK RNA gene by RNA polymerase III is dependent only on the presence of an upstream promoter. *Cell* **51**: 81–87
- Ott M, Geyer M, Zhou Q (2011) The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. *Cell Host Microbe* **10**: 426–35
- Pavletich NP (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287**: 821–8
- Peng J, Zhu Y, Milton JT, Price DH (1998) Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* **12**: 755–62
- Peterlin BM & Price DH (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* **23**: 297–305
- Rafati H, Parra M, Hakre S, Moshkin Y, Verdin E, Mahmoudi T (2011) Repressive LTR nucleosome positioning by the BAF complex is required for HIV latency. *PLoS Biol* **9**: e1001206
- Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH (2010) Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* **91**: 1–12
- Roy S, Delling U, Chen CH, Rosen CA, Sonenberg N (1990a) A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev* **4**: 1365–73
- Roy S, Parkin NT, Rosen C, Itovitch J, Sonenberg N (1990b) Structural requirements for trans activation of human immuno-

deficiency virus type 1 long terminal repeat-directed gene expression by tat: importance of base pairing, loop sequence, and bulges in the tat-responsive sequence. *J Virol* **64**: 1402–6

Shilatifard A, Duan DR, Haque D, Florence C, Schubach WH, Conaway JW, Conaway RC (1997) ELL2, a new member of an ELL family of RNA polymerase II elongation factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3639–43

Tahirov TH, Babayeva ND, Varzavand K, Cooper JJ, Sedore SC, Price DH (2010) Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* **465**: 747–51

Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**: 451–62

Xie B, Invernizzi CF, Richard S, Wainberg MA (2007) Arginine methylation of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by PRMT6 negatively affects Tat Interactions with both cyclin T1 and the Tat transactivation region. *J Virol* **81**: 4226–34

Xue Y, Yang Z, Chen R, Zhou Q (2010) A capping-independent function of MePCE in stabilizing 7SK snRNA and facilitating the assembly of 7SK snRNP. *Nucleic Acids Res* **38**: 360–369

Yang Z, Yik JHN, Chen R, He N, Jang MK, Ozato K, Zhou Q (2005) Recruitment of P-TEFb for Stimulation of Transcriptional Elongation by the Bromodomain Protein Brd4. *Mol Cell* **19**: 535–545

Yik JHN, Chen R, Nishimura R, Jennings JL, Link AJ, Zhou Q (2003) Inhibition of P-TEFb (CDK9 / Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell* **12**: 971–982

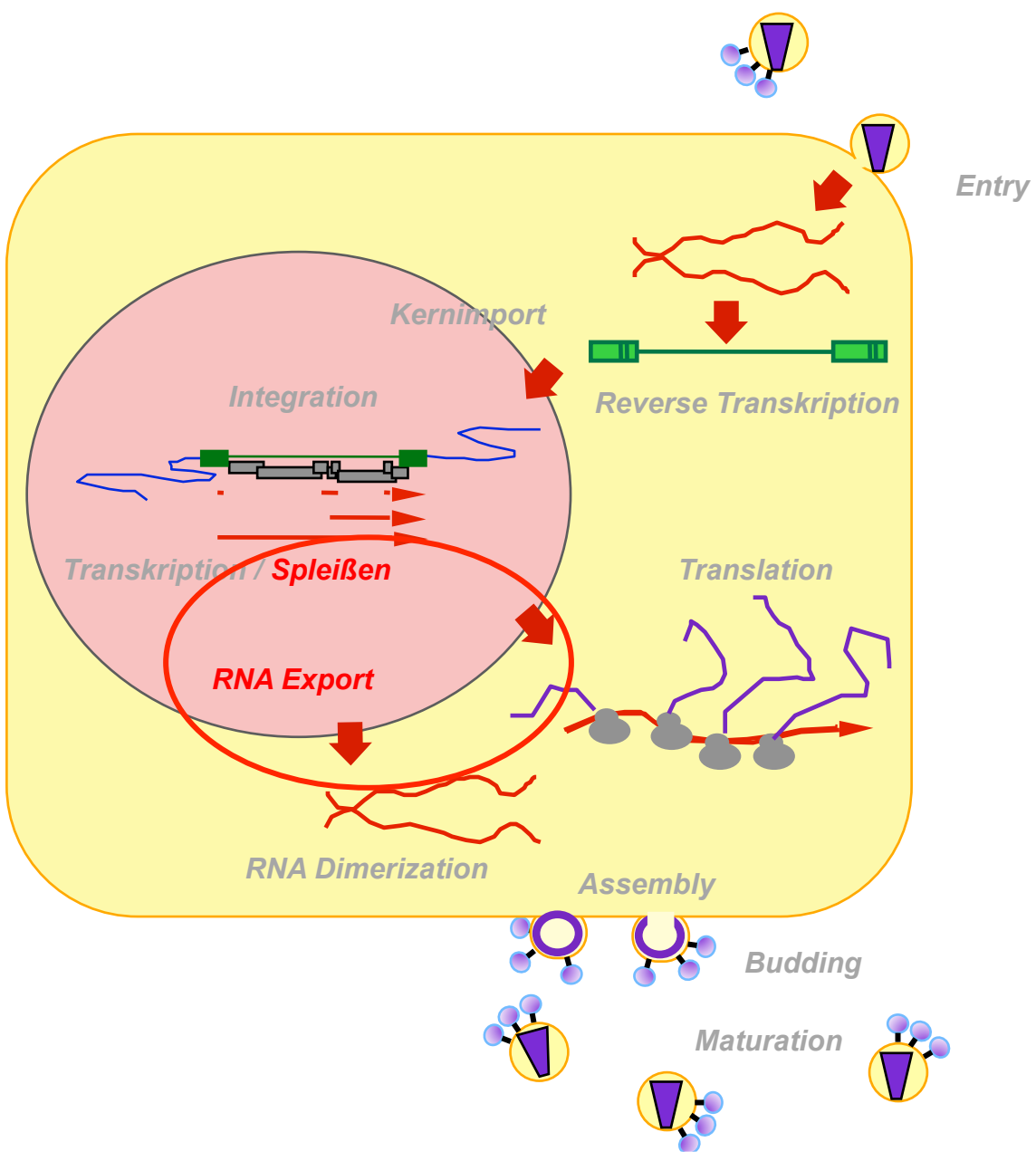
Yik JHN, Chen R, Pezda AC, Samford CS (2004) A human immunodeficiency virus type 1 Tat-like arginine-rich RNA-binding domain is essential for HEXIM1 to inhibit RNA Polymerase II transcription through 7SK snRNA-mediated inactivation of P-TEFb. *Mol Cell Biol* **24**: 5094–5105

Zhou Q, Yik JHN (2006) The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 646–59

5

Posttranskription und RNA Export

Rebecca Moschall, Frank Hillebrand und Jochen Bodem



Inhaltsverzeichnis*

Grundlagen der co- und posttranskriptionellen Prozessierung bei Retroviren	70
Spleißen	71
Posttranskriptionelles Spleißen zellulärer prä-mRNAs	71
Die Spleißreaktion	71
Alternatives Spleißen	72
Intrinsische Stärke der Spleißstellen	72
SR-Proteine	73
hnRNP-Proteine	75
Mechanismen der SR- und hnRNP-Protein vermittelten Spleißregulation	76
Alternatives Spleißen bei HIV	76
Die 2-kb Klasse der HIV-1 mRNAs	77
Die 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs	78
Die 9-kb Klasse der HIV-1 mRNAs	79
Polyadenylierung	80
Zelluläre Polyadenylierung	80
Retrovirale Polyadenylierung	81
RNA-Export	82
Grundlagen des RNA Exports	82
Tap/NXF1-abhängiger mRNA Export	82
RNA Export durch das Exportin Crm1	84
Crm1-vermittelter Export von U snRNAs	84
Crm1-vermittelter Export bei ribosomalen RNAs	84
Crm-1 abhängiger RNA Export bei HIV	84
Klausurfragen	85
Literatur	85

Einleitung

Grundlagen der co- und posttranskriptionellen Prozessierung bei Retroviren

Der Aufbau der eukaryotischen Zelle mit zytoplasmatischen und nukleären Kompartimenten separiert die DNA Replikation und Transkription im Zellkern von der Translation im Zytoplasma. Retrovirale RNAs werden gleich den zellulären mRNAs im Nukleus transkribiert und co- bzw. posttranskriptionell prozessiert, bevor sie in das Zytoplasma exportiert werden können. Um eine effiziente Produktion von Virionnachkommen zu gewährleisten, haben Retroviren verschiedene Mechanismen entwickelt, um den zellulären Abwehrmechanismen und der Degradation von Fremd-Nukleinsäure durch das Nukleosom zu entgehen (Cullen, 2003; Reed, 2003; Rodriguez et al, 2004). Die Prozessierung von retroviralen Transkripten ermöglicht es Viren, den molekularen Anforderungen der Zelle zu entsprechen. Die RNA Prozessierung umfasst im Allgemeinen vier Schritte: Anfügen einer 5' 7-Methylguanosin Kappe, Spleißen von intronischen Sequenzen, 3' Polyadenylierung und RNA Export ins Zytoplasma. Die Addition einer 5' 7-Methylguanosin Kappe wird von zellulären Genprodukten ausgeführt. Die Polyadenylierung bei Retroviren ist von sequenzspezifischen Eigenschaften der viralen RNA abhängig. Eine weitere chemische Modifikation, das Spleißen, kann gleichzeitig erfolgen. Auch wenn innerhalb des Exports keine chemische Modifikation an viralen RNAs vorgenommen wird, kann sie als Teil der Prozessierung beschrieben werden. Retrovirale RNAs werden über zelluläre Exportwege transloziert, interagieren dabei mit viralen Exportproteinen und cis-agierenden RNA Sequenzen (Cullen, 2003; Kohler & Hurt, 2007). Dieses Kapitel beschäftigt sich mit drei Teilgebieten der retroviralen RNA Prozessierung. Im ersten Teilkapitel werden Spleißelemente und die Regulation des Spleißens beschrieben. Der zweiten Teilbereich behandelt die Regulation der Polyadenylierung bei HIV-1 und im dritten Teil wird der RNA Export erklärt.

*Der Text dieses Kapitels wurde zum größten Teil aus der Master-Arbeit von R. Moschall und aus der Doktorarbeit von F. Hillebrand übernommen und modifiziert.

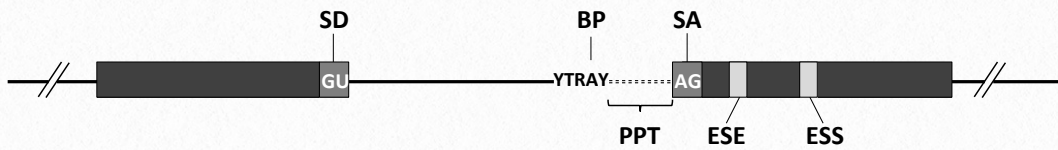


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung benötigter Spleißelemente. Zwei benachbarte Exons werden durch die Erkennung des „branch Point“ (BP) und Poly-Purin-Tracts (PPT) und einer primären Interaktion mit dem Spleißdonor (SD), nachfolgend einer Interaktion des SD mit dem Spleißakzeptors (SA), miteinander verknüpft. Exogene Spleiß-Enhancer (ESE) und exogene Spleiß-Silencer (ESS) wirken innerhalb des alternativen Spleißens auf den 5' gelegenen SA

Spleißen

Posttranskriptionelles Spleißen zellulärer prä-mRNAs

Nach dem Anfügen einer 7-Methylguanocapke an das 5' Ende der zellulären prä-mRNA und vor der Addierung eines Poly(A) Schwanzes an das 3' Ende, werden intronische, dies bedeutet nicht-kodierende Sequenzen, durch das Spleißosom entfernt. Durch das Spleißen kann die kodierende Kapazität erhöht werden. Die exonischen Genabschnitte werden hierbei miteinander verknüpft. Der 5' Terminus eines Introns ist meist durch ein GU-Dinukleotid, der 3' Terminus durch ein AG-Dinukleotid markiert (Abbildung 5.1) (Clark & Thanaraj, 2002). Die Spleißreaktion beruht auf der Erkennung von drei Elementen: 1) dem Spleißdonor (SD = 5' Spleißstelle), welcher das 3' Ende des 5' Exons markiert. 2) dem Spleißakzeptor (SA = 3' Spleißstelle) (Abbildung 5.1), der das 5' Ende des 3' Exons markiert und 3) dem sogenannten Verzweigungspunkt (branch point = BP). Dieser liegt ungefähr 100-18 Nukleotide aufwärts des Spleißakzeptors und ist durch die Erkennungssequenz YTRAY charakterisiert (Y= Pyrimidin C oder T; R= Purin A oder G). In höheren Eukaryoten findet sich zusätzlich ein Polypyrimidin-Trakt (PPT) zwischen dem Verzweigungspunkt und dem Spleißakzeptor (Abbildung 5.1) (Lopez & Seraphin, 1999; Senapathy et al, 1990).

Die Spleißreaktion

Der chemische Mechanismus des Spleißens basiert auf zwei Umesterungsreaktionen. Zuerst erfolgt ein nukleophi-

ler Angriff der freien OH-Gruppe des branch point Adenins an die Phosphatgruppe des Guanins der 5' Schnittstelle, wodurch es zu einer 2'-5'-Phosphordiesterbindung kommt. Folglich entsteht eine freie Hydroxyl-Gruppe am 5' Exon und eine Intron-3' Exon-Lariatstruktur. Innerhalb der zweiten Umesterung kommt es zu einem nukleophilen Angriff der freien Hydroxyl-Gruppe des 5' Exons auf das Guanin-Phosphat der 3' Schnittstelle. Beide Exons werden anschließend über eine Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft und ein freies Lariat formiert sich (Grabowski et al, 1984; Padgett et al, 1984; Ruskin et al, 1984). Innerhalb der beschriebenen chemischen Reaktion des *cis*-Spleißens wird keine zusätzliche Energie benötigt, da es lediglich zu einer Umlagerung von Phosphodiesterbindungen kommt. Die Umesterungsreaktionen werden durch das Spleißosom katalysiert. Das Spleißosom besteht aus insgesamt fünf U snRNAs (Uridine-rich small nuclear RNA) (U1, U2, U4, U5 und U6) die mit Proteinen zu Partikeln assoziiert sind (UsnRNP). Diese spielen eine essentielle Rolle innerhalb des Spleißzyklus, indem sie Spleißstellen erkennen und hierdurch Intron-Exon Grenzen festlegen. Hierfür sind definierte, wechselnde Interaktionen der einzelnen U snRNPs untereinander und mit der zu spleißenden RNA notwendig. Der erste Schritt innerhalb des Spleißmechanismus ist die Erkennung und Bindung der 5' Spleißstelle durch U1snRNP. Die Bindung der U1snRNP erleichtert die Erkennung des Polypyrimidintraktes und der 3' Spleißstelle durch U2AF. U2AF erleichtert wiederum die Bindung des Spleißfaktors 1 (SF1) an den Verzweigungspunkt und der prä-spleißosomale Komplex kann durch eine weitere Interaktion, die Bindung von U2snRNP an den Verzweigungspunkt, formiert

werden. Im Folgenden wird das inaktive Spleißosom durch die Anlagerung des U4/U6.U5 tri snRNP gebildet. Während der anschließenden Spleißosomaktivierung werden U1 und U4 destabilisiert oder entlassen. Das aktivierte Spleißosom führt den ersten katalytischen Schritt durch, es folgen weitere Umlagerungen der spleißosomalen RNP Verbindungen und der zweite katalytische Schritt kann erfolgen. Dies resultiert in einer 3'mRNA Lariatstruktur und der Dissoziation des Spleißosoms (Wahl et al, 2009). Während der Spleißreaktion kommt es somit zu strukturellen Umordnungen innerhalb der U snRNPs und RNA-RNA, sowie auch RNA-Protein Interaktionen (Madhani & Guthrie, 1994; Nilsen, 1994; Staley & Guthrie, 1998).

Alternatives Spleißen

Neben dem konstitutiven Spleißen, können prä-mRNAs auch durch alternatives Spleißen prozessiert werden. Das alternative Spleißen kann hierbei in mehrere Haupttypen untergliedert werden: Das Auslassen eines Exons, das Beibehalten eines Introns, die Verwendung alternativer 5' Spleißstellen oder die Verwendung alternativer 3' Spleißstellen (Abbildung 5.2) (Kan et al, 2002).

Intrinsische Stärke der Spleißstellen

Für den Einschluss eines Exons ist es absolut essentiell, dass die jeweiligen 5'- und 3'-Spleißstellen (5' und 3' SS) korrekt erkannt werden. Hierbei spielt die Stärke der Spleißstellen eine wichtige Rolle und bildet somit den ersten Schritt in der Spleißkontrolle. Da die Konsensussequenzen der meisten Spleißstellen in höheren Eukaryoten relativ degeneriert sind, beschreibt die Spleißstellenstärke die Affinität des U1 snRNP und U2AF zur 5' Spleißstelle bzw. Pyrimidin-reichen Region. Dies gibt die Effizienz der Spleißstellenerkennung wieder (Wahl et al, 2009).

Die Stärke der 5'-Spleißstelle wird durch die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem freien 5' Ende der U1 snRNA und der 11 Nukleotid langen Sequenz des Spleißdonors definiert. Je höher die Komple-

mentarität der U1 snRNA zu seiner Zielsequenz auf der prä-mRNA hierbei ist, umso effizienter wird das Exon letztlich erkannt (Freund et al, 2003; Hertel, 2008).

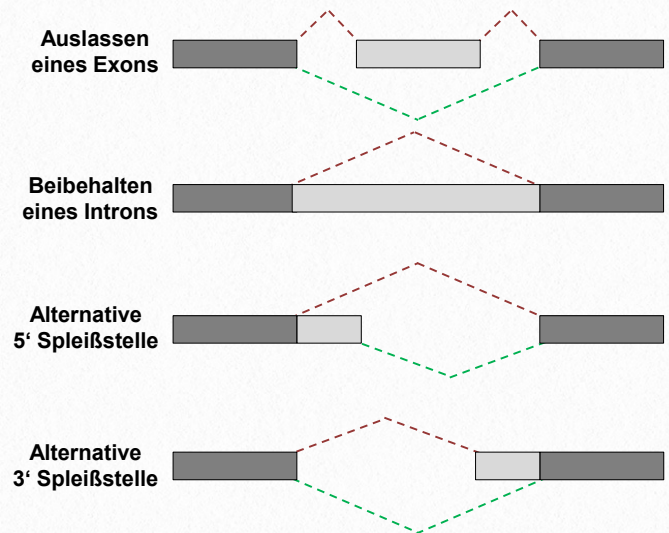


Abbildung. 5.2: Schematische Darstellung des alternativen Spleißens. Die Hauptmechanismen enthalten das Auslassen eines Exons, indem ein zwischenliegendes Exon als Intron gespleißt wird, das Beibehalten eines Introns und das Beibehalten eines Introns durch alternative 5' oder 3' Spleißstellen

Bei der Erkennung der 3'-Spleißstelle spielt hingegen die Affinität der U2AF65 kDa Untereinheit eine entscheidende Rolle, da dieses Spleißprotein an der Rekrutierung des U2 snRNPs zum Verzweigungspunkt beteiligt ist. Die Affinität von U2AF wird dabei durch die Länge und den Gehalt der Pyrimidin-reichen Region bestimmt. Auch hier gilt, dass mit steigender Affinität von U2AF an die Pyrimidin-reiche Region die Effizienz der Spleiß-akzeptor-Erkennung erhöht wird (Wu et al, 1999, Hertel, 2008).

Die Regulierung des alternativen Spleißens ist hauptsächlich von exonic splice enhancers (ESE) und exonic splice silencers (ESS) abhängig. Diese RNA Sequenzen dienen wiederum als Protein-Bindungs-Stellen, die spleißregulatorische, trans-agierende Faktoren rekrutieren. Generell handelt es sich bei diesen Faktoren um SR- (Serin/Arginin-reich) Proteine, die den Spleißprozess positiv regulieren oder um heterogenous nuclear Ribonucleoproteins Proteine (hnRNP), die einen eher inhibitorischen Einfluss auf die Spleißstellenerkennung ausüben (Chasin, 2007; Grave-

ley, 2000; Matlin et al, 2005; Pozzoli & Sironi, 2005). Intronsische Spleißstellen enthalten oftmals keine Konsensussequenz und sind somit suboptimal, sodass beispielsweise der PPT zwischen dem branch Point und dem AG Dinukleotid der 3' Spleißstelle viele Purine enthält und somit nur eine geringe Bindungsaffinität für die Spleißosomkomponente U2AF aufweist (Zheng, 2004). ESE sind oftmals abwärts einer suboptimalen 3' Spleißstelle gelegen (Fairbrother et al, 2002) und stimulieren die Spleißreaktion des aufwärts gelegenen Introns (Chew et al, 1999; Zheng et al, 2000). Viele ESEs kodieren SR-Protein Bindestellen und erhöhen bei Interaktion die Bindungsaffinität von U2AF an die suboptimale aufwärtsgelegene 3' Spleißstelle (Graveley et al, 1998; Lavigueur et al, 1993; Sun et al, 1993). ESS liegen meist abwärts eines ESEs und können das Spleißen durch mehrere Mechanismen inhibieren. Viele ESSs antagonisieren die ESE Aktivität oder wirken ESE- und Spleißstellen-spezifisch. Die detaillierte Wirkungsweise von ESS ist jedoch noch nicht erforscht (Zheng, 2004).

SR-Proteine

Die zu den nicht-snRNP gehörenden SR-Proteine (Serin/Arginin-reich) bilden eine große Gruppe von essentiellen Spleißfaktoren, die sowohl beim Entfernen konstitutiv gespleißter Introns als auch beim alternativen Spleißen eine entscheidende Rolle spielen (Graveley, 2000; Manley & Tacke, 1996).

SR-Proteine besitzen eine charakteristische strukturelle Organisation, wobei zwei funktionelle Domänen von erheblicher Bedeutung sind: die N-terminale RNA-Bindungsdomäne, sowie die C-terminale Serin-Arginin-reiche (RS) Domäne. Die N-terminale Domäne enthält ein bis zwei RNA-Erkennungs-Motive (RRMs), die es den Proteinen ermöglicht mit der prä-mRNA zu interagieren. Die RS-Domäne dagegen besteht aus einer Wiederholung von Serin/Arginin Dipeptiden und dient den Proteinen als Protein-Interaktionsdomäne (Wu und Maniatis, 1993; Kohtz et al, 1994). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die RS-Domäne auch mit der prä-mRNA in Kontakt treten kann, was mit einer alternativen Spleißosom-

Assemblierung im Zusammenhang stehen könnte (Shen & Green, 2004; Shen et al, 2004).

Außerdem führte eine umfassende Suche nach RS-Domänen enthaltender Proteine zu der Entdeckung SR-ähnlicher Proteine, die sich in der Struktur der RS-Domäne sowie in dem Vorhandensein eines typischen RRM von den SR-Proteinen unterscheiden. Zu dieser Gruppe zählen die beiden Untereinheiten von U2AF, die U1 snRNP Untereinheit U1-70K, sowie die Spleiß-Koaktivatoren SRm160/300 (Boucher et al, 2001; Long & Cáceres, 2009).

Die Serin-Reste der RS-Domäne können von diversen SR-Protein-Kinasen reversibel phosphoryliert werden. Der Phosphorylierungsstatus der RS-Domäne reguliert dabei die Protein Funktion, die Protein-Protein Interaktionen sowie die subzelluläre Lokalisation der SR-Proteine innerhalb der Zelle (Xiao & Manley, 1997; Xiao & Manley, 1998).

Man geht davon aus, dass die unterschiedlichen Funktionen der SR-Proteine beim Spleißen einen ganz bestimmten Phosphorylierungsstatus der RS-Domäne erfordern (Graveley, 2000). Die Phosphorylierung des SR-Proteins SRSF1 (SF2/ASF) z.B. fördert die Bindung an das U1-70K (eine Untereinheit des U1snRNPs) Protein *in vitro*. Dagegen wurde die Bindung an andere SR-Proteine, wie SRSF5 (SRp40), oder an U2AF durch die Phosphorylierung reduziert (Misteli, 1999). Weiter konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der SR-Proteinphosphorylierung bei Adenovirus Infektionen eine entscheidende Rolle spielen (Kanopka et al, 1996). Hypo- und hyperphosphorylierte SR-Proteine sind nicht in der Lage, den Spleißprozess zu unterstützen (Prasad et al, 1999).

Außerdem reguliert der Phosphorylierungsstatus auch die subzelluläre Lokalisation der SR-Proteine. Zum einen müssen SR-Proteine für ihre Aufgaben im Nukleus in den Kern importiert werden. Die RS-Domäne agiert hierbei als Kernlokalisierungssignal (NLS), das von den SR-Protein spezifischen nuklearen Kernimportrezeptoren

Transportin SR1 und SR2 (TRN-SR1; TRN-SR2) gebunden wird. Zumindest für den TRN-SR2 vermittelten nuklearen Import ist dabei die Phosphorylierung der RS-Domäne erforderlich (Lai et al, 2000; Lai et al, 2001).

Zum anderen lokalisieren die SR-Proteine im Zellkern in so genannten "speckles", bei denen es sich um nukleare Subdomänen handelt, die der Lagerung und/oder der Re-Assemblierung von Spleißfaktoren dienen (Caceres et al, 1997). Während die Phosphorylierung von Serin-Resten in der RS-Domäne in einer Translokation der SR-Proteine zu Orten der Transkription und des Spleißens resultiert, führt die Dephosphorylierung zu einer erneuten Assoziation der SR-Proteine mit den "speckles" (Misteli & Spector, 1997). Weiter besitzen einige SR-Proteine in Abhängigkeit ihres Phosphorylierungsgrades die Fähigkeit zwischen Nukleus und Zytoplasma zu pendeln (Cazalla et al, 2002).

Als bekannte SR-Protein Kinasen gelten die Mitglieder der SR-Protein-Kinase (SRPK)- und Clk/Sty-Familie, sowie die DNA-Topoisomerase 1 (Colwill et al, 1996; Gui et al, 1994; Rossi et al, 1996). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch die Akt-Kinase (Patel et al, 2001), sowie Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) wie CDK13 als SR-Protein Kinasen wirken können (Berro et al, 2008).

Bis jetzt wurden SRPK-1 und -2 als Mitglieder der SRPK-Familie in Säugetieren beschrieben. SRPKs sind überwiegend im Zytoplasma von Zellen in der Interphase lokalisiert, können SR-Proteine jedoch auch im Nukleus phosphorylieren. Die höchste Aktivität zeigt SRPK1 während der Mitose, was für eine Zellzyklus-abhängige Aktivität spricht. Man geht davon aus, dass SRPKs die intrazelluläre Lokalisation der SR-Proteine beeinflussen und so die SR-Protein Funktion indirekt kontrollieren (Koizumi et al, 1999; Shin et al, 2004). Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Mitglieder der Clk/Sty-Kinase Familie. Die Spleißaktivität der SR-Proteine kann durch eine Veränderung des Phosphorylierungsgrades innerhalb der RS-Domäne durch Clk/Sty beeinflusst werden.

Mit nuklearen Extrakten und permeabilisierten Nuklei konnte gezeigt werden, dass die Serin/Threonin Protein Phosphatasen, Protein Phosphatase 1 (PP1) und Protein Phosphatase 2A (PP2A), die Fähigkeit haben eine Vielzahl von SR-Proteinen zu dephosphorylieren (Mermoud et al, 1994).

Eine primäre Funktion beim Spleißen besteht vor allem in der Spleißstellenerkennung und der Spleißosom-Assemblierung (Sanford et al, 2003; Tacke & Manley, 1999). Zur Zeit werden zwei Modelle in diesem Zusammenhang diskutiert. Das "Rekrutierungs-Modell" beschreibt die Bindung von SR-Proteinen an Exonic Splicing Enhancern (ESEs). Nach diesem Modell fördern ESEs die Rekrutierung und Stabilisierung des U1snRNPs an den SD durch Interaktionen mit der U1-70K Untereinheit (Eperon et al, 1993; Jamison et al, 1995; Kohtz et al, 1994). An dem SA dagegen kommt es durch Interaktionen mit der U2AF35 Untereinheit zur Rekrutierung von U2AF (U2 auxiliary factor), der wiederum die Bindung zwischen U2 snRNP und dem Verzweigungspunkt stimuliert (Tarn & Steitz, 1996; Wu & Maniatis, 1993). Auf der anderen Seite beschreibt das "Inhibitor-Modell" die antagonistische Wirkung der SR-Proteine gegenüber den ESS gebundenen hnRNPs. SR Proteine inhibieren die Bindung von hnRNPs an den ESS, wodurch die inhibitorische Wirkung der hnRNPs auf den Spleißmechanismus verhindert wird (Zhu et al, 2001a). Des Weiteren sind die SR-Proteine an der Intron Überbrückung durch Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Hier kommt es durch Bindung der SR-Proteine an U1-70K und U2AF35 zu einer Annäherung der 5' und 3' SS (Wu & Maniatis, 1993). Man geht ebenfalls davon aus, dass SR-Proteine auch bei der Rekrutierung des U4/U6/U5-tri-snRNPs in das Spleißosom eine Rolle spielen (Zhu et al, 2001a).

hnRNP-Proteine

Wie die SR-Proteine, stellen auch die hnRNP eine große heterogene Gruppe RNA bindender Proteine dar, die eine Vielzahl von Aufgaben im mRNA Metabolismus übernehmen. Hier spielen sie eine entscheidende Rolle beim Verpacken naszierender Transkripte, der Regulation der Translation sowie dem alternativen Spleißen.

hnRNP sind ebenfalls modular aufgebaute Proteine, die multiple, durch Linker-Regionen verbundene Domänen besitzen. Bei der unter den hnRNPs am weit verbreitetsten Domäne handelt es sich um das RNA-Erkennungs-Motiv (RRM), welche die Bindung an die mRNA ermöglicht. Neben dieser RNA-Bindungs-Domäne finden sich bei den unterschiedlichen Familien auch noch weitere Motive für die RNA Bindung.

Ähnlich wie SR-Proteine können auch die hnRNP-Proteine post-translational modifiziert werden. Hierbei können Serien- oder Threoninereste phosphoryliert sowie Arginine methyliert werden, was deren Aktivität, Protein oder RNA-Interaktionen sowie die zelluläre Lokalisation beeinflusst.

Für die Vielzahl von Aufgaben, die hnRNP-Proteine im mRNA Metabolismus übernehmen, ist es erforderlich, dass diese zwischen dem Kern und Zytoplasma pendeln können. Bei hnRNP A1 findet sich hierfür eine 38 Aminosäure lange Glycin-reiche Domäne, die als nukleo-zytoplasmatische-shuttling (NS) Domäne fungiert und als M9-Domäne bezeichnet wird (Siomi & Dreyfuss, 1995). Sie übernimmt hierbei die Aufgabe des Kernimport-Signals und kann auch den Kernexport der Proteine in einer temperatur-abhängigen Weise unterstützen (Michael et al, 1995; Weighardt et al, 1996). Die hnRNP C und U Proteine enthalten dagegen ein klassisches Kern-Lokalisations-Signal (NLS). hnRNP K besitzt sowohl eine klassische NLS sowie eine NS-Domäne, wobei die Serine 284 und 385 innerhalb der NS-Domäne MAPK/ERK abhängig phosphoryliert werden können, was den Export des Proteins ins Zytoplasma zur Folge hat (Habelhah et al, 2001; Michael et al, 1997). Des Weiteren besitzt hnRNP E2 zwei funktionell unabhängige NLS-

Domänen, die bei den hnRNP Proteinen E3 und E4 jedoch fehlen (Chkheidze & Liebhaber, 2003).

Eine wichtige Funktion der hnRNP-Proteine ist die Beteiligung an der Regulation des konstitutiven und alternativen Spleißens. Hier fungieren sie primär als Repressoren des Spleißprozesses. Ähnlich wie bei den SR-Proteinen üben sie ihren Einfluss auf das Spleißen durch Spleißstellen-spezifische Bindungen an der Ziel-RNA aus. hnRNP-Proteine binden hierbei vornehmlich exonische- oder intronische-Spleiß-Silencer wobei sie mit der Spleißosom-Assemblierung bzw. der Rekrutierung von snRNPs zur Spleißstelle interferieren oder Exons in schleifenartige Strukturen bringen, so dass sie von der Spleißmaschinerie nicht mehr erkannt werden können (Martinez-Contreras et al, 2007).

Der inhibitorische Effekt der hnRNP-Proteine kann, durch eine sterische Blockade der SR-Proteinbindung an ESE oder spleißosomaler Faktoren an die Spleißstellen ausgeübt werden. So interferiert die Bindung von hnRNP A1 an ein am Verzweigungspunkt lokalisiertes ISS-Element vor dem HIV-1 Tat Exon3 mit der Rekrutierung des U2 snRNPs (Tange et al, 2001). Ein weiteres Modell stellt hierbei die Bindung von hnRNP A1 an den ESS3 im Tat Exon3 dar, wobei hnRNP A1 hier an das regulatorische Element bindet und weitere hnRNP A1 Proteine an diese Region rekrutiert. Dies hat wiederum zur Folge, dass das SR-Protein SRSF1 aufgrund der sterischen Behinderung sein Enhancer-Element nicht mehr binden kann (Zhu et al, 2001b).

Neben der sterischen Blockierung von Spleißfaktoren können hnRNP-Proteine auch durch Ausbildung einer Schleifen-Struktur ("looped out") die Erkennung des Exons durch die Spleißmaschinerie verhindern. Hierbei kommt es zu Protein-Protein Interaktionen zwischen hnRNPs (z.B. hnRNP A1), die an auseinanderliegenden Sequenzen gebunden sind (meist im Intron lokalisiert), was letztlich das "Ausschleifen" des Exons zur Folge hat (Nasim et al, 2002). hnRNP-Proteine können des Weiteren nicht nur als Spleiß-Repressoren fungieren, sondern können auch aktivatorisch wirksam sein.

Mechanismen der SR- und hnRNP-Protein vermittelten Spleißregulation

In den meisten Fällen ist das alternative Spleißen eine Kombination aus multiplen positiv und negativ wirkenden *cis*-regulatorischen Elementen und deren *trans*-agierenden Spleißfaktoren. Ob ein alternatives Exon letztlich in die mRNA integriert wird, hängt auch von der Konzentration und Aktivität der jeweiligen Spleißfaktoren ab. Hierbei wird nicht nur um gemeinsame RNA-Bindesequenzen konkurriert, sondern auch um Protein-Interaktionen. Das Verhältnis der antagonistisch wirkenden Spleißfaktoren ist daher von entscheidender Bedeutung für das alternative Spleißen. So inhibiert die Bindung von SRSF1 an das ESE-Element im HIV-1 Tat Exon3 (s.u.) z.B. die Rekrutierung weiterer hnRNP A1 Proteine, so dass der repressive Effekt von hnRNP A1 verhindert wird (Zhu et al, 2001a). Dieser Zustand wird natürlich durch die höhere Konzentration an SFRS1 in der Umgebung gefördert, während eine höhere Konzentration an hnRNP A1 die Suppression begünstigen würde. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Konzentration der SR- und hnRNP- Proteine in den unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien stark variieren kann (Hanamura et al, 1998; Kamma et al, 1995; Pollard et al, 2000).

Zusätzlich hierzu hat auch die Position der gebundenen Spleißfaktoren einen erheblichen Einfluss darauf, ob der Faktor aktivierende oder repressive Auswirkungen hat. Ist die SR-Protein Bindungssequenz z.B. im Intron lokalisiert, interferiert die SR-Protein Bindung mit der Spleißosom-Assemblierung.

Alternatives Spleißen bei HIV

Retrovirale Gene liegen auf einer polycistronischen prä-mRNA, die auch als (Prä)-Genom dient (Siehe Kapitel 4 und 6). Um unterschiedliche Genprodukte exprimieren zu können, nutzen RV unterschiedliche Mechanismen auf der Transkriptionsebene, wie differentielles Spleißen, oder auf Translationsebene, wie Frameshift oder Stopkodonsuppression. Wie bei vielen Viren spielt auch

bei HIV-1 das alternative Spleißen eine für die virale Replikation essentielle Rolle. Dies ermöglicht es dem Virus sein Genom optimal und effizient zu nutzen, um alle für die virale Replikation relevanten Proteine zu synthetisieren. Durch die unterschiedliche Nutzung von vier Spleißdonoren (5' ss; D1, D2, D3, D4) und 8 Spleißakzeptoren (3' ss; A1, A2, SA3, A4cab, A5, A7) werden mehr als 40 unterschiedliche virale mRNAs generiert (Purcell und Martin, 1993). Die kodierten Proteine werden hierbei durch die offenen Leserahmens wie bei zellulären Proteinen bestimmt .

Die alternativ gespleißten Transkripte lassen sich in drei Klassen unterteilen (siehe auch Abbildung 5.3) (Purcell und Martin, 1993). Die mRNAs der 9-kb Klasse (ungespleißt) dienen zum einen als genomische virale RNA und zum anderen als mRNAs für die Gag und Gag-Pol- Polyproteine (siehe Kapitel 5). Die Klasse der 4-kb mRNAs kodieren für die Env Glykoproteine sowie für Vpu, Vif und Vpr (Abbildung 5.3). Sie ist charakterisiert durch das enthalten von Intronsequenzen und wird daher oft als Klasse der "unvollständig" gespleißten mRNAs bezeichnet. Bei der 2-kb Klasse (als gespleißte RNA-Klasse bezeichnet) handelt es sich um mRNAs die für die regulatorischen Proteine Rev und Tat sowie das akzessorische Protein Nef kodieren (Abbildung 5.3) (Furtado et al, 1991; Purcell & Martin, 1993). Des Weiteren ist beschrieben, dass die Entstehung der verschiedenen RNA-Klassen während der viralen Replikation zeitlich reguliert ist. Die 2-kb Klasse wird hierbei in der frühen Phasen der Infektion generiert, während die RNAs der 4-kb Klasse in der intermediären und die der 9-kb Klasse vornehmlich in der späten Phase entstehen (Kim et al, 1989).

Wie oben beschrieben wird auch das alternative HIV-1 Spleißen durch die intrinsische Stärke der Spleißstellen sowie durch die Anwesenheit von *cis*- und *trans*-agierenden Elementen reguliert. Die meisten der HIV-1 Spleißstellen besitzen eine geringe intrinsische Stärke und werden daher nur ineffizient genutzt. Während die Spleißdonoren D1 und D4 die intrinsisch höchste Stärke

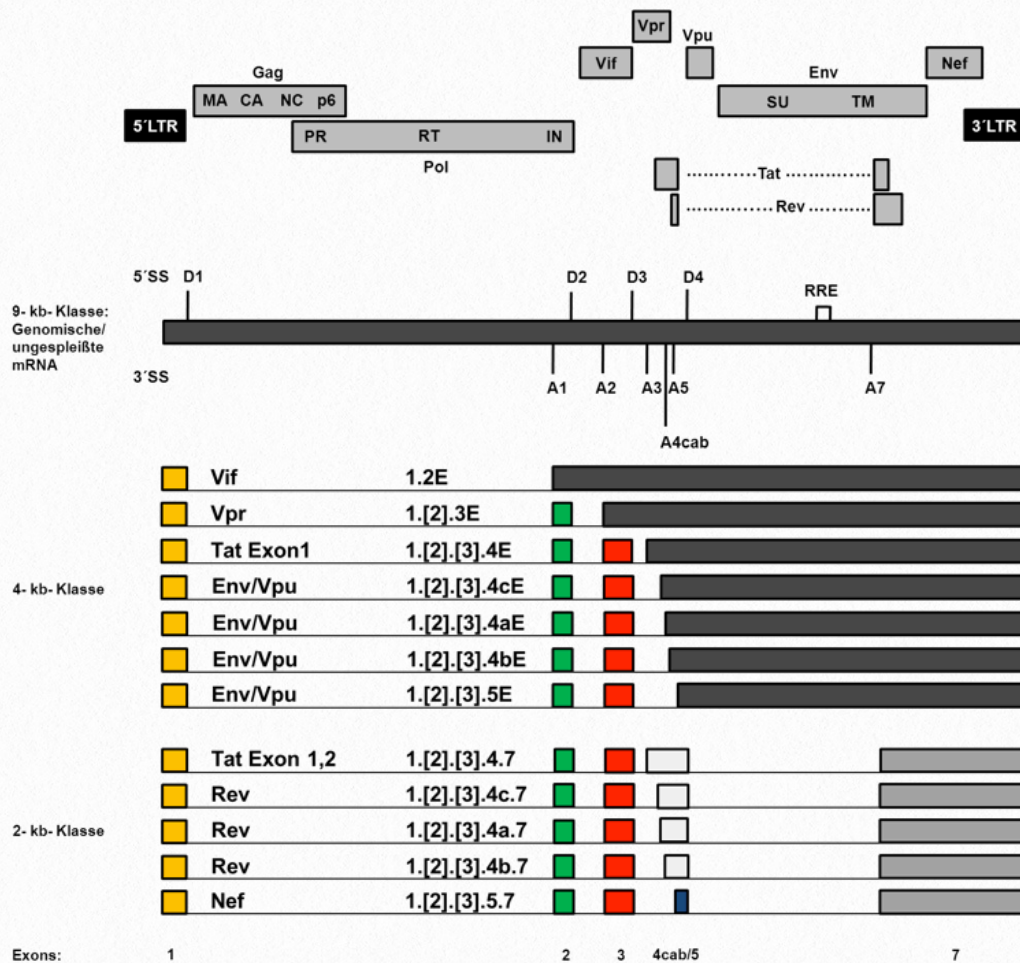


Abbildung 5.3: Alternatives Spleißen bei HIV-1. Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms. Die grauen Rechtecke geben die offenen Leserahmen der HIV-1 Proteine wieder. Die LTRs sind in schwarz gezeigt. Die Exons1, 2 und 3 sind nicht kodierend, wobei Exon1 in allen Transkripten, die Exon2 und 3 jedoch alternativ gespleißt werden (Klammer). B: Lokalisierung der 5' und 3' ss sowie des RRE im HIV-1 Genom. Gezeigt sind die mRNAs der 9-, 2- und 4-kb Klasse. In gelb ist das Exon1, in grün das Exon2, in rot das Exon3, in weiß das Exon4 bzw. Exon 4cab, in blau das Exon5 und in grau das Exon7 dargestellt. Schwarze Rechtecke geben ungespleißte mRNA Bereiche wieder (verändert nach (Stoltzfus, 2009)).

aufweisen, handelt es sich bei den 5' SS D2 und D3 um relativ schwache Donoren (O'Reilly et al, 1995). Aufgrund der suboptimalen Pyrimidin-reichen Regionen, die eingestreute Purine enthalten, sind auch die HIV-1 3' SS intrinsisch schwach (Damier et al, 1997; Dyhr-Mikkelsen & Kjems, 1995). Die 3' SS A2 und A3 weisen hierbei die höchste intrinsische Stärke unter den Akzeptoren auf (Kammler et al, 2006). Aufgrund dieser Tatsachen wird daher die Nutzung der HIV-1 Spleißstellen durch die Anwesenheit von spleißregulatorischen Elementen und Faktoren bestimmt. So sind die Spleißakzeptoren hauptsächlich von ihren 3' liegenden Sequenzen abhängig. Eine Schlussfolgerung ist

daher, dass alternatives Spleißen intrinsisch schwache 3' SSs mit Enhancer Elementen oder die Kombination intrinsisch starken 3' SSs mit Silencer Elementen erfordert (Kammler et al, 2006). Im Falle von HIV-1 sind eine Vielzahl der spleißregulatorischen Elemente und deren bindenden Faktoren bereits beschrieben und in Abbildung 5.4 schematisch dargestellt.

Die 2-kb Klasse der HIV-1 mRNAs

Die 2-kb Klasse der HIV-1 mRNAs ist durch das Fehlen der Gag-Pol sowie der Env codierenden Region charakterisiert (Purcell & Martin, 1993). Wie erwähnt, wird diese Klasse ebenfalls als die Klasse der vollständig gespleißten

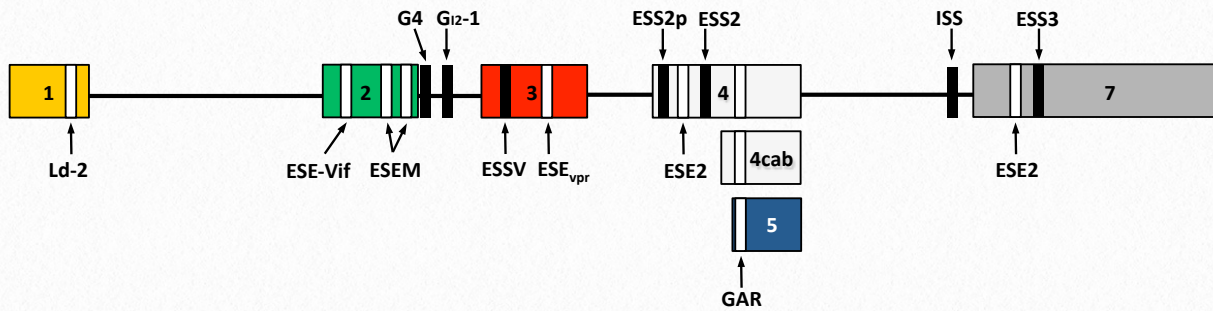


Abbildung 5.4: Positionen der bisher beschriebenen spleißregulatorischen Elemente im HIV-1 Genom. Die Exons sind nach der Nomenklatur in Abbildung 5.3 nummeriert. Spleiß-Enhancer sind als weiße, Spleiß-Silencer als schwarze Rechtecke dargestellt (verändert nach (Stoltzfus, 2009)).

mRNAs bezeichnet und kodiert für die regulatorischen Proteine Tat und Rev und das akzessorische Protein Nef.

Von Rev sind mehrere alternative Spleißvarianten beschrieben, wobei sich diese in der Anwesenheit der beiden Leader Exons 2 und 3 sowie in der Nutzung der Spleißakzeptoren 4cab unterscheiden (Abbildung 5.3) (Purcell & Martin, 1993). Wie nachfolgend diskutiert spielt Rev eine entscheidende Rolle beim Export der unvollständig gespleißten bzw. intronhaltigen mRNAs (4- und 9-kb Klasse) aus dem Kern ins Zytoplasma. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Rev einen inhibitorischen Effekt auf das virale Spleißen besitzt, indem auch das SR-Protein SRSF1 (SF2/ASF) involviert ist (Tange et al, 1996).

Wie von Rev existieren auch von Tat alternative Transkripte, die entweder die Leader Exone 2 und 3 enthalten oder aber z.T. nach dem Spleißakzeptor A3 ungespleißt sind. Letztere werden hierbei zu der 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs gezählt (Purcell & Martin, 1993). Das Tat Protein bindet die im 5'-LTR lokalisierte Transaktivator Responsive Region (TAR) und rekrutiert den Elongation Faktor p-TEFb, was Elongation verstärkt (siehe Kapitel 4).

Ähnlich wie bei Rev konnte auch für das Tat Protein eine Beteiligung am HIV-1 Spleißen nachgewiesen werden. Nach der Azetylierung an den Lysin-Resten 50 und 51 komplexiert Tat mit dem p32 Protein und der Cyclin-abhängigen Kinase 13 (CDK13), was CDK13 daran hindert das SR-Protein SRSF1 (SF2/ASF) zu phosphorylieren. Dies wiederum hat einen inhibitorischen Effekt auf das Spleißen zur Folge (Berro et al, 2008).

Auch Nef besitzt verschiedene Spleißvarianten. Unterschieden werden diese ebenfalls durch das Vorhandensein der Leader Exone 2 und 3 sowie durch die Existenz des Exons 5 (Abbildung 5.3) (Purcell & Martin, 1993). Das Nef Protein interagiert mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen, darunter auch viele Proteine der zellulären Signalgebung (siehe Kapitel 8).

Die 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs

Die 4-kb Klasse der HIV-1 mRNAs ist durch das Fehlen der Gag-Pol kodierenden Region gekennzeichnet (Purcell & Martin, 1993). Da die mRNAs dieser Klasse Introns enthalten sind sie nur "unvollständig" gespleißt und werden daher den Rev-abhängigen mRNAs zugeordnet (Bohne et al, 2005). Die Gruppe umfasst die *env* mRNAs sowie die mRNAs der akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Vpu (Purcell & Martin, 1993).

Es sind zurzeit 16 alternative *env* mRNAs beschrieben, die sich dahingehend unterscheiden, ob sie das Leader Exon 2 oder 3 sowie die Exone 4cab oder das Exon 5 enthalten (Abbildung 5.3) (Purcell & Martin, 1993). Sie kodieren das Vorläufer Glykoprotein gp160, was im Golgi durch zelluläre Proteasen in die reifen Oberflächen Glykoproteine gp120 und gp41 gespalten wird (siehe Kapitel 2).

Das einzige Spleißereignis des *vif* Transkriptes findet vom Donor 1 (D1) auf den Akzeptor 1 (A1, Abbildung 5.3) statt, wobei der Rest der mRNA ungespleißt bleibt (Purcell & Martin, 1993). Das Vif Protein spielt eine essentielle Rolle in der effektiven Vermehrung von HIV-1. Vif verhindert die Enkapsidierung der zellulären antiviralen Faktoren APOBEC3G und APOBEC3F, bei denen es sich um

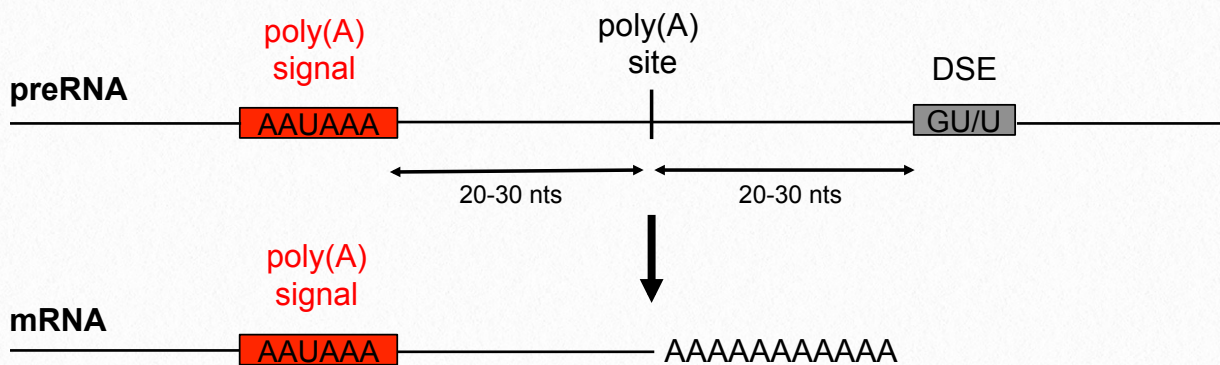


Abbildung 5.5: Essentielle Elemente für die Polyadenylierung. CPSF bindet an das Poly(A) Signal und rekrutiert CFI und II. Anschließend wird die RNA an der Polyadenylierungsstelle gespalten und Adenosinreste angefügt. DSE: G/U reiches 3' Element.

Cytidin Desaminasen handelt (siehe Kapitel 3). Diese Faktoren werden in Abwesenheit von Vif in das Virus enkapsidiert und desaminieren in der viralen cDNA Cytosine zu Uracil. Vif vermittelt die Rekrutierung eines Ubiquitin E3 Ligase Komplexes, was letztlich die Polyubiquitierung und die Protease vermittelten Degradation von APO-BEC3G/F zur Folge hat (siehe Kapitel 3).

Das einzige Spleißereignis bei Vpr findet vom D1 auf den A2 statt, wobei ein alternatives Spleißprodukt noch das HIV-1 Exon 2 enthalten kann (Abbildung 5.3) (Purcell & Martin, 1993). Vpr übernimmt eine Vielzahl von Funktionen, wobei es hierbei mit einer großen Anzahl zellulärer Faktoren interagiert. So ist Vpr an dem Import des viralen Prä- Integration-Komplexes in den Zellkern beteiligt, fördert den G2/M- Phase Arrest in infizierten Zellen, erhöht die Aktivität des HIV-1 LTRs und inhibiert selektiv das Spleißen zellulärer mRNAs (Kuramitsu et al, 2005).

Vpu wird von einer bi-cistronischen mRNA der 4-kb Klasse codiert, die auch parallel das Eng-Glykoprotein exprimiert (Abbildung 5.3 und Kapitel 6). Es konnte gezeigt werden, dass Vpu einen Einfluss auf die Entlassung der Virione aus der Zelle hat indem es antagonistische Funktionen zum zellulären Restriktionsfaktor Tetherin (BST-2/CD317) aufweist (siehe Kapitel 7). Tetherin verhindert in Abwesenheit von Vpu die Freisetzung neugebildeter Viren und wird durch Vpu an der Zelloberfläche herunter reguliert.

Die 9-kb Klasse der HIV-1 mRNAs

Die mRNAs der 9-kb Klasse stellen zum einen das virale Genom und kodieren zum anderen die inneren Strukturproteine (Gag) sowie die Replikations Enzyme (Pol) des Virus. Gag-Pol sind hierbei als Exon definiert und werden von dem ungespleißten Transkript als Polyproteine (Pr55 und Pr160) exprimiert (Bohne et al, 2005).

Gag kodiert für das Polyprotein Pr55, welches bei der Reifung zum infektiösem Virus-Partikel durch die virale Protease in die inneren Strukturproteine p17 (MA), p24 (CA), p7 (NC) und p6 gespalten wird (Freed, 2001).

Pol kodiert für das Polyprotein (Pr160), das der Vorläufer für die viralen Replikationsenzyme ist. Durch einen Frameshift während der Translation kommt es zur Expression von Pr160, welches später ebenfalls durch die virale Protease in die Enzyme Integrase (IN), reverse Transkriptase (RT) und die Protease (PR) proteolytisch gespalten wird siehe (siehe Kapitel 3 und 6).

Polyadenylierung

Zelluläre Polyadenylierung

Die zelluläre Polyadenylierung von RNA ist ein essentieller Schritt innerhalb der posttranskriptionellen Prozessierung. Polyadenylierung umfasst alle zellulären Transkripte der RNA Polymerase II mit Ausnahme von replikationsabhängigen Histon mRNAs höherer Eukaryoten (Dominski & Marzluff, 2007). Der Polyadenylierungsmechanismus lässt sich in zwei Teilschritte untergliedern: Die Spaltung an der Schnittstelle und das Anfügen von Adenosinresten. Eine funktionelle Polyadenylierung wird durch drei Elemente ermöglicht:

Das Polyadenylierungssignal (Poly(A) Signal), eine Hexanukleotid Sequenz AAUAAA 2) vorwiegend maximal 23 Nukleotide abwärts gelegene Spaltungs- bzw. Polyadenylierungsstelle (Abbildung 5.5) (Poly(A) Stelle) (Chen et al, 1995) und 3) eine weniger konservierte GU- oder U-reiche Region ungefähr 10-30nt in 3' Richtung der Polyadenylierungsstelle (Proudfoot, 1991). Das Poly(A) Signal ist essentiell für die Spaltung der Poly(A) Stelle und das Anfügen von Adenosinresten und ist daher hoch konserviert. Die weniger konservierten „downstream“ Elemente (DSE) können entweder aus einer GU- (Konsensus: YGUGUUUYY; Y=Pyrimidin-Base) oder einer U-reichen Region bestehen (Abbildung 5.5). Punktmutationen innerhalb dieser Sequenzen haben im Gegensatz zum hoch konservierten Poly(A) Signal nur geringe Effekte auf die Polyadenylierungseffizienz. Jedoch ist der Abstand von 20-40nt zwischen dem DSE und dem Poly(A) Signal grundlegend für eine funktionelle Polyadenylierung, da die Poly(A) Stelle hauptsächlich hierdurch determiniert wird. Die meisten Gene enthalten eine NA-Dinukleotid, oft auch eine CA-Dinukleotid Poly(A) Stelle (Zhao et al, 1999).

Die posttranskriptionelle Prozessierung des 3' Endes benötigt neben oben aufgeführten Sequenzelementen auch mehrere Proteine. Innerhalb der eukaryotischen Spaltungsreaktion interagieren der Spaltungs- bzw. Polyadenylierungsfaktor (CPSF= cleavage/poly-adenylation specificity

factor), der spaltungsstimulierende Faktor (CstF= cleavage-stimulatory factor), Spalt-Faktoren Im und IIm (CFIm und CFIIIm = Cleavage factor Im und IIm), die RNA Polymerase II und die Poly(A)-Polymerase (PAP) (Zhao et al, 1999). Die darauf folgende Polyadenylierungsreaktion wird durch die Komponenten CPSF, PAP und das Poly(A)- Bindungsprotein II (PAB II) ausgeführt (Zhao et al, 1999).

Initialer Schritt innerhalb der Spaltungsreaktion ist die Erkennung des Poly(A) Signals durch die große CPSF-Untereinheit CSPF-160 und die Bindung des DSE durch die CstF-Untereinheit CstF-64. Beide Bindungen werden durch CF Im reguliert. Die relativ schwachen Wechselwirkungen von CPSF und CstF mit den Elementen werden durch die Interaktion von CPSF-160 mit CstF-77 stabilisiert (Gilmartin & Nevins, 1991; MacDonald et al, 1994; Weiss et al, 1991; Wilusz et al, 1990). Durch eine anschließende Wechselwirkung der RNA-Polymerase II mit CPSF und CstF wird diese angelagert und der Initiationskomplex formiert sich. Zur Vervollständigung des spaltungskompetenten Komplexes werden CF IIm und darauffolgend PAP gebunden. Anschließend wird die prä-mRNA an der Poly(A) Stelle geschnitten, das 3' Ende freigesetzt und degradiert. Mit der Entlassung des geschnittenen 3' Endes dissoziieren auch CstF, die RNA Polymerase II, CF Im und CF IIm Komplexe. Für die folgende Polyadenylierungsreaktion verbleiben CPSF und PAP am geschnittenen RNA-Transkript. Durch die CPSF Interaktion mit PAP beginnt das langsame Anfügen von Adenosinresten am 3' Ende. Die effiziente Polyadenylierung wird anschließend durch die Anlagerung von PAB II ermöglicht. Hierbei bindet das Protein an den neu synthetisierten Poly(A) Schwanz (ca. 10nt) und die effiziente Elongation des Poly(A) Schwanzes von bis zu 250nt beginnt. Nach Erreichen der 250 Nukleotide wird die Elongation verlangsamt und die Polyadenylierungsfaktoren CPSF, PAP und PABII werden freigesetzt (Zhao et al, 1999).

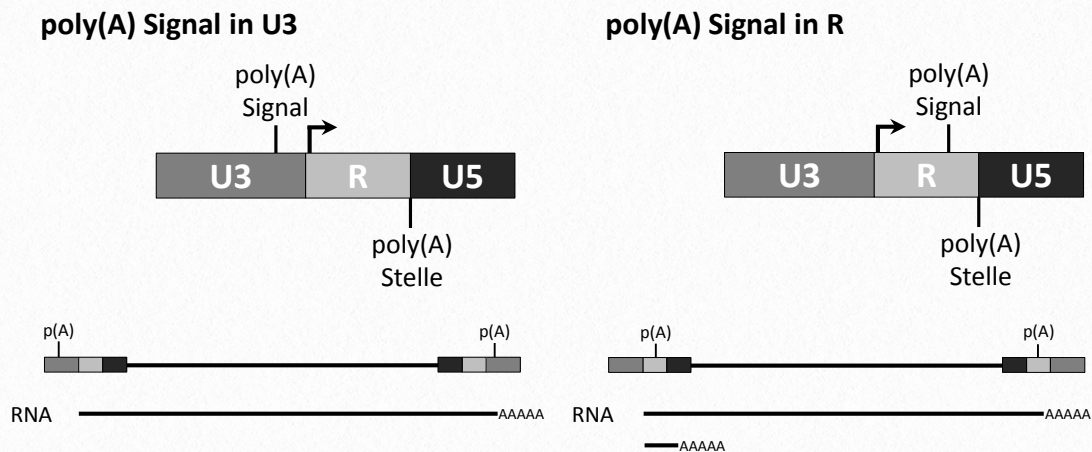


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung essentieller Polyadenylierungselemente. Links: Repräsentation eines Poly(A) Signals in U3 mit resultierendem Transkript; Rechts: Poly(A) Signal innerhalb der R Region mit resultierenden Transkripte

Retrovirale Polyadenylierung

Das retrovirale RNA Genom wird während der Reverse Transkription in DNA umgeschrieben (siehe Kapitel 3) (Coffin et al, 1997; Tang et al, 1999). Hierbei kommt es zu einer Verdopplung der LTR Sequenz, die aus den drei Segmenten U3, R und U5 besteht. Die Transkription startet anschließend am 5' Ende der R Region (Abbildung 5.6). Das Poly(A) Signal befindet sich bei Retroviren innerhalb der LTR Region, liegt somit in der 3' und in der 5' LTR vor. Ein aktives 5' Poly(A) Signal würde jedoch zu verfrühter Polyadenylierung und nicht das Genom umfassenden Transkripte führen und die Effizienz der viralen Genexpression dadurch drastisch herabsetzen (Abbildung 5.6) (Barabino & Keller, 1999; Colgan & Manley, 1997; Proudfoot, 1991). Retroviren können anhand ihrer Poly(A) Signal Lokalisierung in zwei Gruppen unterteilt werden.

Viren der ersten Gruppe kodieren das Poly(A) Signal innerhalb der U3 Region vor dem Transkriptionsstart in der R Region (Abbildung 5.6). Das abwärtsgelegene GU/U-reiche Element ist am Beginn der U5 Region lokalisiert, somit befindet sich die Spaltstelle am 3' Ende von R. Daraus resultiert, dass die für die Polyadenylierung relevanten Sequenzen nur innerhalb der 3' LTR lokalisiert vorliegen und dadurch eine 5' Polyadenylierung umgangen werden kann (Furger et al, 2001). Zu den Vertretern dieser

Gruppe werden das murine Mamma-tumor Virus (MMTV), das Rous Sarkoma Virus (RSV) und die humanen T-Zell Leukämie Viren Typ 1 und Typ 2 (HTLV1 und 2) gezählt. Die R Region von MMTV und RSV ist relativ kurz (15 und 21 Nukleotide), wodurch das Poly(A) Signal und die GU/U-reiche Region in räumlicher Nähe vorliegen. HTLV Viren besitzen hingegen mit 228 Nukleotiden eine sehr ausgeprägte R Region (Coffin et al, 1997). Dadurch liegt das Poly(A) Signal in einem Abstand von 269 Nukleotiden aufwärts der Poly(A) Stelle (Bar-Shira et al, 1991). HTLV erhält hierbei die funktionelle Abhängigkeit der Distanz-abhängigen Polyadenylierung durch Ausbildung einer Sekundärstruktur, dem „Rex Responsive Element“ (RexRE). Das in R-U3 gelegene RexRE umfasst 255 Nukleotide und bringt die Polyadenylierungselemente wieder in räumliche Nähe (Bar-Shira et al, 1991), sodass eine effiziente Polyadenylierung innerhalb der 3' LTR erfolgen kann.

Die zweite Gruppe umfasst das humane Immundefizienz Virus Typ 1 und Typ 2 (HIV-1 bzw. HIV-2), das Moloney murine Leukämie Virus (MoMLV) und das equine infektiöse Anämie Virus (EIAV). Das Poly(A) Signal und die GU/U-reiche Sequenz sind hier in der R Region lokalisiert (Abb 1.5.1). Dies bedeutet, dass in beiden LTRs ein funktionelles Poly(A) Signal vorliegt und virale Mechanismen vorhanden sein müssen die eine 5'

Polyadenylierung supprimieren, um somit eine effiziente Genexpression zu gewährleisten (Furger et al, 2001).

Für die Polyadenylierungsregulation von HIV-1 konnte gezeigt werden, dass die U3 Region der LTR eine fördernde Wirkung auf die CPSF-Bindung an das Poly(A) Signal ausübt (Ashe et al, 1995; Gilmartin et al, 1995; Valsamakis et al, 1991). Die U3 Region wird lediglich in der 3' LTR transkribiert, da sie innerhalb der 5' LTR noch vor dem Transkriptionsstart in R kodiert liegt. Dennoch ist die unterstützende Funktion der U3 Region alleine nicht ausreichend, um das starke Poly(A) Signal innerhalb der 5' LTR zu unterdrücken (Ashe et al, 2000).

Spleißen und Polyadenylierung sind gekoppelte und kointegrationell stattfindende Prozesse (Moore et al, 2009; Zhao et al, 1999). Spleißen verbessert dabei die Polyadenylierungs-Effizienz (Rigo et al, 2009; Moore et al., 2009; Millevoi et al, 2009; Wang et al, 2008; Rigo et al, 2008). Studien von Ashe und Kollegen zeigten, dass die U1snRNP während des Spleißosomaufbaus an den +195nt lokalisierten Hauptspleißdonor bindet und daraus die 5' abhängige Poly(A) Stellen Unterdrückung hervorruft (Ashe et al, 2000). Hierbei wechselwirkt die Haarnadelstruktur 1 in U1snRNP mit dem U1 70K Protein des Spleißosoms. Das U1 70K Protein interagiert möglicherweise mit PAP, was zu einer Polyadenylierungsinhibition führt (Ashe et al, 2000; Gunderson et al, 1998).

RNA Export

Grundlagen des RNA Exports

Die Regulation der Genexpression ist unter anderem von Transportwegen, gerichteten Bewegungen von spezifischen Makromolekülen zwischen Zytoplasma und Zellkern, abhängig (Nakielny & Dreyfuss, 1999). Hierbei müssen beispielsweise Histone, DNA Replikations- und Transkriptionsfaktoren nach der zytoplasmatischen Synthese in den Zellkern importiert werden. Im Gegensatz hierzu wird ein Großteil nukleär produzierte RNAs aus dem Nucleus exportiert, um ihre spezifische Funktionen zu erfüllen. Der bidirektionale Transport von Makromolekülen

über die Kernmembran ist ein streng regulierter, aktiver Prozess und erfolgt über nukleäre Porenkomplexe (NPC) innerhalb der Kernmembran. Moleküle und Proteine kleiner als 9nm Durchmesser und unter 20-40kDa können frei durch NPCs diffundieren, während größere Proteine, RNAs oder Ribonukleo-proteinkomplexe (RNP) über spezifische Transport-rezeptoren in energieabhängiger Form transportiert werden (Fried & Kutay, 2003).

Generell werden eukaryotische prä-mRNAs, die durch die Polymerase II synthetisiert wurden, nach der Prozessierung durch das Transportmolekül Tap/NXF1 in das Zytoplasma transloziert (Carmody & Wentz, 2009). Im Gegensatz hierzu gibt es eine zweite Gruppe von mobilen Transportrezeptoren, welche zur Familie der Karyopherine gehören. Karyopherine wirken je nach Kargo-Erkennungssequenz als Importin oder Exportin (Fried & Kutay, 2003; Görlich & Kutay, 1999). Hierbei werden kurze Peptidsequenzen, entweder ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) oder ein nukleäres Exportsignal (NES), auf dem zu transportierenden Molekül gebunden (Görlich & Kutay, 1999; Mattaj & Englmeier, 1998; Pemberton et al, 1998). Die benötigte Energie innerhalb des Karyopherin-vermittelten Transports wird durch den RanGTP-RanGDP Gradienten bereitgestellt (Moore & Blobel, 1993). Exportine wirken somit in einer Vielzahl von RNA-Exportmechanismen die von Peptidsequenzen abhängig sind; zudem können sie ebenfalls Nukleotidmotive erkennen. Im Gegensatz zum Karyopherin-vermittelten Export von Proteinen, tRNA (transfer RNA), miRNA (micro RNA), snRNA (small nuclear RNA) und rRNA (ribosomale RNA) (Rodriguez et al, 2004), ist der mRNA Kernexport unabhängig von Exportinen und dem Ran Zyklus und wird über das Exportprotein NXF1/Tap in das Zytoplasma transportiert (Conti & Izaurralde, 2001; Reed & Hurt, 2002).

Tap/NXF1-abhängiger mRNA Export

Eukaryotische prä-mRNAs werden durch die Polymerase II synthetisiert und durchlaufen mehrere Prozessierungsschritte: 5' Capping, Spleißen und Polyadenylierung. Jede dieser Modifikationen ist essentiell für einen

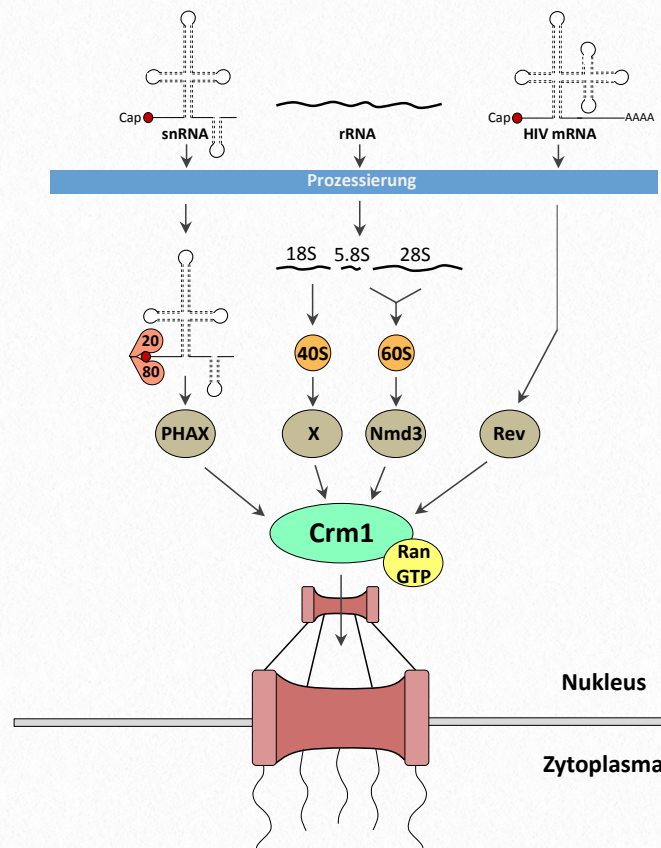


Abbildung 5.7: Schematische Darstellung des Crm1-abhängigen RNA Exports Das Exportprotein Crm1 (grün) exportiert in Ran GTP Abhängigkeit (gelb) snRNA, rRNA und HIV mRNA in das Zytoplasma. Die snRNA 7-Methylguanodin Kappe wird von den CBC Untereinheiten CBC20 und CBC80 gebunden, interagiert mit dem phosphorylierten Protein Phax (braun). Über eine Phax Interaktion mit Crm1 wird die snRNA exportiert. Innerhalb des ribosomalen RNA Exports wechselwirken 5,8S und 28S RNA mit dem Adapterprotein Nmd3 (braun), 18S rRNA mit einem nicht identifizierten Protein (braun). Der HIV-1 mRNA Export wird durch die Bindung des Exportadapters Rev (braun) an das RRE und eine anschließende Interaktion mit Crm1 realisiert.

effizienten mRNA Export, da nur vollständig prozessierte mRNAs in das Zytoplasma entlassen werden und durch die Prozessierung die Anlagerung von Export Komponenten an das Transkript ermöglicht wird (Cullen, 2003). Der erste Schritt innerhalb der Prozessierung ist die Anlagerung einer 7-Methylguanodin Kappe an das 5' Ende (Shatkin & Manley, 2000), welche anschließend vom CBC gebunden wird (Izaurrealde et al, 1995). Nach erfolgtem Spleißen lagert sich der Exon-junction-complex (EJC) an die Stelle der Exonfusion. Durch das Capping und Spleißen kann nachfolgend der konservierte transcription-export-complex (TREX) an das Transkript rekrutiert werden (Cheng et al, 2006; Masuda et al, 2005). Der für den Export humaner mRNA essentielle TREX Komplex setzt sich aus mehreren Exportfaktoren wie UAP56 (HEL), ALY(REF) und dem THO Komplex

zusammen (Masuda et al, 2005; Strasser et al, 2002). Anschließend wird das 3' Ende des mRNA Transkripts durch CPSF (cleavage/polyadenylation specific factor) geschnitten und polyadenyliert (Proudfoot, 2004).

Der Gesamt-mRNA Export ist im Gegensatz zu Proteinen, tRNAs oder auch rRNAs unabhängig vom RanGTP-GDP Gradienten und von Karyopherinen und wird durch das Heterodimer NXF1-NXT1 (Metazoa: Tap/p15; S.cerevisiae: Mex67/Mtr2) ins Zytoplasma transportiert (Herold et al, 2000; Segref et al, 1997). Die Rekrutierung von NXF/NXT1 an das mRNP erfolgt indirekt durch die Interaktion der ATP-abhängigen RNA-Helikase UAP56 mit ALY. Die Bindung von ALY an TREX wird durch die ATP-gebundene Helikase ermöglicht, was wiederum die ATPase Aktivität von UAP56 erhöht (Taniguchi & Ohno, 2008). Die ATP-Hydrolyse bewirkt einen Transfer der

mRNA von UAP56 an ALY. Ein ternärer Komplex wird durch die Bindung von NXF1 an eine argininreiche Sequenz in ALY gebildet, was in einem erneuten mRNA Transfer von ALY an den Exportrezeptor NXF1/NXT1 resultiert (Haut-bergue et al, 2008). Durch Interaktion von NXF1/NXT1 mit spezifischen Nukleoporinen der Kernpore kommt es letztendlich zur Translokation ins Zytoplasma (Terry & Went, 2007). Finaler Schritt innerhalb des mRNA Exports ist die Freilassung der Nukleinsäure in das Zytoplasma.

RNA Export durch das Exportin Crm1

Das Exportin Crm1 (Exportin1, Crm1p, Xpo1) gehört zur Familie der Karyopherin Transportrezeptoren und erkennt Transportmoleküle mit einem leucinreichen nukleären Exportsignal (Fornerod et al, 1997). Crm1 kann keine RNA binden. Jedoch interagiert es über RNA-gebundene, NES enthaltende Adapterproteine mit der zu exportierenden RNA (Abbildung 5.7). Erstmals konnten NES-Sequenzen im viralen HIV-1 Protein Rev und im zellulären Protein Kinase Inhibitor (PKI) identifiziert werden (Askjaer et al, 1998; Wen et al, 1995). NES Sequenzen sind schwach konserviert und setzen sich aus Leucinen oder anderen hydrophoben Aminosäuren zusammen (Bogerd et al, 1996). Neben seiner Rolle als Exportrezeptor für zelluläre Proteine, vermittelt Crm1 auch den Export von zellulären U snRNAs, rRNAs und inkomplett gespleißten Transkripten komplexer Retroviren (Abbildung 5.7) (Emerman et al, 1989; Fornerod et al, 1997; Ho et al, 2000; Malim et al, 1989; Moy & Silver, 1999; Murdoch et al, 2002).

Crm1-vermittelter Export von U snRNAs

Der Crm1-vermittelte Export von U snRNAs bezieht sich auf die spleißosomalen Untereinheiten U1, U2, U4 und U5, welche durch Pol II als prä-snRNAs synthetisiert werden (Hamm & Mattaj, 1989). Durch ko-transkriptionelle Prozessierung werden an die 5' Enden der jeweiligen U snRNAs 7-Methylguanosin-Kappen synthetisiert, die einen effizienten Export ermöglichen (Izaurralde et al, 1995). Die prä-snRNA 5' Kappe wird hierbei durch den CBC (cap binding complex), der aus den Untereinheiten

CBP20 und CBP80 besteht, erkannt. Nachfolgend kann das phosphorylierte Protein PHAX (phosphorylated adaptor for RNA export) zusammen mit Crm1-RanGTP an CBC binden (Abbildung 5.7) (Ohno et al, 2000). Crm1 interagiert mit Nukleoporinen der Kernpore und transloziert die U snRNA in das Zytoplasma.

Crm1-vermittelter Export bei ribosomalen RNAs

Neben U snRNAs werden ebenfalls RNAs der einzelnen ribosomalen Untereinheiten durch eine Crm1 Interaktion exportiert (Ho et al, 2000; Moy & Silver, 1999; Murdoch et al, 2002). Im Allgemeinen sind Ribosomen aus einer kleinen 40S Untereinheit und einer großen 60S Untereinheit zusammengesetzt. Diese Untereinheiten bestehen insgesamt aus mehr als 70 Proteinen und vier ribosomalen RNAs (28S rRNA, 18S rRNA, 5,8S rRNA und 5S rRNA). Nach der Synthese von prä-60S und prä-40S Partikeln im Nukleolus, werden die RNA- und Protein-Bestandteile der kleinen bzw. großen Untereinheiten im Nukleus separat zusammengesetzt und darauffolgend exportiert. Der Exportmechanismus der großen ribosomalen Untereinheit konnte in Hefe und Metazoa gezeigt werden (Emerman et al, 1989; Gadal et al, 2001; Thomas & Kutay, 2003). Das NES-enthaltende Adapterprotein Nmd3 bindet an prä-60S Partikel im Zellkern und führt über eine Interaktion mit Crm1 und RanGTP zur Translokation ins Zytoplasma (Abbildung 5.7)(Gadal et al, 2001; Ho et al, 2000). Des Weiteren konnten zwei andere auxiliäre Adapterproteine, Arx1 und Mex67-Mtr2 (Hung & Johnson, 2006; Nissan et al, 2002; Yao et al, 2007), identifiziert werden. Analog zum Export der 60S Untereinheit ist ebenfalls die Translokation der kleinen Untereinheit von Crm1- und RanGTP-abhängig. Jedoch konnte das Adapterprotein für die Interaktion zwischen 40S Untereinheit und Crm1 noch nicht identifiziert werden (Moy & Silver, 1999).

Crm-1 abhängiger RNA Export bei HIV

Das Genom des human immunodeficiency virus type 1 (HIV) umfasst insgesamt neun Gene in sich überlappenden offenen Leserastern. Diese werden nach erfolgter

Transkription durch alternatives Spleißen von einem einzigen proviralen Transkript generiert. Dadurch entstehen das ungespleißte Transkript, die partiell gespleißten Transkripte für *env*, *vif*, *vpu* und *vpr* und die vollständig gespleißten Transkripte *tat*, *nef* und *rev* (Cullen & Greene, 1990). Die nicht-vollständig gespleißten Transkripte enthalten jedoch funktionelle Introns, müssen daher den zellulären Retentions-mechanismen für Intron-enthaltene RNA entkommen (Chang & Sharp, 1989; Cullen, 2003; Hanly et al, 1989; Shatkin & Manley, 2000). Innerhalb der frühen viralen Transkriptionsphase werden komplett gespleißte virale RNAs durch den Tap-abhängigen Export in das Zytoplasma transportiert und translatiert. Das in Rev enthaltene NLS befähigt das Protein in den Nukleus importiert zu werden (Truant & Cullen, 1999). Eine Inaktivierung von Rev führt zu einer Expressions-inhibierung der Strukturgene, wobei komplett gespleißte Transkripte in normalen, teilweise erhöhten Mengen translatiert werden (Sodroski et al, 1986). Nukleär lokalisiertes Rev bindet mit einer argininreichen Sequenz an das in *env* kodierte Rev-responsive-element (RRE) innerhalb partiell- oder ungespleißter RNA (Emerman et al, 1989; Malim et al, 1989). Die Rev-RRE Interaktion führt des Weiteren zu einer Rev Multimerisierung am RRE. Die C-terminale Domäne in Rev kodiert ein leucinreiches NES welches vom Exportadapter Crm1 erkannt werden kann (Fischer et al, 1995). Anschließend wird der RNA-RRE-Rev Komplex in Crm1-Abhängigkeit über einen RanGTP Gradienten ins Zytoplasma transportiert (Abbildung 5.7).

Rev und RRE Homologe finden sich ebenfalls in anderen komplexen Retroviren. Im humanen T-lymphotrophen Virus Typ I (HTLV-I) wirkt Rex durch Bindung an das 274nt große Rex-responsive-element (RexRE) als Exportadapter (Hanly et al, 1989; Seiki et al, 1988), ebenso wurde 2008 auch in Maus Mammatumor Viren (MMTV) die Interaktion des Exportproteins Rem mit dem 249nt großen Rem-responsive-element (RemRE) nachgewiesen (Mullner et al, 2008).

Klausurfragen

1. A) Rem ist das funktionshomologe Protein von MMTV zu HIV Rev. Schlagen Sie einen Rev-analogen Mechanismus zum RNA Export für MMTV mit Hilfe von Rem vor. (Zeichnen Sie dazu schematisch die Membran, Pore, virale RNA, Rem und die zellulären Proteine) B) Welche Klassen der HIV RNAs kennen Sie und wie werden diese exportiert?
 2. Wie läuft die Poly(A) Addition ab?
 3. Beschreiben Sie die Rev-Funktion und zeichnen Sie schematisch die Rev mit den notwendigen Domänen?
 4. Wie werden die HIV-Pol und -Eng Proteine exprimiert?
 5. A) Beschreiben Sie Faktoren, die für das differenzielle Spleißen notwendig sind. Nennen Sie Viren und deren differenziell gespleißte Transkripte. B) Nennen Sie zwei Funktionen der U1 snRNPs.
 6. Zeichnen Sie 3 für Polyadenylierung wichtigen Elemente in die HIV-Sequenz ein.
- CCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGT
GCTCAAAGTAGTGTGTGCCGTCTGTTGTGTG
7. Geben Sie zwei Beispiele an wie Retroviren die Polyadenylierung in der 5'LTR unterdrücken. Beschreiben Sie die Regulation der Polyadenylierung des Botinnen Papillomavirus.

Literatur

- Ashe MP, Furger A, Proudfoot NJ (2000) Stem-loop 1 of the U1 snRNP plays a critical role in the suppression of HIV-1 polyadenylation. *RNA* 6: 170-177
- Ashe MP, Griffin P, James W, Proudfoot NJ (1995) Poly(A) site selection in the HIV-1 provirus: inhibition of promoter-proximal polyadenylation by the downstream major splice donor site. *Genes Dev* 9: 3008-3025
- Askjaer P, Jensen TH, Nilsson J, Englmeier L, Kjems J (1998) The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* 273: 33414-33422

- Bar-Shira A, Panet A, Honigman A (1991) An RNA secondary structure juxtaposes two remote genetic signals for human T-cell leukemia virus type I RNA 3'-end processing. *J Virol* 65: 5165-5173
- Barabino SM, Keller W (1999) Last but not least: regulated poly(A) tail formation. *Cell* 99: 9-11
- Berro R, Pedati C, Kehn-Hall K, Wu W, Klase Z, Even Y, Geneviere AM, Ammosova T, Nekhai S, Kashanchi F (2008) CDK13, a new potential human immunodeficiency virus type 1 inhibitory factor regulating viral mRNA splicing. *J Virol* 82: 7155-7166
- Bogerd HP, Fridell RA, Benson RE, Hua J, Cullen BR (1996) Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* 16: 4207-4214
- Bohne J, Wodrich H, Kräusslich H (2005) Splicing of human immunodeficiency virus RNA is position-dependent suggesting sequential removal of introns from the 5' end. *Nucleic Acids Res* 33: 825-837
- Boucher L, Ouzounis CA, Enright AJ, Blencowe BJ (2001) A genome-wide survey of RS domain proteins. *RNA* 7: 1693-1701
- Caceres JF, Misteli T, Sreaton GR, Spector DL, Krainer AR (1997) Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J cell biol* 138: 225-238
- Carmody SR, Wentz SR (2009) mRNA nuclear export at a glance. *J Cell Sci* 122: 1933-1937
- Cazalla D, Zhu J, Manche L, Huber E, Krainer AR, Caceres JF (2002) Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins. *Mol Cell Biol* 22: 6871-6882
- Chang DD, Sharp PA (1989) Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell* 59: 789-795
- Chasin LA (2007) Searching for splicing motifs. *Adv Exp Med Biol* 623: 85-106
- Chen F, MacDonald CC, Wilusz J (1995) Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res* 23: 2614-2620
- Cheng H, Dufu K, Lee CS, Hsu JL, Dias A, Reed R (2006) Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* 127: 1389-1400
- Chkheidze AN, Liebhaber SA (2003) A novel set of nuclear localization signals determine distributions of the alphaCP RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 23: 8405-8415
- Clark F, Thanaraj TA (2002) Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced introns and exons from human. *Human molecular genetics* 11: 451-464
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (1997) The Interactions of Retroviruses and their Hosts. In *Retroviruses*, Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (eds). Cold Spring Harbor (NY)
- Colgan DF, Manley JL (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11: 2755-2766
- Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, Duncan PI (1996) The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *Embo J* 15: 265-275
- Conti E, Izaurralde E (2001) Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* 13: 310-319
- Cujec TP, Cho H, Maldonado E, Meyer J, Reinberg D, Peterlin BM (1997) The human immunodeficiency virus transactivator Tat interacts with the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol* 17: 1817-1823
- Cullen BR (2003) Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci* 28: 419-424
- Cullen BR, Greene WC (1990) Functions of the auxiliary gene products of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 178: 1-5
- Damier L, Domenjoud L, Branlant C (1997) The D1-A2 and D2-A2 pairs of splice sites from human immunodeficiency virus type 1 are highly efficient in vitro, in spite of an unusual branch site. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 182-187
- Dominski Z, Marzluff WF (2007) Formation of the 3' end of histone mRNA: getting closer to the end. *Gene* 396: 373-390
- Dyhr-Mikkelsen H, Kjems J (1995) Inefficient spliceosome assembly and abnormal branch site selection in splicing of an HIV-1 transcript in vitro. *J Biol Chem* 270: 24060-24066
- Emerman M, Vazeux R, Peden K (1989) The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell* 57: 1155-1165
- Eperon IC, Ireland DC, Smith RA, Mayeda A, Krainer AR (1993) Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF. *Embo J* 12: 3607-3617
- Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82: 475-483

- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90: 1051-1060
- Freed EO (2001) HIV-1 replication. *Somatic cell mol gene* 26: 13-33
- Freund M, Asang C, Kammler S, Konermann C, Krummheuer J, Hipp M, Meyer I, Gierling W, Theiss S, Preuss T, Schindler D, Kjems J, Schaal H (2003) A novel approach to describe a U1 snRNA binding site. *Nucleic Acids Res* 31: 6963-6975
- Fried H, Kutay U (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60: 1659-1688
- Furger A, Monks J, Proudfoot NJ (2001) The retroviruses human immunodeficiency virus type 1 and Moloney murine leukemia virus adopt radically different strategies to regulate promoter-proximal polyadenylation. *J Virol* 75: 11735-11746
- Furtado MR, Balachandran R, Gupta P, Wolinsky SM (1991) Analysis of alternatively spliced human immunodeficiency virus type-1 mRNA species, one of which encodes a novel tat-env fusion protein. *Virology* 185: 258-270
- Gadal O, Strauss D, Kessl J, Trumpower B, Tollervey D, Hurt E (2001) Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* 21: 3405-3415
- Gilmartin GM, Fleming ES, Oetjen J, Graveley BR (1995) CPSF recognition of an HIV-1 mRNA 3'-processing enhancer: multiple sequence contacts involved in poly(A) site definition. *Genes Dev* 9: 72-83
- Gilmartin GM, Nevins JR (1991) Molecular analyses of two poly(A) site-processing factors that determine the recognition and efficiency of cleavage of the pre-mRNA. *Mol Cell Biol* 11: 2432-2438
- Görllich D, Kutay U (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 607-660
- Grabowski PJ, Padgett RA, Sharp PA (1984) Messenger RNA splicing in vitro: an excised intervening sequence and a potential intermediate. *Cell* 37: 415-427
- Graveley BR (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6: 1197-1211
- Gui JF, Lane WS, Fu XD (1994) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369: 678-682
- Gunderson SI, Polycarpou-Schwarz M, Mattaj IW (1998) U1 snRNP inhibits pre-mRNA polyadenylation through a direct interaction between U1 70K and poly(A) polymerase. *Mol Cell* 1: 255-264
- Habelhah H, Shah K, Huang L, Ostareck-Lederer A, Burlingame AL, Shokat KM, Hentze MW, Ronai Z (2001) ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nature cell biology* 3: 325-330
- Hamm J, Mattaj IW (1989) An abundant U6 snRNP found in germ cells and embryos of *Xenopus laevis*. *EMBO J* 8: 4179-4187
- Hanamura A, Caceres JF, Mayeda A, Franza BR, Jr., Krainer AR (1998) Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA* 4: 430-444
- Hanly SM, Rimsky LT, Malim MH, Kim JH, Hauber J, Duc Dodon M, Le SY, Maizel JV, Cullen BR, Greene WC (1989) Comparative analysis of the HTLV-I Rex and HIV-1 Rev trans-regulatory proteins and their RNA response elements. *Genes Dev* 3: 1534-1544
- Hautbergue GM, Hung ML, Golovanov AP, Lian LY, Wilson SA (2008) Mutually exclusive interactions drive handover of mRNA from export adaptors to TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5154-5159
- Herold A, Suyama M, Rodrigues JP, Braun IC, Kutay U, Carmo-Fonseca M, Bork P, Izaurralde E (2000) TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture. *Mol Cell Biol* 20: 8996-9008
- Hertel KJ (2008) Combinatorial control of exon recognition. *J Biol Chem* 283: 1211-1215
- Ho JH, Kallstrom G, Johnson AW (2000) Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol* 151: 1057-1066
- Hung NJ, Johnson AW (2006) Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 26: 3718-3727
- Izaurralde E, Lewis J, Gamberi C, Jarmolowski A, McGuigan C, Mattaj IW (1995) A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* 376: 709-712
- Jamison SF, Pasman Z, Wang J, Will C, Luhrmann R, Manley JL, Garcia-Blanco MA (1995) U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characterization of required elements. *Nucleic Acids Res* 23: 3260-3267
- Kamma H, Portman DS, Dreyfuss G (1995) Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Exp Cell Res* 221: 187-196

- Kammler S, Otte M, Hauber I, Kjems J, Hauber J, Schaal H (2006) The strength of the HIV-1 3' splice sites affects Rev function. *Retrovirology* 3: 89
- Kan Z, States D, Gish W (2002) Selecting for functional alternative splices in ESTs. *Genome research* 12: 1837-1845
- Kanopka A, Muhlemann O, Akusjarvi G (1996) Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* 381: 535-538
- Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D (1989) Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol* 63: 3708-3713
- Kohler A, Hurt E (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 761-773
- Kohtz JD, Jamison SF, Will CL, Zuo P, Luhrmann R, Garcia-Blanco MA, Manley JL (1994) Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* 368: 119-124
- Koizumi J, Okamoto Y, Onogi H, Mayeda A, Krainer AR, Hagiwara M (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J Biol Chem* 274: 11125-11131
- Kuramitsu M, Hashizume C, Yamamoto N, Azuma A, Kamata M, Tanaka Y, Aida Y (2005) A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA. *Microbes Infect* 7: 1150-1160
- Lai MC, Lin RI, Huang SY, Tsai CW, Tarn WY (2000) A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J Biol Chem* 275: 7950-7957
- Lai MC, Lin RI, Tarn WY (2001) Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10154-10159
- Long JC, Caceres JF (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *biochem J* 417: 15-27
- Lopez PJ, Seraphin B (1999) Genomic-scale quantitative analysis of yeast pre-mRNA splicing: implications for splice-site recognition. *RNA* 5: 1135-1137
- MacDonald CC, Wilusz J, Shenk T (1994) The 64-kilodalton subunit of the CstF polyadenylation factor binds to pre-mRNAs downstream of the cleavage site and influences cleavage site location. *Mol Cell Biol* 14: 6647-6654
- Madhani HD, Guthrie C (1994) Dynamic RNA-RNA interactions in the spliceosome. *Annu Rev Genet* 28: 1-26
- Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, 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: 254-257
- Manley JL, Tacke R (1996) SR proteins and splicing control. *Genes Dev* 10: 1569-1579
- Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, Fiset JF, Revil T, Chabot B (2007) hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol* 623: 123-147
- Masuda S, Das R, Cheng H, Hurt E, Dorman N, Reed R (2005) Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev* 19: 1512-1517
- Matlin AJ, Clark F, Smith CW (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 386-398
- Mattaj JW, Englmeier L (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67: 265-306
- Mermoud JE, Cohen PT, Lamond AI (1994) Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *Embo J* 13: 5679-5688
- Michael WM, Choi M, Dreyfuss G (1995) A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83: 415-422
- Michael WM, Eder PS, Dreyfuss G (1997) The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *Embo J* 16: 3587-3598
- Millevoi S, Vagner S (2009) Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Res* 38: 2757-2774
- Misteli T (1999) RNA splicing: What has phosphorylation got to do with it? *Curr Biol* 9: R198-200
- Misteli T, Spector DL (1997) Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends Cell Biol* 7: 135-138
- Moore MJ, Proudfoot NJ (2009) Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136: 688-700
- Moore MS, Blobel G (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 365: 661-663
- Moy TI, Silver PA (1999) Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev* 13: 2118-2133

- Mullner M, Salmons B, Gunzburg WH, Indik S (2008) Identification of the Rem-responsive element of mouse mammary tumor virus. *Nucleic Acids Res* 36: 6284-6294
- Murdoch K, Loop S, Rudt F, Pieler T (2002) Nuclear export of 5S rRNA-containing ribonucleoprotein complexes requires CRM1 and the RanGTPase cycle. *European journal of cell biology* 81: 549-556
- Nakielny S, Dreyfuss G (1999) Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99: 677-690
- Nasim FU, Hutchison S, Cordeau M, Chabot B (2002) High-affinity hnRNP A1 binding sites and duplex-forming inverted repeats have similar effects on 5' splice site selection in support of a common looping out and repression mechanism. *RNA* 8: 1078-1089
- Nilsen TW (1994) RNA-RNA interactions in the spliceosome: unraveling the ties that bind. *Cell* 78: 1-4
- Nissan TA, Bassler J, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E (2002) 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J* 21: 5539-5547
- O'Reilly MM, McNally MT, Beemon KL (1995) Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology* 213: 373-385
- Ohno M, Segref A, Bachi A, Wilm M, Mattaj JW (2000) PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 101: 187-198
- Padgett RA, Konarska MM, Grabowski PJ, Hardy SF, Sharp PA (1984) Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* 225: 898-903
- Patel NA, Chalfant CE, Watson JE, Wyatt JR, Dean NM, Eichler DC, Cooper DR (2001) Insulin regulates alternative splicing of protein kinase C beta II through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway involving the nuclear serine/arginine-rich splicing factor, SRp40, in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 276: 22648-22654
- Pemberton LF, Blobel G, Rosenblum JS (1998) Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol* 10: 392-399
- Pollard AJ, Sparey C, Robson SC, Krainer AR, Europe-Finner GN (2000) Spatio-temporal expression of the trans-acting splicing factors SF2/ASF and heterogeneous ribonuclear proteins A1/A1B in the myometrium of the pregnant human uterus: a molecular mechanism for regulating regional protein isoform expression in vivo. *J clin endo metab* 85: 1928-1936
- Pozzoli U, Sironi M (2005) Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 62: 1579-1604
- Prasad J, Colwill K, Pawson T, Manley JL (1999) The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol* 19: 6991-7000
- Proudfoot N (1991) Poly(A) signals. *Cell* 64: 671-674
- Proudfoot N (2004) New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16: 272-278
- Purcell DF, Martin MA (1993) Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* 67: 6365-6378
- Reed R (2003) Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr Opin Cell Biol* 15: 326-331
- Reed R, Hurt E (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108: 523-531
- Rigo F, Martinson HG (2008) Functional coupling of last-intron splicing and 3'-end processing to transcription in vitro: the poly(A) signal couples to splicing before committing to cleavage. *Mol Cell Biol* 28: 849-862
- Rigo F, Martinson HG (2009) Polyadenylation releases mRNA from RNA polymerase II in a process that is licensed by splicing. *RNA* 15: 823-836
- Rodriguez MS, Dargemont C, Stutz F (2004) Nuclear export of RNA. *Biol Cell* 96: 639-655
- Rossi F, Labourier E, Forne T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, Antoine E, Cathala G, Brunel C, Tazi J (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* 381: 80-82
- Ruskin B, Krainer AR, Maniatis T, Green MR (1984) Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 38: 317-331
- Sanford JR, Longman D, Caceres JF (2003) Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Prog Mol Subcell Biol* 31: 33-58
- Segref A, Sharma K, Doye V, Hellwig A, Huber J, Luhrmann R, Hurt E (1997) Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J* 16: 3256-3271
- Seiki M, Inoue J, Hidaka M, Yoshida M (1988) Two cis-acting elements responsible for posttranscriptional trans-regulation of gene expression of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7124-7128

- Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL (1990) Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol* 183: 252-278
- Shatkin AJ, Manley JL (2000) The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nature structural biology* 7: 838-842
- Shen H, Green MR (2004) A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly. *Molecular cell* 16: 363-373
- Shen H, Kan JL, Green MR (2004) Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Molecular cell* 13: 367-376
- Shin C, Feng Y, Manley JL (2004) Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature* 427: 553-558
- Siomi H, Dreyfuss G (1995) A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J cell Biol* 129: 551-560
- Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E, Haseltine W (1986) A second post-transcriptional transactivator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 321: 412-417
- Staley JP, Guthrie C (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92: 315-326
- Stoltzfus CM (2009) Chapter 1. Regulation of HIV-1 alternative RNA splicing and its role in virus replication. *Adv Virus Res* 74: 1-40
- Strasser K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodriguez-Navarro S, Rondon AG, Aguilera A, Struhl K, Reed R, Hurt E (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417: 304-308
- Tacke R, Manley JL (1999) Determinants of SR protein specificity. *Current opinion in cell biology* 11: 358-362
- Tang H, Kuhen KL, Wong-Staal F (1999) Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet* 33: 133-170
- Tange T, Damgaard C, Guth S, Valcárcel J, Kjems J (2001) The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *EMBO J* 20: 5748-5758
- Tange TO, Jensen TH, Kjems J (1996) In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *J Biol Chem* 271: 10066-10072
- Taniguchi I, Ohno M (2008) ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56. *Mol Cell Biol* 28: 601-608
- Tarn WY, Steitz JA (1996) Highly diverged U4 and U6 small nuclear RNAs required for splicing rare AT-AC introns. *Science* 273: 1824-1832
- Terry LJ, Wentz SR (2007) Nuclear mRNA export requires specific FG nucleoporins for translocation through the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 178: 1121-1132
- Thomas F, Kutay U (2003) Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *J Cell Sci* 116: 2409-2419
- Truant R, Cullen BR (1999) The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* 19: 1210-1217
- Valsamakis A, Zeichner S, Carswell S, Alwine JC (1991) The human immunodeficiency virus type 1 polyadenylation signal: a 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2108-2112
- Wahl MC, Will CL, Luhrmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136: 701-718
- Wang Z, Burge CB (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14: 802-813
- Weighardt F, Biamonti G, Riva S (1996) The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) in RNA metabolism. *Bioessays* 18: 747-756
- Weiss EA, Gilmartin GM, Nevins JR (1991) Poly(A) site efficiency reflects the stability of complex formation involving the downstream element. *EMBO J* 10: 215-219
- Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82: 463-473
- Wilusz J, Shenk T, Takagaki Y, Manley JL (1990) A multicomponent complex is required for the AAUAAA-dependent cross-linking of a 64-kilodalton protein to polyadenylation substrates. *Mol Cell Biol* 10: 1244-1248
- Wu JY, Maniatis T (1993) Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75: 1061-1070

Wu S, Romfo CM, Nilsen TW, Green MR (1999) Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* 402: 832-835

Xiao SH, Manley JL (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev* 11: 334-344

Xiao SH, Manley JL (1998) Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *Embo J* 17: 6359-6367

Yao W, Roser D, Kohler A, Bradatsch B, Bassler J, Hurt E (2007) Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol Cell* 26: 51-62

Zhao J, Hyman L, Moore C (1999) Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 405-445

Zhu J, Mayeda A, Krainer AR (2001a) Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol cell* 8: 1351-1361

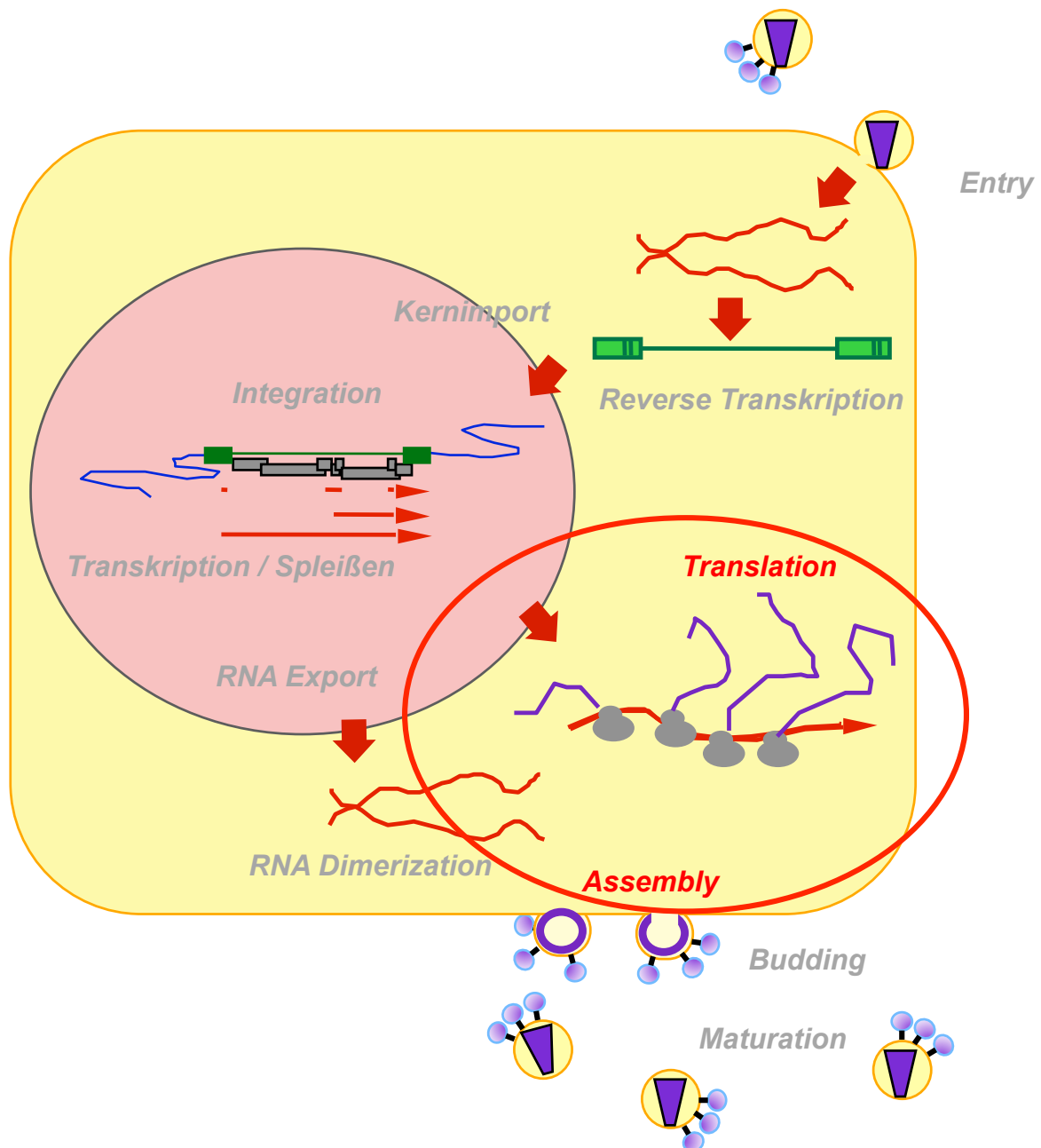
Zhu J, Mayeda A, Krainer AR (2001b) Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol cell* 8: 1351-1361

Zhu Y, Pe'ery T, Peng J, Ramanathan Y, Marshall N, Marshall T, Amendt B, Mathews MB, Price DH (1997) Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev* 11: 2622-2632

6

Intrazelluläres Trafficking

Markus Sauer



Inhaltsverzeichnis

Einleitung	93
Der Transport der viralen RNAs	94
Gespleißte virale RNAs	94
Teil- und nicht gespleißte RNAs	95
Genomische RNA	95
Synthese retroviraler Proteine	95
Gag und Gag-Pol Translation und Transport	96
Das virale Strukturprotein Gag	96
Translation des Gag-Pol-Fusionsproteins	96
Der Weg durch das Zytoplasma	97
Bindung und Verankerung an der Plasmamembran	98
Die viralen Oberflächenmoleküle	98
Env-Translation, Modifikation und Prozessierung	98
Regulatorische HIV-1 Proteine	99
Das akzessorische virale Protein U (Vpu)	99
Vpr – ein virales Protein mit vielen Funktionen	100
Das ESCRT-Netzwerk und seine Rolle bei der viralen Knospung	101
Die native zelluläre Funktion des ESCRT-Netzwerkes	101
Rekrutierung und Umfunktionierung des ESCRT-Netzwerkes durch das HI-Virus	103
Literatur	104

Einleitung

Ein wichtiger Schritt im Zyklus der Replikation des HIV-1 bildet das „intrazelluläre Trafficking“, da es die Translation, die Prozessierung und den Transport der viralen Proteinbausteine umfasst. Dieser Teil der Replikation beginnt mit dem Export der im Zellkern transkribierten viralen RNAs ins Zytoplasma, dem Ort der ribosomalen Translation. Dabei muss das Virus Mechanismen anwenden, die den Export von teil- oder nicht gespleißten mRNAs, entgegen der zellulären Schutzmechanismen, erlauben (Fischer et al, 1999). Der nächste Schritt besteht aus dem Transport dieser Protein-codierenden Makromoleküle zu den entsprechenden translationsaktiven Bereichen des Zytoplasmas. Dabei muss beachtet werden, dass lösliche Proteine, wie das Pr55^{Gag} Vorläuferpeptid oder die viralen Enzyme von zytosolischen Ribosomen produziert werden. Im Gegensatz dazu werden Membran-gebundene Peptide (im Besonderen Env) durch Ribosomen am Rauen Endoplasmatischen Reticulum (RER) translatiert (Sundquist & Kräusslich, 2012). Folglich ergeben sich unterschiedliche Transportwege der jeweiligen Proteine von dem Ort ihrer Herstellung zur Plasmamembran, dem Ort des Zusammenbaus und der Knospung der neuen Viren (Swanson & Malim, 2006). Zudem muss bedacht werden, dass aufgrund des komprimierten Genoms des Virus einige mRNAs für mehrere Proteine codieren (polycistronische mRNAs). So sind zum einen das Strukturprotein Gag mit den viralen Enzymen (Protease, Reverse Transkriptase und Integrase) auf einer gemeinsamen mRNA codiert (Swanson & Malim, 2006), zum anderen dient eine bicistronische mRNA bei der Translation der Oberflächenmoleküle Env und Vpu als Vorlage (Krummheuer et al, 2007). Um nun eine differenzielle Expression der einzelnen Proteine zu erreichen, muss das HI-Virus verschiedene Mechanismen anwenden. Diese werden im des Kapitels genauer erläutert.

Neben den neu synthetisierten Proteinen müssen auch nicht gespleißte RNAs, welche in den neuen Viren als genomische RNA (gRNA), also als Erbinformation dienen, an die Knospungsstelle („budding site“) transportiert wer-

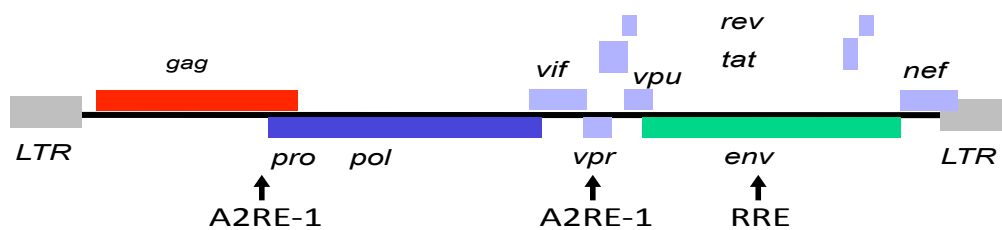


Abbildung 6. 1: Genomische Struktur des HIV-1. Die *cis*-agierenden Elemente A2RE-1, A2RE-2 und das Rev responsive element (RRE) sind mit Pfeilen markiert.

den (Jewell & Mansky, 2000; Swanson & Malim, 2006). Dazu binden diese an Pr55^{Gag} Vorläuferpeptide, für welche die nicht gespleißte RNA zugleich als Translationsvorlage („Template“) dient. Anschließend erfolgt zusammen als Ribonukleoprotein (RNP) die Translokation an die Plasmamembran.

Für die Knospung selbst benötigt HIV jedoch noch ein relativ unbekanntes, zelluläres Netzwerk an Proteinen, die sogenannten ESCRT-Komplexe („ESCRT = endosomal sorting complex required for transport“) (Henne et al, 2011; von Schwedler et al, 2003). In normalen, nicht-infizierten Zellen interagieren alle vier ESCRT-Komplexe miteinander, um Multivesikelkörper (engl. multi vesicle bodies, MVB) herzustellen (Williams & Urbe, 2007). Diese werden für die effektive Degradation von Oberflächenmolekülen über den endosomal Degradationweg im Zuge der Rezeptor-Reiz-Regulierung benötigt. Das HI-Virus adaptiert nun dieses System, indem es zwei dieser Komplexe an die Plasmamembran rekrutiert, um seine eigene Knospung zu forcieren (Hurley & Emr, 2006).

Auf dem Weg durch die Zelle manipuliert das HI-Virus vielfach bestehende zelluläre Maschinen und Mechanismen und nutzt diese so für seine Zwecke. Jedoch müssen auch einige Hindernisse, die dem Schutz der Wirtszelle dienen, umgangen werden. Im Folgenden werden der Weg der viralen Komponenten vom Zellkern zur Plasmamembran, sowie die Rekrutierung von Teilen des ESCRT-Netzwerks im Detail beschrieben.

Der Transport der viralen RNAs

Gespleißte virale RNAs

Als erstes soll nun der Transport der viralen RNAs in Augenschein genommen werden. Bereits beim Export dieser Transkripte aus dem Zellkern stößt HIV dabei auf einen zellulären Schutzmechanismus. Beim normalen eukaryontischen Spleißen dient das Platzieren eines Proteinkomplexes, dem sogenannten „exon junction complex“ (EJC), an jede gespleißte Stelle als Qualitätsmerkmal, das absolut notwendig für den Export der mRNA ist. Bei den teil- oder ungespleißten viralen mRNAs sind somit nur ungenügend viele EJCs vorhanden, die den Exportprozess fokussieren können. Somit werden diese mRNAs im Kern zurückgehalten. Lediglich die drei komplett gespleißten, viralen mRNAs der 2-kb-Klasse, welche für den Transkriptionsaktivator Tat, den Pathogenitätsfaktor Nef und den Exportfaktor Rev codieren (Purcell & Martin, 1993), werden über den Tap/Nxt1-Exportweg aus dem Zellkern transportiert (Cullen, 2005). Dieser Tap-abhängige Export scheint besonders für Moleküle geeignet zu sein, die über den normalen, unter anderem durch Crm1vermittelten Weg nur unzureichend exportiert werden (Jin et al, 2003).

Von entscheidender Bedeutung beim Transport der gespleißten RNAs scheint zudem eine Nukleotidsequenz zu sein. Dieses *cis*-Element hat große Ähnlichkeit mit dem zellulären hnRNP A2 response element (A2RE), was zur Folge hat, dass diese als Bindungsstellen für den *trans*-agierenden Transportfaktor hnRNP A2 dienen. Dieses Ribonukleoprotein bindet im Zellkern die transkribierten, gespleißten viralen RNAs, welche in der ersten Phase des post-transkriptionellen Prozesses

entstehen und exportiert jene mit der Hilfe des Tap/Nxt1-Mechanismus aus dem Zellkern (Mouland et al, 2001).

Nach dem Export aus dem Zellkern werden diese mRNAs wie zelluläre mRNAs durch die Ribosomen der Wirtszelle translatiert.

Teil- und nicht gespleißte RNAs

Auf dem zuvor beschriebenen Weg können gespleißte virale RNAs in das Zytoplasma gelangen, jedoch werden die wichtigen teil- oder nicht gespleißten RNAs durch die Qualitätskontrollmaschinerie des Zellkerns zurückgehalten. Diese Gruppe umfasst die 4-kb-Klasse (codieren für Vpu/Env, Vif und Vpr), sowie die 9-kb-Klasse (Gag, Gag-Pro-Pol) der HIV-mRNAs (Purcell & Martin, 1993). Der Export dieser ist nur mit dem viralen Protein Rev möglich. Dieses Protein wird in den Zellkern importiert und bindet an ein sogenanntes Rev-responsive element (RRE), eine Sekundärstruktur, welche von den polycistronischen viralen RNAs gebildet wird. Genomisch ist das RRE im *env*-Gen codiert, sodass es in jeder teils- oder ungespleißten mRNA vorhanden ist. Rev vermittelt nun im Folgenden den Export dieser RNAs ins Zytoplasma (Fischer et al, 1999). Dazu bindet zuerst ein Rev-Protein über eine Arginin-reiche Helix („arginine rich motif, ARM“) eine Haarnadelschleife („Stem IIB“) des RRE. Diese Bindung ist über eine Kombination aus basenspezifischen Interaktionen und elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrad möglich. Daraufhin binden weitere Rev-Moleküle sowohl an das RRE als auch an das primäre Rev, sodass der Export der RNA durch bis zu sechs Rev-Einheiten pro RRE vermittelt wird (Daugherty et al, 2008).

Der nächste Schritt beinhaltet den Transport der viralen RNAs in translationsaktive Bereiche im Zytoplasma. Je nach Spleißstatus beinhaltet jede virale RNA mindestens ein hnRNP A2 response element. Der Transport kann somit über den Faktor hnRNP A2 gesteuert und fokussiert werden. Aufgrund der hohen Viskosität im dicht gepackten Zytoplasma fällt Diffusion als effektiver Transportweg aus. Deshalb bilden die viralen RNAs mit den gebunde-

nen hnRNPs sogenannte Granula, welche an Dyneinkomplexe gebunden werden (Mouland et al, 2001). Diese Motorproteine können Vesikel wie zum Beispiel das Granula oder auch ganze Zellkompartimente entlang der Mikrotubuli unter ATP-Verbrauch transportieren. Dyneinproteine wandern dabei von den Pluspolen der Mikrotubuli in der Peripherie der Zelle zu einem speziellen Komplex, dem „microtubuli organizing center“ (MTOC). Dieser Komplex bildet das Zentrum der Mikrotubuli. Bei diesem Transport kommen die viralen RNAs durch eine perizentriolare Region, in der Ribosomen auf die RNAs geladen werden. (Naghavi & Goff, 2007) Die bicistronische RNA, die für die membrangängigen Proteine Env und Vpu codieren, werden über eine Signalsequenz zum RER befördert, wo die Translation erfolgt. Abhängig davon, welche RNA vorliegt und welche Proteine daraus translatiert werden, gibt es im weiteren Verlauf unterschiedliche Wege durch das Zytoplasma zur Plasmamembran.

Genomische RNA

Nachdem die 9-kb große genomische RNA (gRNA) das Zytoplasma durch den Rev-vermittelten Kernexport und den Dynein-Transport erreicht hat, wird dieser zwei grundlegende Aufgaben zu teil: Zum einen dient die gRNA als Template für die Translation des viralen Strukturproteins Gag sowie des ebenfalls essentiellen Gag-Pol-Fusionsproteins. Zum anderen muss die gRNA erfolgreich in nasente Viren, welche sich an der Plasmamembran bilden, verpackt werden, in denen sie die Funktion der Erbinformation übernimmt (Swanson & Malim, 2006).

Synthese retroviraler Proteine

Die Initiation der Translation von HIV mRNAs wird höchst wahrscheinlich nicht, wie bei eukaryotischen mRNAs üblich, über das Erkennen der Cap-Struktur am 5'-Ende durch den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF4E) vermittelt. Hinweise darauf sind, dass die 5'-übersetzte Region („5'untranslated region, 5'UTR“) der viralen RNAs zwar eine Cap-Struktur besitzen, jedoch ist dieser RNA-Abschnitt hoch strukturiert, was eine ungünstiges Substrat für den Cap-abhängigen Ribosomeneintritt

darstellt. Allerdings scheint auch die Aktivität von klassischen „internen ribosomalen Eintrittsstellen“ (engl. internal ribosomal entry sites, IRES) in HIV relativ schwach zu sein. Dabei gibt es Hinweise, die sowohl für als auch gegen die Benutzung von IRES sprechen. Beim jetzigen Stand der Forschung kann die Frage des Ribosomeneintritts nicht eindeutig geklärt werden (Locker et al, 2011; Yilmaz et al, 2006).

Gag und Gag-Pol Translation und Transport

Das virale Strukturprotein Gag

Das virale Protein Gag dient als Hauptstrukturkomponente des HI-Virus. Abbildung 6.2 zeigt den Aufbau des Proteins. Es wird als Vorläufer-Polypeptid Pr55^{Gag} synthetisiert und besitzt mehrere Domänen: Matrix (MA), Capsid (CA), Nucleocapsid (NC) und P6. Zudem enthält es zwei Platzhalterregionen („Spacer“): SP1 liegt zwischen CA und NC und SP2 zwischen NC und P6. Jedes dieser Elemente besitzt im weiteren Verlauf des Replikationszyklus wichtige Funktionen, auf die später in diesem Kapitel genauer eingegangen werden. Erst nach der Knospung der entstehenden Viren erfolgt der Reifungsschritt des Gag durch die virale Protease, bei dem sich die neuentstandenen Viren zu infektiösen Partikel entwickeln (Sundquist & Kräusslich, 2012).

Eine konservierte Struktur im Offenen Leserahmen (ORF) der mRNA des Pr55^{Gag} Polypeptids scheint einen alternativen Präinitiationskomplex bestehend aus der ribosomalen 40S Untereinheit und eIF3 zu rekrutieren, was eine Möglichkeit zur Cap-unabhängigen Translationsinitiation darstellt. (Locker et al, 2011)

Während das Protein synthetisiert wird erfolgt am N-terminalen Ende eine ungewöhnliche, aber wichtige Modifikation. Dabei wird die 14-Kohlenstoffatome lange, gesättigte Myristinsäure co-translationell an das N-terminale Glycin gehängt. Die Tertiärstruktur des N-terminalen Endes bildet zudem eine hydrophobe Tasche, in welche die Fettsäure aufgenommen wird (Chukkapalli

& Ono, 2011). Die Funktion dieser Fettsäure wird in späteren Teilen dieses Kapitels genauer beschrieben.

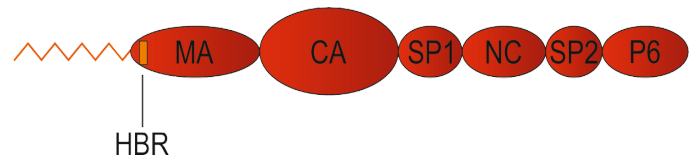


Abbildung 6.2: Schematische Zeichnung des Pr55^{Gag}-Vorläuferprotein. Am N-terminalen Ende befindet sich die Myristolkette. Die Matrixdomäne (MA) besitzt eine stark basische Region (orange). Capsid, Nucleocapsid und P6 sind durch die Spacerpeptide SP1 und SP2 voneinander getrennt.

Translation des Gag-Pol-Fusionsproteins

Während der Replikation von Retroviren wird eine große Anzahl an Gag-Vorläuferproteinen synthetisiert, da aus diesen die strukturellen Grundbausteine des Virus prozessiert werden. Von anderen wichtigen Proteinen, wie der viralen Protease, der Reversen Transkriptase und der Integrase werden jedoch weitaus geringere Mengen für jedes neue Virus benötigt. Jedoch dient sowohl für die Gag-Proteine als auch für die viralen Enzyme die genomische RNA als mRNA (Chukkapalli & Ono, 2011). Um diese Proteine im richtigen Mengenverhältnis herzustellen, hat HIV einen Mechanismus entwickelt, der die gesteigerte Expression des Gag-Proteins im Verhältnis zu den Enzymen, codiert in den *pro*- und *pol*-Genen, gestattet.

Grundlage hierfür bildet die Tatsache, dass in der genomischen Organisation die *pro*- und *pol*-Gene direkt auf das 5'-gelegene *gag*-Gen folgen. Soll nun ein Gag-Pro-Pol-Polypeptid synthetisiert werden, so wird das Stop-Codon des *gag*-Gens überlesen, sodass der komplette Genkomplex translatiert wird. Dieses Überlesen wird durch eine sogenannte „rutschigen Sequenz“ („slippery sequence“) erreicht, welche die Änderung des Leserahmens (frameshift) provoziert. Wie in Abbildung 6.3 zu sehen ist, besteht diese „slippery sequence“ aus sechs Uridinen (UUUUUUA) auf die eine Haarnadelstruktur (hairpin) folgt (Girnary et al, 2007). Befindet sich das Ribosom nun während der Translation

auf dieser Poly-U-Region und erfasst es jedes Nukleotid richtig, so befindet es sich in einem Leseraster, bei dem nach circa 200 weiteren Nukleotiden ein Stop-Codon auftritt, wodurch die Translation endet. Das entstehende Protein ist das Pr55^{Gag} Polypeptid.

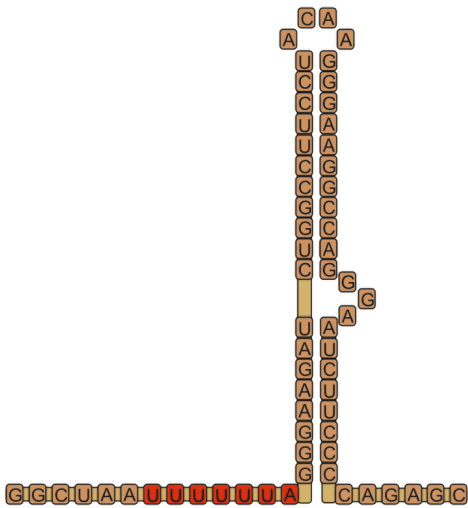


Abbildung 6.3: Slippery sequence. In Rot sind die sechs Uridine und das Adenin dargestellt.

Statistisch gesehen tritt in 5-10% aller Fälle eine Leserasterverschiebung auf. Diese entsteht durch das „Rutschen“ des Ribosoms über die „slippery sequence“. Dabei werden alle sechs Uridine erkannt werden, jedoch wird das Adenin am Haarnadelstamm doppelt erfasst. Dies bedeutet im Vergleich zur Pr55^{Gag}-Translation einen geänderten Leserahmen. Dadurch wird das 200-nt abwärts gelegene Stopp-Codon nicht als solches erkannt und die Translation wird im Bereich der *pro* und *pol*-Gene weitergeführt (Abbildung 6.4). So entsteht das Fusionsprotein Gag-Pro-Pol. Durch diesen Mechanismus werden ungefähr zehn bis zwanzig Gag-Moleküle auf jedes Gag-Pro-Pol-Polypeptid hergestellt (Brierley, 1995; Girnary et al, 2007).

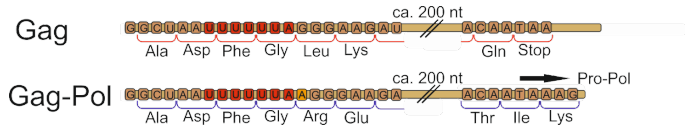


Abbildung 6. 4: Leserahmenverschiebung beim Übergang von Gag auf Gag-Pol. Durch das doppelte Erfassen des Adenins der „slippery sequence“ entsteht ein ribosomaler „Frameshift“ der dazu führt, dass das 200nt strangabwärts gelegene Stop-Codon nicht erkannt wird.

Der Weg durch das Zytoplasma

Im folgenden Teil wird der Transport dieser Proteine zur Plasmamembran beschrieben. Der Mechanismus ist bei Gag-Proteinen und Gag-Pro-Pol-Proteinen identisch, weshalb im Weiteren aus Gründen der besseren Lesbarkeit nur die Rede von Gag-Molekülen sein wird.

Nach der Translation oligomerisieren die neu synthetisierten Pr55^{Gag} auf den gRNA-Dimeren. Für die Bindung an die Ribonukleinsäuren dient das Nucleocapsid des Proteins als Plattform, wobei Zinkfinger-Domänen RNAs relativ unspezifisch binden. So ist es möglich, dass gespleißte und sogar zelluläre RNAs von der NC gebunden werden (Dawson & Yu, 1998). Zur Kontrolle, dass nur virale genomische RNA und nicht etwa andere, gespleißte RNA verpackt werden, dient ein gRNA spezifisches Ψ-Signal am 5'-Ende der Nukleinsäure. Dieses Ψ-Signal bildet die spezifische Bindungsstelle für die Zinkfinger des Nucleocapsids (Lever et al, 1989). Die C-terminale Domäne (CTD) des Capsids wirkt bei der Oligomerisierung als Interaktionspunkt zwischen den einzelnen Gag-Proteine (Ivanov et al, 2007). Die SP1-Region scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen. Es wird vermutet, dass diese Domäne sich konformationell restrukturiert, sobald das Gag an die genomische RNA gebunden hat und somit als Auslöser („Trigger“) der Oligomerisierung der Gag-Moleküle dient (Datta et al, 2011). HIV benutzt nur eine einzige Spezies an gRNA, welche zum einen als Translationsvorlage zum anderen auch als Erbinformation für die neuen Virionen dient. Somit besteht ein Wettbewerb zwischen der Translationsmaschinerie, welche die gRNA zur Translati-

on benötigt und den Gag-Proteinen, welche versuchen, die Nukleinsäure zu verpacken. Bei der Regulation dieser Prozesse, scheint der Transport der Pr55^{Gag} und der gRNA in sogenannte P-Körperchen (P-bodies) beteiligt zu sein. In diesen zellulären Regionen sind verschiedene Enzyme versammelt, welche Inhibierend auf die Translation wirken und somit das Verpacken begünstigen (Swanson & Malim, 2006). Zudem moduliert Gag seine eigene Translation, indem es bei geringe Gag-Konzentrationen die Proteinsynthese stimuliert, während hohe Konzentrationen diese inhibieren (Anderson & Lever, 2006).

Der alternative Weg, dass Pr55^{Gag} Proteine in den Zellkern importiert werden, dort an neu synthetisierte gRNA oligomerisiert und diese dann im Folgenden wiederum exportiert werden, kann mittlerweile ausgeschlossen werden (Swanson & Malim, 2006).

Der Transport dieser gRNA-Protein-Komplexe zur Plasmamembran kann nun einerseits wiederum entlang des Cytoskeletts erfolgen. Dabei interagieren die gRNPs mit Kinesin-Motorproteinen, welche Makromoleküle und Zellbestandteile vom MTOC entlang der Mikrotubuli in die Peripherie der Zelle zur Plasmamembran transportieren. Andererseits ist auch ein Transport über den endosomalen Weg möglich. (Naghavi & Goff, 2007; Swanson & Malim, 2006). Dabei interagieren Gag-Moleküle mit dem viralen Hüllprotein Env, welches, integral in die Endosomenmembran gebunden, auf diesem Weg transportiert wird.

Zudem ist ein Transport durch andere zelluläre Faktoren wie zum Beispiel einer weiteren Interaktion zwischen den A2R-Elementen der genomischen RNA und den hnRNPs denkbar (Mouland et al, 2001).

Bindung und Verankerung an der Plasmamembran

Zum Abschluss des Transports dieser Ribonukleoprotein-Partikel kommt der Matrixdomäne des Pr55^{Gag}-Polyproteins einer besonderen Rolle zu. Diese Domäne befindet sich am N-Terminus des Pr55^{Gag}. Sie ist für die Lokalisation und die Bindung des Vorläuferpeptids an der Plasma-

membran, dem Ort der Knospung, zuständig. Dazu ist das Protein am N-terminalen Ende myristoyliert, was bedeutet, dass die gesättigte Fettsäure Myristinsäure (C₁₄H₂₈O₂) gebunden ist. Mit Hilfe dieser Fettsäure kann nun das Vorläuferprotein an die Plasmamembran binden. Dazu interagiert die Myristinkette mit einem speziellen Phospholipid, dem sauren Phosphoinositolderivat PI(4,5)P₂, welches ein charakteristischer Baustein der Plasmamembran ist (Ono et al, 2004). Eine PI(4,5)P₂ – unabhängige Membranbindung wird durch die am Pr55^{Gag} gebundene gRNA verhindert. Die Myristolkette interkaliert hierbei in die Plasmamembran, während die so frei gewordene, hydrophobe Bindungstasche die gesättigte Kette des PI(4,5)P₂ aufnimmt (Chukkapalli & Ono, 2011). Durch diesen Mechanismus wird gewährleistet, dass die Lokalisation der viralen Bestandteile an der Plasmamembran stattfindet, was eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Knospung ist. MA ist zudem für die Rekrutierung und Bindung von Env-Molekülen an der „Budding site“ zuständig (Sundquist & Kräusslich, 2012).

Zusätzlich zu dieser Interaktion bilden die Aminosäuren 14 bis 31 in der Peptidkette der Matrixdomäne durch ihren hohen Anteil an Lysin und Arginin eine stark-basische Region (HBR) (Chukkapalli et al, 2010). Dieser Bereich wechselwirkt zusätzlich mit den negativ geladenen Phosphoglykanstrukturen des PI(4,5)P₂, wodurch die Verankerung des Vorläuferproteins an die Membran verstärkt wird (Ghanam et al, 2012).

Die viralen Oberflächenmoleküle

Env-Translation, Modifikation und Prozessierung

Das HIV-Env-Protein ist für den Replikationszyklus ein essentieller Faktor, da es als Oberflächenmolekül die Zielzellen erkennt und die Fusion der viralen mit der zellulären Membran vermittelt. Der genaue Mechanismus des Eintritts in die Zelle wird in Kapitel 2 „Attachment & Entry“ beschrieben.

Das retrovirale Env ist ein Glykoprotein, welches als Vorläuferpolypeptid gp160 am Rauhen Endoplasmatischen

Reticulum translatiert wird (Sundquist & Kräusslich, 2012). Bei dem Translationsvorgang dient eine einfach gespleißte, bicystronische *vpu/env* mRNA als Vorlage (Schwartz et al, 1990). Mit Hilfe einer Signalsequenz am N-terminalen Ende wird das entstehende Polypeptid teilweise in das Lumen des RER transloziert. Eine hydrophobe Sequenz in der transmembralen Domäne (TMD) dient dabei als Membrananker und verhindert eine komplette Translokation. So befindet sich der spätere, extrazelluläre Teil im Lumen des RER wohingegen die zukünftigen zytoplasmatischen Regionen ins Zytoplasma ragen (Checkley et al, 2011).

Noch während der Translation wird die Signalsequenz durch zelluläre Peptidasen im RER vom gp160-Peptid abgetrennt und degradiert. Zudem werden Oligosaccharidketten über zumeist N-glykosidische Bindungen an die extrazelluläre Domäne geheftet.

Im Anschluss dazu trimerisieren die einzelnen gp160-Vorläuferproteine miteinander, wobei auch Dimere und Tetramere entstehen können. Diese Multimerisierung bewirkt einen weiteren Transport zum Golgi-Komplex (Checkley et al, 2011).

Hier angekommen wird das gp-160-Vorläuferprotein an einer sehr konservierten Stelle durch zelluläre Furin oder Furin-ähnliche Proteasen gespalten, wodurch das Oberflächenmolekül gp120 und das transmembrale Protein gp41 entstehen (Moulard et al, 1999). Trotz der Trennung verbleiben die beiden Proteine durch nicht-kovalente Interaktionen assoziiert. Zusätzlich werden an den Oligosaccharidresten noch weitere, komplexere Modifikationen angefügt. Die trimerisierten Makromoleküle bilden letztlich jeweils einen „spike“ (Dorn).

Über den sekretorischen Weg gelangen diese Spikes nun an die Plasmamembran, von wo sie jedoch aufgrund von zellulärer, clathrin-abhängiger Endocytose rasch wieder in das Zellinnere aufgenommen werden (Abbildung 6.5). Dieser Mechanismus bewirkt eine relativ geringe Konzentration an Env-Proteinen in der Plasmamembran, wodurch eine geringe Anzahl dieser Moleküle in HI-Viren

(~10 pro Virus) erreicht wird. Durch Interaktionen zwischen Pr55^{Gag}-Molekülen und dem zytoplasmatischen Teil des im Endosom gebundenen Env können auf diesem Weg auch Gag-Moleküle zusammen mit gRNA-Dimere an die Plasmamembran transportiert werden (Checkley et al, 2011).

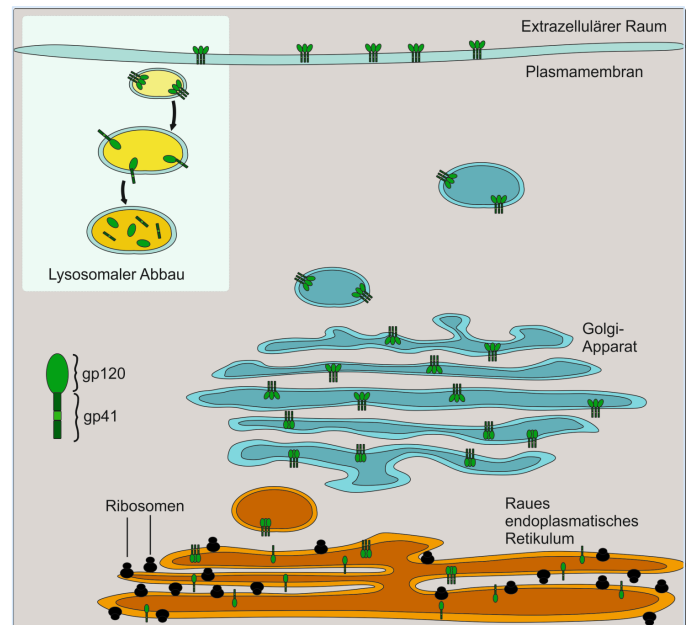


Abbildung 6.5: Sekretorischer Transport des Env-Proteins. Die Translation von Env erfolgt durch die Ribosomen am RER. Nach der Trimerisierung der Membran-gebunden Env-Moleküle erfolgt der Transport zum Golgi-Apparat. Hier erfolgt die Prozessierung der der weitere Transport zur Plasmamembran. Über den lysosomalen Weg wird Env regelmäßig abgebaut.

Regulatorische HIV-1 Proteine

Das akzessorische virale Protein U (Vpu)

Wie am Anfang dieses Unterkapitels erwähnt, ist Env in einer bicystronischen mRNA zusammen mit dem akzessorischen viralen Protein U (Vpu) codiert (Schwartz et al, 1990), wobei sich die Gene teilweise überlappen. Die Expression dieses Transkripts unterscheidet sich jedoch von dem Mechanismus, der bei der Translation der *gag-pol*-mRNA beschrieben wurde. So besitzen beide Gene jeweils ein eigenes Startcodon, was bedeutet, dass kein Fusionsprotein hergestellt wird. Vielmehr werden

zwei eigenständige Proteine translatiert. Aus Regulatorischen Gründen befindet sich direkt vor der *vpu*-codierenden Sequenz ein mikro ORF (μ ORF), bestehend aus dem Startcodon AUG und dem Stopp-Codon UAA (Krummheuer et al, 2007).

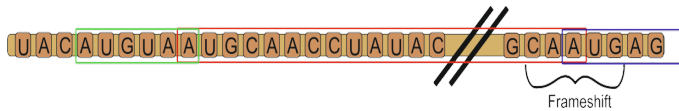


Abbildung 6. 6: Leserahmenverschiebung in der bicistronischen *vpu/env* – mRNA. Grün markiert ist der μ ORF. Der rote Kasten zeigt den *vpu*-Leserahmen an. Mit Blau ist der *env*-Leserahmen markiert.

Das eigentliche Startcodon für den *vpu*-Leserahmen beginnt mit dem letzten Adenin des Stop-Codons. Durch diese genetische Konstellation wird die ribosomale Expression des Vpu verringert. Der μ ORF fängt sozusagen Ribosomen ab, sodass das Start-Codon des Vpu nur schwer zugänglich für Ribosomen ist (Krummheuer et al, 2007). Zudem ist die Initiationssequenz des μ ORF eine sehr schwache Kozak-Consensussequenz, da es in den wichtigen Stellen -3 und +4 ein Uridin besitzt. Bei der Initiation der Translation in Wirbeltieren wären eine Purinbase an der -3-Stelle und ein Guanin an der +4-Stelle förderlich gewesen (Kozak, 1987). Dadurch wird gleichzeitig neben der Schwächung des Vpu-Start-Codons die Attraktivität des *env*-Startcodons, welches weiter strangabwärts gelegen ist, um etwa das fünffache gesteigert (Krummheuer et al, 2007). Dieses besitzt nämlich eine weit bessere Kozak-Sequenz mit einem Guanin an der -3-Stelle und einem Adenin (Purin) an der +4-Stelle. Der Leserahmen des *env* beginnt bereits in der *vpu*-codierenden Sequenz. Daraus entsteht die Notwendigkeit einer Leserahmenverschiebung zwischen den beiden Startcodons (der Abstand beträgt 166 Nukleotide), damit das Stopp-Codon des *vpu*-Transkripts im Leseraster des Env-Proteins nicht als solches erfasst wird. Dies ist essentiell, da eine vorzeitige Termination verhindert werden muss.

Das 81 Aminosäuren kleine Vpu ist in drei helicale Domänen gefaltet, wobei die N-terminal gelegene Helix

als Membrananker dient. Durch Oligomerisieren ist das 16kDa große Protein in der Lage Kanäle durch die Plasmamembran zu bilden, wodurch die Freisetzung der Virionen verstärkt und die endozytotische Wiederaufnahme in die Zelle verhindert wird. Der genaue Mechanismus hierfür ist noch nicht bekannt. Auch konnte bis jetzt keine Interaktion von Vpu mit Gag nachgewiesen werden (Neil et al, 2006). Jedoch wurden Beweise veröffentlicht, die darauf schließen lassen, dass Vpu als Ionenkanal dienen kann. Wie die Manipulation der Ionenkonzentrationen das Freisetzen der neuen Viren fördern kann, ist jedoch noch nicht verstanden (Montal, 2003).

Zudem besitzt Vpu noch eine andere wichtige Aufgabe. Humane CD4-Moleküle passieren, analog dem Env-Protein, ebenfalls das RER. Somit besteht die Gefahr, dass Env entsprechend seiner biologischen Funktion an CD4-Rezeptoren, welche sich auf dem sekretorischen Weg befinden, bindet. Dadurch stünde dieses gebundene Env nicht der Biogenese neuer Viren zur Verfügung. Vpu ist nun in der Lage an CD4 zu binden und einen Ubiquitin-abhängigen Abbau dieses Komplexes zu erreichen. Neu synthetisierte Env-Glykoproteine können somit ungestört zur Plasmamembran gelangen (Montal, 2003). Ein weiterer Grund für diesen Vpu-initiierten CD4-Abbau liegt in der Erhöhung der Effizienz der Virusvermehrung. So ist eine Folge dieses Mechanismus daran zu erkennen, dass HIV-infizierte T-Zellen weniger CD4-Moleküle auf ihrer Oberfläche besitzen, wodurch eine Superinfektion mit weiteren HI-Viren verhindert wird (Wildum et al, 2006).

Vpr – ein virales Protein mit vielen Funktionen

Ein weiteres Protein des HI-Virus ist das akzessorische Virale Protein R (VPR). Dieses muss in bereits in den neuen Viren vorhanden sein, da es elementare Funktionen bereits in der frühen Phase der Replikation übernimmt. Aus diesem Grund muss für eine erfolgreiche Vermehrung sichergestellt werden, dass etwa 5 – 10 Kopien des 96-Aminosäuren großen Vpr in jedem Provirus vorhanden ist.

Vpr ist auf einer mRNA codiert, die zu der 4-kb-Klasse gehört. Daraus lässt sich schließen, dass es sich hierbei um eine teilgespleißte mRNA handelt (Purcell & Martin, 1993). Sie besitzt ein RRE, über das der Export aus dem Zellkern mittels Rev vermittelt wird.

Vpr besitzt mehrere Funktionen, die das Virus in seiner Replikation unterstützen. Zum einen besitzt es die Fähigkeit, die Translokation des Präintegrationskomplexes in den Nucleus der infizierten Zelle zu fördern. Dazu besitzt es, ähnlich dem Gag, eine Kern-Lokalisations-Sequenz (NLS) die an das Importin binden. Zum anderen transaktiviert Vpr den LTR-Promotor und stimuliert damit die Transkription der viralen Gene. Dabei scheint es Interaktionen mit dem eukaryontischen Transkriptionsfaktor TFIIb einzugehen. Gleichzeitig induziert Vpr einen Zellzyklusarrest in der G2/M Phase. Dazu bindet es p34, einen Inhibitor des Co-Aktivators der basalen Transkription (p300) (Bukrinsky & Adzhubei, 1999; Le Rouzic & Benichou, 2005). Es ist durchaus möglich, dass Vpr noch weitere Funktionen besitzt.

Da Vpr nicht zusammen mit Gag synthetisiert wird, ist ein Mechanismus nötig, durch den genügend Vpr-Moleküle in die neuen Virionen eingebaut werden. Als essentiell hierbei hat sich eine amphiphatische Helixstruktur am N-terminalen Ende von Vpr erwiesen. Diese Helix interagiert mit der P6-Domäne von Gag, wodurch Vpr in die entstehenden Viren eingebaut wird. Allerdings ist scheinbar das gesamte Gag-Molekül für die Bindung nötig, da ansonsten P6 eine Konformation besitzt, an die Vpr nicht binden kann. (Bachand et al, 1999).

Das ESCRT-Netzwerk und seine Rolle bei der viralen Knospung

Sobald alle notwendigen Komponenten zum Zusammenbau der neuen Virionen an die Plasmamembran transportiert wurden, beginnen die Vorbereitungen für die Knospung. Dazu rekrutiert das HI-Virus ein ganzes Netzwerk an zellulären Proteinen an die Zellmembran,

die sogenannte ESCRT-Maschine (endosomal sorting complex required for transport).

Die native zelluläre Funktion des ESCRT-Netzwerkes

Dieses Netzwerk besteht aus insgesamt drei Multiprotein-komplexen, welche mono-ubiquitinierte Membranproteine in Endosomen erkennen, sortieren und für den Abbau vorbereiten.

Ubiquitin ist ein 77 Aminosäuren großes Peptid, welches als Degradationssignal an defekte oder nicht mehr benötigte Proteine über eine Isopeptidbindung gebunden wird. Durch weitere Anlagerungen von anderen Ubiquitin-Einheiten an das primär gebundene Peptid, entstehen Ubiquitinketten an dem Zielprotein, was dessen Abbau fokussiert. Dieser erfolgt letztlich im Proteasom, einem aus 28 Proteinen bestehenden, fassförmigen Komplex, welcher als Hauptkomponente im zytosolischen Proteinabbau fungiert (Hershko & Ciechanover, 1992).

Im Gegensatz dazu werden die meisten Membranproteine nur mit einem einzigen Ubiquitin-Molekül modifiziert, so dass sich keine Ubiquitin-Ketten ausbilden können. Spezielle Rezeptoren in der Plasmamembran binden und sammeln nun mono-ubiquitinierte Proteine. Daraufhin wird in mehreren Schritten dafür gesorgt, dass sich an dieser Stelle die Plasmamembran nach innen stülpt und die nicht mehr benötigten Membranproteine über den endosomalen Pfad entfernt werden. Um diese Oberflächenmoleküle abzubauen zu können, müssen sie in Vesikeln in das Innere des Endosoms gelangen. Nur so gelangen die Abbausubstrate in das Lysosom, sobald das Endosom mit diesem verschmilzt. Für diese Einschnürungen in das Endosom wird das ESCRT-Netzwerk benötigt, wodurch sogenannte MVBs (multi vesicular bodies) entstehen (Hurley & Emr, 2006). Dieser Weg stellt einen wichtigen Mechanismus zur negativen Regulation von Oberflächenmolekülen, wie zum Beispiel Signalrezeptoren oder Antigen-präsentierende MHC-Moleküle dar.

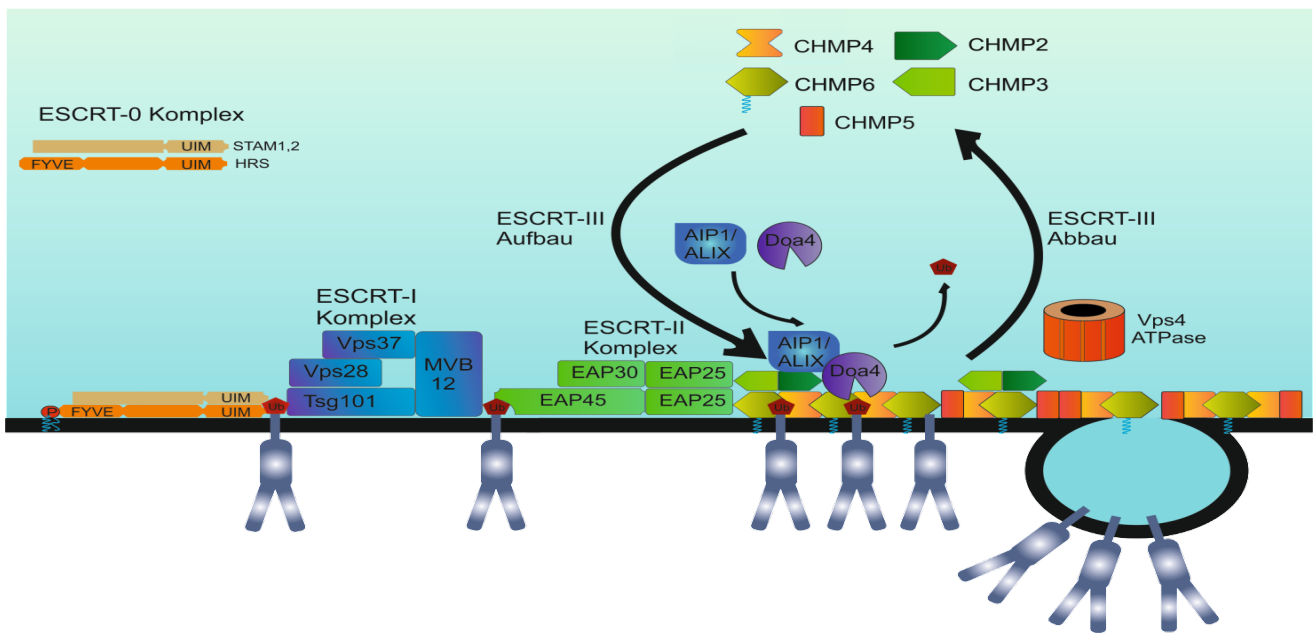


Abbildung 6. 7: Schematischer Aufbau des ESCRT-Netzwerkes. Die einzelnen ESCRT-Komplexe werden nacheinander an die Endosomenmembran rekrutiert. Monoubiquitinierte Membranmoleküle werden gesammelt und in das Endosom eingeschürt. Ein Multivesikelkörper entsteht.

Um nun die so in die Zelle aufgenommenen und an Endosomen gebundenen Membranproteine abbauen zu können, wird nun das ESCRT-Netzwerk benötigt (Abbildung 6.7). Dazu werden zuerst mono-ubiquitinierte Proteinuntereinheiten am Endosom durch den STAM 1,2/HRS-Komplex (ESCRT-0) erkannt. Für diese Aufgabe besitzen sowohl STAM 1,2 als auch HRS spezielle Ubiquitin-Bindemotive (UIM) wodurch ein initialer Kontakt zum Vesikel hergestellt wird. Die feste Bindung entsteht durch eine FYVE-Domäne des HRS, welche das für Endosomen spezifische Lipid Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI(3)P) erkennt und bindet (Hurley & Emr, 2006).

Der so an das Endosom gebundene ESCRT-0 dient nun als Plattform für den ESCRT-I Komplex. Dieser besteht aus den Proteinen Tsg101, Vps28, Vps37 und MVB12 (Morita et al, 2007). Die genaue Funktion der einzelnen Proteine ist bis jetzt noch nicht bekannt. Lediglich die Funktion von Tsg101 scheint gefunden zu sein, da es eine UEV („unusual E2 variant“)-Domäne besitzt, die monoubiquitinierte Moleküle erkennt und bindet. Zudem interagiert die UEV mit den UIMs des ESCRT-0. ESCRT-I kann aber auch mit anderen Faktoren über eine spezielle

P(S/T)XP-Sequenz binden. Diese Eigenschaft wird später immens wichtig, wegen der Fähigkeit des HI-Virus das ESCRT-Netzwerk zu entführen (Henne et al, 2011).

Als nächstes wird der ESCRT-II Komplex neben den ESCRT-I Komplex rekrutiert. Bestehend aus mehreren Proteinen (EAP30, EAP25, EAP45, EAP25) fungiert es als Bindeglied zwischen ESCRT-I und ESCRT III. EAP45 besitzt ein „Gram-like ubiquitin element“ (GLUE), welches Ubiquitin zusammen mit dem PI(3)P bindet, was wiederum die korrekte Lokalisation an der Endosomenmembran sichert. EAP25 ist essentiell für die folgende Bindung zum ESCRT-III, genauer zu dem Protein CHMP6. Über die Funktion der anderen Proteine ist nichts Genaueres bekannt (Henne et al, 2011; Williams & Urbe, 2007). Dieser letzte ESCRT-Komplex besteht im Kern aus mehreren „charged multivesicular body proteins“ (CHMP2, CHMP3, CHMP4, CHMP5, CHMP6) (von Schwedler et al, 2003) und forciert nun die Einstülpung der Endosomenmembran. Dazu binden die stark-basischen Regionen der Proteine CHMP6 und CHMP4 an die negativ geladene Membran. Zusätzlich besitzt CHMP6 noch eine Myristol-Kette, welche die Bindung verstärkt (Williams & Urbe,

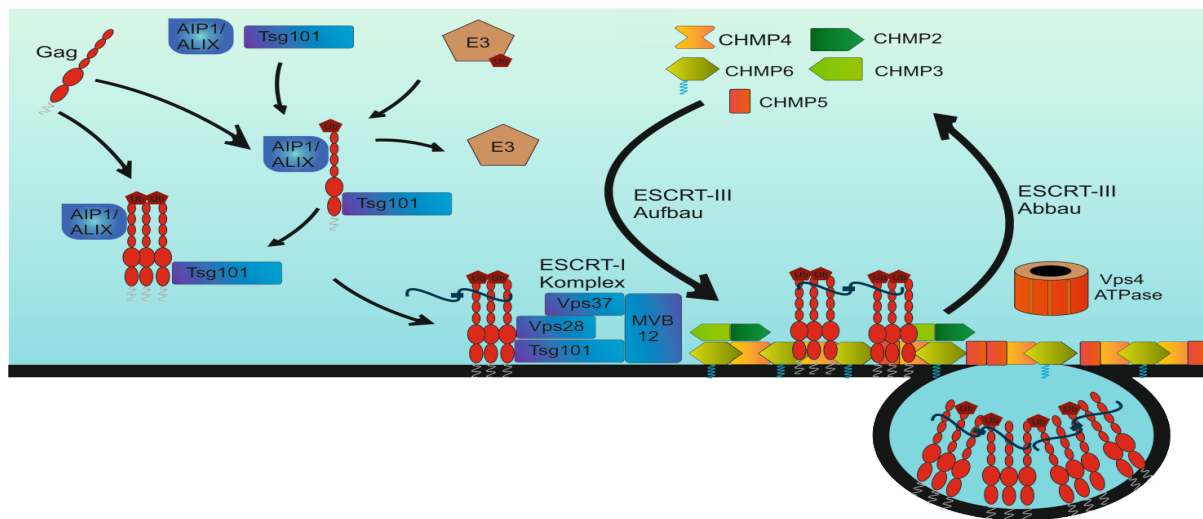


Abbildung 6. 8: Adaption des ESCRT-Netzwerks durch HIV. Virale Gag-Proteine rekrutieren Bestandteile des ESCRT-1 Komplexes und binden an die Zellmembran. Durch die Einschnürung der Membran durch das ESCRT-3 System entstehen neue Viren.

2007). Durch das Zusammenspiel der ESCRT-Maschinen gelangen die für den Abbau bestimmten Membranproteine in die Einstülpungen. Das an CHMP4 gebundene Enzym AIP1/ALIX rekrutiert nun die Deubiquitinase Doa4, welche schließlich das Ubiquitin am Substrat abspaltet. Als letzter Schritt löst das Protein Vps4 unter ATP-Verbrauch die Bestandteile des ESCRT-III Komplexes von der „budding site“, wodurch die einzelnen Faktoren recycelt werden und sich die Endosomeneinstülpung ab-schnürt (Hurley & Emr, 2006; Williams & Urbe, 2007).

Rekrutierung und Umfunktionierung des ESCRT-Netzwerkes durch das HI-Virus

Das HI-Virus nutzt nun Teile dieses Netzwerkes zur Unterstützung seiner eigenen Knospung (Abbildung 6.8). Dazu wird der zelluläre Faktor Tsg101, Teil des ESCRT-1, an kurze, Prolin-reiche Sequenzen in der p6-Domäne des viralen Gag-Proteins gebunden. Dieses PTAP-Motiv ist hoch konserviert, woraus sich seine Bedeutung für die Rekrutierung der ESCRT-Maschinerie ableiten lässt. Zudem wird ein weiteres Prolin-reiches Element, das YPLASL-Motiv, von dem Adaptermolekül AIP1/Alix gebunden. Anschließend wird Gag durch eine bislang nicht identifizierte E3-Ubiquitinligase ubiquitiniert. Mehrere Gag-Moleküle oligomerisieren und werden mit Hilfe ihrer Myristolkette an der Plasmamembran lokalisiert. Hier er-

folgt nun der, im Vergleich zur eigentlichen, zellulären Funktion des ESCRT-Netzwerkes, geänderte Aufbau an der Plasmamembran. Das an die Gag-Oligomere gebundene Tsg101 dient nun als Plattform für den Aufbau des ESCRT-I Komplexes, welcher in diesem Fall nur aus den Faktoren Vps37 und Vps28 besteht. Zusätzlich dient ein weiterer Faktor, Mvb12, als Adapter zum ESCRT-III Komplex (von Schwedler et al, 2003).

Dessen Einheiten polymerisieren an der Verknüpfungsstelle, was eine Ausstülpung der Plasmamembran zur Folge hat. In diese Ausstülpung werden nun die Gag-Vorläuferproteine zusammen mit der viralen gRNA, den Env-Proteinen und weiteren viralen Enzymen und Faktoren gesammelt. Der Abbau des ESCRT-III Komplexes aus der Knospungsstelle ist wiederum ATP-abhängig und benötigt das Enzym Vps4 sowie den Koaktivator LIP5.

Zu beachten ist, dass in der viralen Knospung des HIV kein ESCRT-II Komplex benötigt wird. Weiterhin ist es ausgesprochen erstaunlich, dass das Virus eine hochkomplexe, zelluläre Struktur nicht nur einfach benutzt, sondern diese von ihrem eigentlichen Arbeitsplatz, der Endosomenmembran, zur Plasmamembran transloziert und seinen Bedürfnisse entsprechend modulieren und verwenden kann (von Schwedler et al, 2003).

Literatur

- Anderson EC, Lever AM (2006) Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *J. Virol* **80**: 10478-10486
- Bachand F, Yao XJ, Hrimech M, Rougeau N, Cohen EA (1999) Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *TJBC* **274**: 9083-9091
- Brierley I (1995) Ribosomal frameshifting viral RNAs. *The JGV* **76 (Pt 8)**: 1885-1892
- Bukrinsky M, Adzubei A (1999) Viral protein R of HIV-1. *Reviews in medical virology* **9**: 39-49
- Checkley MA, Luttmann BG, Freed EO (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *JMB* **410**: 582-608
- Chukkapalli V, Oh SJ, Ono A (2010) Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 1600-1605
- Chukkapalli V, Ono A (2011) Molecular determinants that regulate plasma membrane association of HIV-1 Gag. *JMB* **410**: 512-524
- Cullen BR (2005) Human immunodeficiency virus: nuclear RNA export unwound. *Nature* **433**: 26-27
- Datta SA, Temeselew LG, Crist RM, Soheilian F, Kamata A, Mirro J, Harvin D, Nagashima K, Cachau RE, Rein A (2011) On the role of the SP1 domain in HIV-1 particle assembly: a molecular switch? *J Virol* **85**: 4111-4121
- Daugherty MD, D'Orso I, Frankel AD (2008) A solution to limited genomic capacity: using adaptable binding surfaces to assemble the functional HIV Rev oligomer on RNA. *Mol cell* **31**: 824-834
- Dawson L, Yu XF (1998) The role of nucleocapsid of HIV-1 in virus assembly. *Virology* **251**: 141-157
- Fischer U, Pollard VW, Luhrmann R, Teufel M, Michael MW, Dreyfuss G, Malim MH (1999) Rev-mediated nuclear export of RNA is dominant over nuclear retention and is coupled to the Ran-GTPase cycle. *Nucleic acids research* **27**: 4128-4134
- Ghanam RH, Samal AB, Fernandez TF, Saad JS (2012) Role of the HIV-1 Matrix Protein in Gag Intracellular Trafficking and Targeting to the Plasma Membrane for Virus Assembly. *Frontiers in microbiology* **3**: 55
- Girnary R, King L, Robinson L, Elston R, Brierley I (2007) Structure-function analysis of the ribosomal frameshifting signal of two human immunodeficiency virus type 1 isolates with increased resistance to viral protease inhibitors. *JGV* **88**: 226-235
- Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD (2011) The ESCRT pathway. *Developmental cell* **21**: 77-91
- Hershko A, Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annual review of biochemistry* **61**: 761-807
- Hurley JH, Emr SD (2006) The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **35**: 277-298
- Ivanov D, Tsodikov OV, Kasanov J, Ellenberger T, Wagner G, Collins T (2007) Domain-swapped dimerization of the HIV-1 capsid C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 4353-4358
- Jewell NA, Mansky LM (2000) In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *JGV* **81**: 1889-1899
- Jin L, Guzik BW, Bor YC, Rekosh D, Hammarskjold ML (2003) Tap and NXT promote translation of unspliced mRNA. *Genes Dev* **17**: 3075-3086
- Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research* **15**: 8125-8148
- Krummheuer J, Johnson AT, Hauber I, Kammler S, Anderson JL, Hauber J, Purcell DF, Schaal H (2007) A minimal uORF within the HIV-1 vpu leader allows efficient translation initiation at the downstream env AUG. *Virology* **363**: 261-271
- Le Rouzic E, Benichou S (2005) The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* **2**: 11
- Lever A, Gottlinger H, Haseltine W, Sodroski J (1989) Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol* **63**: 4085-4087
- Locker N, Chamond N, Sargueil B (2011) A conserved structure within the HIV gag open reading frame that controls translation initiation directly recruits the 40S subunit and eIF3. *Nucleic acids research* **39**: 2367-2377
- Montal M (2003) Structure-function correlates of Vpu, a membrane protein of HIV-1. *FEBS letters* **552**: 47-53
- Morita E, Sandrin V, Alam SL, Eckert DM, Gygi SP, Sundquist WI (2007) Identification of human MVB12 proteins as

ESCRT-I subunits that function in HIV budding. *Cell host & microbe* **2**: 41-53

Mouland AJ, Xu H, Cui H, Krueger W, Munro TP, Prasol M, Mercier J, Rekosh D, Smith R, Barbarese E, Cohen EA, Carson JH (2001) RNA trafficking signals in human immunodeficiency virus type 1. *MCB* **21**: 2133-2143

Mouland M, Hallenberger S, Garten W, Klenk HD (1999) Processing and routing of HIV glycoproteins by furin to the cell surface. *Virus research* **60**: 55-65

Naghavi MH, Goff SP (2007) Retroviral proteins that interact with the host cell cytoskeleton. *Current opinion in immunology* **19**: 402-407

Neil SJ, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD (2006) HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS pathogens* **2**: e39

Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO (2004) Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14889-14894

Purcell DF, Martin MA (1993) Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* **67**: 6365-6378

Schwartz S, Felber BK, Fenyo EM, Pavlakis GN (1990) Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J J Virol* **64**: 5448-5456

Sundquist WI, Kräusslich HG (2012) HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**: a006924

Swanson CM, Malim MH (2006) Retrovirus RNA trafficking: from chromatin to invasive genomes. *Traffic* **7**: 1440-1450

von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B, Ward DM, Chung HY, Morita E, Wang HE, Davis T, He GP, Cimbara DM, Scott A, Krausslich HG, Kaplan J, Morham SG, Sundquist WI (2003) The protein network of HIV budding. *Cell* **114**: 701-713

Wildum S, Schindler M, Münch J, Kirchhoff F (2006) Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol* **80**: 8047-8059

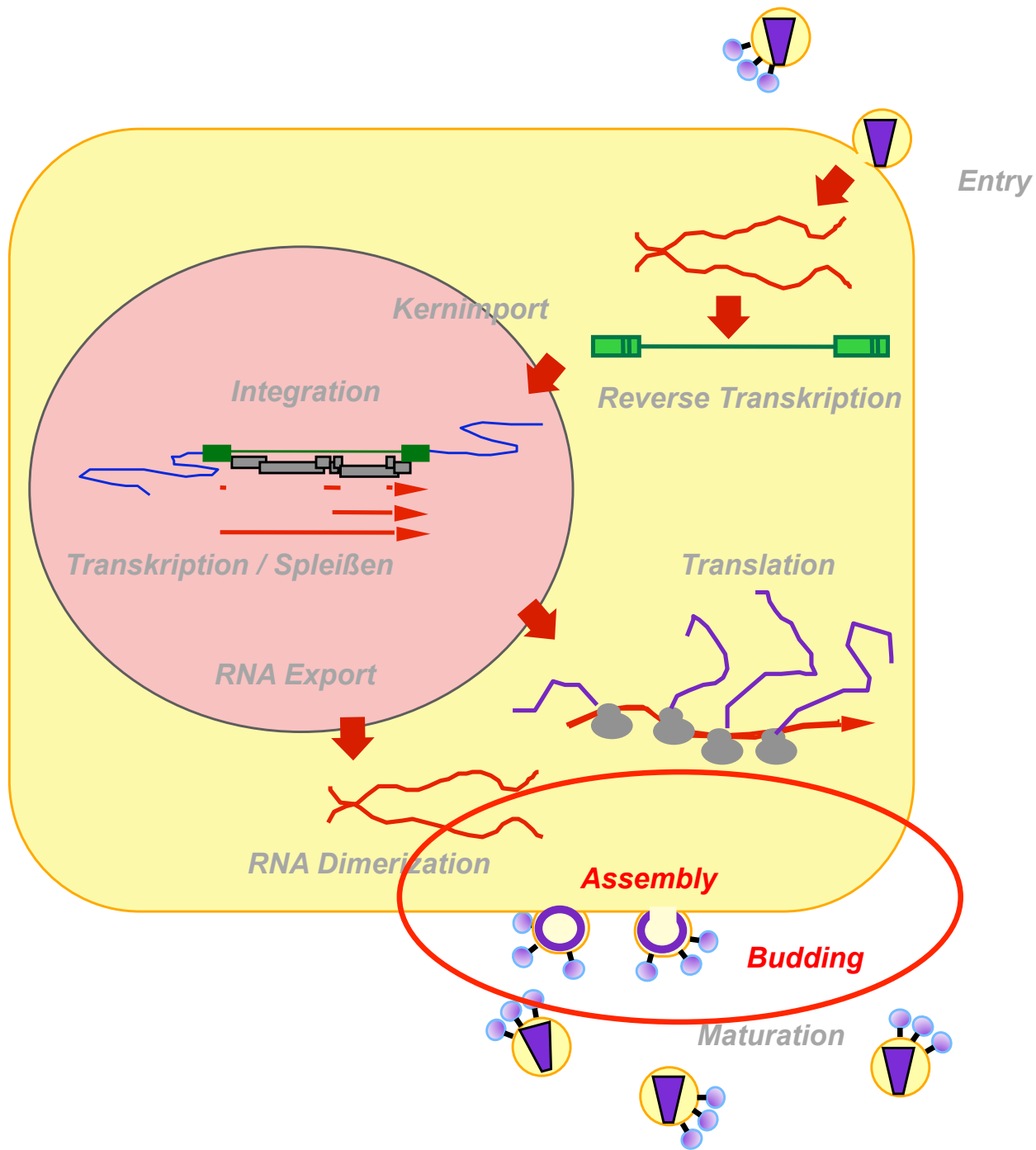
Williams RL, Urbe S (2007) The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 355-368

Yilmaz A, Bolinger C, Boris-Lawrie K (2006) Retrovirus translation initiation: Issues and hypotheses derived from study of HIV-1. *Current HIV research* **4**: 131-139

7

Virus assembly und budding

Stefanie Bock



Inhaltsverzeichnis

Viruszusammenbau und -freisetzung	107
HIV-1 Assembly	107
Membran-Mikrodomänen	109
Env Inkorporation und Env Verteilung	109
MPMV Assembly	110
Budding und Freisetzung	112
Struktur unreifer Viren	113
Alternative Freisetzungswege	114
Zelluläre Restriktionsfaktoren	115
CD 317	115
ISG-15	116
Fragen	116
Antworten	116
Literatur	117

Viruszusammenbau und -freisetzung

HIV-1 Assembly

Einer der letzten Schritte der HIV-1 Replikation ist der Zusammenbau der Viren an der Plasmamembran infizierter Zellen (Abbildung 7.1) (Flint, 2009). Vermittelt und initiiert wird der Viruszusammenbau hauptsächlich durch das virale Gag-Vorläuferprotein, das aus dem Matrix Protein (MA), Capsid (CA), Nucleocapsid (NC), einem kurzen Peptid (p6), sowie zwei „Spacer“-Peptiden (SP1, SP2) besteht (Abbildung 7.2) (Briggs & Kräusslich, 2011; Carlson et al, 2008; Ganser-Pornillos et al, 2008; O'Carroll et al, 2012). Gag gelangt als Monomer, oder bereits mit anderen Gag- oder Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteinen, die ca. 5% aller Gag-Vorläuferproteine ausmachen (Sundquist & Kräusslich, 2012), als Dimere oder Trimere zusammengelagert an die Plasmamembran (Bukrinskaya, 2004; Martin-Serrano & Neil, 2011), wo die stark-basische Region (HBR) der helikalen Domäne von MA mit Phospholipiden (PI(4,5)P₂) der Zellmembran interagiert (Checkley et al, 2011; Ono, 2010). Durch diese Interaktion gelangt die am N-Terminale Ende von MA angefügte Myristylsäure in die Nähe der Plasmamembran und kann in diese eingelagert werden (Ganser-Pornillos et al, 2008). Da die Myristylsäure in einer Tasche der MA Region eingelagert ist, wird sie zur Insertion durch einen ansteigenden pH-Wert, sowie durch die Membranbindung der HBR zuerst freigesetzt (Bell & Lever, 2012). Die Membranbindung ist meist mit dem Vorhandensein verschiedener Membran-Mikrodomänen assoziiert (Kerviel et al, 2012). An Membranregionen, wo HIV-1 Zusammenbau stattfindet, tritt eine höhere Dichte an „Lipid Rafts“, Tetraspanin Mikrodomänen und anderen Membran-Mikrodomänen auf (Kerviel et al, 2012; Ono, 2010; Sundquist & Kräusslich, 2012). Durch diese hohe Dichte an Membran-Mikrodomänen wird eine erhöhte Stabilität und zugleich Flexibilität der Virusmembran erreicht (Sundquist & Kräusslich, 2012). Zudem erleichtern diese Mikrodomänen während dem Viruszusammenbau die Anlagerung weiterer Gag-Vorläuferproteine, sowie die Inkorporation der viralen Env Glycoproteine (siehe Kap.6 Trafficking).

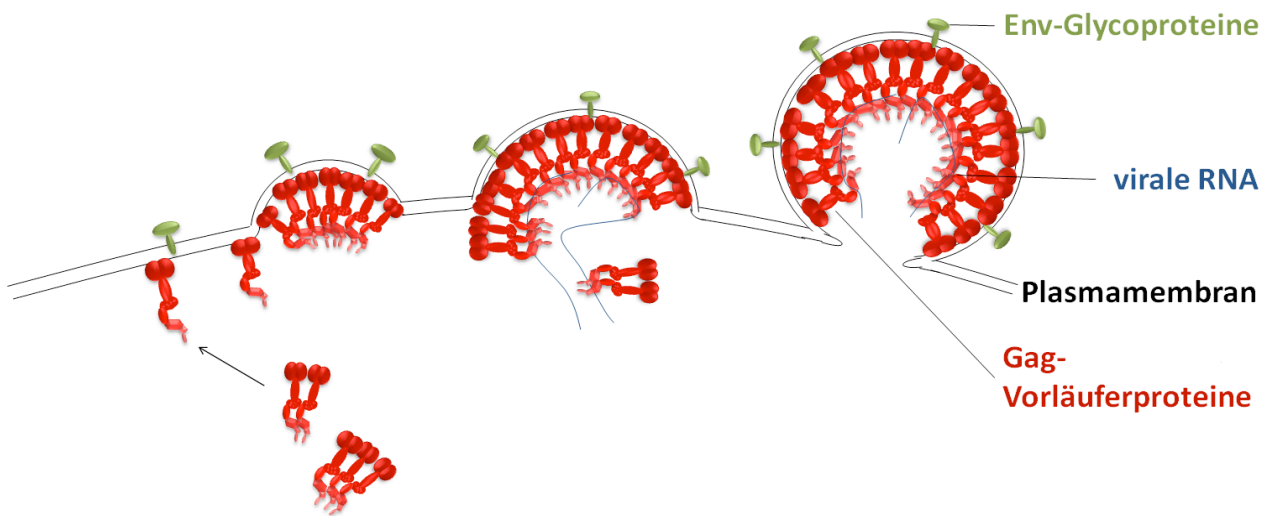


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung des HIV-1 Zusammenbaus an der Plasmamembran

Um einen effizienten Viruszusammenbau zu erreichen, kann Gag über NC die Lage und Dichte der Membran-Mikrodomänen an gewissen Stellen erhöhen, aber auch eine Neusynthese von „Lipid Rafts“ initiieren (Ono, 2010). Die Ausstülpung der Plasmamembran während des HIV-1 Zusammenbaus wird durch die Anlagerung weiterer Gag Mono-/Multimere bewirkt (Briggs & Kräusslich, 2011). Seitliche Interaktionen der Gag-Vorläuferproteine im Bereich CA-SP1 stabilisiert das Gag-Gitter während des Zusammenbaus und der Freisetzung, bis die Virusreifung initiiert wird und bestimmen somit auch die Struktur der unreifen Viren (siehe Kap. 7.2.2 Struktur unreifer Viren) (Briggs & Kräusslich, 2011; Ganser-Pornillos et al, 2008; Sundquist & Kräusslich, 2012). Hauptsächlich an dieser Interaktion beteiligt ist die MHR („major homology region“) des C-Terminalen Endes des Capsids (CA_{CTD}), sowie dem angrenzenden SP1 (Ganser-Pornillos et al, 2008). Die Aufnahme des viralen plus-strängigen RNA Genoms wird über Bindung einer spezifischen RNA Erkennungssequenz, dem Ψ-Faktor durch Zink Finger Domänen des NC-Bereichs vermittelt (Ganser-Pornillos et al, 2008). Dabei besitzt das Nucleocapsid für die Verpackung der RNA, sowie für die Anlagerung der zellulären tRNA Primer, eine Chaperon-ähnliche Aktivität (Sundquist & Kräusslich, 2012). Zusätzliche Interaktionen der RNA mit der basischen Region von MA erhöht zum einen die Gag Multimerisierungsrate und verhindert zum anderen un-

spezifische Membranbindungen von MA, da diese Interaktion nur durch die Bindung der HBR an die sauren Phospholipide (Phosphatidylserin oder PI(4,5)P₂) der Zellmembran gelöst werden kann (Kerviel et al, 2012; Martin-Serrano & Neil, 2011). Darüber hinaus wird durch die Bindung der vRNA an NC die Konformation des SP1 und daraufhin ebenso die Konformation des Capsid-Bereichs so verändert, dass die lateralen Interaktionen dieser Region verstärkt werden (O'Carroll et al, 2012).

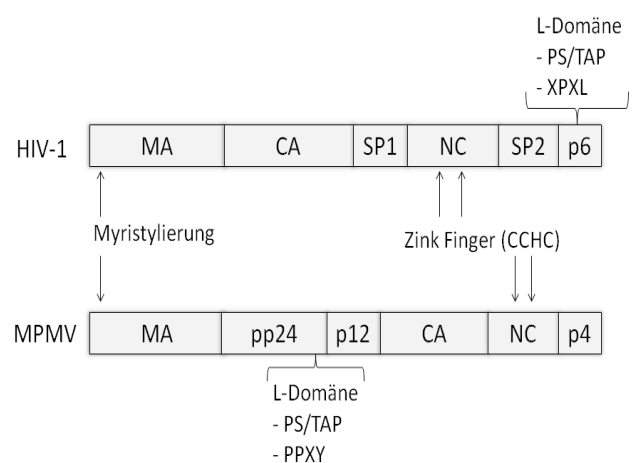


Abbildung 7.2: HIV-1 und MPMV Gag Polyprotein. Kennzeichnung der Myristylierungsstelle, L-Domäne und Zink Finger Domänen.

Das p6 Peptid am C-Terminale Ende des Gag-Vorläuferproteins ist zum einen für die Aufnahme weiterer viraler Proteine, z.B. Vpr, in die Viruspartikel, sowie die Assoziation mit zellulären Faktoren für die Virus-freisetzung zuständig (Bell & Lever, 2012; Sundquist & Kräusslich, 2012). Während des Viruszusammenbaus (Abbildung 7.2) steigt die Gag Menge an der Assembly-Site exponentiell an, bis ein Plateau erreicht ist und die Virusfreisetzung eingeleitet wird (Sundquist & Kräusslich, 2012). Der Zusammenbau der Virionen hängt alleine von der Anwesenheit von Gag ab, da diese selbst ohne andere virale Proteine Virus-ähnliche Partikel bilden und diese freisetzen können (Ganser-Pornillos et al, 2008). Dabei ist die CA_{CTD}-SP1 Region besonders wichtig, da bei Mutationen in diesem Bereich kein Viruszusammenbau und ebenso keine HIV-1 Freisetzung mehr stattfinden kann (O'Carroll et al, 2012). Der Grund hierfür ist die fehlende Stabilisierung des Gag-Gitters, ohne die ein erfolgreicher Zusammenbau nicht möglich ist (Ganser-Pornillos et al, 2008; Ono, 2010).

Membran-Mikrodomänen

„Lipid Rafts“ sind kleine, hoch dynamische, sterol- (cholesterol) und sphingolipid-reiche Domänen der Plasmamembran, die zelluläre Prozesse kompaktimentalisieren (Checkley et al, 2011; Kerviel et al, 2012; Ono, 2010). Kleinere „Rafts“ können durch Protein-Protein oder Protein-Lipid Interaktionen stabilisiert werden, um größere Plattformen zu bilden (Ono, 2010). Die zellulären Funktionen der „Lipid Rafts“ liegen in der Signalweiterleitung, Protein Sortierung und der Ausbildung einer Zellpolarität (Ono, 2010). Eine weitere wichtige Gruppe der Membran-Mikrodomänen sind die „Tetraspin-Enriched“ Mikrodomänen (TEM), die durch Protein-Protein Interaktionen gebildet werden und aus vier transmembranen Domänen bestehen (Kerviel et al, 2012). Zudem existieren weitere Mikrodomänen, die reich an sauren Lipiden (ALEMs = Acidic Lipid Enriched MicroDomänens) sind (Kerviel et al, 2012), oder Resistenzen gegenüber verschiedenen Detergentien, wie Triton-X, aufweisen und deshalb „Detergent Resistant MicroDomänens“, kurz DRMs, genannt werden (Ono, 2010).

Env Inkorporation und Env Verteilung

Das virale Env Glycoprotein ist ein integrales Membranprotein, das an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und direkt in dieses eingelagert wird (Checkley et al, 2011; Sundquist & Kräusslich, 2012). Env besteht aus gp41 und gp120 Heterodimeren, die sich zu trimeren Spikes zusammenlagern (Checkley et al, 2011). Über den zellulären sekretorischen Weg gelangt es an die Plasmamembran und somit an die Zelloberfläche (genaueres siehe Kap.6 Trafficking). Während des Viruszusammenbaus gelangt Env an die „Assembly-Site“, um so in die Viruspartikel aufgenommen werden zu können. Wie Env an die Stelle der Plasmamembran gelangt, an der die Viren zusammengebaut werden und wie genau es in die Viruspartikel inkorporiert wird, ist nach aktuellem Stand der Forschung noch nicht geklärt. Hierzu existieren vier verschiedene Modelle (Abbildung 7.3). Eines dieser Modelle besagt, dass Env zufällig als Membranbestandteil in die Viruspartikel aufgenommen wird (Checkley et al, 2011). Da Env über den sekretorischen Weg vom ER aus an die Zelloberfläche sekretiert wird, wird es, wie auch andere zelluläre Membran- und Oberflächenproteine, ohne einen definierten Mechanismus in die Viren verpackt. Ein zweites Modell geht von einer direkten Interaktion von Gag und Env aus (Checkley et al, 2011). Dabei wird die Env Aufnahme in die Viruspartikel durch direkte Bindung des mit der Plasmamembran assoziierten N-Terminus von MA und dem C-Terminus des transmembranen gp41 angenommen (Bell & Lever, 2012). Eine weitere Annahme ist, dass keine direkte, sondern eine indirekte Verbindung zwischen Gag und Env über ein zelluläres Protein besteht (Checkley et al, 2011). Gestärkt wird diese Annahme durch eine Vielzahl bekannter Interaktionen von Gag, sowie der C-Terminale Domäne von gp41 mit zellulären Proteinen. Allerdings gibt es aus dieser Vielzahl an möglichen Faktoren, die für die Env Inkorporation zuständig sein könnten, keinen, bei dem diese Funktion eindeutig bestätigt ist. Ein letztes Modell geht von einem „Co-Targeting“ von Gag und Env über gemeinsam gebundene zelluläre Strukturen aus (Checkley et al, 2011). Hier stehen vor allem „Lipid Rafts“ der Plasmamembran im Vor-

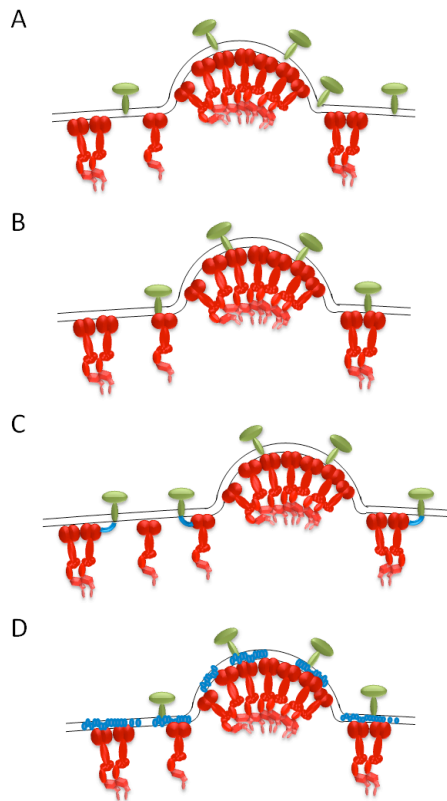


Abbildung 7. 3: Modelle der Env Inkorporation. (A) Zufällige Aufnahme von Env in die Viruspartikel. (B) Env Aufnahme durch direkte Gag(MA) - Env(gp41) Interaktion. (C) Env Inkorporation durch „Co-Targeting“ über Protein, die sowohl mit Gag, als auch mit Env interagieren. (D) Assoziation von Env und Gag mit Membranmikrodomänen.

dergrund, da eine Interaktion von Gag und Env mit diesen Mikrodomänen bekannt ist. Zudem ist eine erhöhte Dichte an „Lipid Rafts“ in der Virusmembran zu finden, die durch Interaktion von Gag mit diesen Mikrodomänen hervorgerufen wird (Ono, 2010). Da Env ebenso mit diesen Membran-Mikrodomänen assoziiert, kann durch Rekrutierung der Mikro-domänen durch das Gag-Vorläuferprotein, das virale Glycoprotein in die entstehenden Viruspartikel inkorporiert werden. Betrachtet man die aktuellen Forschungsergebnisse genauer, ist eine Tendenz in Richtung einer direkten Interaktion von Gag und Env oder die Inkorporation von Env über die Assoziation mit Membran-Mikrodomänen, zu erkennen. Die zufällige Inkorporation des viralen Glycoproteins in die Viruspartikel steht, trotz passender theoretischer Env Verteilung von im Schnitt zehn zufällig inkorporierter Glycoproteine pro Virion, nicht mehr im Fokus.

MPMV Assembly

Innerhalb der Gruppe der Retroviren gibt es zwei verschiedene Orte des Zusammenbaus in der Zelle. Typ D Retroviren, wozu auch das Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV) gehört, assemblieren die Gag-Vorläuferproteine, sowie alle anderen viralen Proteine und das virale Genom, im Cytoplasma (Rhee & Hunter, 1990). Typ C Retroviren, wie HIV-1 oder das Moloney Murine Leukämie Virus (MoMuLV), assemblieren hingegen an der Plasmamembran (Choi et al, 1999). Diese unterschiedlichen Orte des Zusammenbaus kann man sich zunutze machen, um die Virusreplikation genauer zu untersuchen und eventuell neue Angriffspunkte für Antivirale-Therapien zu finden. Der MPMV Zusammenbau (Abbildung 7.4) wird hauptsächlich durch das virale Gag Vorläuferprotein, das aus dem Matrix Protein (MA), dem Phosphoprotein pp24, p12, CA, NC und p4 besteht, vermittelt (Bohmova et al, 2010). Dabei werden die Gag-Vorläuferproteine als Monomere, aber auch als Dimere oder Trimere an die „Assembly-Site“ transportiert. Das entscheidende Signal für den Transport der Gag-Vorläuferproteine an die cytoplasmatische „Assembly-Site“ befindet sich in MA (Rhee & Hunter, 1990). Identifiziert wurde ein 18 Aminosäuren langer Bereich, der die notwendigen Informationen enthält die Gag-Vorläuferproteine an den Ort des Zusammenbaus der unreifen Viruscapside in der pericentriolaren Region der Zelle zu bringen (Choi et al, 1999). Der Transport der Gag-Vorläuferproteine an die pericentriolare Region über dieses CTRS (Cytoplasmic Targeting/Retention Signal) resultiert aus einer Interaktion dieses Bereiches mit dem zellulären Vesikeltransportweg (Vlach et al, 2008). Hierbei bindet das CTRS an das akzessorische Tctex-1 Protein der leichten Kette des zellulären Dynein/Dynein Motorkomplexes (Vlach et al, 2008). Somit werden die Gag-Vorläuferproteine an der „Assembly-Site“ konzentriert und verbleiben an dieser Stelle, bis der Capsid-Zusammenbau beendet ist (Choi et al, 1999). Eine Deletion dieses Bereiches hat den Zusammenbau der Viren an der Plasmamembran zur Folge (Choi et al, 1999). Allerdings liegt diese Veränderung der Assembly-Site von der pericentriolaren Region hin zur Plasmamembran an einer einzigen Amino-

säure, deren Veränderung einen „Switch“ von Typ D zu Typ B/C Zusammenbau bewirkt (Choi et al, 1999; Rhee & Hunter, 1990). Hierbei handelt es sich um die Veränderung von Arginin an Position 55 des Gag-Vorläuferproteins, in MA, zu Tryptophan (R55W Mutation) (Rhee & Hunter, 1990). MPMV^{R55W} zeigt einen mit wildtypischen MPMV vergleichbaren Gehalt an Gag-Vorläuferproteinen, ebenso wie eine vergleichbare Virusmenge, die freigesetzt wird (Rhee & Hunter, 1990). Allerdings sind diese Viren nicht infektiös. Hauptunterschied zwischen wildtypischem MPMV und MPMV^{R55W} ist, wie bereits genannt, der Ort des Viruszusammenbaus. Durch diese Mutation werden strukturelle Umlagerungen der Gag-Vorläuferproteins induziert, wodurch das CTRS nicht mehr frei zugänglich ist und somit keine Interaktion mit Tctex-1 stattfinden kann (Vlach et al, 2008). Da MPMV Gag, ebenso wie HIV-1 Gag, N-Terminal myristyliert wird, binden die Gag-Vorläuferproteine bei Fehlen des CTRS an der Plasmamembran und bauen sich dort mit anderen Gag-Vorläuferproteinen zu dem unreifen Virus zusammen (Vlach et al, 2008). Der Zusammenbau der unreifen Viruspartikel verläuft nach ähnlichem Prinzip wie der HIV-1 Zusammenbau. Auch bei MPMV sind laterale Gag Interaktionen, die hauptsächlich durch den C-Terminalen Bereich des CA und, da MPMV kein SP1 zwischen CA und NC besitzt, durch den N-Terminalen Bereich von NC, wichtig

(Bohmova et al, 2010). Zudem wirken p12-p12, NC-RNA und NC-NC Interaktionen stabilisierend während des Viruszusammenbaus (Bohmova et al, 2010; Weldon et al, 1998). Die zusammengebauten viralen Procapside werden zur Freisetzung an die Plasma-membran transportiert. Dieser Transport erfordert eine N-Terminale Myristylierung des viralen Gag, sowie eine Interaktion mit dem viralen Glycoprotein Env (Sfakianos & Hunter, 2003). Der Env Transport über den sekretorischen Transportweg der Zelle durch das Trans-Golgi Netzwerk hin zur Plasmamembran kann Veränderungen der Zellmorphologie, sowie der endosomalen Transportwege induzieren, die den Procapsid Transport zur Plasmamembran fördern (Sfakianos & Hunter, 2003; Song et al, 2005). Für den Transport des Procapsids zu der Plasmamembran wird, ebenso wie für die Assoziation der Gag-Vorläuferproteine mit der pericentriolaren Region bei dem Viruszusammenbau, ATP benötigt (Weldon et al, 1998). Das MPMV Budding findet, wie auch das HIV-1 Budding in Abhängigkeit der zellulären ESCRT Maschinerie statt (Song et al, 2005).

Da das Signal, das für die Unterschiede in der Assembly Site der Typ D und TypB/C Retroviren bekannt ist, kann man nicht nur den MPMV Zusammenbau durch die R55W Mutation an die Plasmamembran verlagern, sondern auch bei Typ B Retroviren einen cytoplasmatischen Viruszusammenbau induzieren. Hierzu wurde

Tabelle 7.1: Gegenüberstellung HIV-1 und MPMV Zusammenbau

	HIV-1	MPMV
Virustyp	Typ C	Typ D
Assembly-Site	Plasmamembran	Zytoplasma, Pericentriolare Region
Targeting Signal	Myristylsäure HBR	CTRS
Gag-Gag Interaktionsstellen	CA _{CTD} /SP1 - CA _{CTD} /SP1 NC - NC NC - vRNA	CA _{CTD} /NC _{NTD} - CA _{CTD} /NC _{NTD} NC - NC NC - vRNA
Bildung von VLP	Gag ausreichend für die Bildung von VLP	keine Bildung von VLP bei Fehlen viraler Proteine und der viralen RNA
Env	Inkorporation durch Interaction mit Gag	Notwendig für Transport der Procapside an die Plasmamembran
ESCRT Rekrutierung	L-Domäne in p6: PTAP/PSAP, XPXL	L-Domäne in pp24: PTAP/PSAP, PPXY

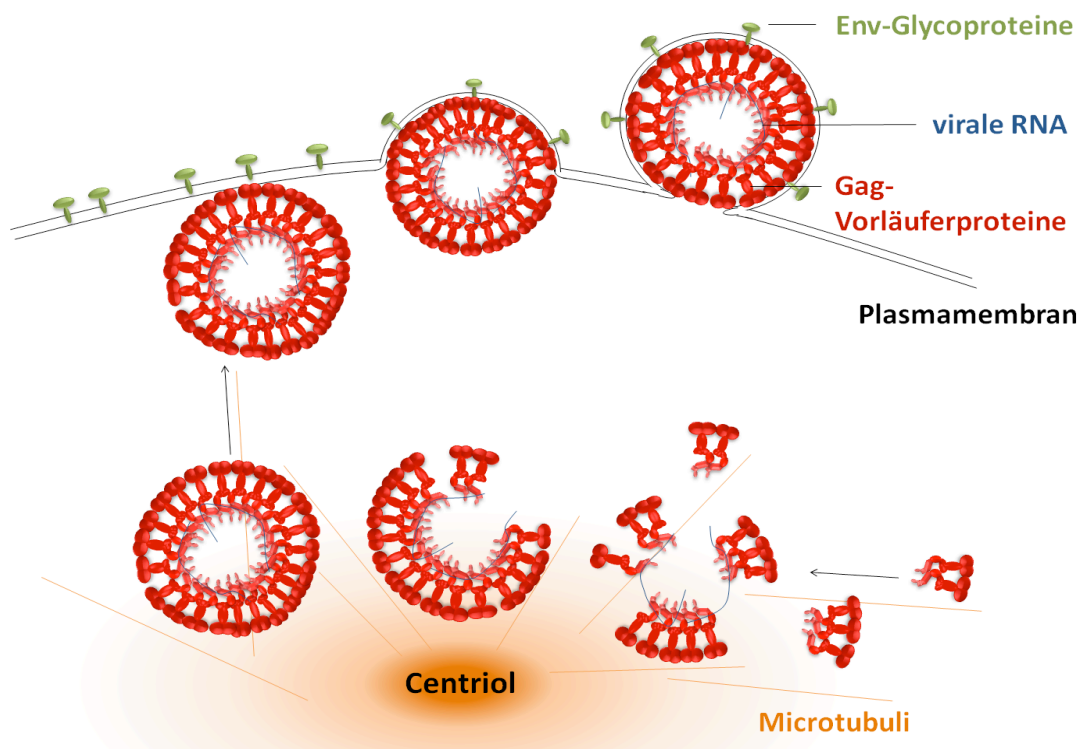


Abbildung 7. 4: MPMV Assembly und Capsid Transport. Schematische Darstellung des MPMV Mikrotubuli-assoziierten Zusammenbaus an der Pericentriolaren Region im Zytoplasma und anschließendem Transport der Procapside an die Plasmamembran.

das MPMV CTRS anstelle einer ähnlichen, elf Aminosäuren lange Sequenz in MA des MoMuLV eingebracht (Choi et al, 1999; Vlach et al, 2008). Diese Insertion hat den Zusammenbau des Typ B MoMuLV in der pericentriolaren Region zur Folge (Vlach et al, 2008). Durch diese Veränderungen in der Assembly Site der verschiedenen Retroviren, die wie man sieht, gegenseitig austauschbar sind, kann man retrovirale Infektionen besser studieren und, wie bereits genannt, potentielle Angriffspunkte für Inhibitoren identifizieren.

Budding und Freisetzung

Das HIV-1 Budding und die Freisetzung ist von der zellulären ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) Maschinerie abhängig (Abbildung 7.5) (Bukrinskaya, 2004; Sundquist & Kräusslich, 2012). Hauptverantwortlich für die Rekrutierung der zellulären ESCRT Maschinerie ist die L-Domäne (Late-Domäne) von p6 des Gag-Vorläuferproteins (Martin-Serrano & Neil, 2011; Sundquist & Kräusslich, 2012). Diese Domäne

besteht aus zwei verschiedenen Bindemotiven, über die Bestandteile des ESCRT Weges aktiviert und gebunden werden können. Das p6 PTAP/PSAP Motiv bindet die ubiquitinylierte TSG101 Untereinheit von ESCRT I, wodurch die Freisetzung initiiert wird (Bukrinskaya, 2004; Martin-Serrano & Neil, 2011). Die Rekrutierung von ESCRT III kann durch das p6 XPXL-Motiv und dessen Bindung eines ALIX Faktors (Kuang et al, 2011; Sundquist & Kräusslich, 2012), allerdings auch durch eine Verbindung über ESCRT II Proteine oder das ESCRT III Protein CHMP6 vermittelt werden (Martin-Serrano & Neil, 2011). Eine weitere Interaktion des viralen Gag mit der ESCRT Maschinerie wird durch Ubiquitinylierung von Gag vermittelt (Sundquist & Kräusslich, 2012), was bei einer Deletion der L-Domäne die Virusfreisetzung aufrecht erhält (Martin-Serrano & Neil, 2011). Allerdings kann ebenso bei ausbleibender Gag Ubiquitinylierung Virusfreisetzung stattfinden (Martin-Serrano & Neil, 2011), wodurch kein viraler Faktor identifiziert werden kann, der für die Freisetzung abso-

lut notwendig ist. Vermutlich ist die Virusfreisetzung das Resultat des Zusammenspiels verschiedener Faktoren, die im Einzelnen nicht notwendig, aber dennoch ausreichend sind, um die Freisetzung zu initiieren. Nach erfolgreicher Initiation der Freisetzung und Bindung von ESCRT I folgt durch die Rekrutierung von ESCRT III die Abschnürung der Viren. Hierfür sind vor allem CHMP2 und CHMP4 verantwortlich, die sich in einem Komplex um den Membranhals schnüren, diesen dadurch verlängern und die beiden Membran-Seiten in engen Kontakt bringen (Martin-Serrano & Neil, 2011; Sundquist & Kräusslich, 2012). Generell wird bei der Vesikelabschnürung durch die ESCRT Maschinerie neben CHMP2 und CHMP4 auch CHMP6 zur Rekrutierung der CHMPs benötigt (Martin-Serrano & Neil, 2011). Die Rekrutierungsfunktion von CHMP6 kann bei der HIV-1 Freisetzung durch die ALIX Faktoren ersetzt werden (Martin-Serrano & Neil, 2011). Die endgültige Freisetzung wird durch die Membranfusion, sowie den Abbau der ESCRT III Faktoren vermittelt. Dieser Abbau ist energieabhängig und benötigt somit die Hydrolyse von ATP (Pincetic et al, 2010). Hierfür wird VPS4 (Vakuolar Protein Sorting), das eine ATPase bindet, rekrutiert (Pincetic et al, 2010). CHMP4B und CHMP6 binden bereits während der Abschnürung VPS4 an der Plasmamembran, wodurch es für den Abbau des ESCRT III Komplexes verfügbar ist (Kuang et al, 2011). Ein Komplex aus CHMP5 und LIP5 bindet die VPS4-ATPase, vermittelt so den Kontakt zu den CHMPs und infolge der ATP Hydrolyse den Abbau von ESCRT III, wodurch die Viren freigesetzt werden (Kuhl et al, 2011; Martin-Serrano & Neil, 2011; Pincetic et al, 2010; Sundquist & Kräusslich, 2012).

Struktur unreifer Viren

Die unreifen Viren enthalten bereits alle benötigten viralen Proteine, sowie das virale Genom. Während des Zusammenbaus der Viren werden ca. 2500 Kopien des Gag- und GagProPol-Vorläuferproteins (Briggs & Kräusslich, 2011; Carlson et al, 2008) an die Plasmamembran gebunden. Mit Gag assoziiert werden zwei Kopien des viralen positiv strängigen RNA Genoms, inklusive zellulärer

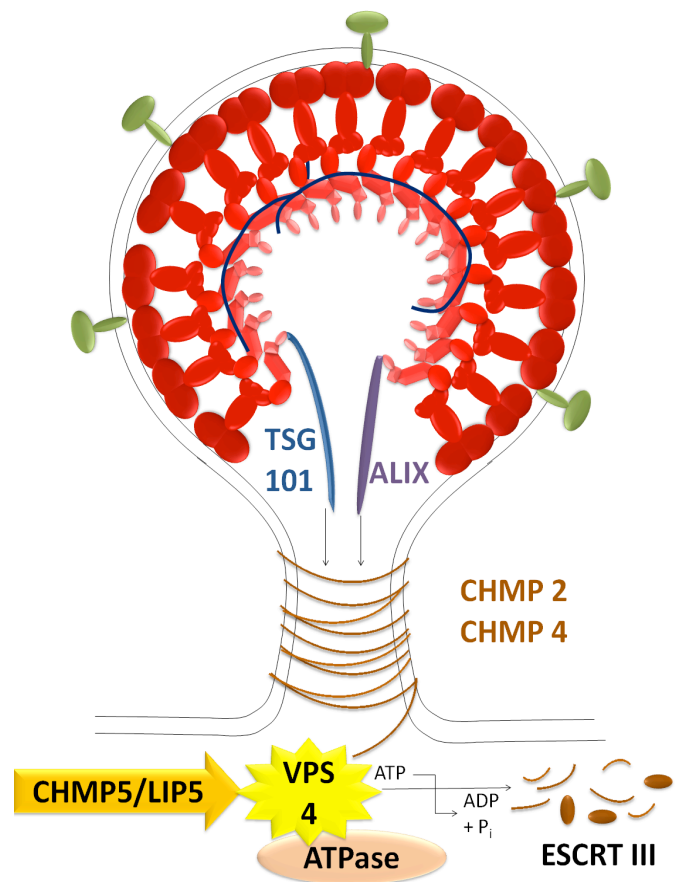


Abbildung 7. 5: Schematische Darstellung der Rekrutierung der zellulären ESCRT Maschinerie zur Virusfreisetzung.

tRNA Primer, integriert (Sundquist & Kräusslich, 2012). Von dem viralen Env Protein sind ca. zehn Trimere des Glycoproteins auf der Oberfläche eines Viruspartikels enthalten (Checkley et al, 2011; Sundquist & Kräusslich, 2012). Diese geringe Anzahl an viralen Oberflächenproteinen reicht für die Bindung an eine neue Zielzelle aus und mindert gegenüber einer, wie bis vor einigen Jahren angenommen und immer noch häufig dargestellten weitaus höheren Menge an Env auf der Virusoberfläche, die Immunantwort, sowie cytotoxische Effekte (Checkley et al, 2011).

Die Krümmung der Virionen wird durch die radiale Anordnung der Gag-Vorläuferproteine, deren N-Terminales Ende durch das Matrix Protein in der Virusmembran verankert und das C-Terminale Ende Richtung Viruszentrum orientiert ist, sowie durch die hexamere Gitterstruktur, her-

vorgerufen (Ganser-Pornillos et al, 2008). Hauptverantwortlich für dieses Gitter aus Gag-Vorläuferproteinen ist die C-Terminale Domäne des CA Bereichs und SP1. Durch „molecular crowding“ aneinandergrenzender CA_{CTD} Regionen wird eine kontinuierliche α Helix gebildet, die an den Berührungspunkten dimerisiert (Sundquist & Kräusslich, 2012). Seitlich betrachtet ergibt sich aus der hexagonalen Struktur, durch die Interaktion des CA_{CTD} eine Tassenförmige Struktur (Ganser-Pornillos et al, 2008). Zwischen MA und CA_{NTD} besteht keine feste Bindung. Diese beiden Bereiche werden lediglich über eine flexible Interaktionsstelle verbunden (Ganser-Pornillos et al, 2008). Insgesamt wird die Struktur unreifer HIV-1 Partikel durch verschiedene Bindestellen bestimmt und stabilisiert. Formgebend ist, wie bereits beschrieben, die Interaktion zwischen den C-Terminalen Bereichen des Capsids und des SP1. Zudem wird die Struktur durch die Bindung des viralen RNA Genoms an NC und zusätzliche NC-NC Interaktionen verstärkt.

Jedoch ist das Gitter aus Gag-Vorläuferproteinen nicht geschlossen, da während der letzten Budding Schritte kein Gag mehr in die Virionen eingelagert werden kann (Briggs & Kräusslich, 2011). Ab einem gewissen Fortschritt des HIV-1 Zusammenbaus und der daraus resultierenden Ausstülpung der Virionen kann durch die verbleibende Öffnung kein Gag-Vorläuferprotein mehr in die Virionen gelangen. Dadurch entsteht an der Stelle, an der die Viren von der Zellmembran abgeschnürt werden eine Lücke in der Gag-Schicht (Briggs & Kräusslich, 2011; Carlson et al, 2008). Somit sind nach der Virusfreisetzung lediglich ungefähr zwei Drittel der Virusmembran mit Gag bedeckt (Carlson et al, 2008).

Alternative Freisetzungswege

Neben der zellfreien Virustransmission gibt es noch eine Reihe weiterer möglicher Übertragungswege. Zudem wurden in verschiedenen Zellkulturen alternative Orte des Viruszusammenbaus, sowie der Freisetzung festgestellt. HIV-1 kann neben dem Zusammenbau und Budding an der Plasmamembran auch an der Membran von intrazellu-

lären Vesikeln, späte Endosomen oder Multivesikuläre Körper, stattfinden (Balasubramaniam & Freed, 2011). Dabei „buddet“ die Viren in das Vesikelinnere und werden über den zellulären exosomalen Weg freigesetzt (Balasubramaniam & Freed, 2011). In Makrophagen kann die Freisetzung aus sogenannten Nanotubuli stattfinden (Bennett et al, 2009). Diese tubulären Kompartimente sind mit HIV-1 enthaltenden Multivesikulären Körpern verbunden und haben einen Durchmesser von ca. 150-200 nm bei einer Länge von ca. 5 μ m, wodurch die Viren freigesetzt werden (Bennett et al, 2009). Dadurch kann eine gezielte Freisetzung und Ausbreitung einer großen Virusmenge erreicht werden. Der am häufigsten auftretende alternative HIV-1 Übertragungsweg ist die Virologische Synapse (VS) (Balasubramaniam & Freed, 2011; Flint, 2009; Llewellyn et al, 2010; Sundquist & Kräusslich, 2012). Die Virusausbreitung über VS ist zwei bis drei Zehnerpotenzen effizienter als über eine zellfreie Transmission (Flint, 2009). Virologische Synapsen sind stabile interzelluläre Verbindungen, die vor allem von infizierten CD4⁺ T-Zellen, aber auch von Makrophagen, dendritischen Zellen und Monocyten ausgebildet werden (Jolly, 2010; Sundquist & Kräusslich, 2012). Die Ausbildung der Synapsen erfordert, neben der Infektion durch HIV-1, einen engen Kontakt mit einer Zielzelle (Balasubramaniam & Freed, 2011). Zielzellen sind Zellen, die das Potential besitzen VS ausbilden zu können, wie CD4⁺ T-Zellen, aber auch Epithelzellen (Jolly, 2010; Sundquist & Kräusslich, 2012). Um eine Verbindung der Zellen herzustellen, muss eine Polarisierung der infizierten Zelle stattfinden, was bei T-Zellen die Ausbildung von Uropoden bedeutet (Llewellyn et al, 2010). Vermittelt wird die Polarisierung der infizierten Zelle Richtung Zielzelle durch Reorganisation des Aktin Cytoskeletts, sowie einer Veränderung der Lage des Mikrotubuli-Organisations-Zentrums (MTOC) (Jolly, 2010). Der Zusammenbau der Viren findet an den Uropoden statt. Die Lokalisation des viralen Gag wird dabei durch die Konzentration von „Lipid Rafts“ und Integrinen an der Kontaktzone zu einer Zielzelle hin gerichtet gesteuert (Jolly, 2010; Llewellyn et al, 2010). Durch die NC-RNA vermittelte Multimerisierung

der Gag-Vorläuferproteine gelangen möglichst viele Gag-Vorläuferproteine, sowie alle anderen Viruskomponenten an die Uropoden-Plasmamembran (Llewellyn et al, 2010). Auch an der Zielzelle findet eine Reorganisation des Cytoskeletts statt (Jolly, 2010). Zudem werden CD4 Rezeptoren, sowie die Corezeptoren CXCR4, auf T-Lymphocyten, bzw. CCR5 auf Makrophagen, an die Kontaktstelle zu der infizierten Zelle rekrutiert (Felts et al, 2010; Flint, 2009). Zellkontakt, sowie Membranfusion werden, wie bei dem Kontakt freier Viren mit der Zielzelle, über das virale Env, das ebenfalls an Uropoden der infizierten Zelle lokalisiert ist, und den CD4 Rezeptoren, sowie entsprechenden Corezeptoren vermittelt (Llewellyn et al, 2010). Wird eine VS zwischen einer infizierten Dendritischen Zelle (DC) und einer nicht infizierten T-Zelle ausgebildet, werden die Viren in Membranzwischenräume der DCs freigesetzt und gelangen über Filopodienbrücken, die von der T-Zelle Richtung DC gebildet werden, an die Rezeptoren (CD4, CXCR4) der T-Zelle und werden von dieser aufgenommen (Felts et al, 2010). Zusätzlich zu diesen Übertragungswegen findet immer Virusfreisetzung durch Zusammenbau und Abschnürung an anderen Stellen der Plasmamembran statt (Flint, 2009). Bei der gleichzeitigen Ausbildung einer virologischen Synapse können freigesetzte Viren durch Assoziation mit der Zelloberfläche der infizierten Zelle leichter an neue Zielzellen gelangen, indem sie die Oberfläche der Virologischen Synapse, oder nahe gelegene Filopodien nicht infizierter T-Zellen, als Transmissionsweg nutzen (Jolly, 2010; Sundquist & Kräusslich, 2012).

Zelluläre Restriktionsfaktoren

CD 317

CD317 gehört zu der Gruppe der Typ II Transmembranproteine (Kuhl et al, 2011; Ono, 2010) und ist in der Lage die Virusfreisetzung zu inhibieren, indem es die Viren an die Zellmembran bindet (Neil et al, 2007; Van Damme et al, 2008). Es besteht aus einer kurzen N-Terminalen zytoplasmatischen Domäne, einer transmembran-Domäne, einer extrazellulären Dimerisierungsdomäne und ei-

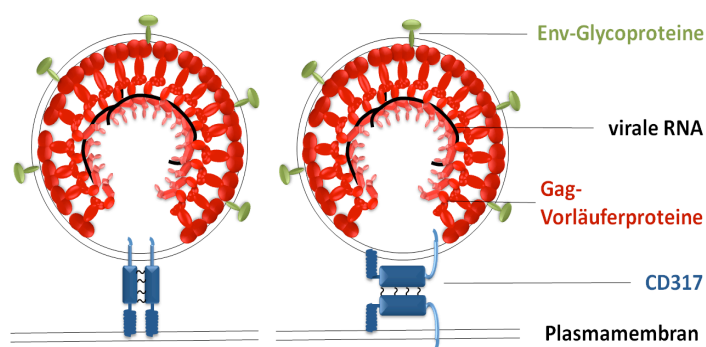


Abbildung 7. 6: Arten der Bindung der freigesetzten Viren an die Plasmamembran durch CD317

nem C-Terminalen GPI-(Glycosylphosphatidylinositol-) Anker (Kuhl et al, 2011; Ono, 2010). Am N-Terminalen Ende ist CD 317 über die Transmembrane Domäne in die Plasmamembran integriert und am C-Terminus über den GPI-Anker, der mit „Lipid Rafts“ der Zellmembran assoziiert (Ono, 2010). Die „Lipid Rafts“ stellen zudem eine direkte Verbindung von Gag-Vorläuferproteinen und CD 317 dar, wodurch eine direkte Verbindung zwischen CD 317 und der HIV-1 Assembly-Site entsteht. Die festhaltende Funktion des CD 317 entsteht zum einen durch die membranspannende Eigenschaft, da das Protein an beiden Enden mit der Plasmamembran assoziiert, zum anderen durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Ectodomänen zweier paralleler CD 317 (Kuhl et al, 2011). Dies ergibt zwei verschiedene Bilder, wie die Viren an der Zelloberfläche gehalten werden (Abbildung 7.6). Die so gebundenen Viren werden von der Zelle wieder aufgenommen und in späten Endosomen oder Lysosomen abgebaut (Kuhl et al, 2011).

Antagonisiert wird CD 317 durch das virale Protein Vpu (Ono, 2010). Es sorgt für die herunter Regulierung von CD 317 auf der Zelloberfläche über zwei verschiedene Mechanismen. Es kann zum einen den generellen CD 317 Pool der Zelle reduzieren und zum anderen bereits in die Membran eingelagertes CD 317 via proteasomalen oder lysosomalen Abbauwegen abbauen (Ono, 2010).

Unterschieden wird aufgrund des Vorkommens von CD 317 zwischen permissiven und restriktiven Zellen (Neil et

al, 2007). B-Zellen, Dendritische Zellen, sowie aktivierte T-Zellen gehören, da sie CD 317 exprimieren, in die Gruppe der restriktiven Zellen (Van Damme et al, 2008). Makrophagen beispielsweise sind permissive Zellen, da diese kein CD 317 exprimieren.

ISG-15

ISG-15 (Interferon-stimuliertes Gen 15), ein Ubiquitin-ähnliches Dimer, inhibiert die Freisetzung der Viren über den zellulären ESCRT Weg (Pincetic et al, 2010; Skaug & Chen, 2010). Die Freisetzung der Viren durch die zelluläre ESCRT Maschinerie benötigt eine Ubiquitylierung von Gag, sowie die Rekrutierung von Vps4 und ESCRT III (Martin-Serrano & Neil, 2011; Pincetic et al, 2010). Da ISG-15 Ubiquitin-ähnlich ist, wäre anzunehmen, dass dieses Protein an Gag bindet und dadurch die Ubiquitylierung verhindert, was die Virusfreisetzung inhibiert. Allerdings ist dies nicht der Angriffspunkt von ISG-15. Es bindet stattdessen kovalent an die ESCRT III Proteine CHMP2A, CHMP4B, CHMP5 und CHMP6 (Kuang et al, 2011; Skaug & Chen, 2010; Sundquist & Kräusslich, 2012). ISGylierung von CHMP4B und CHMP6 bewirkt eine Abschwächung der Bindung von VPS4, wodurch dieses nicht mehr an der Plasmamembran gehalten, sondern in das Cytosol freigesetzt wird (Kuhl et al, 2011). ISGylierung von CHMP2A und im Besonderen ISGylierung von CHMP5 verhindert die Interaktion von CHMP5 mit LIP5, wodurch VPS4 und die dadurch aktivierte ATPase nicht rekrutiert und gebunden werden kann (Kuhl et al, 2011; Pincetic et al, 2010). Durch die fehlende Energie aus der ATP Hydrolyse kann der ESCRT III Komplex nicht gespalten werden und die Viren bleiben an der Membran gebunden (Pincetic et al, 2010). Die Inhibition der Virusfreisetzung durch ISG-15 ist durch die Wirkung von ISG-15 auf zelluläre Proteine ein generell antiviraler Mechanismus, der auf verschiedene Viren, die die zelluläre ESCRT Maschinerie zur Virusfreisetzung verwenden, wirkt (Skaug & Chen, 2010).

Fragen

1. Nennen Sie zwei unterschiedliche Mechanismen des retroviralen Assembly mit jeweils zwei Beispielen.
2. Welches vitale Protein ist für das HIV-1 Assembly unerlässlich?
3. Was sind „lipid rafts“ und welche Rolle spielen sie beim HIV-1 Assembly?
4. Was ist ein CTRS und welche Funktion hat es?
5. Wo genau in der Zelle findet das MPMV Assembly statt und wie erfolgt der Transport der unreifen Capside?
6. Beschreiben Sie die zwei Modelle für HIV-1 Assembly und Release. Welches trifft vermutlich zu?
7. Was versteht man unter Maturation?
8. Wie unterscheiden sich unreife und reife HIV-1 Partikel (bezüglich Gag)?
9. Welches Protein spielt bei der HIV-1 Maturation eine Rolle? Wie entsteht es und wie gelangt es zu seiner enzymatischen Aktivität?
10. Geben Sie die Reihenfolge der Gag-Schnittstellen, die nacheinander von der PR gespalten werden, an.
11. Wie viele Proteaseinhibitoren (PIs) sind zur Zeit auf dem Markt? Nennen Sie die Besonderheiten von Ritonavir und Darunavir.
12. Nennen Sie mögliche Resistenzmechanismen gegen PIs.

Antworten

1. Zum einen kann retrovirales Assembly an der Plasmamembran stattfinden, z.B. HIV-1 und MLV, zum anderen kann Assembly der Retroviren im Falle von MPMV oder MMTV im Cytoplasma stattfinden.
2. Das Gag Protein.
3. „Lipid Rafts“ sind spezielle Membranmikrodomänen, die Cholesterol, Glycosingolipide und verschiedene spezifische Proteine enthalten. Sie spielen bei der Inkorporation von Env in die Viruspartikel eine wichtige Rolle und sind

zudem mit Gag assoziiert. Ist kein Cholesterol in der Plasmamembran vorhanden, kann kein HIV-1 Assembly stattfinden.

4. Das CTRS ist ein kurzes Peptid-Signal in der MA Domäne von MPMV Gag. Dieses Signal ist hochkonserviert in Typ B und D Retroviren. Das CTRS ist für die Lokalisation der Gag Polyproteine in der Pericentriolaren Region im Cytoplasma der Zellen zuständig.
5. MPMV Assembly findet im Cytoplasma in der pericentriolaren Region statt. Der Transport der unreifen Capside von der pericentriolaren Region an die Plasmamembran erfolgt Env-abhängig und Mikrotubuliassoziiert durch das Vesikel-Transportsystem der Zelle.
6. Ein Modell besagt, dass die zelluläre ESCRT Maschinerie bereits früh während dem Budding rekrutiert und aktiviert wird, wobei das Gag-Gitter noch nicht vollständig geschlossen ist. In einem zweiten Modell sorgt die ESCRT Maschinerie erst nach vollständigem Viruszusammenbau für die Virusfreisetzung. Das erste Modell trifft dabei vermutlich zu.
7. Maturation ist der Prozess, in dem das unreife Gag Gitter durch die Spaltung der Gag Vorläuferproteine durch die virale Protease disassembled und sich anschließend zu dem reifen Core Capsid zusammensetzt.
8. Das unreife Gitter besteht aus einem Netz aus hexameren Gag- Vorläuferproteinen mit Lücken in der Struktur. Das reife Gitter besteht aus dem conischen Core aus CA.
9. Die virale Protease spielt bei der HIV-1 Reifung eine wichtige Rolle und erlangt durch autokatalytische Spaltung und Dimerisierung seine enzymatische Aktivität.
10. 1) SP1/NC
2) MA/CA, SP2/P6
3) CA/SP1, NC/SP2
11. Zur Zeit sind neun verschiedene Proteaseinhibitoren auf dem Markt. Ritonavir zum Boosten (P450), Darunavir: hohe genetische Barriere, wirkt somit auch in Therapie-erfahrenen Patienten.
12. Resistenz-Mutationen (primär und sekundär), AA Insertionen, Mutationen in Gag

Literatur

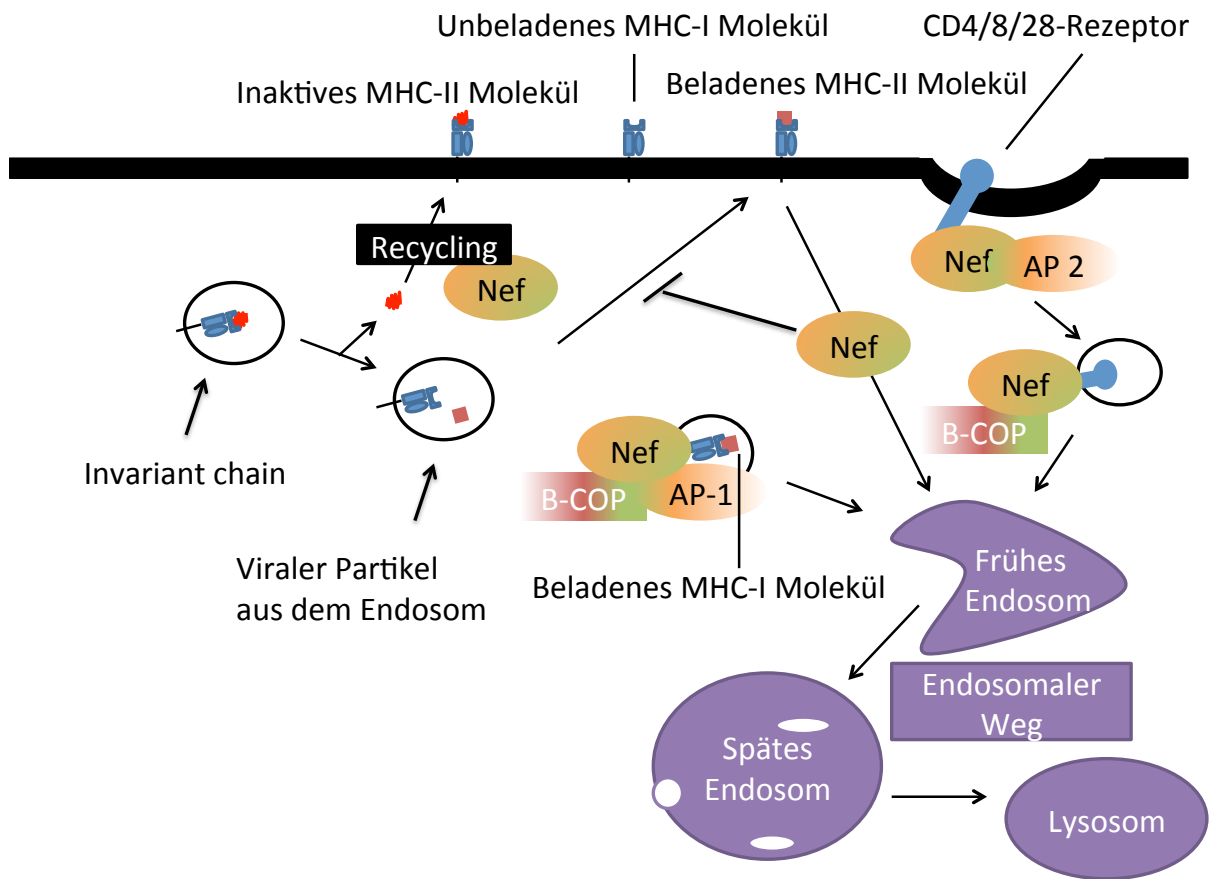
- Balasubramaniam M, Freed EO (2011) New insights into HIV assembly and trafficking. *Physiology* **26**: 236-251
- Bell NM, Lever AM (2012) HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends in microbiology*
- Bennett AE, Narayan K, Shi D, Hartnell LM, Gousset K, He H, Lowekamp BC, Yoo TS, Bliss D, Freed EO, Subramaniam S (2009) Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages. *PLoS pathogens* **5**: e1000591
- Bohmova K, Hadravova R, Stokrova J, Tuma R, Ruml T, Pichova I, Rumlova M (2010) Effect of dimerizing Domänes and basic residues on in vitro and in vivo assembly of Mason-Pfizer monkey virus and human immunodeficiency virus. *J Virol* **84**: 1977-1988
- Briggs JA, Kräusslich HG (2011) The molecular architecture of HIV. *JMB* **410**: 491-500
- Bukrinskaya AG (2004) HIV-1 assembly and maturation. *Archives of virology* **149**: 1067-1082
- Carlson LA, Briggs JA, Glass B, Riches JD, Simon MN, Johnson MC, Muller B, Grunewald K, Kräusslich HG (2008) Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell host & microbe* **4**: 592-599
- Checkley MA, Luttmann BG, Freed EO (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *Journal of molecular biology* **410**: 582-608
- Choi G, Park S, Choi B, Hong S, Lee J, Hunter E, Rhee SS (1999) Identification of a cytoplasmic targeting/retention signal in a retroviral Gag polyprotein. *Journal of virology* **73**: 5431-5437
- Felts RL, Narayan K, Estes JD, Shi D, Trubey CM, Fu J, Hartnell LM, Ruthel GT, Schneider DK, Nagashima K, Bess JW, Jr., Bavari S, Lowekamp BC, Bliss D, Lifson JD, Subramaniam S (2010) 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 13336-13341
- Flint SJ (2009) *Principles of Virology*, 3. Auflage edn.: American Society for Microbiology.
- Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI (2008) The structural biology of HIV assembly. *Current opinion in structural biology* **18**: 203-217

- Jolly C (2010) T cell polarization at the virological synapse. *Viruses* **2**: 1261-1278
- Kerviel A, Thomas A, Chaloin L, Favard C, Muriaux D (2012) Virus assembly and plasma membrane Domänen: Which came first? *Virus research*
- Kuang Z, Seo EJ, Leis J (2011) Mechanism of inhibition of retrovirus release from cells by interferon-induced gene ISG15. *Journal of virology* **85**: 7153-7161
- Kuhl BD, Cheng V, Wainberg MA, Liang C (2011) Tetherin and its viral antagonists. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* **6**: 188-201
- Llewellyn GN, Hogue IB, Grover JR, Ono A (2010) Nucleocapsid promotes localization of HIV-1 gag to uropods that participate in virological synapses between T cells. *PLoS pathogens* **6**: e1001167
- Martin-Serrano J, Neil SJ (2011) Host factors involved in retroviral budding and release. *Nature reviews Microbiology* **9**: 519-531
- Neil SJ, Sandrin V, Sundquist WI, Bieniasz PD (2007) An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell host & microbe* **2**: 193-203
- O'Carroll IP, Soheilian F, Kamata A, Nagashima K, Rein A (2012) Elements in HIV-1 Gag contributing to virus particle assembly. *Virus research*
- Ono A (2010) Relationships between plasma membrane microDomänen and HIV-1 assembly. *Biology of the Cell* **102**: 335-350
- Pincetic A, Kuang Z, Seo EJ, Leis J (2010) The interferon-induced gene ISG15 blocks retrovirus release from cells late in the budding process. *Journal of virology* **84**: 4725-4736
- Rhee SS, Hunter E (1990) A single amino acid substitution within the matrix protein of a type D retrovirus converts its morphogenesis to that of a type C retrovirus. *Cell* **63**: 77-86
- Sfakianos JN, Hunter E (2003) M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome. *Traffic* **4**: 671-680
- Skaug B, Chen ZJ (2010) Emerging role of ISG15 in antiviral immunity. *Cell* **143**: 187-190
- Song C, Micoli K, Bauerova H, Pichova I, Hunter E (2005) Amino acid residues in the cytoplasmic Domäne of the Mason-Pfizer monkey virus glycoprotein critical for its incorporation into virions. *J Virol* **79**: 11559-11568
- Sundquist WI, Kräusslich HG (2012) HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**: a006924
- Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J (2008) The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell host & microbe* **3**: 245-252
- Vlach J, Lipov J, Rumlova M, Veverka V, Lang J, Srb P, Knejzlik Z, Pichova I, Hunter E, Hrabal R, Ruml T (2008) D-retrovirus morphogenetic switch driven by the targeting signal accessibility to Tctex-1 of dynein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10565-10570
- Weldon RA, Jr., Parker WB, Sakalian M, Hunter E (1998) Type D retrovirus capsid assembly and release are active events requiring ATP. *J Virol* **72**: 3098-3106

9

HIV-1 Nef

Yannick Giernat



Inhaltsverzeichnis

Einleitung	120
Rezeptor Modulation	121
T Zell Migration	123
Apoptose	124
Effekte auf Transkription und intrazelluläre Signalweiterleitung	125
Molekulares und Struktur	125
Literatur	126

Einleitung

Unter anderen Faktoren ist Nef der Hauptpathogenitätsfaktor von HIV. Es ist für die Ausbildung von AIDS verantwortlich, indem es effizient CD4+ Zellen und auch andere „bystander“ Zellen durch Apoptose tötet (Xu *et Al.*, 1999). In transgenen Mäusen, die Nef exprimieren, kann schon Nef alleine eine AIDS ähnliche Krankheit auslösen, was als Beweis gilt, dass Nef bei der Entwicklung von humanem AIDS stark beteiligt ist (Hanna *et al.*, 1998).

Ein vollständig gespleißtes, 2-kbp langes Transkript kodiert für Nef. *nef* ist am 3' Ende vor der HIV-1 LTR lokalisiert und überlappt mit dieser (s. auch Kapitel 1). Es kodiert ein 27-35 kDa großes Protein, abhängig von der post-translationalen Modifikation (Glykolysierung, Myristylierung) (Cullen, 1991).

Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von Nef an der Ausbildung von AIDS zeigt eine australischen Kohorte, in der 8 HIV positive Personen mit einer *nef* Deletion in der Region, in der das *nef* Gen mit der LTR überlappt, über einen längeren Zeitraum untersucht wurden. Die Personen mit *nef* Deletion bekamen nach 14 bis 18 Jahren nach Infektion kein AIDS und blieben, bis auf eine Ausnahme, asymptomatisch, auch ohne antiretrovirale Therapie. Infiziert wurden sie durch einen HIV positiven Blutdonor. Diese Personen wurden bekannt als „longterm non-progressor“ (Learmont *et al.*, 1999).

Eine weitere Studie wurde mit kloniertem „simian immunodeficiency virus“ (SIV) durchgeführt, bei dem ein verfrühtes Stopcodon in der *nef* Region ein kloniert wurde. Infizierte Rhesusaffen wiesen ein hohes Maß an Revertanten auf, die in den infizierten Individuen vorherrschten (Kestler *et al.*, 1991). Dies zeigt, dass starke, selektive Kräfte auf diese *nef* Mutation wirken und Revertanten begünstigt sind. Wurde *nef* komplett aus dem SIV Genom deletiert, so wurde die *in vitro* Replikation von SIV nicht beeinträchtigt. Die *in vivo* Replikation dagegen wurde stark verändert. Niedrigere

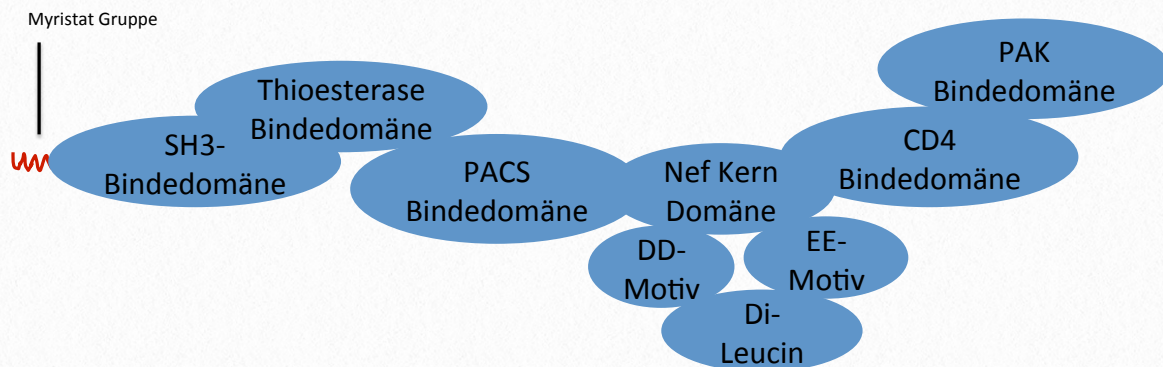


Abbildung 9.1: Schema Nef Interaktionsdomänen. Schematisch gezeigt sind wichtige Domänen von Nef, welche in der Bindung zellulärer Proteine eine Rolle spielen.

Virustiter und geringere Pathogenität (kein AIDS) waren die Folge (Kestler et al, 1991). Auch dies beweist, dass Nef eine kritische Rolle in der HIV Pathogenität innehat.

Die beschriebenen Funktionen von Nef sind mannigfaltig. Es trägt dazu bei, dass infizierte Zellen vom Immunsystem des Wirts nicht als solche erkannt werden, es ist mitverantwortlich für den Rückgang der T-Zell Zahlen, es erhöht die Infektiosität von Viruspartikeln, inhibiert die Apoptose in infizierten Zellen und induziert sie in Nachbarzellen. Nicht zuletzt inhibiert Nef die Zellmotilität von infizierten Zellen und aktiviert inaktivierte infizierte Zellen.

Rezeptor Modulation

Eine dieser Funktionen ist die Herunterregulation des CD4 Rezeptors. Nef bindet mit seiner CD4 Binderegion an den Aminosäuren 407-419 des Rezeptors, besonders wichtig hierbei sind 2 Leucine an Position 413 und 414. Nef rekrutiert das zelluläre Protein Adapterprotein AP-2, welches zur Familie der Clathrin rekrutierenden Proteine gehört, zu dem CD4 Rezeptor, durch Bindung des Di-Leucin Motivs an der μ Untereinheit von AP-2 (Abbildung 9.2) (Marsh & McMahon, 1999). Durch die Co-Lokalisation von CD4 und AP-2 wird die Endozytose durch Clathrin-coated Vesikel erleichtert (Jin et al., 2005). Endozytose findet in der Zelle auch im Normalzustand auf die gleiche Art und Weise statt, Oberflächenproteine werden ständig recycelt. Nach der Endozytose interagiert Nef mit β -COP durch das EE Motiv. β -COP ist ein zelluläres Protein, welches den endozytierten CD4 Rezeptor zum endosomalen Weg und damit zur Degradation dirigiert (Abbildung 9.2) (Schaefer et al., 2008). Dieser Prozess geschieht schon sehr früh nach der Infektion, da eine Superin-

fektion mit anderen HI-Viren ausgeschlossen werden soll (Alessia et al., 2011). Eine Superinfektion setzt die Zelle stark unter Stress und löst Apoptose aus. Außerdem wird dadurch die Immunantwort gemindert, da der CD4 Rezeptor wichtig für die Aktivierung der T-Zellen nach Stimulierung durch ein Antigen beladenes MHC-II Molekül ist. Nach Stimulierung würde der CD4 Rezeptor Signalkaskaden auslösen, die zu einer Immunantwort führen. Diese bestünde aus IFN- γ und FasL Produktion. Ebenfalls wichtig in diesem Zusammenhang ist der „Release“ von Virionen. Da sich auf einem HIV Virion Env befindet, welches an CD4 bindet, ist CD4 Modulation vonnöten, um Bindung an diesen Rezeptor durch Env (gp120 und gp41) zu verhindern und damit den „Release“ der Virionen zu erleichtern (Lundquist et al., 2004). Auf die gleiche Art und Weise wie CD4 wird auch CD28 (Leonard et al., 2011) und der CD8 β Teil des CD8 Rezeptors (hier Endozytose durch AP - 1) herunterreguliert (Stove et al., 2005).

Ein weiterer herunterregulierter Rezeptor ist der „major histocompatibility complex class“ I (MHC-I). Dieser präsentiert Antigene an zytotoxische T-Zellen. Dazu wird er im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Antigenen beladen, die im Proteasom aus ubiquitinierten Proteinen gebildet werden. Sowohl zelluläre als auch virale Proteine werden ubiquitiniert und im Proteasom degradiert und danach durch den Tap1/2 Komplex unter ATP Verbrauch in das ER befördert. Beladene MHC-I Moleküle können nun durch den Golgi Apparat zur Zelloberfläche befördert werden. Dabei ist der MHC Komplex im Vesikel und nur der zytoplasmatische Schwanz ragt heraus (Principles Of Virology, Flint, 2000). Dadurch wird der Peptid-beladene

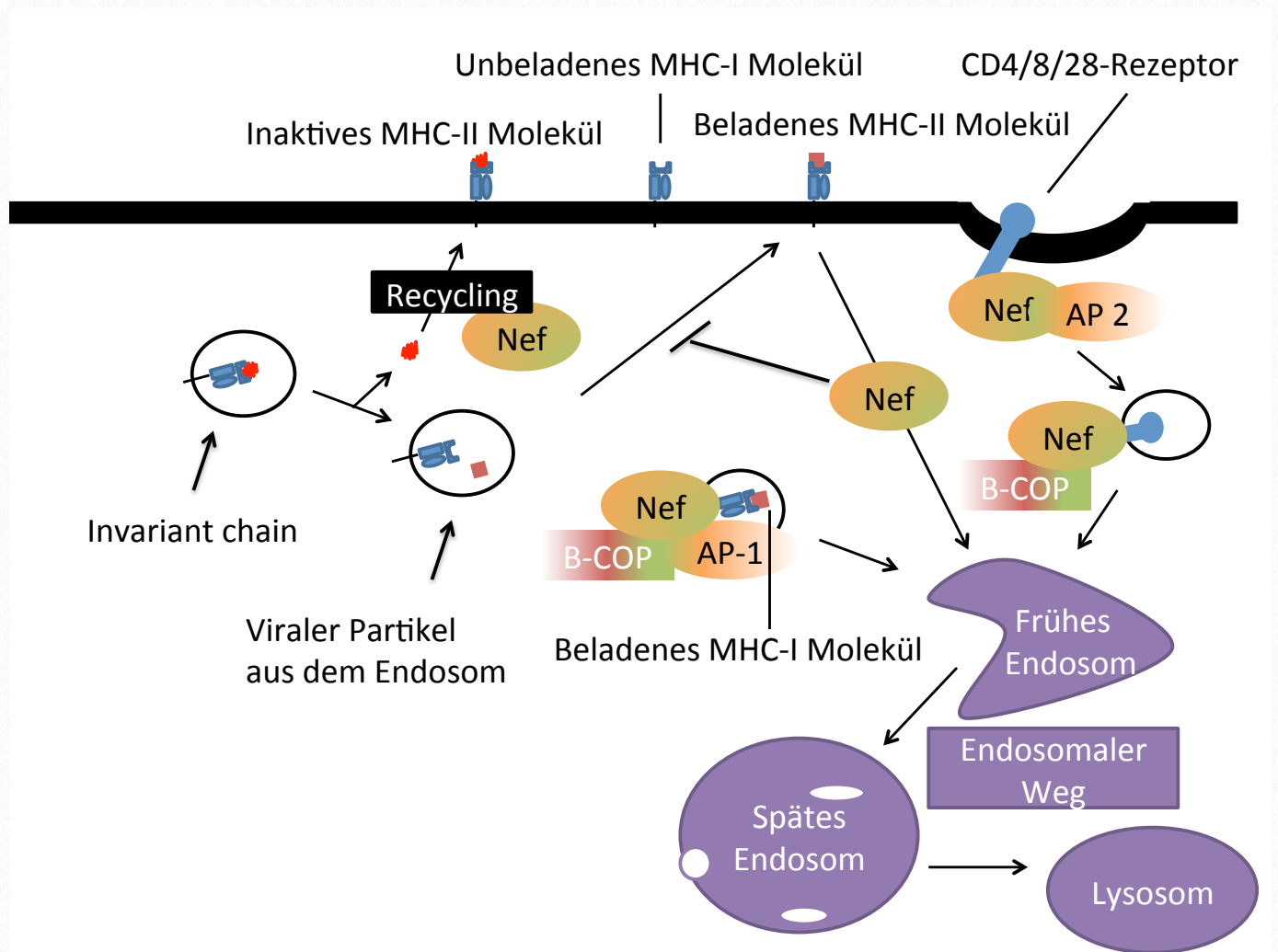


Abbildung 9.2: Schema Rezeptor Modulation durch Nef. CD4, CD8 und CD28 werden alle durch Nef-AP2 Interaktion per Clathrin „coated“ Vesikel endozytiert und durch β -COP zum Endosomalern Weg dirigiert. Beladene MHC-I Moleküle werden ebenfalls durch β -COP zum Endosomalern Weg „rerouted“, statt an die Zelloberfläche gebracht zu werden. MHC-II Moleküle werden von der Zelloberfläche endozytiert und im Endosomalern Weg lysiert und durch Verhinderung der Abspaltung der „invariant chain“ oder recycling der „invariant chain“ zur Zelloberfläche inaktiviert.

Komplex geschützt. An der Zelloberfläche binden Zytotoxische T-Zellen (CTL) mit dem T-Zell Rezeptor (TCR) an die MHC-I Moleküle. Zelleigene Proteine werden erkannt und lösen keine Reaktion aus, virale Proteine dagegen aktivieren CTLs und lösen damit die Vernichtung der aktivierten Zelle aus (Principles Of Virology, Flint, 2000). Um der Lyse und der Immunantwort zu entkommen, bindet Nef schon im sekretorischen Kompartiment mit der EEEE Domäne an den zytoplasmatischen Schwanz von MHC-I (Abbildung 9.2). Dadurch wird eine Bindestelle an

Nef frei, die AP-1 rekrutieren kann (Sing *et al.*, 2009), welches zur selben Familie wie AP-2 gehört. Interaktion mit β -COP dirigiert MHC-I, analog zu CD4, zum Lysosom, anstatt an die Zelloberfläche gebracht zu werden (Abbildung 9.2) (Leonard *et al.*, 2011). Diese Vorgehensweise von Nef resultiert in einer geminderten Immunantwort des Wirts, da die infizierten Zellen nicht als solche erkannt werden. Zusätzlich werden die bereits an der Zelloberfläche vorhandenen Moleküle verschont. Zellen ohne MHC-I Moleküle an ihrer Oberfläche werden von Natürlichen

Killerzellen (NK) als Folge der angeborenen Immunantwort abgetötet, da MHC Moleküle NK Zellen in ihrer Funktion, Zellen abzutöten, inhibieren (Alessia *et al.*, 2011).

Ebenfalls herunterreguliert ist der MHC-II Rezeptor, welcher ebenfalls Antigene an Antikörper produzierende und zytotoxische T-Zellen präsentiert. MHC-II Moleküle kommen nur auf „professional antigen presenting cells“ (APC) vor, dazu gehören zum Beispiel dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen (Principles Of Virology, Flint, 2000). In anderen Zelltypen kann MHC-II nur durch Interferon γ Stimulation produziert werden. Dieser Rezeptor wird, anders als MHC-I, mit von außen aufgenommenen Peptiden beladen. Dazu werden Viruspartikel, virale Proteine und Proteine auf der Zelloberfläche durch Phagozytose oder Endozytose aufgenommen. In den Vesikeln werden sie durch Proteasen zerstückt. Die Vesikel verschmelzen dann mit Vesikeln, die vom Golgi Apparat kommen und ein MHC-II Molekül transportieren. Dieses MHC-II Molekül wurde im ER hergestellt und mit einer invariablen Kette zu einem Komplex fusioniert. Die invariable Kette schützt das MHC-II Molekül vor einer frühzeitigen Beladung mit einem zellulären Peptid. Nach der Verpackung in ein Vesikel im Golgi Apparat wird die invariable Kette abgespalten und degradiert. Das Molekül ist jetzt bereit, beladen zu werden, was nun durch Verschmelzung mit einem Endosom Vesikel geschieht. Das beladene MHC-II Molekül wird zur Zelloberfläche gebracht und präsentiert dort sein Antigen. T-Helferzellen können mit dem TCR dieses Antigen erkennen und reagieren mit Interleukin-2 Ausschüttung, was zu einer Immunaktivierung führt (Principles Of Virology, Flint, 2000). Nef verhindert die Abspaltung der invariablen Kette oder löst Recycling der invariablen Kette zur Zelloberfläche aus (Abbildung 9.2) (Stumpner-Cuvelette *et al.*, 2001), vermutlich durch eine Interaktion mit Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) (Stumpner-Cuvelette *et al.*, 2003). Notwendig hierzu sind die aziden Reste der C-terminalen proximalen Schleife und das Di-Leucin Motiv (Schindler *et al.*, 2007).

Zusätzlich relokalisiert Nef MHC-II Moleküle von der Zelloberfläche zum Lysosom. Der Mechanismus hierzu ist unbekannt, doch er ist abhängig von Rab5 und PI3K und von Cholesterol in der Plasmamembran. Das EEEE Motiv ist da-

zu ebenso unerlässlich wie die Prolin Reste 72 und 75 des PxxP Motivs (Schindler *et al.*, 2007).

DC-SIGN, ein transmembranes Typ II Lectin, wird von Nef dagegen hochreguliert. Das geschieht durch Inhibition der Endozytose von DC-SIGN, wobei das Dileucin Motiv von Nef beteiligt ist. DC-SIGN ist ein Molekül, welches ausschließlich auf dendritischen Zellen vorkommt und bei der Adhäsion an T-Lymphozyten bei Antigen Präsentation eine wichtige Rolle spielt. Bei eben dieser Adhäsion kann das Virus durch Zell-Zell Transmission übertragen werden, Erhöhung der Dichte dieses Moleküls an der Zelloberfläche kann also die Verbreitung von HIV im Körper verbessern (Sol-Fouillon *et al.*, 2002).

T-Zell-Migration

Ebenfalls von großer Wichtigkeit für die Verbreitung von HIV im Körper ist die Fähigkeit von HIV, durch Nef, T-Zell Migration zu inhibieren und dadurch T-Zellen in Lymphknoten zu halten. Andere T-Zellen können so leicht infiziert werden und die Lymphknoten werden infolgedessen zu einem Virus Reservoir. Zusätzlich wird, durch Inhibition der Motilität von T-Lymphozyten, verhindert, dass sie in das Keimzentrum lokalisieren (Stolp *et al.*, 2009). Im Keimzentrum präsentieren T-Lymphozyten Antigene an B-Zellen, um Antikörper Produktion und den, zum Beispiel von IgM zu IgA, Antikörper Klassenswitch zu induzieren, was für die adaptive Immunantwort unerlässlich ist. Inhibition der T-Zell Motilität durch Nef erzeugt also eine verminderte Immunantwort auf HIV Infektion und eine verstärkte Transmission der Infektion.

Um die T-Zell-Migration zu verhindern, interagiert Nef mit Pak2, ein zelluläres Protein, welches in der Lage ist, Cofilin zu phosphorylieren. Es sind diverse molekulare Maßnahmen nötig für eine Zelle, um zu migrieren. Dazu gehört die Polarisierung in die gewünschte Richtung, in die sich die Zelle bewegen möchte, Aktin Modulation und dadurch ausgelöst die Ausbildung von Membrankräuselungen („membrane ruffles“). Polarisierung benötigt die Ausrichtung und Translokation des Golgi Apparates und des „mikrotubuli organisation center“ (MTOC) analog zur Fortbewegungsrichtung der Zelle. Aktin Modulation benötigt die Polymerisation und Depolymerisation von Aktin, gesteuert unter anderem von Cofilin.

Cofilin ist ein Protein, welches F-Aktin depolymerisiert und dadurch F-Aktin Fragmente als Substrat für neue Aktin Filamente bereitstellt. Phosphoryliertes Cofilin ist inaktiviert. Durch Nef's Inhibition von Cofilin kann kein F-Aktin für Aktin Polymerisation bereitgestellt werden und die Zelle kann sich nicht fortbewegen. Mutation der Aminosäure F195 zu Alanin oder Isoleucin kann diese Funktion von Nef fast vollständig abschalten. Dieses Motiv ist für die Bindung der Pak2 nötig (Stolp *et al.*, 2009).

Nef kann die Migration von Zellen auch durch einen zweiten Mechanismus inhibieren. Nef reguliert den Korezeptor von HIV, CXCR4, herunter. Dieser Rezeptor ist für die Detektion von Chemokinen zuständig, zu denen auch SDF1- α gehört. Dieses Chemokin ist eines, welches Migration in Richtung der steigenden Konzentration auslöst. Durch die Herunterregulation von CXCR4 kann die Zelle nicht mehr auf SDF1- α reagieren. Der Rezeptor wird aber nicht vollständig von der Zelloberfläche reguliert, daher können infizierte Zellen mit Nef F195A Punktmutation noch teilweise migrieren (Stolp *et al.*, 2009).

Apoptose

Eine wichtige Funktion von Nef ist es, Apoptose in den infizierten Zellen zu verhindern. Apoptose kann durch extrinsische oder intrinsische Faktoren ausgelöst werden. Zu den extrinsischen gehört zum Beispiel der rezeptoraktivierte Zelltod durch FasL. FasL ist ein membrangebundener oder löslicher Ligand für den Rezeptor FasR. Bindung von FasL an FasR induziert die Bildung des „death inducing signalling complex“ (DISC), der aus FasR, FADD und „cysteine dependent aspartate-specific proteases“ (Caspase) 8 besteht, welche aktiviert wird (Zauli *et al.*, 1999). Diese Familie der Proteasen wird als inaktives Enzym synthetisiert und erst durch spezielle Signale aktiviert. Caspasen zerschneiden andere Proteine in der Nähe eines Aspartates (TM, 2001). Caspase 8 aktiviert wiederum zusammen mit „apoptosis signaling kinase“ 1 (ASK1) Caspase 3, was zu Apoptose führt. DNA Degradierung und Membran „Blebbing“ ist die Folge. „Blebbing“ bezeichnet die Verpackung der Zellbestandteile in Vesikel (Kerr *et al.*, 1972). Nef inhibiert die Aktivierung von Caspase 3, indem es ASK1 inaktiviert. Diese Funktion von Nef verschwindet, wenn man das N-terminale Myristylierungsmotiv mutiert oder eine R106A Punktmutation einfügt, was eine Bindungsstelle für ein

Protein der p21 aktivierten Kinase (PAK) Familie ist. Man nimmt daher an, dass PAK in Inaktivierung von ASK1 involviert ist (Suman, 2005).

Intrinsisch wird Apoptose durch veränderte Homöostase ausgelöst, zum Beispiel Virusinfektion. Die verantwortlichen Proteine hierfür sind Bad, Bax, Bcl-2 und Bcl-x. Bad und Bax sind pro-apoptotische Proteine, Bcl-2 und Bcl-x anti-apoptotische. Ob Apoptose ausgelöst wird, bestimmt das Verhältnis der pro-apoptotischen zu anti-apoptotischen Proteinen. Liegen mehr pro-apoptotische Proteine als anti-apoptotische in der Zelle vor, kommt es zur Apoptose. Bad und Bax induzieren Mitochondrien Dysfunktion durch Bcl-2 und Bcl-x Bindung, welche normalerweise das Mitochondrium stabil halten, und dadurch Freilassung von Caspase aktivierenden Stoffen, wie zum Beispiel Cytochrom c, was in der Aktivierung von Caspase 3 resultiert. Nef aktiviert PI3K und Pak, was in der Phosphorylierung von Bad endet und damit Bcl-2 freisetzt. Das Verhältnis wird damit zugunsten der anti-apoptotischen Faktoren verschoben und Apoptose verhindert. Nef interagiert zusätzlich mit p53, einem Tumor Suppressor Protein. Es hat im Normalfall pro-apoptotische Eigenschaften. Nef destabilisiert dieses Protein und schafft somit einen weiteren anti-apoptotischen Effekt in der infizierten Zelle (Suman, 2005).

In Nachbarzellen kann Nef dagegen Apoptose auslösen, ein Effekt, der größtenteils dafür verantwortlich ist, dass während einer HIV Infektion T-Lymphozyten und andere Zelltypen sterben. Nef induziert, analog zum zellulären Mechanismus, durch Aktivierung der ζ -TCR Kette FasL Hochregulation. Dies resultiert im Zelltod von Nachbarzellen, welche an die infizierte Zelle binden, zum Beispiel auf der Suche nach infizierten Zellen. Dieser Effekt von Nef trägt auch zum Ausweichen vor dem Immunsystem bei. Wie die Aktivierung der ζ -TCR Kette funktioniert, ist nicht bekannt. Es wird aber vermutet, dass Nef-gebundene Signalproteine dafür verantwortlich sind (Simmons *et al.*, 2001).

Nef wirkt zudem zelltoxisch, wenn es sich im Extrazellulärraum befindet. Die Myristylierung am N-Terminus führt dazu, dass sich Nef von außen an Zellen anheften kann und dort die Membran schwächt oder gar ganz aufreißt. Nef wird von infizierten Zellen durch Exozytose sekretiert (Fackler & Baur, 2002).

Effekte auf Transkription und intrazelluläre Signalweiterleitung

Für die Transkription von integriertem HIV ist die Aktivierung der T-Lymphozyten von eminenter Bedeutung (Stevenson, 2003). Gleichzeitig dürfen die T-Lymphozyten nicht zu aktiv werden, da sie sonst durch Apoptose untergehen. Dieses fine-tuning wird von Nef vermittelt (Schindler *et al.*, 2006). Nef rekrutiert hierzu die zelluläre Kinase Lck von der Plasmamembran hin zum trans-Golgi Netzwerk (TGN) bzw. zum ‚recycling endosome‘ (RE). Durch das Fehlen der Lck an der Plasmamembran kann durch die Ausbildung der immunologische Synapse, welche Signalkaskaden und die Aktivierung der T-Lymphozyten auslöst, eben diese Signalkaskaden nicht mehr ausgelöst werden. Dadurch bleibt die Aktivierung der infizierten Zellen unter dem Schwellenwert, der Apoptose auslösen würde. Um überhaupt Aktivierung zu vermitteln, rekrutiert Nef zusätzlich aktives N-Ras zu dem bereits translokalisierten Lck an das TGN oder RE. Dadurch wird die infizierte Zelle sensitiv für ERK, welches als Antwort auf T-Zell Rezeptor Aktivierung aktiv wird. Letzten Endes wird durch ERK nach Stimulierung des TCR Interleukin-2 Ausschüttung induziert (Pan *et al.*, 2012).

ERK1/2 wird von Nef durch Rekrutierung der Lck Kinase ebenfalls mit dem Ziel aktiviert, die Unterdrückung des HIV Promotors zu negieren. Die Aktivierung von ERK1/2 und auch MAPK wird durch Phosphorylierung von PKC θ vermittelt, einer Proteinkinase, die ein Bestandteil des NAKC (‚nef associated kinase complex‘) Komplexes darstellt, welcher am N-Terminus von Nef rekrutiert wird. Ein weiterer Bestandteil dieses Komplexes ist Lck, eine zelluläre Tyrosin Kinase, die PKC θ phosphoryliert. Ist ERK1/2 am Ende der Signalkaskade aktiv wird vermutet, dass es Histon remodelling Enzyme aktiviert und LSF, einen Repressor der HIV LTR, inhibiert. Durch diese Effekte wird die HIV Transkription induziert oder zumindest nicht mehr reprimiert (Witte *et al.*, 2008).

Molekularer Aufbau und Struktur

Nef wird schon sehr früh transkribiert, sogar noch bevor die revers transkribierte DNA in die Wirtszell DNA integriert wird (Wu & Marsh, 2001). Es wird zu einem Protein translatiert, welches myristyliert wird (Abbildung 9.1). Myristylierung ist eine posttranslationelle Modifikation.

Nach dieser Modifizierung wird Nef von der Zellmaschinerie zur Plasmamembraninnenseite transportiert, genauer gesagt zu den Glykolipid angereicherten Mikrodomänen, auch ‚lipid rafts‘ genannt.

Myristylierung erfolgt an der zweiten Aminosäure von Nef, einem Glycin (G). Die erste Aminosäure Methionin (M) wird dabei abgespalten und ein Myristat über eine Amid Bindung angehängt. Dieser Prozess erfolgt durch die zelluläre N-Myristoyl Transferase, deren Erkennungssequenz MGxxxS (S=Serin) ist. Diese Sequenz ist in Nef hochkonserviert und spiegelt damit die Wichtigkeit der Myristylierung wider. Die Myristylierung ist essentiell, um ein Protein an die Innenseite der Plasmamembran zu lokalisieren. Das spiegelt die Wichtigkeit der Lokalisierung von Nef an der Plasmamembran wider, um seine Funktion zu entfalten (Harris, 1995).

Ist Nef an der Plasmamembran angekommen, so wird die Myristat Gruppe in die Membran inseriert und dient nun als Anker für Nef. Während dem Transport an die Membran sind die Domänen noch zusammengefaltet und inaktiv. Bei Entfaltung werden sie aktiv und können zelluläre Proteine binden (Anne, 2004).

Eine weitere Modifikation an Nef ist die Spaltung von Nef durch die virale Protease. Diese geschieht im Virion, in welches Nef während des ‚Assembly‘ mit eingeschleust wird. Spaltung erfolgt an der Stelle W57 (Tryptophan) zu L58 (Leucin), die den Übergang von Anker- zu Kerndomäne ausmacht (Welker *et al.*, 1996).

In Nef gibt es Motive, die in intrazelluläre Signalgebung und andere, die in intrazellulären Transport involviert sind. In Signalgebung ist die linkshändige Typ II Polyprolin Helix involviert. Sie ist 10 Aminosäurereste lang und ist in (PxxP) $_3$ Cluster unterteilt. Dieses Motiv bindet zelluläre Signalmoleküle mit einer SH3 Domäne, wie zum Beispiel Hck und Vav, und ist bei der Zellaktivierung von großer Wichtigkeit, was sich auch in der starken Konservierung dieses Motivs widerspiegelt. Ein Motiv, dass Pak Bindung vermittelt (Abbildung 9.1), ist am N-Terminus der $\alpha 4$ Helix lokalisiert (R105 und R106). Es besteht aus 2 Argininen. Zusätzlich ist noch eine weitere Region für die Pak Interaktion vonnöten. Sie befindet sich zwischen der SH3 Bindedomäne und dem gerade erwähnten RR Motiv. Sie

besteht aus 4 Aminosäuren (P69 (Prolin), L76, L112 und F121 (Phenylalanin)) und ist ebenfalls hoch konserviert (Sawai *et al.*, 1995).

Mehrere Domänen beeinflussen den Transport in der Zelle. Die erste dieser Domänen ist die CD4 Binderegion. Sie umfasst die hydrophobischen W57, G96 (Glyzin), R106 und I109 (Isoleucin) Reste. Besonders stark an der CD4 Bindung beteiligt sind die Seitenketten von W57, L58 und L110. Alle diese Reste sind hoch konserviert in Nef (Grzesiek *et al.*, 1996). Drei weitere Domänen befinden sich in der flexiblen Schleife von Nef. Im Zentrum dieser Schleife befindet sich ein Di-Leucin Motiv (Abbildung 9.1), L164 und L165). Es bindet an die μ Untereinheit von AP (Adapterprotein) Komplexen (Bresnahan *et al.*, 1998). Zueinander komplementär und gleichweit vom LL Motiv entfernt befinden sich 2 Domänen (Abbildung 9.1). Eine geht dem Di-Leucin Motiv voraus und besteht aus 2 Glutaminsäuren (E154, E155), die andere befindet sich hinter dem Di-Leucin Motiv und besteht aus 2 Aspartaten (D174 und D175). Diese Domäne bindet an die katalytische Einheit der vakuolären ATPase (V1H) und bringt Nef somit zur endozytotischen Maschinerie (Lu *et al.*, 1998). Das LL Motiv ist das konservierteste dieser 3 Motive, gefolgt von DD, bei dem das erste Aspartat gelegentlich gegen Glutamin ausgetauscht wird. Das EE Motiv ist nicht besonders konserviert und kann seine Funktion auch komplett verlieren. Es bindet an β -COP, welches benötigt wird, um Proteine zum endosomalen Weg zu dirigieren (Piguet *et al.*, 1999).

Die fünfte Domäne ist ein (EEEE)₆₂ Motiv, welches mit PACS-1 interagiert, ein Protein, das den Transport vom Endosom zum Golgi-Apparat kontrolliert (Piguet *et al.*, 2000). Auch diese Region von Nef ist sehr konserviert. Variationen sind zum einen die Insertion einer fünften Aminosäure (E oder D) oder Insertion eines Glycins. Letzteres geschieht nur selten (Geyer & Peterlin, 2001).

Als letzte Domäne, die in intrazellulärem Transport beteiligt ist, gilt die hoch konservierte (FPD)₁₂₁ Domäne. Sie befindet sich in der Schleife, die die α 4 Helix und das β 2 Faltblatt verbindet. Dieses Motiv interagiert mit der humanen Thioesterase und ist wichtig für die herunter Regulation von Oberflächenmolekülen der Wirtszelle (Liu *et al.*, 2000).

Literatur

Alessia Landi, V. I., Anouk Van Nuffel, Pieter Meuwissen, Bruno Verhasselt (2011). "One Protein to Rule them All: Modulation of Cell Surface Receptors and Molecules by HIV Nef."

Alimonti, J. B., et al. (2003). "Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS." *J Gen Virol* 84(Pt 7): 1649-1661.

Anne Pihlajaniemi, N. S. (2004). "The structure and functions of HIV-1 Nef."

Bresnahan P.A., Yonemoto, W., Ferrell, S., Williams-Herman, D., Geleziunas, R. and Greene, W.C. (1998) A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr. Biol.*, 8, 1235–1238.

Cullen, B. R. (1991). "Regulation of HIV-1 gene expression."

Fackler, O. T. and A. S. Baur (2002). "Live and let die: Nef functions beyond HIV replication." *Immunity* 16(4): 493-497.

S. J. Flint, L. W. Enquist, R. M. Krug, V. R. Racaniello, A. M. Skalka (2000) "Principles Of Virology"

Geyer M. and Peterlin, B.M. (2001) Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS Lett.*, 496, 91–95.

Matthias Geyer, O. T. F., B. Matija Peterlin (2001). "Structure-function relationships in HIV-1 Nef."

Grzesiek S., Stahl, S.J., Wingfield, P.T. and Bax, A. (1996) The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry*, 35, 10256–10261.

Hanna, Z., et al. (1998). "Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice." *Cell* 95(2): 163-175.

Harris M. (1995) The role of myristoylation in the interactions between human immuno-deficiency virus type 1 Nef and cellular proteins. *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 557–561.

Jin Y-J, Cai CY, Zhang X, Zhang H-T, Hirst JA, Burakoff SJ. HIV Nef-mediated CD4 down-regulation is Adaptor Complex 2 Dependent. *J Immunol* 2005; 175: 3157-64.

J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics *Br J Cancer*, 26 (1972), pp. 239–257.

- Kestler, H. W., 3rd, et al. (1991). "Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS." *Cell* 65(4): 651-662.
- Leonard JA, Filzen T, Carter CC, Schaefer M, Collins KL. HIV-1 Nef disrupts intracellular trafficking of MHC-I, CD4, CD8 and CD28 by distinct pathways that share common elements. *J Virol* 2011; 85: 6867-81.
- Learmont, J. C., et al. (1999). "Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort." *N Engl J Med* 340(22): 1715-1722.
- Liu L.X. et al. (2000) Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions. *J. Virol.*, 74, 5310–5319.
- Lu X., Yu, H., Liu, S.H., Brodsky, F.M. and Peterlin B.M. (1998) Interactions between HIV-1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity*, 8, 647–656.
- Lundquist CA, Zhou J, Aiken C. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 replication in primary T cells by enhancing virion-associated gp120 levels: coreceptor-dependent requirement for Nef in viral replication. *J Virol* 2004; 78: 6287-96.
- Marsh M. and McMahon, H.T. (1999) The structural era of endocytosis. *Science*, 285, 215–220.
- Pan X, Rudolph JM, Abraham L, Habermann A, Haller C, Krijnse-Locker J, Fackler OT. HIV-1 Nef compensates for disorganization of the immunological synapse by inducing trans-Golgi network-associated Lck signaling. *Blood*. 2012 Jan 19;119(3):786-97. doi: 10.1182/blood-2011-08-373209. Epub 2011 Nov 28.
- Piguet V., Gu, F., Foti, M., Demaurex, N., Gruenberg, J., Carpentier, J.L. and Trono, D. (1999) Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of β -COP in endosomes. *Cell*, 97, 63–73.
- Piguet V., Wan, L., Borel, C., Mangasarian, A., Demaurex, N., Thomas, G. and Trono, D. (2000) HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nature Cell Biol.*, 2, 167–173.
- Sawai E.T., Baur, A.S., Peterlin, B.M., Levy, J.A. and Cheng-Mayer, C. (1995) A conserved domain and membrane targeting of Nef from HIV and SIV are required for association with a cellular serine kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 270, 15307–15314.
- Schaefer MR, Wonderlich ER, Roeth JF, Leonard JA, Collins KL. HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. *PLOS pathogens* 2008; 4: e1000131.
- Schindler M, Münch J, Kutsch O, Li H, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Müller-Trutwin MC, Novembre FJ, Peeters M, Courgnaud V, Bailes E, Roques P, Sodora DL, Silvestri G, Sharp PM, Hahn BH, Kirchhoff F. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell*. 2006 Jun 16;125(6):1055-67.
- Schindler et al. Nef alleles from children with non-progressive HIV-1 infection modulate MHC-II expression more efficiently than those from rapid progressors. *AIDS* 2007; 21: 1103-7.
- Simmons A, Aluvihare V, McMichael A. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity*. 2001 Jun;14(6):763-77.
- Singh RK, Lau D, Noviello CM, Ghosh P, Guatelli JC. An MHC-I cytoplasmic domain/HIV-1 Nef fusion protein binds directly to the μ subunit of the AP-1 endosomal coat complex. *PLoS One* 2009; 4: e8364.
- Sol-Foulon N, Moris A, Nobile C, et al. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity* 2002; 16: 145-55.
- Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med*. 2003 Jul;9(7): 853-60.
- Stolp, B., et al. (2009). "HIV-1 Nef interferes with host cell motility by deregulation of Cofilin." *Cell Host Microbe* 6(2): 174-186.
- Stove V, Van de Walle I, Naessens E, et al. Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T- cell coreceptor CD8 . *J Virol* 2005; 79: 11422-33.
- Suman Ranjan Das, S. J. (2005). "Biology of the Nef protein." *Indian J Med Res*.
- Stumptner-Cuvelette P, Jouve M, Helft J, et al. Human immunodeficiency virus-1 Nef expression induces intracellular accumulation of multivesicular bodies and major histocompatibility complex class II complexes: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 4857-70.
- Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, et al. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12144-9.

TM., R. (2001). "Using death to one's advantage HIV modulation of apoptosis." *Leukemia*.

Welker R., Kottler, H., Kalbitzer, H.R. and Kräusslich, H.-G. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology*, 219, 228–236.

Witte V, Laffert B, Gintschel P, Krautkrämer E, Blume K, Fackler OT, Baur AS. Induction of HIV transcription by Nef involves Lck activation and protein kinase C theta raft recruitment leading to activation of ERK1/2 but not NF kappa B. *J Immunol*. 2008 Dec 15;181(12):8425-32.

Wu, Y. and J. W. Marsh (2001). "Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA." *Science* 293(5534): 1503-1506.

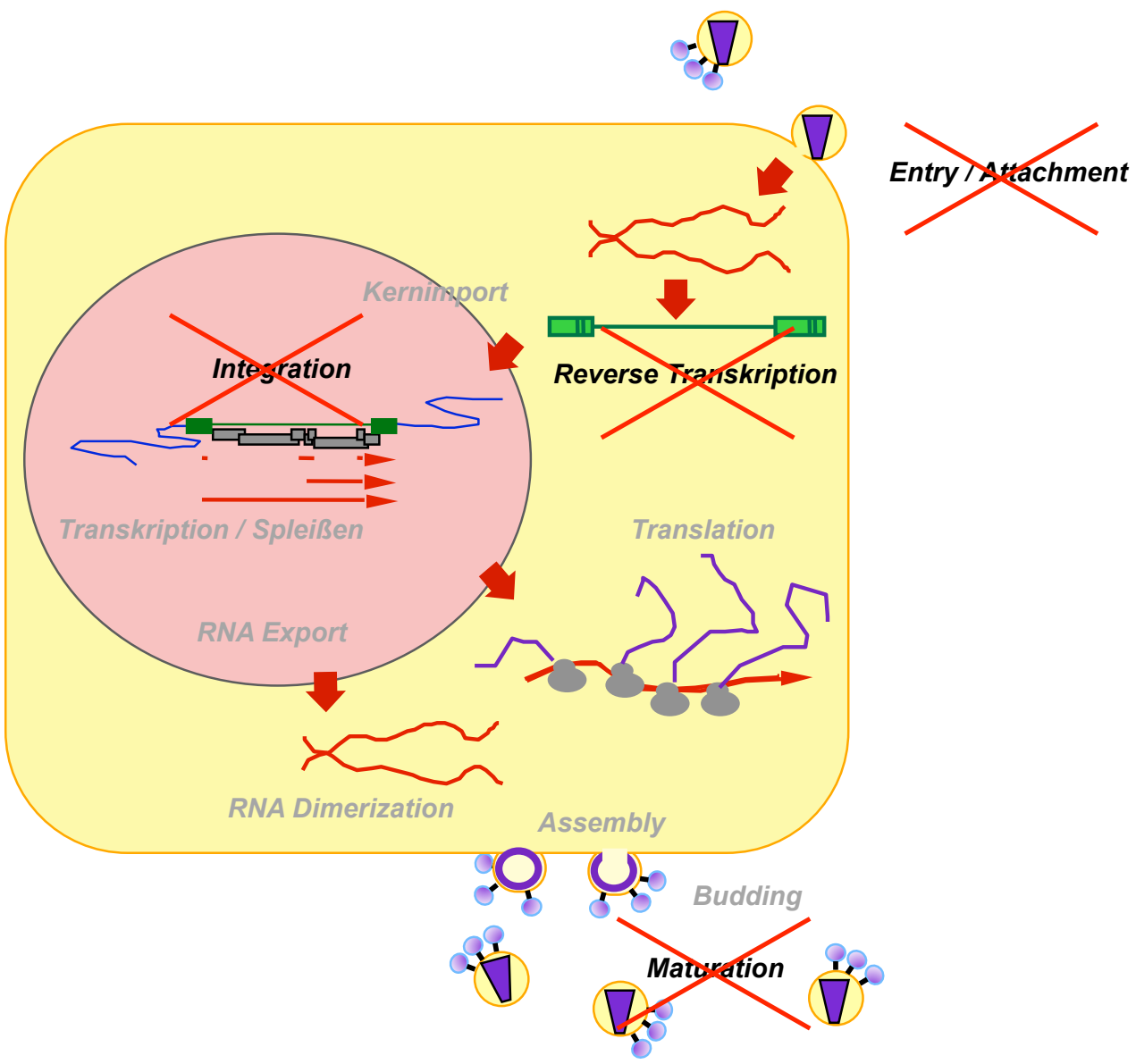
Xu, X. N., Laffert, B., Screamon, G. R., Kraft, M., Wolf, D., Kolanus, W., Mongkolsapay, J., McMichael, A. J. & Baur, A. S. (1999). Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J Exp Med* 189, 1489–1496.

Zauli, G., Gibellini, D., Secchiero, P., Dutartre, H., Olive, D., Capitani, S. & Collette, Y. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4+ T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway. *Blood* 93, 1000–1010.

9

Die antiretrovirale Therapie

Darja Kozlova



Inhaltsverzeichnis

Einleitung	131	Protease-Inhibitoren	137
Erforderliche Kriterien für eine HIV-1 Therapie	131	Wirkungsweise	137
Notwendige Untersuchungen des Patienten	131	Nebenwirkungen	138
Behandlungsindikation	131	Resistenzen	138
Symptomatische Patienten <350 CD4+ cells/mm ³	132	Entry-Inhibitoren	139
Asymptomatische Patienten	132	Attachment-Inhibitoren	139
CD4-Zellzahl zwischen 350-500/mm ³	132	Wirkungsweise	139
CD4-Zellzahl >500 cells/mm ³	132	Resistenzen	139
Viruslast	132	Fusions-Inhibitoren	139
HIV-assoziierte Nephropathie (HIVAN)	133	Wirkungsweise	139
Chronische Hepatitis B und C	133	Resistenzen	140
Weitere Kriterien	133	Korezeptor-Inhibitoren	140
Zusammenfassung	133	Wirkungsweise	140
Die HIV-Therapie	133	CCR5-Antagonisten	140
Ziel der Therapie	133	CXCR4-Antagonisten	141
Entwicklung der Therapie	134	Integrase Inhibitoren	142
Antivirale Medikamente	134	Wirkungsweise	142
Reverse Transkriptase-Inhibitoren	135	Raltegravir	143
Nukleosidische/nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren	135	Elvitegravir	143
Wirkungsweise	135	Die Wahl der richtigen Medikamente	144
Nebenwirkungen	135	Erste ART bei Erwachsenen	144
Resistenzen	136	Zweite ART bei Erwachsenen	144
Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptaseinhibitoren (NNRTIs)	136	Fragen	144
Wirkungsweise	136	Antworten	144
Nebenwirkungen	137	Klausurfragen	145
Resistenzen	137	Literatur	145

Einleitung

Mit einer antiretroviralen Therapie (ART) wird die Vermehrung des HI-Virus und damit der Auslöser der beschriebenen immunpathogenetischen Veränderungen unterdrückt. Mit der Verabreichung antiretroviraler Medikamente wird neben der Verlängerung der Lebenszeit, eine Verbesserung der Lebensqualität und eine Minderung der Infektiösität erreicht, die durch Senkung der Viruslast erzielt wird. Die einhergehende Erholung des Immunsystems verhindert zusätzlich die Infektion mit opportunistischen Erregern. Eine ART führt somit zur Reduzierung HIV-assoziiierter Morbidität und Mortalität (Palella et al., 1998) und der perinatalen und Verhaltens-assoziiierter Übertragung von HIV auf den Menschen (Mofenson et al., 1999; Cohen et al., 2011). Eine vollständige Beseitigung (Eradikation) der Viren und somit eine Heilung ist bislang jedoch nicht möglich.

Erforderliche Kriterien für eine HIV-Therapie

Notwendige Untersuchungen des Patienten

Bevor mit einer ART begonnen werden sollte, muss neben einer vollständigen medizinischen Untersuchung, der physische Zustand und eine laborchemische Auswertung des Patienten vorliegen (Adults, 1998). Nach diesen Gesichtspunkten richtet sich die anschließende Behandlung. Dabei sind folgende Tests entscheidend (HIV-Infektion Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie, 2012):

- HIV Antikörpertest
- Anzahl der CD4 T-Zellen
- Plasma HIV RNA-Kopien (Viruslast: Genomkopien/ml Plasma)
- vollständiges Blutbild; chemisches Profil, Transaminasemenge, Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN) und Kreatinin, Urinuntersuchung und Serologietest für Hepatitis A, B und C
- Blutzucker und Serumlipide
- Genotypischer Resistenztest

Neben dieser medizinischen Bewertung müssen weitere Aspekte in Augenschein genommen werden, die ebenfalls für die Behandlung von Relevanz sind. Neben den gesundheitlichen Faktoren ist zu beachten, ob der Patient ein erhöhtes Ansteckungsrisiko durch sein Verhalten/Tätigkeit darstellt, dabei spielt ein möglicher Konsum von Drogen eine Rolle, ebenso das soziale Umfeld, psychisches Leiden oder weitere Begleiterkrankungen (die gehäuft im hohen Alter auftreten können). Aber auch ökonomische Faktoren, wie der Besitz einer Krankenversicherung und finanzielle Rücklagen, spielen neben der Reduzierung der HIV Transmission eine wichtige Rolle in der Beurteilung einer angemessenen Therapie.

Behandlungsindikation

Der Zeitpunkt des Therapiebeginns ist ein Thema, welches noch immer Diskussion bedarf (HIV-Infektion Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie, 2012). Dabei wird heutzutage der Therapiebeginn abhängig vom Fortschritt der Infektion gemacht. Doch schätzt man in Deutschland, dass die Hälfte aller HIV-Infektionen zu spät erkannt werden. Und zwar zu einem Zeitpunkt, bei dem eine ART schon hätte begonnen werden sollen (Marcus-U, 2012). Etwa ein Drittel aller Patienten weisen einen weit fortgeschrittenen Immundefekt mit einer CD4-Zellzahl unter 200/ μ L auf. Eine Früherkennung der HIV-Infektion ist nicht nur für den Betroffenen von Bedeutung, sondern auch aus der Sicht der Gesamtbevölkerung wichtig, da durch das Wissen um die Infektion und der entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen die Übertragung von HIV auf Mitmenschen deutlich reduziert werden kann. Am 30. Juni 2013 veröffentlichte die WHO neue Richtlinien zur Therapiebehandlung. Dabei empfiehlt die Organisation den Start einer ART bereits ab einer CD4 Menge von 500 pro Mikroliter Blut und nicht wie bisher bei spätestens 350. Man hoffe damit bis 2025 drei Millionen Todesfälle infolge von HIV und Aids, sowie 3,5 Millionen HIV-Übertragungen verhindern zu können. Begründet werden diese neuen Leitlinien mit der Erkenntnis aus der HPTN12 Studie. In der es heißt, dass ein früher Therapiestart die Übertragung von HIV durch sexu-

ellen Kontakt senkt und HIV-positive seltener die Begleitinfektion Tuberkulose ausprägen als Positive, die eine Therapie mit einer CD4 Zellzahl von 250/mm³ beginnen (WHO, 2013).

Zu Beginn der Therapie muss zum einen das Progressionsrisiko, die Langzeittoxizitäten und die Gefahr der Resistenzentwicklung gegeneinander abgewogen werden. In den 90er Jahre, war eine baldige Therapie relativ unabhängig von Klinik, Viruslast und Helferzellzahlen propagiert worden. Heutzutage steht die amerikanische, britische und deutsch-österreichische Empfehlung einem frühen Therapiebeginn wesentlich zurückhaltender gegenüber. Bezüglich der Therapiedikation wird zunächst zwischen Patienten mit HIV-assoziierten Symptomen, einem akuten retroviralen Syndrom und asymptomatischen Patienten unterschieden (HIV-Infektion Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie, 2012). Diese Patientenklassen werden weitergehend anhand der Viruslast und der T-Helferzellzahl differenziert. Unabhängig von sämtlichen Leitlinien ist der Zeitpunkt des Therapiebeginns jedoch eine im Einzelfall zu treffende Entscheidung, bei der weitere Parameter wie z.B. das Alter des Patienten beachtet werden sollten (Vogel und Rockstroh, 2007). So wird bei älteren Patienten aufgrund der geringeren Regenerationsfähigkeit des Immunsystems, ein eher früher Therapiebeginn empfohlen (Grabar et al., 2004).

Symptomatische Patienten <350 CD4+ cells/mm³

Patienten mit symptomatischer HIV-1-Infektion stellt eine Indikation zur Behandlung dar. Liegt die CD4 Zellzahl <350 Zellen/mm³, so sollte eine ART Therapie erfolgen. Diese Patienten sind neben einem hohen Risiko der Erkrankung mit opportunistischen Erregern, einer erhöhten nicht-AIDS Morbidität und dem Tod ausgesetzt, als Patienten die eine höhere CD4 Zellzahl aufweisen (Baker et al, 2008; Zolopa et al, 2009).

Asymptomatische Patienten

Die Therapie erfolgt hier in Absprache mit dem spezialisiertem Arzt und dem Patienten, dabei ist der Therapiebeginn abhängig vom Stadium der Infektion. Dabei sollte individuell eine Risikoabschätzung erfolgen. Diese orien-

tiert sich vorrangig an der absoluten CD4+-Zellzahl und unter Berücksichtigung weiterer Kriterien.

CD4-Zellzahl zwischen 350-500/mm³

Gremien wie die DHSS (United States Centers for Disease Control and Prevention) und DÖ (Deutsch-Österreichische Leitlinien) raten bei dieser CD4 Zellzahl zu einer frühen ART. Ergebnisse unterschiedlicher Kohortenstudien ergab, dass eine frühe eingeleitete ART bei einer CD4 Zellzahl zwischen 350-500/mm³, AIDS- und nicht-AIDS assoziierte Morbiditäten und Mortalitäten in Patienten zu reduzieren vermag (Sterne JA, 2009; Cole, 2011). Da eine unbehandelte HIV Infektion oder unkontrollierte Virämie, mit der Entwicklung von einigen nicht-AIDS bestimmenden Erkrankungen einhergeht. Dazu zählen kardiovaskuläre Erkrankungen, Nieren-, und Lebererkrankungen, sowie neurologische Komplikationen und Hautkrebs, die mit einem frühen Beginn gesenkt werden können. Desweiteren kann eine frühe ART die Transmission von HIV senken. Somit ist ein weiteres Ziel der ART die Übertragung des Virus auf andere Individuen zu reduzieren gegeben (Cohen, 2011).

CD4-Zellzahl >500 cells/mm³

Unterschiedliche Studien zur ART bei einer CD4 Zellzahl über 500/mm³, zeigten widersprüchliche Erkenntnisse. Während eine Studie von einer deutlich gesenkten Sterberate derjenigen sprach, die mit einer frühen ART begonnen hatten, konnten zwei weitere Studien keinen signifikanten Unterschied in der AIDS-Progression oder dem Tod zeigen (Sterne JA , 2009; Cole, 2011; Kitahata, 2009). Mit dieser Erkenntnis, muss die Behandlung mit der potentiellen Gefahr der Lang- und Kurzzeit Medikation in asymptomatischen Patienten mit den möglichen auftretenden Komplikationen aufgewogen werden. Desweiteren sind die Kosten der Behandlungen nicht außer Acht zu lassen.

Viruslast

Eine hohe Plasmavirämie (>100.000 RNA-Kopien/mL) kann ein Zusatzkriterium für die Indikationsstellung

darstellen. Doch dient die Messung der Viruslast primär der Therapiekontrolle.

Eine unbehandelte HIV-Infektion mit hoher Plasma-virämie geht mit einem rascheren Absinken der CD4+-Zellzahl und einem erhöhten Progressionsrisiko einher (Rodríguez *et al*, 2006). Diese ist aber allein nicht bestimmend für das Ausmaß des CD4+-Zellverlustes.

HIV-assoziierte Nephropathie (HIVAN)

HIVAN ist die am häufigsten auftretende chronische Nierenerkrankung HIV-infizierter Patienten. Diese Erkrankung tritt überwiegend in Patienten afrikanischer Herkunft auf und ist unabhängig von der CD4 Zellzahl (Wyatt *et al*, 2008). Somit sollte hier mit einer ART, unabhängig von der CD4 Zellzahl, begonnen werden.

Chronische Hepatitis B und C

Eine chronische Hepatitis-C-Virus-Koinfektion und eine chronische Hepatitis B-Koinfektion stellt wegen der leberassoziierten Mortalität ein wichtiges Zusatzkriterium für den Beginn einer ART dar, dabei werden Medikamente verabreicht die sich gegen beide Erkrankungen richten.

Weitere Kriterien

Ein höheres Lebensalter und ein rasches Absinken der CD4+ T-Zellzahl sind mit einer höheren Progressionsrate assoziiert. Mit dem Alter erhöht sich das Risiko für rasche CD4+ T-Zellverluste bei erhöhter Virusreplikation, sollte ein früherer Therapiebeginn in Erwägung gezogen werden. Auch eine Schwangerschaft stellt eine Therapieindikation im Rahmen der maternofetalen Transmissionsprophylaxe dar.

Zusammenfassung

Wie bereits beschrieben herrscht Uneinigkeit bezüglich des Therapiebeginns, während einige Experten jedem HIV-Patienten eine Therapie empfehlen würden, bleiben Andere konservativer und empfehlen nur in Sonderfällen einen Therapiebeginn oberhalb einer CD4-Zellzahl von

350/ μ L. Im Falle einer akuten HIV-Infektion zeigen bisherige Studien widersprüchliche Ergebnisse, so dass vorerst die Behandlung solcher Fälle im Rahmen kontrollierter Studien erfolgen sollte. Im Laufe der Zeit hat sich eine zunehmende Individualisierung der Leitlinien durchgesetzt, das heißt in Abhängigkeit von Begleiterkrankungen oder besonderen Risiken für eine Krankheitsprogression der HIV-Infektion wird für besonders gefährdete Patientengruppen zu einem früheren Therapiebeginn geraten (zum Beispiel Hepatitiskoinfektion, höheres Lebensalter usw.).

Eine schnelle Therapie sollte eingeleitet werden:

- Schwangerschaft
- symptomatische Patienten
- akute opportunistische Infektionen
- niedrige CD4 Zellzahl (<350 Zellen/ mm^3)
- HIVAN
- HIV/HBV Koinfektion
- schnelle rückläufige CD4 Zellzahl (>100 Zellen/ mm^3)
- hohe Viruslast ($>100,000$ Kopien/mL)

Die HIV-Therapie

Ziel der Therapie

Die Behandlung von HIV stellt eine Herausforderungen dar, da sich das Virus rasch vermehrt (die tägliche Virusproduktion wird auf mindestens 10^9 - 10^{10} Viren geschätzt). Während der Vermehrung treten häufige Mutationen auf, die auf etwa 1 neue Mutation pro Virusreplikationszyklus geschätzt werden. Um eine langfristig wirksame HIV-Behandlung gewährleisten zu können und eine Vermehrung, insbesondere eine Resistenzentwicklung gegenüber den eingesetzten antiretroviralen Medikamenten unterbinden zu können, ist eine dauerhafte maximale Suppression der HI-Viruslast nötig. Es hat sich gezeigt, dass eine dauerhafte Senkung der HIV-RNA unterhalb der Nachweisgrenze (20 bis 50 Kopien/mL) ausreichend ist (HIV-Infektion Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie, 2012). Steigt die Viruslast jedoch auf > 400

HIV-RNA Kopien/mL, ist die Wahrscheinlichkeit eine therapie-resistente Virusmutanten zu selektieren erhöht. Besonders wichtig bei der Wahl der Medikamente ist für den Patienten die Therapieadhärenz.

Entwicklung der Therapie

Die ersten Erfolge einer HIV-Behandlung konnten Ende der 80er Jahre mit einer antiretroviralen Monotherapie (ART) erzielt werden. Dabei wurden sogenannte NRTIs (nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren) auf den Markt gebracht. Der anfängliche Erfolg erwies sich jedoch als unzureichend wirkungsvoll.

Die Ergebnisse zweier Studien, der europäisch-australischen DELTA und der amerikanischen ACTG 175 ließen im September 1995 erneut Hoffnung zu. Die Verabreichung zweier NRTIs konnte zu einem signifikanten Unterschied bezüglich der klinischen Progression und Tod beitragen (Delta Coordinating Committee, 1996). Mit dem Anstieg der Infektionsrate in den 90er Jahren, konnte die Zahl der Todesfälle um das 4-fache mit dem Einsatz dieser antiviralen Behandlung gesenkt werden.

Der Durchbruch erwies sich jedoch mit der Entwicklung einer völlig neuen Wirkstoffklasse, mit den Proteaseinhibitoren (PIs). Die Verabreichung beider Wirkstoffklassen in Kombination machte die Behandlung von HIV noch effizienter, die sogleich die Bezeichnung einer „Hochaktive Antiretrovirale Therapie“ (HAART) erhielt. Im Jahr 1996 wurden auf der 3. Retroviruskonferenz (CROI) in Washington von Bill Cameron die ersten Daten der ABT-247-Studie veröffentlicht. Diese zeigten, dass die Hinzugabe von PIs (Ritonavir) die Häufigkeit von HIV-1 bedingten Todesfällen und AIDS von 38 auf 22% zu senken vermag (Cameron, 1998). Durch HAART konnte die niedrigste Viruslast im Blut erzielt werden, wasebenfalls eine verminderte Resistenzentwicklung einschließt. Patienten die eine Behandlung mit HAART erhielten, wiesen über einige Jahre hinweg eine HIV RNA Kopienzahlen auf, die unter 50/ml Plasma lag (die niedrigste messbare Zahl) (Flint, 3. Edition, Band 2). Doch zeigten nähere Blutbild,- und Gewebeuntersuchungen, dass eine virale Replikation durch HAART nicht vollständig zum Erliegen

kommt. HIV bleibt auch nach langfristiger Suppression in latent infizierten Zellen vorhanden. Mit dem nicht-nukleosidalen Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI) Nevirapin war 1996 eine dritte Wirkstoffklasse eingeführt worden. Auch Nelfinavir, ein neuer PI, war hinzugekommen. Schon im Jahr 1997 wurden starke Nebenwirkungen der PIs wie z.B. Diabetes mellitus und Lipodystrophie beobachtet. Bei der Lipodystrophie handelt es sich um eine Fettspeicherstörung, die auch zu einem Anstieg der Triglyceridwerte führt (Brinkman *et al.*, 1999).

Vielversprechend ist heutzutage die Behandlung des dritten Inhibitors gegen das dritte virale Enzym, die Integrase (Flint, 3. Edition, Band 2) und die Inhibition der Co-Rezeptorbindung. Mit der Einführung dieser Klassen fand eine vielversprechende Entwicklungen statt.

Antivirale Medikamente

HIV-1 ist wie alle Viren bei der Replikation auf lebende Zellen angewiesen. Bevor die Viren sich replizieren können, müssen sie zunächst in die Zellen eindringen. Das HI-Virus benötigt zum Eindringen den CD4-Rezeptor, der vor allem auf weißen Blutkörperchen (Lymphozyten), den Helferzellen (CD4-Zellen, T-Helferzellen) sitzt (siehe Kapitel 2). Sobald das Virus in eine Zelle eingedrungen ist, kommt es zur reversen Transkription und zur Integration (siehe Kapitel 3). Die Vermehrung von HIV ist ein komplizierter Vorgang, bei dem viele Schritte nacheinander ablaufen. Die HIV-Medikamente können hier an verschiedenen Stellen der Virusvermehrung eingreifen, die zusammenfassend in der folgenden Abbildung dargestellt sind (Abbildung 10.1). Heutzutage kann auf 20 wirksame Medikamente zur Behandlung von HIV aus sechs verschiedenen Medikamentengruppen zurück gegriffen werden. Dabei kann die Übersetzung der Erbinformation durch eine Hemmung der Reversen Trankskriptase erfolgen, die durch Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) und Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs) bewerkstelligt wird. Die Inhibition der Protease und Integrase kann mit Hilfe der Proteaseinhibitoren (PI) und

Integraseinhibitoren erfolgen. Sowie zwei Vertreter der Entry-Inhibitoren die eine Fusionierung oder das Andocken an die Zielzellen unterbinden, sind bereits auf dem Markt erhältlich (Adults, 1998). Im weiteren Abschnitt wird näher auf die Medikamente, deren Wirkungsweise, die Nebenwirkungen, Resistenzen und die empfohlenen Kombinationsmöglichkeiten dieser eingegangen.

Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (RTIs) lassen sich bezüglich ihres Wirkmechanismus in zwei große Gruppen einteilen: in nukleosidische/nukleotidische (NRTI/NtRTI) und in nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI). Ihr Ansatzpunkt ist das HIV-Enzym die Reverse Transkriptase. Als alternative Substrate oder „falsche Bausteine“ konkurrieren sie mit physiologischen Nucleosiden. Der Einbau der Nucleosidanaloga induziert dabei den Abbruch der DNA-Kette, was zur Hemmung der viralen Replikation führen soll.

Nucleosidische/nucleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren

Wirkungsweise

Nucleosidische/nucleotidische Reverse Transkriptase (RT)-Inhibitoren sind Nucleosidanaloga („Nukes“) der natürlicherweise in der Zelle vorkommenden DNA-Bausteine, von denen sie sich durch geringe Modifikationen am Zuckermolekül (Ribose) unterscheiden. NRTIs konkurrieren kompetitiv als „falsche Bausteine“ mit den physiologischen Nucleotiden der Zelle um das Enzym der RT. Sie sind demnach kompetitive RT Inhibitoren. Wird ein NRTI durch das Enzym in eine DNA Kette eingebaut, kommt es zur Termination bei der Umschreibung der viralen RNA in die cDNA, da keine beständigen Phosphodiesterbrücken zur Doppelstrang-stabilisierung aufgebaut werden können (Abbildung 10.1).

Die Nucleosidanaloga werden unverändert von der Zelle aufgenommen und erst durch eine intrazelluläre Phosphorylierung wirksam, bei der ihnen schrittweise drei Phospha-

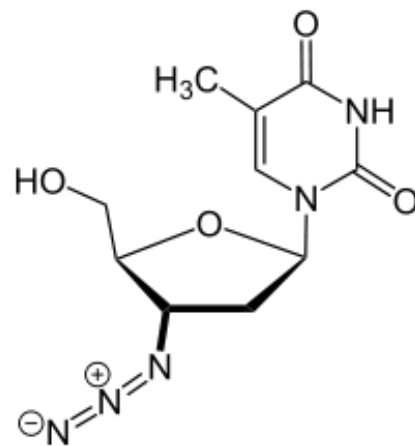


Abbildung 10.1: Azidothymidin-Struktur. Kettenterminatoren besitzen keine freie Hydroxyl-Gruppe an der 3' Position. Quelle: Wikipedia

te angehängt werden (Mitsuya *et al.*, 1985; Furman *et al.*, 1986). Somit sind als ein Triphosphat-derivat (Nucleotide) aktiv.

Folgend werden hier zu den natürlich vorkommenden Nucleosiden die NRTIs Analoga aufgeführt:

- Cytidinanaloga: 3TC (Lamivudin, Epivir®); DDC (Zalcitabin, HIVID®); FTC (Emtricitabin, Emtriva®)
- Thymidinanaloga: D4T (Stavudin, Zerit®); AZT (Zidovudin, Retrovir®)
- Inosinanalogen: DDI (Didanosin, Videx®)
- Guanosinanalogen: Abacavir (ABC, Ziagen®)
- Nucleotidanalogen: TDF (Teno-fovir, Viread®)

Nebenwirkungen

Nucleosidanaloga waren die ersten Medikamente in der HIV-Therapie. 1987 wurde AZT als erstes zugelassen. Die Einnahme erfolgt heutzutage einmal täglich. Die Verträglichkeit ist recht gut, die anfänglichen Beschwerden der ersten Wochen äußern sich in Müdigkeit, Kopfschmerzen und gastrointestinale Probleme, die von leichtem Völlegefühl bis hin zu Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoen variieren können. Die Einnahme über einen langen Zeitraum

hinweg kann ein breites Spektrum an Nebenwirkungen verursachen. Dies kann von Myelotoxizität, Laktatazidosen, Polyneuropathie bis hin zu Pankreatitiden führen. Zunächst dachte man, dass die Lipodystrophie ausschließlich auf PIs zurückzuführen ist, doch wurde in den letzten Jahren klar, dass viele metabolische Störungen und insbesondere die Lipoatrophie auch durch Nukleosidanaloga entstehen (Galli *et al.*, 2002). Sie sind wahrscheinlich über eine mitochondriale Toxizität zu erklären, die 1999 erstmals beschrieben wurde (Brinkman *et al.*, 1999). Zwischen den einzelnen Substanzen gibt es jedoch deutliche Unterschiede in der mitochondrialen Toxizität.

Nukleosidanaloga werden überwiegend renal ausgeschieden und interagieren nicht mit Medikamenten, die durch hepatische Enzymsysteme metabolisiert werden. Bei nierensuffizienten Patienten müssen im Gegensatz zu den PIs und NNRTIs die Dosen angepasst werden.

Resistenzen

Die ersten Resistenzen gegen NRTIs traten im Jahr 1989 mit der Einführung von Zidovudin auf. In diesem Zusammenhang konnten Mutationen in den Aminosäurebereichen D67N, K70R, T215F/Y und K219Q ausgemacht werden (Larder *et al.*, 1989). Bis heute kamen 17 weitere Aminosäurepositionen hinzu, die mit einer NRTI-Resistenz einhergehen (Johnson *et al.*, 2009). Alle 21 Position sind in den RT Subdomänen lokalisiert, die die ankommenden Nukleotide umfasst und somit eine NRTI Eingliederung in die naszierende Kette verhindert. Die häufigsten Mutationen treten in M181I/V, K65R und Q151M auf und konnte in direktem Zusammenhang mit der Behandlung der Medikamente Lamivudine, Emtricitabine und Aabacavir gebracht werden (Shirasaka *et al.*, 1995b). Die Mutation Q151M tritt als alternativer Resistenzweg bei ca. 4% der AZT behandelten Patienten auf. Mutationen, die diese Stellen betreffen, zeigen eine reduzierte Binfähigkeit von Lamivudin und Emtricitabine-5'-Triphosphat (Wilson, 1996). Diese ist auf die Ausbildung eines steirischen Hindernisses zurück zu führen, welches eine Bindung an die RT verhindert (Sarafianos *et al.*, 1999).

Die weitere häufigste NRTI-Resistenz tritt mit Mutationen der Thymidinanaloga auf (TAM). Dies betrifft die Mutationen M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F und K219Q/E (Shiro *et al.*, 2011). Bei diesen Resistenzen handelt es sich um ATP-abhängige Pyrophosphorolyse Reaktionen. Dabei kommt es zur Entfernung der NRTIs am 3' Ende der naszierenden DNA und somit zur Aufhebung der vorzeitigen Kettentermination (Arion *et al.* 1998; Boyer *et al.*, 2001; Meyer, 1999). Die TAM Mutation, T215Y/F, scheint eine „Schlüsselmutation“ zu sein, die einen direkten Kontakt zu ATP herstellt, dem Pyrophosphat-Donor für die erforderliche Reaktion (Boyer *et al.*, 2001).

TAM-enthaltene Reverse Transkriptasen können somit, mit der Elongation der viralen DNA fortfahren, auch wenn NRTIs vorhanden sind. Dieser Mechanismus wird als Exzision bezeichnet.

Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptaseinhibitoren (NNRTIs)

Wirkungsweise

Bei dieser Substanzklasse kommt es nicht zur Konkurrenz mit den zellulären Nukleotiden um die Substratbindungsstelle der RT. Die RT wird hier nicht-kompetitiv durch die Bindung an einen hydrophoben Bereich nahe des „katalytischen Zentrums“ gehemmt (Kohlstaedt, 1992). Die hydrophobe Bindungsstelle besteht aus hydrophoben Resten (Y181, Y188, F227, W229 und Y232) und anhydrophilen Resten wie K101, K103, S105, D192, und E224 der p66 Untereinheit und E138 der p51 Untereinheit (Sluis-Cremer *et al.*, 2004).

Nach Bindung der NNRTIs kommt es zu einer Konformationsänderung der RT, wodurch diese inaktiviert wird (Spence *et al.*, 1995). Ebenfalls anders als NRTIs, müssen diese nicht in der Zelle aktiviert werden. Bisher kamen vier NNRTIs auf den Markt: Etravirin, Nevirapin, Delavirdin und Efavirenz (Arts & Hazuda, 2012).

Die Behandlung mit NNRTI konnte als effektiv belegt werden, wenn sie mit Nukleosidanaloga kombiniert wer-

den. Die geringe Pillenzahl und die insgesamt gute Verträglichkeit haben dazu beigetragen, dass Nevirapin und Efavirenz ein wichtiger Bestandteil von HAART geworden sind. Jedoch ist die Gefahr von Resistenzen bei diesem Medikament sehr hoch, die zudem sehr schnell auftreten können.

Nebenwirkungen

Auch die NNRTIs werden meist gut vertragen, mögliche Nebenwirkungen könne sein Fieber, Erhöhung der Blutfette und Schlafstörungen.

Ihr Abbau erfolgt überwiegend nach hepatischer Metabolisierung durch verschiedene Enzyme des Cytochrom P450-Systems, wo sie hier als Inhibitoren wirken können (Adults, 1998).

Resistenzen

Die Entwicklung von Resistenzen impliziert fast immer eine Resistenz gegen die gesamte Klasse. Wird bei nicht vollständiger Virussuppression nicht unmittelbar gehandelt, so besteht neben der Gefahr von Kreuzresistenzen gegen die Substanzklasse auch das Auftreten von Punktmutationen. Diese treten überwiegend bei L100, K101, K103, E138, V179, Y181, und Y188 der NNRTI-Bindetasche der RT auf (Tantillo et al. 1994). Jedoch am häufigsten an der Position K103N und Y181C (Demeter, 2000; Richman, 1994).

Die hohe Prävalenz für die Mutation K103N, kann mit 4 Beobachtungen begründet werden. Erstens, wird zu Beginn der Therapie überwiegend mit den Medikamenten Nevirapine und Efavirenz behandelt. Zweitens, konnte mit der Behandlung dieser Medikamente eine stark auftretende Resistenz beobachtet werden (Bachelier *et al.*, 2001). Drittens K103N zeigt keine Inkompatibilität mit weiteren RT-Inhibitor-resistenz Mutationen und viertens, K103N hat nur einen geringen Einfluss auf die virale Replikation (Wang *et al.*, 2010). Die K103N enthaltenen RTs weisen eine verminderte RNase H Aktivität auf (Wang *et al.*, 2010). In einer Strukturanalyse der K103N mutierten RT in Verbindung mit Efavirenz, konnten Veränderungen

der NNRTI-Bindetasche gezeigt werden, diese äußerten sich in einer Umstrukturierung zwischen Efavirenz und der Bindetasche (Ren *et al.*, 2000).

Eine weitere Strukturanalyse der K103N Mutante ohne Liganden, konnte in der NNRTI-Bindetasche ein neues Netzwerk aus Wasserstoffbindungen gezeigt werden. Mit dieser Beobachtung kam man zu der Annahme dass diese Struktur eine stabilisierenden Einfluss besitzen könnte und somit zur Abnahme NNRTI-bindung der RT beiträgt (Hsiou *et al.*, 1996).

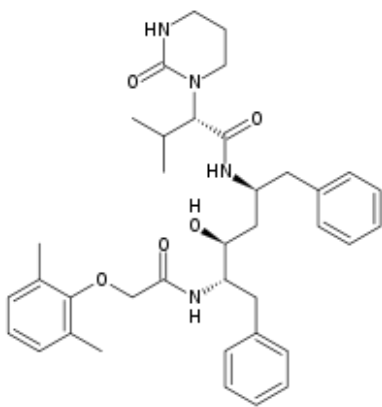
Protease-Inhibitoren

Wirkungsweise

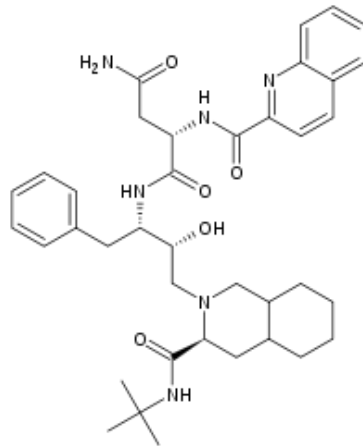
Der Einsatz der Proteaseinhibitoren in Kombination mit NRTIs führte Mitte der 90er zu einer Senkung der AIDS-Zahlen besonders in den Industrienationen. Ihre klinische Wirksamkeit konnte in mehreren Studien bewiesen werden (Cameron *et al.*, 1998; Hammer *et al.*, 1997).

Die virale Protease ist für die Aufspaltung des Gag-Pol-Vorläuferprotein in seine aktiven Untereinheiten verantwortlich. Während der viralen Maturation entstehen aus dem Gag-Vorläufer-Protein verschiedene virale Proteine, aus dem Pol-Vorläuferprotein die Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase (siehe Kapitel 1 und 3). HIV-Proteaseinhibitoren (PI) hemmen die Spaltung des Gag- und des Gag-Pol-Präkursorproteins durch die viruseigene Protease. Hierdurch wird die Virusreifung beeinträchtigt.

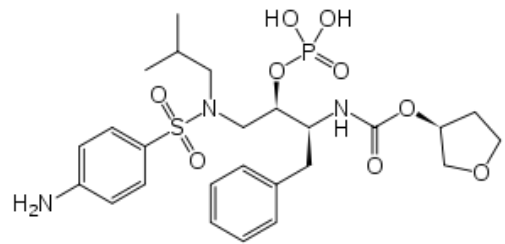
Heute befindet sich eine ganze Reihe von Protease-inhibitoren auf dem Markt, unter ihnen Amprenavir (APV, Agenerase), Atazanavir (ATZ, Reyataz), Darunavir (TMC114, Prezista), Fosamprenavir (Lexiva), Indinavir (IDV, Crixivan), Lopinavir (LPV), Nelfinavir (NFV, Viracept), Ritonavir (RTV, Norvir), Saquinavir (SQV, Fortovase/Invirase), und Tipranavir (TPV, Aptivus) (Abbildung 10.2). Darunavir ist ein neuer, gut verträglicher PI mit beachtlicher Aktivität gegen PI-resistente Viren. Es wird mit Ritonavir geboostert und gut vertragen.



Lopinavir



Saquinavir



Fosamprenavir

Abbildung 10.2: Proteaseinhibitor-Strukturen. Proteaseinhibitoren enthalten alle eine Peptidbindung und wirken als kompetitive Inhibitoren. Quelle: Wikipedia.

Nebenwirkungen

Neben stärkeren und anhaltenden gastrointestinalen Beschwerden finden sich in der Langzeittherapie, Erhöhungen der Blutfettwerte und das Problem der Lipodystrophie (Nolan, 2003b). Auch die Proteaseinhibitoren werden ebenso wie die NNRTIs durch das hepatische Cytochrom P450-System metabolisiert. Als Substrat und Inhibitor des CYP3A4-Systems sind sie Ursache weitreichender Medikamenteninteraktionen (Adults, 1998).

Daher wird z.B. Ritonavir als Inhibitor des Typs 3A4 des Cytochrom-P450-Systems fast ausschließlich als Minimaldosierung („baby dose“) als „booster“ bzw. pharmakologischer „enhancer“ in Kombination mit anderen PIs eingesetzt.

Resistenzen

Auf Grund der aktiven Rolle im HIV-1 Zyklus und der relative kleinen Größe von 11 kDa, ging man zunächst von einer geringen Resistenzentwicklung aus. Mittlerweile konnte in der Prothese-kodierenden Region 36 bekannte Punktmutationen, die mit Resistenzen assoziiert sind, ausgemacht werden (Shafer *et al.*, 2006).

Diese können gehäuft in der Nähe des aktiven Zentrums auftreten, an der Stelle der Substrat/Inhibitor Bindestelle.

Hierbei kommt es zur Änderung der Proteasestruktur die eine reduzierte Bindungsaffinität zum Inhibitor aufweist. Dies kann mit einer Abnahme der Van der Waals Kräfte zwischen Inhibitor und Bindeseite begründet werden (Saskova *et al.*, 2009).

Neue PIs wie Darunavir finden dann Verwendung, wenn bereits Resistenzen aufgetreten sind. Dabei wurde der Inhibitor so hergestellt, dass dennoch eine Bindung an das resistente Enzym möglich ist (Ghosh *et al.* 2007).

Um diesen viralen Fitnessverlust zu kompensieren, konnten Viren bestimmt werden die bis zu 20 Punktmutationen in der kodierenden Region der viralen Protease besitzen (Saskova *et al.*, 2009). Diese können sich außerhalb oder innerhalb der Protease befinden. Diese Mutationen haben nur einen geringfügigen Effekt auf die Inhibitorbindung, viel mehr befinden sich diese in der Nähe der Gag proteolytischen Schnittstelle, die zu einer verbesserten Prozessierung von Gag führen können (Fun *et al.*, 2011).

Dieser weitere Mutationsort kann somit die virale Fitness positiv beeinflussen und dadurch zur Medikamenten-resistenz beitragen (Shafer *et al.*, 2001). Da alle PIs eine ähnliche Struktur aufweisen, treten bei dieser Medikamentenklasse besonders häufig Kreuzresistenzen auf.

Entry-Inhibitoren

Die wichtigsten Schritte des viralen Eintritts in die Zelle, stellt die die Bindung des CD4 T-Zellrezeptors (Attachment) mit dem viralen Protein gp120 dar, sowie die Bindung der Korezeptoren CCR5 und/oder CXCR4, die ebenfalls über das virale Protein gp120 ermöglicht wird. Die Fusion der viralen und zellulären Membran erfolgt über das Protein gp41 (siehe Kapitel 2). Diese Ereignisse können durch sogenannte Entry-Inhibitoren gehemmt werden, auf die im weiteren Abschnitt näher eingegangen wird.

Attachment-Inhibitoren

Wirkungsweise

Die Entdeckung des CD4 Hauptrezeptor im Jahre 1984 war ein Durchbruch in der HIV Biologie. Der erste Schritt des HIV Eintritts in die Zelle geschieht durch Bindung des HIV Proteins gp120 an den CD4 Rezeptor der Zielzelloberfläche. Das virale Protein gp120 besteht aus einer inneren und äußeren Domäne, die über ein sogenanntes Bridging-Sheet verbunden ist, eine Formation aus 2 doppelsträngigen β -Faltblättern. In dieser Domäne befinden sich fünf konservierte (C1-C5) und fünf variable Regionen (V1-V5). Eine der wichtigen Regionen des viralen Eintritts stellt V1/V2, V3 und C4 dar. Die drei-dimensionale Darstellung der gp120 Struktur zeigte, dass intramolekulare Disulfid-Bindungen eingegangen werden. Diese Interaktion mit dem CD4 Rezeptor ist entscheidend für die Entwicklung von potentiellen Inhibitoren (Leonard *et al.*, 1990).

Es gibt viele Moleküle die eine Inhibierung zwischen gp120 und CD4 bewerkstelligen können, unterscheiden lassen sich diese in ihrer Struktur und ihrem Mechanismus:

PRO-542 (CD4-IgG2) ist ein tetravalentes CD4-IgG2 Fusionsprotein, das in ersten klinischen Studien zu einer signifikanten Hemmung der Virusreplikation führte. Dieser umfasst 5 Kopien der CD4 Virusbindedomäne und ahmt den CD4 Rezeptor nach (Allaway *et al.*, 1995).

Dieser Bindungsinhibitor ist derzeit am besten entwickelt und Studien konnten zudem belegen, dass dieser eine gute Verträglichkeit zeigt. Ein Nachteil ist die Einnahme die nicht oral erfolgen kann und subkutan injiziert werden muss.

TNX-355 ist ein nicht-immunosuppressiver monoklonaler Antikörper der gegen CD4 Rezeptoren gerichtet ist. Es kompetiert mit HIV gp120 um die CD4-Bindung.

Die ersten Studien zeigten, dass bereits die Verabreichung einer Einzeldosis zur Reduzierung der HIV-1 Virenlast im Plasma führt und zugleich zu einer Steigerung der CD4 Zellzahl (Kuritzkes *et al.*, 2004).

BMS-806 bindet mit hoher Affinität an gp120 und unterbindet damit die Konformationsänderung, die durch die Bindung an den CD4 Rezeptor ausgelöst wird (Guo *et al.*, 2003). Dieses Molekül ist gut verträglich und weist keine signifikante Cytotoxizität auf.

Resistenzen

Mehrere Untersuchungen in *in vitro* Modellen wurden zum Mechanismus dieser Inhibitoren durchgeführt. Bislang konnten die Resistenzentstehung nicht ganz geklärt werden. Da diese Moleküle auf unterschiedliche Art und Weisen agieren wird ihr Entwicklung dahingehend auch unterschiedlich eingeschätzt.

In vitro Studien konnten jedoch für BMS-806 und verwandte Verbindungen wie BMS-155 zeigen, dass in gp120 die Aminosäuren Phe-43 an der Entstehung von Resistenzen verantwortlich sein könnten. Weitere Mutationen in gp120 die die Reste Trp-112, Thr-257, Ser-375, Phe-382, Met-426, Met-434 und Met-475 betreffen, resultieren ebenfalls in einer Resistenz gegen BMS-806 und BMS-155 Inhibitoren (Guo *et al.*, 2003).

Fusions-Inhibitoren

Wirkungsweise

Das gp41 besitzt neben einer extrazellulären Ectodomäne (N-Terminus), eine Transmembrandomäne (TM) und eine intrazelluläre Endodomäne (C-Terminus) (Gallaher und

Ball *et al.*, 1989; Kilby und Eron 2003). Bei der Fusion von gp41 mit einem Fusionsprotein, kommt es zu einer strukturellen Reorganisation. Dies wird durch eine Interaktion der hepta wiederholenden Regionen HR1 und HR2 eingeleitet. Dabei wird ein Hairpin-Konformation gebildet, die aus sechs-Helix-Bündeln besteht (Wilensky und Doms, 2011).

Der Peptidfusionsinhibitor wurde nach dieser Erkenntnis gestaltet, da die zwei homologen Domänen HR1 und HR2 eine Interaktion miteinander eingehen. Die Mimikry einer dieser Domänen durch ein heterologes Protein bindet diese und führt zur Störung der intramolekularen Interaktion des viralen Proteins. Die Bildung eines solchen Helikaleninhibitors brachte das Medikament **T-20/Enfuvirtide** hervor, welches eine homologe Sequenz zu HR2 aufweist. Dieses Medikament muss aufgrund seiner Molekülgröße subkutan injiziert werden. Nebenwirkungen äußern sich mit lokalen Hautreaktionen.

Resistenzen

In vitro Studien konnten zeigen, dass Resistenzen gegen Enfuvirtide auf Mutationen in der HR1 Region des gp41 zurück zu führen sind. Das betrifft die Aminosäuren in der Position 36-38 (Rimsky *et al.*, 1998). Weitere Untersuchungen dahingehend konnten noch weitere Mutationen aufdecken, die in den Positionen zwischen 36 bis 45 auftreten können. Diese Mutationen führen zur direkten Abnahme der Haftung und zu einer abnehmenden Ausbildung der Bindeenergie zum Peptid (Eggink *et al.*, 2011).

Korezeptor-Inhibitoren

Wirkungsweise

Zusätzlich zur Bindung des Zellrezeptors CD4, erfordert HIV zum Eintritt in die Zelle die Bindung der Chemokin-Korezeptoren. Die Hauptkorezeptoren sind CCR5 und CXCR4. Diese Interaktion wird durch die Konformationsänderung, die durch Bildung eines Komplexes aus CD4 und gp120 entsteht, bewerkstelligt (siehe Kapitel 2).

CCR5 und CXCR4 gehören zur Familie der sieben Transmembran G Proteinen-gekoppelten Rezeptoren. Diese besitzen eine alpha-Helix Struktur die aus vier Transmembrandomänen, drei extrazellulären Loops und einer N-terminalen Domäne besteht.

Der CD4-gp120 Komplex bindet an die Korezeptoren via seiner V3 Region. Weitere Regionen wie V1/V2 und C4 können ebenfalls daran beteiligt sein (Cormier & Dragic, 2002). So findet generell eine Interaktion der Korezeptoren CCR5 und/oder CXCR4 mit der Aminosäuresequenz der V3 Region statt. Die Involvierung weiterer Regionen ermöglicht die Differenzierung der HIV Viren in die Klassen R5, X4 und R5/X4.

Somit findet bei der gp120-Korezeptorbindung der R5 Klasse-Viren eine zusätzliche Interaktion der N-terminale Domäne und des zweiten extrazellulären Loops (ECL2) statt (Cormier & Dragic, 2002). Diese Stämme nutzen bevorzugt den Korezeptor CCR5. Die X4 Stämme hingegen weisen lediglich eine Interaktion mit ECL2 auf und haben eine Präferenz für CXCR4 Rezeptoren. Somit stellt diese Erkenntnis einen wichtigen Schritt in der Entwicklung von Inhibitoren dar.

Die CCR5 und CXCR4 Antagonisten lassen sich in drei Gruppen einteilen die größenabhängig sind. Große Moleküle wie PRO-140, oder Moleküle einer mittleren Größe wie Met-RANTES und AOP-RANTES, sind modifizierte natürliche CCR5 Liganden, die eine Bindung an CCR5 schwer zugänglich machen. Kleinere Molekülinhibitoren hingegen richten sich direkt gegen die Korezeptoren CCR5 (TAK-779, SCH-C, SCH-D, UK-427857 und GW-873140) oder CXCR4 (AMD3100 and KRH-1636).

CCR5-Antagonisten

Bei den derzeit häufigsten CCR5 Antagonisten, handelt es sich um kleine Moleküle die eine Interaktion zwischen gp120 und dem Korezeptor verhindern, indem sie direkt an diesen binden. Diese Moleküle ahmen Chemokine nach, die natürlicherweise an die Rezeptoren binden würden.

TAK-779 war das erste nicht-Peptid Molekül welches die *in vitro* Replikation der R5 Stämme, durch Eingreifen in die Interaktionsbildung der CCR5 Korezeptoren, blockierte (Baba *et al.*, 1999). Die Bindeseite ist in einer CCR5 transmembranen Vertiefung lokalisiert, die durch die 1, 2, 3, und 7 Korezeptor Transmembranregion gebunden wird (Dragic *et al.*, 2000). TAK-779 besitzt eine geringe orale Bioverfügbarkeit und die klinische Entwicklung wurde dahingehend unterbrochen, da die Injektionsstellen zu lokalen Reaktionen führten, die die Handhabung erschwerten. Fortlaufende Studien brachten TAK-220 und TAK-652 hervor, welches im Gegensatz zu TAK-779 eine noch bessere orale Bioverfügbarkeit besitzt und ebenso, sehr effektiv die Replikation der Viren zu hemmen vermag (Baba *et al.* 2005).

PRO-140 ist ein monoklonaler Antikörper der sich gegen den CCR5 Korezeptor richtet und diesen in der Bindung an HIV gp120 hindert. Dieser Inhibitor vermag neben HIV-1 Subtyp B auch die Subtypen A, C, E und F am Eintritt in die Zellen zu stören.

Die Entwicklung der **SCH-C** Medikamente (SCH-351,125) galt zunächst als sicher und gut tolerierbar. Jedoch erwies sich im Laufe der Zeit, dass eine hohe Dosierungen klinische Folgen besitzt, die sich in Störungen des Herzrhythmus äußerten (Adults, 1998).

Aufgrund dieser Erkenntnis, wurde das Analog **Vicriviroc** (SCH-417, 690 oder SCH-D) und **AD101** (SCH-350,581) entwickelt. Diese CCR5 Antagonisten werden ebenfalls oral eingenommen und reagieren direkt mit der CCR5 Transmembran-Vertiefung indem sie die HIV gp120 Bindung inhibieren (Tsamis *et al.*, 2003).

Das Medikament **Maraviroc** (UK-427, 857) ist ebenfalls ein oral verabreichter CCR5 Antagonist. Die ersten Studien zum Phase 2 Medikament sind sehr vielversprechend. Überwiegend alle Patienten zeigten eine beachtliche Reduzierung der Plasmavirämie (1.42 log). Dabei konnte die Suppression auch noch nach zehn Jahr, nach Beginn der Behandlung, erfolgreich beibehalten werden (Fätkenheuer *et al.*, 2005). Auch Maraviroc bindet an die transmembra-

ne Korezeptor-Vertiefung mit Hilfe der 2, 3, 6 und 7 Helix. Diese Helixbindung unterscheidet sich zur Bindestelle des Medikaments TAK-779.

Zuletzt zeigte das Medikament **Aplaviroc** (GW-873140) signifikante *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse in der antiviralen Therapie. Die Plasmavirämie ließ sich auch hier signifikant um 2 logs senken (Maeda *et al.*, 2004). Im Jahr 2005, musste allerdings die klinische Entwicklung eingestellt werden, da unerwartete Fälle der Hepatotoxizität auftraten. Dieses Medikament ist ebenfalls ein CCR5 Antagonist und richtet sich gegen die Klasse der R5 Viren. Dabei interagiert das Medikament direkt mit ECL2 und nicht mit der transmembranen Vertiefung (Maeda *et al.*, 2004).

Aufgrund der unterschiedlichen Mechanismen der Korezeptorinhibierung, wird für diese Klasse der Medikamente unterschiedliche Resistenzenentwicklung erwartet. Somit erhofft man sich auch eine Senkung von Kreuzresistenzen mit anderen CCR5 Antagonisten.

CXCR4-Antagonisten

Zunächst konnte eine hohe antivirale Aktivität für **AMD3100** (Mozobil™) in *in vitro* und *in vivo* Studien für X4 Stämme ausgemacht werden (Donzella *et al.* 1998).

Die Entwicklung weiterer Derivate, wie **AMD070** zeigten im Gegensatz zum Derivat 3100 eine noch bessere orale Bioverfügbarkeit und Verträglichkeit (Schols *et al.* 2003), da mit der Behandlung des Phase 1 Medikaments unerwünschte Nebenwirkungen wie kardiologische Abnormalitäten auftraten. Seit März 2005 finden klinische Versuche zu AMD070 statt.

KRH-1636 ist ein weiterer CXCR4 Antagonist, der eine ähnliche antivirale Aktivität aufweist wie AMD3100. Studien in Ratten zeigen, dass dieses Medikament duodenal aufgenommen wird und somit über eine gute Bioverfügbarkeit verfügt (Ichiyama *et al.*, 2003).

Bei dem Derivat **KRH-2731** handelt es sich um ein CXCR4 Antagonisten, der an die zweite und dritte extra-

zelluläre Schleife (ECL2 und ECL3) bindet. In vitro Studien belegten eine hohe antivirale Aktivität gegen X4 und R5/X4 HIV-Stämme die bis zu 10-fach höher lagen als bei AMD070 (Murakami *et al.* 2004).

Die Bindeseite der CXCR4 Antagonisten ist in ECL2 der CXCR4 Korezeptoren lokalisiert (Labrosse *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 1997). Aufgrund der hohen negative Ladung die CXCR4 aufweist, geht man bei der Interaktion der HIV gp120 V3 Schleife von elektrostatischen Anziehungskräften aus (Brelot *et al.*, 1997).

Resistenzen

Zwei mögliche Wege der Resistenzenstehungen für CCR5 und CXCR4 Antagonisten sind möglich: Der erste könnte einen Wechsel der Korezeptor Nutzung darstellen. Der zweite resultiert in Änderungen der genomischen Region in HIV, die es erlaubt trotz Anwesenheit eines Inhibitors eine Interaktion zwischen gp120 und dem Korezeptor einzugehen.

Die bisherigen Daten zeigen soweit, dass die meisten CCR5 Antagonist-resistenten Stämme eher den Korezeptor CCR5 nutzen, als zum CXCR4 auszuweichen.

Desweiteren konnten vielseitige Mutationen in unterschiedlichen Regionen von HIV gp120 ausgemacht werden (V3, C2, V2, C4), die für einen resistenten Phänotyp sprechen (Trkola *et al.*, 2002; Kuhmann *et al.*, 2004).

Die bisher bestimmten Resistenzen unterscheiden sich jedoch und sind abhängig von der Bindung die sie eingehen, somit erhofft man sich eine Limitierung von Kreuzresistenzen. Dennoch sind weitere klinische Studien erforderlich um diese Annahme zu überprüfen.

Resistenzen gegen CXCR4 Antagonisten sind bislang noch weniger dokumentiert, als gegen CCR5 Antagonisten. Es konnten Mutationen in der V3 Domäne ausgemacht werden die zu einer Abnahme der Bindung führen können. Aber auch Mutationen die die V1, V2 und V4 Region betreffen, konnten mit Resistenzen dieses Korezeptors assoziiert werden. Dabei kann es wie im Falle von

V4 zu Deletionen von fünf Aminosäuren (Kodon 364-367 (FNSTW) kommen (Schols *et al.*, 1998) die sich in einer Minderung der Affinität äußern.

Somit konnten die bisherigen Untersuchung die Annahme, dass Resistenzen möglicherweise über den Wechsel des Rezeptors statt finden, nicht bestätigt werden. Diese Theorie der Resistenzenstehung ist wichtig für Patienten die mit beiden Spezies, R5 und X4 infiziert sind. Hier besteht die Gefahr, dass eine vorläufige Suppression nicht beibehalten werden kann und es im Laufe der Therapie zu einer Inflammation des ursprünglich suprimierten Stammes kommt.

Integrase Inhibitoren

Wirkungsweise

Die Integrase ist neben der Reversen Transkriptase und der Protease eines der drei Schlüsselenzyme im HIV-1-Replikationszyklus. Dieses aus 288 Aminosäuren bestehende und vom HIV-pol-Gen kodierte Enzym ist bei der Integration viraler DNA in die Wirts-DNA im Zellkern involviert und für die Vermehrung von HIV essentiell. Die Entwicklung der Integrasehemmer ist die wohl mit den meisten Hoffnungen besetzte neue Substanzgruppe in der HIV-Therapie. Die Integration viraler DNA verläuft über mindestens vier Schritte, die durch verschiedene Integrasehemmer inhibiert werden können. Bisher sind allerdings lediglich zwei Medikamente die den Schritt des Strangtransfers inhibieren (STIs) auf dem Markt. Die Schritte sind wie folgt:

1. Bindung des Integrase-Enzyms im Zytoplasma an die virale DNA: Hierdurch entsteht ein sogenannter Präintegrationskomplex. Integrase-DNA-Bindungs-hemmer könnten diesen Schritt unterbinden.
2. 3'-Prozessierung: In einem ersten katalytischen Schritt schneidet die Integrase ein Dinukleotid an beiden Enden der viralen DNA heraus und produziert nun neue 3'-Hydroxylenden innerhalb des Präintegrationskomplexes. Dieser Schritt könnte durch sogenannte Prozessierungsinhibitoren gehemmt werden.

3. Strangtransfer: Nach dem der veränderte Präinte-grationskomplex durch Kernporen in den Zellkern eingeschleust wurde, bindet die Integrase an die Wirts-DNA. Dabei vermittelt sie das Andocken und die irreversible Bindung der Hydroxylenden der viralen DNA an die Phosphodiesterbrücken der Wirts-DNA. Zurzeit sind zwei vielversprechende Strangtransferinhibitoren (STIs) auf dem Markt, **Raltegravir** und **Elvitegravir**, die diesen Schritt des Strangtransfers inhibieren. Dabei bindet der Inhibitor spezifisch zwischen die Integrase und die virale DNA und interagiert zugleich mit zwei essentiellen Magnesium Metallionen, die zur Aktivierung der Integrase also Kofaktoren beitragen (Grobler et al. 2002).

4. Lückenreparatur: Die Kombination aus viraler DNA und Wirtszell-DNA ist ein intermediäres Produkt mit Lücken, welche durch wirtszelleigene Reparaturenzyme repariert werden. Hierfür ist möglicherweise keine Integrase mehr notwendig → die Reparatur kann aber durch zum Beispiel Methylxanthine gehemmt werden.

Raltegravir

Raltegravir (Isentress®, MK-0518) ist ein Integrasehemmer (Strangtransfer-Inhibitor, STI) mit einer breiten Wirkung gegen R5- und X4-trope Viren. Auch die Suppression von HIV-2 kann durch dieses Medikament bewerkstelligt werden. Studien zeigten eine Senkung der Viruslast nach 10 Tagen um 1,7-2,2 Logstufen (Markowitz 2006). Bestätigt wurde das Ergebnis in weiteren Studien bei denen 79% der behandelten Patienten bereits nach 16 wöchiger Therapie eine Viruslast unter 400 Kopien/ml erreichten. Selbst unter jenen Patienten, in denen nach dem genotypischen Resistenztest zu Beginn keine Substanz mehr benutzt werden konnte, lag die Rate bei 57%.

Die Daten zur Resistenzentwicklung sind noch limitiert, es scheint aber drei genetische Resistenzpfade zu geben, die über die Mutation N155 oder über Q148K/R/H und Y143 laufen und im katalytischen Kern der Integrase lokalisiert sind, in unmittelbarer Nähe zu den Aminosäurenresten die wohlmöglich den Kofaktor, das essentielle Magnesium koordiniert (Hare *et al*, 2011;

Fransen et al. 2009). Diese primären Mutationen konnten mit weiteren, sekundär auftretenden Mutationen in Zusammenhang gebracht werden, die da wären: N155(H), E92Q, V151L, T97A, G163R, und L74M. Auch signifikante Kreuzresistenzen konnten für diese Mutationen beobachtet werden. (Goethals et al. 2008; Marinello et al. 2008). Wie sich diese Mutationen äußern wird derzeit noch untersucht und hierzu struktur-, und biochemische Analysen durchgeführt. Dennoch konnte eine erhebliche Minderung der Enzymaktivität bestimmt werden, die möglicherweise auf die Mutation zurückzuführen ist.

Elvitegravir

Elvitegravir (GS 9137, früher JTK-303) ist ein Integrasehemmer der wie Raltegravir den Strangtransfer hemmt. Einzeldosen waren oral bioverfügbar, sicher und gut verträglich (Kawaguchi 2006), und in vitro besteht ein Synergismus mit anderen Medikamenten (Matsuzaki 2006). In einer Studie an 40 HIV-Patienten (therapienaiv und vorbehandelt) sank die Viruslast nach 10 Tagen Monotherapie um etwa 2 Logstufen (DeJesus 2006). Wesentlicher Nachteil scheint zu sein, dass Elvitegravir mit 100 mg Ritonavir geboostert werden muss (Kearney 2006). Die Verträglichkeit war wie bei Raltegravir sehr gut.

Auch bei Elvitegravir lassen sich durch in-vitro Passagen Resistenzmutationen selektionieren, und es scheint ebenfalls mindestens zwei Resistenzpfade über T66I oder E92Q zu geben (Jones 2007). Vor allem E92Q scheint für eine hohe Resistenz (36-fach) zu sorgen. Teilweise überlappen sich die Resistenzen von Elvitegravir und Raltegravir. Klassenübergreifende Kreuzresistenzen könnten also möglich sein (Kodama 2006, Jones 2007).

Die Wahl der richtigen Medikamente

Bei HAART werden jeweils zwei Nukleosidanaloga bzw. Nukleotidanaloga („Nuke-Backbone“) verwendet. Dies hat überwiegend einen historischen Hintergrund, da NRTIs die ersten HIV-Medikamente waren. Mit der Entwicklung von PIs war die Gabe zweier NRTIs als Standard etabliert. Frühere NRTI-Backbones enthielten mit AZT oder D4T meist ein Thymidin- Analogon (TA). Da diese Toxizitätsprobleme und Resistenzen bei Therapieversagen verursachen, wird inzwischen meist auf TA-freie Backbones ausgewichen. Die wichtigsten sind TDF+3TC, TDF+FTC. Diese Kombinationen haben desweiteren den Vorteil, dass diese nur einmal täglich eingenommen werden müssen und TDF+FTC sogar in einer Tablette erhältlich ist.

Erste ART bei Erwachsenen

Wie erwähnt sollte die erste ART aus zwei NRTIs und einem NNRTI bestehen. Hierfür werden laut WHO 2013 folgende Präparate vorgeschlagen

TDF + 3TC (or FTC) + EFV werden als eine fixe-Dose in Kombination verabreicht.

Wenn diese Kombination aufgrund Unverträglichkeiten nicht verabreicht werden kann oder nicht zu erwerben ist, können folgenden Kombinationen alternativ eingenommen werden:

- AZT + 3TC + EFV
- AZT + 3TC + NVP
- TDF + 3TC (or FTC) + NVP

Zweite ART bei Erwachsenen

Die zweite ART für Erwachsene sollte ebenfalls aus zwei NRTIs, einem Ritonavir-booster Proteaseinhibitor (PI) bestehen.

- Nach einer fehlgeschlagenen ersten Therapie mit TDF +3TC (oder FTC), sollte AZT + 3TC als NRTI-Backbone verwendet werden.

- Nach AZT oder d4T + 3TC, sollte TDF + 3TC (oder FTC) als NRTI- Backbone verwendet werden.
- Die Kombination aus ATV/r und LPV/r sind die bevorzugten Proteaseinhibitoren.

Fragen

1. Wo finden bevorzugt Resistentmutationen gegen Korezeptorantagonisten beim HIV-1 statt? Nenne ein Beispiel.
2. Welche zwei Escapemechanismen hat HIV-1 in Bezug auf T2635 entwickelt?
3. Woraus wird VIRIP gebildet? Welches Enzym ist daran beteiligt?
4. Welche Probleme bringt VIRIP in Bezug auf therapeutische Anwendung mit sich?
5. Warum hat Dolutegravir eine hohe genetische Barriere?
6. Was ist der Unterschied zwischen Raltegravir und MK-0536 (denke an die Y143R-Mutation)?
7. Welche andere Funktion der Integrase spielt bei der Entwicklung neuer IN-Inhibitoren seit neuestem ebenfalls eine Rolle und warum?
8. Wodurch zeichnen sich die Bindungen von Darunavir und Tipranavir in der Prothese aus?
9. Warum müssen beide geboostet verabreicht werden?
10. Welchen sichtbaren Unterschied erkennt man, wenn man die Maturation ohne und mit Bevirimat vergleicht? Warum ist das so?

Antworten

1. Die Mutationen befinden sich vor allem in dem V3-Loop des ps120. Beispiel: Die Mutation Ile323Val. Die dadurch entstandene ungeordnetere Sekundärstruktur des Loops und die Tatsache, dass Valin weniger Platz als Isoleucin benötigt, verursachen eine Reduktion im Intercafebereich und der Loop wird "variabler", sodass er trotz gebundenem Maraviroc an CCR5 binden kann.

2. 1: Die Doppelmutante Q66R im HR1 und N113D im HR2. Die elektrostatische Interaktion zwischen D113 und R66 begünstigt die Konfiguration HR1-HR2 (läuft schneller ab, als die Einlagerung von T2635).
- 2: Fall sich T2635 doch einlagern sollte, wird es in eine ungünstige Drehung gezwungen, verursacht durch die Interaktion zwischen R66 des HR1 und E4 des T2635.
3. VIRIP wird aus α 1-Antitrypsin durch Matrixmetalloproteasen freigespalten. (α 1-Antitrypsin selbst wirkt sehr schwach antiretroviral und dient im Organismus vor allem dem Schutz der Lunge vor proteolytischer Schädigung.)
4. Es ist teuer in der Herstellung, muss in hohen Dosen und intravenös verabreicht werden.
5. Dolutegravir kann seine Position und Form den Veränderungen in der IN anpassen, die durch Mutationen entstehen.
6. RAL formt eine π - π -Wechselwirkung mit Y143, die aufgrund der Mutation zu R verloren geht und die Inhibitorbindung geschwächt wird. MK-0536 geht keine π - π -Wechselwirkung mit Y143 ein, sondern eine hydrophobe Interaktion. R143 ermöglicht MK-0536 eine weitere hydrophobe Interaktion, sodass es stärker in der Integrale bindet kann.
7. Non enzymatic Funktion. Dabei handelt es sich um eine unterstützende Rolle bei der RT-Aktivität. Es wurde gezeigt, dass Aminosäurenveränderungen der konservierten HHCC in der NTD mit starker Reduktion der DNA-Synthese einhergingen. Man vermutet, dass die tetramere Form, die durch NTD-CCD-Interaktion stabilisiert wird, eine kritische Rolle bei der Reverse Transkription spielt.
8. Darunavir kann 5, Tipranavir 7 Wasserstoffbrücken mit den Seitenketten der AS im aktiven Zentrum der Protease ausbilden. Zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen stabilisieren das Molekül in seinem gebundenen Zustand.
9. Darunavir und Tipranavir werden hauptsächlich über CYP3A abgebaut. Ritonavir wirkt als CYP3A Inhibitor, sodass die Halbwertszeit von Darunavir und Tipranavir auf nahezu 15 Stunden steigt.

10. Die Kernformation ist gestört. Bevirimat stabilisiert das 6-Helix-Bündel von CA-SP1, wodurch die Spaltung durch die Protease verhindert wird. Nur ca. 20% reifes CA können entstehen.

Klausurfragen

1. Was versteht man unter nicht-kompetitiven Inhibitoren (bitte mit virologischem Beispiel)?
2. Beschreiben Sie die Funktion von Fusionsinhibitoren am Beispiel von T20 (inkl. Mechanismus)?
3. Beschreiben Sie die Unterschiede zwischen Acyclovir und einem NRTI aus der HIV-Therapie (z.B. AZT)?

Literatur

- Adults H--infected (1998) Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. *African journal of medical practice / African Academy of Sciences* **5**: 79–104
- Allaway, G. P., K. L. Davis-Bruno, G. A. Beaudry, E. B. Garcia, E. L. Wong, A. M. Ryder, K. W. Hasel, M. C. Gauduin, R. A. Koup, J. S. McDougal, and P. J. Maddon. (1995). Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **11**:533–539.
- Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G., and Parniak, M.A. (1998). Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* **37**:15908–15917.
- Arts EJ & Hazuda DJ (2012) HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2: doi: 10.1101/cshperspect.a007161
- Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, Shiraishi M, Aramaki Y, Okonogi K, Ogawa Y, Meguro K & Fujino M (1999) A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5698–703.
- Baba M, Takashima K, Miyake H, et al. (2005) TAK-652 inhibits CCR5-mediated human immunodeficiency virus type 1 infection in vitro and has favorable pharmacokinetics in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**:4584-91.
- Bachelor, L., Jeffrey, S., Hanna, G., D'Aquila, R., Wallace, L., Logue, K., Cordova, B., Hertogs, K., Larder, B., Buckery, R.,

- Baker, D., Gallagher, K., Scarnati, H., Tritch, R., and Rizzo, C. (2001) Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *J Virol* **75**, 4999-5008.
- Baker JV, Peng G, Rapkin J, Abrams DI, Silverberg MJ, MacArthur RD, Cavert WP, Henry WK, Neaton JD; Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS (CPCRA).(2008) CD4+ count and risk of non-AIDS diseases following initial treatment for HIV infection. *AIDS* **22**: 841–848
- Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. (2001) Selective Excision of AZTMP by Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase. *J. Virol* **75**: 4832–4842
- Brelot a, Heveker N, Pleskoff O, Sol N & Alizon M (1997) Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *J Virol* **71**: 4744–51
- Brinkman, K.; Smeitink, J. A.; Romijn, J. A. and Reiss, P. (1999): Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy, *Lancet* **354**:. 1112-5.
- Cameron DW, Heath-Chiozzi M, Danner S, Cohen C, Kravcik S, Maurath C, et al.(1998) Randomised placebo- controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. *Lancet* **351**:543-9.
- Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, Hakim JG, Kumwenda J, Grinsztejn B, Pilotto JH, Godbole SV, Mehendale S, Chariyalertsak S, Santos BR, Mayer KH, Hoffman IF, Eshleman SH, Piwowar-Manning E, Wang L, Makhema J, Mills LA, de Bruyn G, Sanne I, Eron J, Gallant J, Havlir D, Swindells S, Ribbaudo H, Elharrar V, Burns D, Taha TE, Nielsen-Saines K, Celentano D, Essex M, Fleming TR; HPTN 052 Study Team. (2011) Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med* **11**:493–505
- Cole S (2011) Timing of HAART initiation and clinical outcomes in human immunodeficiency virus type 1 seroconverters. *Arch intern Med* **171**: 1560–9
- Cormier EG & Dragic T (2002) The Crown and Stem of the V3 Loop Play Distinct Roles in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Interactions with the CCR5 Coreceptor. *J Virol* **76**: 8953–8957
- DeJesus E, Berger D, Markowitz M, et al.(2006) Antiviral activity, pharmacokinetics, and dose response of the HIV-1 integrase inhibitor GS-9137 (JTK-303) in treatment-naive and treatment-experienced patients. *J AIDS*, **43**:1-5
- Demeter LM, Shafer RW, Meehan PM, Holden-Wiltse J, Fischl MA, Freimuth WW, Para MF, Reichman RC (2000) Delavirdine susceptibilities and associated reverse transcriptase mutations in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients in a phase I/II trial of delavirdine monotherapy (ACTG 260). *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 794–7
- Donzella, G. A., D. Schols, S. W. Lin, J. A. Este, K. A. Nagashima, P. J. Maddon, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, G. Henson, E. De Clercq, and J. P. Moore. (1998). AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat. Med.* **4**:72–77.
- Dragic T, Trkola a, Thompson D a, Cormier EG, Kajumo F a, Maxwell E, Lin SW, Ying W, Smith SO, Sakmar TP & Moore JP (2000) A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5639–44
- Eggink D, Bontjer I, Langedijk JPM, Berkhout B & Sanders RW (2011) Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to a third-generation fusion inhibitor requires multiple mutations in gp41 and is accompanied by a dramatic loss of gp41 function. *J Virol* **85**: 10785–97
- Fätkenheuer, A. L. Pozniak, M. A. Johnson, A. Plettenberg, S. Staszewski, A. I. Hoepelman, et al., (2005) Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat. Med.* **11**: 1170–1172
- Fransen S, Gupta S, Danovich R, Hazuda D, Miller M, Witmer M, Petropoulos CJ, Huang W. (2009). Loss of Raltegravir susceptibility of HIV-1 is conferred by multiple non-overlapping genetic pathways. *J Virol* **83**: 11440– 11446.
- Flint, 3. Edition, Band 2, Principles of Virology, S.194
- Fun A, van Maarseveen NM, Pokorná J, Maas REM, Schipper PJ, Kanvalinka J, Nijhuis M, (2011): HIV-1 protease inhibitor mutations affect the development of HIV-1 resistance to the maturation inhibitor bevirimat. *Retrovirology*, **8**:70.
- Furman P a, Fyfe J a, St Clair MH, Weinhold K, Rideout JL, Freeman G a, Lehrman SN, Bolognesi DP, Broder S & Mitsuya H (1986) Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 8333–7
- Gallagher, W. R., J. M. Ball, R. F. Garry, M. C. Griffin, and R. C. Montelaro. (1989). A general model for the

- transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**:431–440.
- Galli M, Ridolfo AL, Adorni F, et al. (2002) Body habitus changes and metabolic alterations in protease inhibitor-naive HIV-1-infected patients treated with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *JAIDS*, **29**: 21-31.
- Ghosh A.K., Dawson, H. Mitsuya (2007), Darunavir, a conceptually new HIV-1 protease inhibitor for the treatment of drug-resistant HIV, *Bioorg. Med. Chem.* **15** 7576–7580.
- Grabar, S., Kousignian, I., Sobel, A., et al., (2004): Immunologic and clinical responses to highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV; *AIDS* **18**:2029-38
- Grobler JA, Stillmock K, Hu B, Witmer M, Felock P, Espe- seth AS, Wolfe A, Egbertson M, Bourgeois M, Melamed J, et al. (2002). Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 6661–6666.
- Goethals O, Clayton R, Van Ginderen M, Vereycken I, Wage- mans E, Geluykens P, Dockx K, Strijbos R, Smits V, Vos A, et al. (2008). Resistance mutations in HIV type 1 integrase selected with elvitegravir confer reduced susceptibility to a wide range of integrase inhibitors. *J Virol* **82**: 10366–10374.
- Guo Q, Ho H, Dicker I, Fan L, Zhou N, Friborg J, Wang T, Mcauliffe B V, Wang HH, Rose RE, Fang H, Scarnati HT, Langley DR, Meanwell NA, Abraham R, Colonno RJ & Lin P (2003) Biochemical and Genetic Characterizations of a Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibitor That Blocks gp120-CD4 Interactions. *J Virol* **77**: 10528–10536
- Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, 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.
- Hare S, Smith SJ, Me M, Jaxa-chamiec A, Pommier Y, Hughes SH & Cherepanov P (2011) Structural and Functional Analyses of the Second-Generation Integrase Strand Transfer Inhibitor Dolutegravir (S/GSK1349572) *Mol Pharmacol.* **80**: 565–572
- HIV-Infektion Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie (2012) Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion. *DAIG und Öster. AIDS Gesellschaft*: 1–41
- Hsiou Y, Ding J, Das K, Clark A Jr, Hughes S H, Arnold E (1996) Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure* **4**:853–860.
- Ichiyama K, Yokoyama-Kumakura S, Tanaka Y, Tanaka R, Hirose K, Bannai K, Edamatsu T, Yanaka M, Niitani Y, Miyano-Kurosaki N, Takaku H, Koyanagi Y & Yamamoto N (2003) A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4185–90
- Johnson VA, Calvez V, Günthard HF, Paredes R, Pillay D, Shafer R, Wensing AM, Richman DD. (2010) Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1 International AIDS Society–USA. *Top Antivir Med.* **19**: 156-64
- Jones G, Ledford RM, Yu F, et al. (2007) In vitro resistance profile of HIV-1 mutants selected by the HIV-1 integrase inhibitor, GS-9137 (JTK-303). Abstract 627, 14th CROI, Los Angeles.
- Kawaguchi I, Ishikawa T, Ishibashi M, Irie S, Kakee A. (2006) Safety and pharmacokinetics of single oral dose of JTK-303/ GS 9137, a novel HIV integrase inhibitor, in HIV healthy volunteers. Abstract 580, 13th CROI, Denver.
- Kearney B, Mathias A, Zhong L, et al. (2009) Pharmacokinetics/pharmacodynamics of GS-9137 an HIV integrase inhibitor in treatment-naive and experienced patients. Abstract 73, Kitahata Engl J Med : 1815–1826
- Kitahata MM, Gange SJ, Abraham AG, Merriman B, Saag MS, Justice AC, Hogg RS, Deeks SG, Eron JJ, Brooks JT, Rourke SB, Gill MJ, Bosch RJ, Martin JN, Klein MB, Jacobson LP, Rodriguez B, Sterling TR, Kirk GD, Napravnik S, Rachlis AR, Calzavara LM, Horberg MA, Silverberg MJ, Gebo KA, Goedert JJ, Benson CA, Collier AC, Van Rompaey SE, Crane HM, McKaig RG, Lau B, Freeman AM, Moore RD; NA-ACCORD Investigators. (2009) Effect of Early versus Deferred Antiretroviral Therapy for HIV on Survival. *N Engl J Med* **360**: 1815-26
- Kilby, J. M., and J. J. Eron. (2003). Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N. Engl. J. Med.* **348**:2228–2238.
- Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, et al. (2006) In vitro antiviral activity and resistance profile of a novel HIV integrase inhibitor JTK-303/GS-9137. Abstract H-254, 46th ICAAC 2006
- Kohlstaedt, L. A., and Steitz, T. A. (1992) Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus can use either human tRNA(3Lys) or Escherichia coli tRNA(2Gln) as

- a primer in an in vitro primer-utilization assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9652-6.
- Kuhmann SE, Pugach P, Kunstman KJ, Taylor J, Stanfield RL, Snyder A, Strizki JM, Riley J, Baroudy BM, Wilson IA, Korber BT, Wolinsky SM, Moore JP, Kuhmann SE, Strizki JM, Maxwell E, Ketas T, Morgan T, Pugach P, Wojcik SXL, et al (2004) Genetic and Phenotypic Analyses of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from a Small-Molecule CCR5 Inhibitor. *J Virol* **78**: 2790–2807
- Kuritzkes DR, Jacobson J, Powderly WG, Godofsky E, DeJesus E, Haas F, Reimann K a, Larson JL, Yarbough PO, Curt V & Shanahan WR (2004) Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J Infect Dis* **189**: 286–91
- Labrosse B, Brelet a, Heveker N, Sol N, Schols D, De Clercq E & Alizon M (1998) Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *J Virol* **72**: 6381–8
- Larder, B.A., Darby, G., and Richman, D.D. (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* **243**, 1731–1734.
- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN & Gregory TJ (1990) Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *JBC* **265**: 10373–82
- Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, Shibayama S, Sagawa K, Fukushima D, Moravek J, Koyanagi Y & Mitsuya H (2004) Spirodiketopiperazine-Based CCR5 Inhibitor Which Preserves CC-Chemokine / CCR5 Interactions and Exerts Potent Activity against R5 Human Immunodeficiency Virus Type 1 In Vitro. *J Virol* **78**: 8654–8662
- Marcus-U F 34 (2009) Zum Verlauf der HIV-Epidemie in Deutschland bis Ende 2009. *Epidem Bulletin* **48**: 491-98
- Markowitz M, Nguyen B-Y, Gotuzzo F, et al. (2006) Potent antiretroviral effect of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, as part of combination ART in treatment-naïve HIV-1 infected patients. Abstract THLB0214, XVI IAC, Toronto.
- Marinello J, Marchand C, Mott B, Bain A, Thomas CJ, Pommier Y. (2008). Comparison of raltegravir and elvitegravir on HIV-1 integrase catalytic reactions and on a series of drug-resistant integrase mutants. *Biochemistry* **47**: 9345–54.
- Marozsan AJ, Moore DM, Lobritz MA, Fraundorf E, Abraha A, Reeves JD, Arts EJ. (2005). Differences in the fitness of two diverse wild-type human immunodeficiency virus type 1 isolates are related to the efficiency of cell binding and entry. *J Virol* **79**: 7121–7134
- Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, et al. (2006) JTK-303/GS 9137, a novel small-molecule inhibitor of HIV-1 integrase: anti-HIV activity profile and pharmacokinetics in animals. Abstract 508, 13th CROI, Denver.
- Meyer PR (1999) A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell* **4**: 35–43
- Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman P a, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW & Broder S (1985) 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 7096–100
- Mofenson LM, Lambert JS, Stiehm ER, Bethel J, Meyer WA 3rd, Whitehouse J, Moye J Jr, Reichelderfer P, Harris DR, Fowler MG, Mathieson BJ, Nemo GJ. (1999) Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. *N Engl J Med*. **341**: 385–393
- Murakami BT, Nakajima T, Koyanagi Y, Yoshida N, Waki M & Matsumoto A (1997) A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 Infektion *J Exp Med* **186**: 1389-93.
- Murakami E, Ray AS, Schinazi RF, Anderson KS (2004). Investigating the effects of stereochemistry on incorporation and removal of 5-fluorocytidine analogs by mitochondrial DNA polymerase gamma: comparison of D- and L-D4FC-TP. *Antiviral Res* **62**:57-64
- Nolan D, John M, Mallal S.(2001) Antiretroviral therapy and the lipodystrophy syndrome, part 2: concepts in aetiopathogenesis. *Antivir Ther* **6**:145-60.
- Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD.(1998) HDeclining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. **238**: 853–860
- Ren J, Diprose J, Warren J, Esnouf RM, Bird LE, Ikemizu S, Slater M, Milton J, Balzarini J, Stuart DI, Stammers DK. (2000) Structural basis for the resilience of efavirenz (DMP-266) to drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *JBC* **275**:5633–5639

- Richman DD (1994) Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. *J Virol* **68**: 1660–6
- Rimsky LT, Shugars DC & Matthews TJ (1998) Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol.* **72**: 986–93
- Rodríguez B, Sethi AK, Cheruvu VK, Mackay W, Bosch RJ, Kitahata M, Boswell SL, Mathews WC, Bangsberg DR, Martin J, Whalen CC, Sieg S, Yadavalli S, Deeks SG & Lederman MM (2006) Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA* **296**: 1498–506
- Sarafianos, S. G., Das, K., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Boyer, P. L., Hughes, S. H., and Arnold, E. (1999a) Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10027-32.
- Saskova KG, et al. (2009). Molecular characterization of clinical isolates of human immunodeficiency virus resistant to the protease inhibitor darunavir. *J. Virol.* **83**:8810–8818.
- Schols D., Esté J a, Cabrera C & De Clercq E (1998) T-cell-line-tropic human immunodeficiency virus type 1 that is made resistant to stromal cell-derived factor 1alpha contains mutations in the envelope gp120 but does not show a switch in coreceptor use. *J Virol* **72**: 4032–7
- Schols D, Claes S, Hatse S, Princen K, Vermeire K, Clercq ED, Skerlj R, Bridger G, and Calandra G (2003) Anti-HIV activity profile of AMD070, an orally bioavailable CXCR4 antagonist, in 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections;; Boston, MA. Abstract no. 563.
- Shafer RW, Dupnik K, Winters M a & Eshleman SH (2001) A Guide to HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease Sequencing for Drug Resistance Studies. HIV sequence Kompendium. *HIV Seq Compend* **2001**: 1–51
- Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W. Y., Kojima, E., Alcaide, M. L., Chokekijchai, S., Roy, B. M., Arnold, E., and Yarchoan, R. (1995b) Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**, 2398 -2402.
- Shiro Ibe, Wataru Sugiura (2011) Clinical Significance of HIV Reverse-transcriptase Inhibitor-resistance Mutation. *Future Microbiol.* **6**:295-315.
- Sluis-Cremer N, Temiz NA, Bahar I. (2004) Conformational Changes in HIV-1 Reverse Transcriptase Induced by Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Binding. *Curr HIV Res.* **2**: 323–332
- Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S., and Johnson, K. A. (1995) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* **267**, 988-93.
- Sterne JA, May M, Costagliola D, et al.(2009) Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1-infected patients: a collaborative analysis of 18 HIV cohort studies. *Lancet* **373**:1352-63.
- Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, Hughes SH, Pauwels R, Andries K, Janssen PA, Arnold EA, et al. (1994). Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *JMB* **243**: 369–387.
- Trkola A, Kuhmann SE, Strizki JM, Maxwell E, Ketas T, Morgan T, Pugach P, Xu S, Wojcik L, Tagat J, Palani A, Shapiro S, Clader JW, McCombie S, Reyes GR, Baroudy BM & Moore JP (2002) HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**: 395–400
- Tsamis F, Gavrillov S, Kajumo F, Seibert C, Kuhmann S, Ketas T, Trkola A, Palani A, Clader JW, Tagat JR, McCombie S, Baroudy B, Moore JP & Sakmar TP (2003) Analysis of the Mechanism by Which the Small-Molecule CCR5 Antagonists SCH-351125 and SCH-350581 Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry. *J Virol* **77**: 5201–5208
- Wang J, Bambara RA, Demeter LM, Dykes C. (2010). Reduced fitness in cell culture of HIV-1 with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations correlates with relative levels of reverse transcriptase content and RNaseH activity in virions. *J. Virol.* **84**:9377–9389.
- WHO (2013) Guidelines the use of Antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection.
- Wilén CB, Tilton JC, Doms RW. (2011). HIV: Cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* doi: 10.1101/cshperspect.a006866.
- Wilson J (1996) Human Immunodeficiency Virus Type-1 Reverse Transcriptase. (2013) CONTRIBUTION OF MET-184 TO BINDING OF NUCLEOSIDE 5prime - TRIPHOSPHATE. *JBC* **271**: 13656–13662
- Wyatt CM, Rosenstiel PE & Klotman PE (2008) HIV-associated nephropathy. *Nephrology* **159**: 151–61
- Zolopa A, Andersen J, Powderly W, Sanchez A, Sanne I, Suckow C, Hogg E & Komarow L (2009) Early antiretroviral

therapy reduces AIDS progression/death in individuals with acute opportunistic infections: a multicenter randomized strategy trial. *PloS one* **4**: e5575

Vogel M., Schwarze-Zander, C., Wasmuth, J-C, Spengler, U. Sauerbruch, T. & Rockstroh, JK (2010) Therapie der HIV-Infektion, *Deutsches Ärzteblatt International* **107**: 507-515

Abkürzungen

A2RE	hnRNP A2 response element	Cyc	Cyclin
AF9	transkriptioneller Co-Aktivator	DC	Dendritische Zelle
AFF4	transkriptioneller Co-Aktivator	DC-SIGN	Dendritic cell specific intercellular Adhäsion Molecule-3-Grabung non-ingetrin
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome	DISC	death inducing signalling complex
AIP1/Alix	ALG-2 interacting protein 1; synonym for Alix	DNA	Desoxyribonucleinsäure
ALEM	Acidic Lipid Enriched Microdomains	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ALIX	ALG-2 interacting protein X	Doa	degradation of alpha2
ANP	Phosphoaminophosphonsäure-Adenylat-Ester	DRM	detergent mesistant microdomains
AP	Adapterprotein	DSIF	DRB sensitivity-inducing factor
APC	Antigenpräsentierende Zelle	Eap	ELL associated protein (human orthologs of ESCRT-II subunits)
APOBEC	Apolipoprotein B Editing Complex	EBV	Epstein-Barr-Virus
ARM	arginine rich motiv	eIF3	eukaryotischer Initiationsfaktor 3
ART	Antiretrovirale Therapie	EJC	exon junction complex
ASK	apoptosis signaling kinase	ENL	transkriptioneller Co-Aktivator
ATP	Adenosintriphosphat	env	envelope glycoprotein
bad	Bcl-2-associated death promotor	ER	Endoplasmatisches Retikulum
BAF	Form des SWI/SNF-Komplexes	ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
bax	Bcl-2-associated X protein	FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
bcl-2	B-cell lymphoma	FasL	Fas Ligand
Brd4	bromodomain-containing protein 4	FasR	Fas Rezeptor
Bro	BCK1-like resistance to osmotic shock	fDC	Follikuläre Dendritische Zelle
CA	Capsid	FP	Fusionspeptid
Caspase	cysteine dependent aspartate-specific proteases	FYVE	Fab1, YOTB, Vac1, EEA1
CBP	CREB-Bindeprotein	gag	group specific antigen
CCL	CC-Motiv-Chemokin	gp	Glykoprotein
CCR4	C-C chemokine receptor type 4	gRNA	genomische RNA
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5	GTFs	general transcription factors
CCT	Craniale Computertomographie	HAT	Histon-Acetyltransferase
CD	cluster of differentiation	HBR	Highly Basic Region
cDC	Konventionelle Dendritische Zelle	HBV	Hepatitis-B-Virus
CDK7	Cyclin abhängige Kinase 7	HDAC	histone deacetylase 6
CDK9	Cyclin-abhängige Kinase 9	HET	Heterosexueller Übertragungsweg
cDNA	komplementären DNA	HEXIM1	hexamethylene bis-acetamide-inducible protein 1
CHMP	charged multivesicular body protein	HHV	Humanes-Herpesvirus
CMV	Cytomegalie-Viren	HIV-1	Humanes-Immundefizienz-Virus Typ 1
cPPT	zentraler Polypurintrakt	HL	Hodgkin-Lymphom
CREB	cAMP-response element-binding protein-1	hnRNP	heterogeneous ribonucleoprotein particle
CTD	C-terminale Domäne	HR	Heptad Repeat
CTL	cytotoxic T cells	HR-CT	High Resolution Computed Tomography
CTRS	Cytoplasmic Targeting/Retention Signal	HRS	hepatocyte growth factor receptor substrate
Cul5	Cullin 5		
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4		
CXCR5	C-X-C chemokine receptor type 5		

HSV	Herpes simplex-Virus	PCR	polymerase chain reaction
IBD	Integrase-binding Domain	PI3K	phosphoinositid 3 kinase
iDC	Unfreie Dendritische Zelle	PIC	Pre-Integrationskomplex
IFN	Interferon	PML	Progressive Multifokale Leukoenzephalopathie
IgA	Immunglobulin A bzw. M	pol	Polymerase
IgE	Immunglobulin E	Pol II	RNA-Polymerase II
Imp7	Importin-7	pp24	Phosphoprotein24
Impa	Importin- α	PPI	perinataler Übertragungsweg
Imp β	Importin- β	PPT	Polypurintrakt
IN	ntegrase	PR	Protease
IRES	internal ribosomal entry site	PRMT6	protein arginine N-methyltransferase 6
IVD	intravenöser Drogenkonsum (als Übertragungsweg)	PTD	protein transduction domain
JCV	JC-Virus	P-TEFb	positiver Transkriptionselongationskomplex b
b	Base(n)	PZNSL	primäre ZNS-Lymphome
Da	Dalton	RANTES	Regulated and Normal T-cell Expressed and Secreted
KS	Kaposi-Sarkom	Rbx1	Ring-Box Protein 1
LARP7	La ribonucleoprotein domain family - member 7	RelA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
LEDGF	lens epithelium-derived growth factor	RER	Raues endoplasmatisches Reticulum
LIP5	LYST-Interacting Protein 5	Rev	regulator of virion expression
LTR	Long-Term-Repets	RKI	Robert-Koch-Institut
LysRS	Lysyl-tRNA Synthetase	RNA	Ribonucleinsäure
MA	Matrix	RNP	Ribonucleoprotein
MAC	Mycobacterium avium complex	RRE	rev responsive element
mDC	Reife Dendritische Zelle	RT	Reverse Transkriptase
MePCE	methylphosphate capping enzyme	SAMHD1	SAM-domain und HD-domain enthaltene Protein 1
MHC	Major Histocompatibility Complex	SDF	Stromal Cell-derived Factor
MHR	Major Homology Region	SEC	Superelongationskomplex
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins	SIV	simian immunodeficiency virus
MMC	Multizentrischer Morbus Castleman	snRNA	small nuclear RNA
MoMuLV	Moloney Murine Leukämie Virus	snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle
MPMV	Mason-Pfizer Monkey Virus	Sp1	specificity factor 1
mRNA	messenger Ribonucleinsäure	SP1/SP2	Spacer Peptide 1/2
MRT	Magnetresonanztomographie	STAM s	ignal transducing adaptor molecule
MSM	Männer die Sex mit Männer haben (als Übertragungsweg)	SWI/SNF	chromatin remodeling complex
MTOC	Mikrotubuli organisierendes Zentrum	TAFs	TBP assoziierte Faktoren
MVB	Multivesikelkörper	Tap	antigen peptide transporter
NC	Nucleocapsid	TAR	transactivation responsive region
nef	negative regulatory factor	tat	trans-activator of transcription
NELF	negativer Elongationsfaktor	TB	Tuberkulose
NF- κ B	Nuklearer Faktor κ B	TBP	TATA-box binding protein
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom	TFH	follikuläre T-Helferzelle
NK	Natürliche Killerzelle	TFIID	Transkriptionsfaktor D der Polymerase II
NKT	Natürliche Killer-T-Zelle	TH1	T1-Helferzelle
NLS	nucleäres Lokalisationssignal	TH17	T17-Helferzelle
NPC	Poren des Zellkern	TH2	T2-Helferzelle
nt	Nukleotid	TiReg	Induzierte regulatorische T-Zelle
NTD	N-Terminale Domäne	TM	Transmembranregion
nuc	Nukleosom	TMD	transmembrale Domäne
NUPS	Nukleoporine	tMRCA	time of most recent common ancestor
OI	Opportunistische Infektionen	TNPO3	Transportin-3
ORF	Open Reading Frame	TRIM5 α	5-alpha Motiv Protein
p300	Histon-Acetyltransferase	TRM	Tat/TAR recognition motif
p50	Untereinheit von NF- κ B	TSG101	tumor suppressor gene 101; the human ortholog of vps23
Pak	p21 associated kinase	TSS	Transkriptionsstartstelle
PBAF	Form des SWI/SNF-Komplexes	TZR	T-Zell-Rezeptor
PBS	Primer-Binding-Site	UN	United Nations
PCAF	P300/CBP-associated factor		
PCP	Pneumocystis-Pneumonie		

unb./k.A. (zum	unbekannter Übertragungsweg/ keine Angaben Übertragungsweg)
UTR	untranslated region
V1H	vakuolare ATPase
vif	viral infectivity factor
vpr	viral protein r
VPS	vacuolar protein sorting
VPS4	Vakuolar Protein Sorting 4
vpu	viral protein u
Vpx	virales Protein X
VS	Virologische Synapse
VZV	Varizella-Zoster Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem
μORF	mikro Open Reading Frame