

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

**Untersuchungen zum Mechanismus der Herunterregulation von
HLA-E von der Oberfläche HIV-1–infizierter T-Zellen durch die
akzessorischen Proteine Nef und Vpu**

Publikationsdissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Janet Ifeoma Akko (geb. Chukwukelu)
aus Bonn

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.12.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Schulze zur Wiesch

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Marcus Altfeld

Inhaltsverzeichnis

1	Originalarbeit der Publikationsdissertation	1
2	Zusammenfassende Darstellung der Publikation mit Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext.....	23
2.1	Einleitung.....	23
2.1.1	Die HIV-Pandemie und ihre Entwicklung	23
2.1.2	Die akzessorischen Proteine Nef und Vpu	24
2.1.3	Die Rolle des Humanen Leukozyten-Antigen-Systems (HLA) in der HIV-1-Infektion .	26
2.1.4	Das nicht-klassische HLA-E-Molekül in der HIV-1-Infektion.....	28
2.1.5	Darstellung der Publikation.....	29
2.2	Material und Methoden	29
2.3	Ergebnisse.....	34
2.4	Diskussion	36
2.5	Zusammenfassung	43
2.6	Summary.....	44
2.7	Abkürzungsverzeichnis	45
2.8	Literaturverzeichnis	46
3	Erklärung des Eigenanteils an der Publikation.....	53
4	Danksagung.....	54
5	Lebenslauf	55
6	Publikationsliste.....	56
7	Eidesstattliche Erklärung	57

1 Originalarbeit der Publikationsdissertation

van Stigt Thans T[#], Akko JI[#], Niehrs A, Garcia-Beltran WF, Richert L, Stürzel CM, Ford CT, Li H, Ochsenbauer C, Kappes JC, Hahn BH, Kirchhoff F, Martrus G, Sauter D, Altfeld M, Hölzemer A.

Primary HIV-1 Strains Use Nef To Downmodulate HLA-E Surface Expression.

Journal of Virology (2019)

[#] Es liegt eine geteilte Erstautorenschaft zwischen diesen beiden Autor:innen vor.



Primary HIV-1 Strains Use Nef To Downmodulate HLA-E Surface Expression

Thomas van Stigt Thans,^a Janet I. Akko,^{a,b} Annika Niehrs,^{a,b} Wilfredo F. Garcia-Beltran,^c Laura Richert,^{a,d} Christina M. Stürzel,^e Christopher T. Ford,^a Hui Li,^f Christina Ochsenbauer,^g John C. Kappes,^g Beatrice H. Hahn,^f Frank Kirchhoff,^e Glòria Martrus,^a Daniel Sauter,^e Marcus Altfeld,^{a,b,h} Angélique Hölzemer^{a,b,i}

^aHeinrich Pette Institute, Leibniz Institute for Experimental Virology, Hamburg, Germany

^bGerman Center for Infection Research (DZIF), Site Hamburg-Lübeck-Borstel-Riems, Germany

^cRagon Institute of MGH, MIT, and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA

^dUniversité Bordeaux, Inserm, Bordeaux Population Health Research Center, UMR 1219, Inria SISTM, Bordeaux, France

^eInstitute of Molecular Virology, Ulm University Medical Center, Ulm, Germany

^fDepartment of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA

^gDepartment of Medicine, Division of Hematology and Oncology, and CFAR, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA

^hInstitute for Immunology, University Medical Center Eppendorf, Hamburg, Germany

ⁱFirst Department of Internal Medicine, University Medical Center Eppendorf, Hamburg, Germany

ABSTRACT Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has evolved elaborate ways to evade immune cell recognition, including downregulation of classical HLA class I (HLA-I) from the surfaces of infected cells. Recent evidence identified HLA-E, a nonclassical HLA-I, as an important part of the antiviral immune response to HIV-1. Changes in HLA-E surface levels and peptide presentation can prompt both CD8⁺ T-cell and natural killer (NK) cell responses to viral infections. Previous studies reported unchanged or increased HLA-E levels on HIV-1-infected cells. Here, we examined HLA-E surface levels following infection of CD4⁺ T cells with primary HIV-1 strains and observed that a subset downregulated HLA-E. Two primary strains of HIV-1 that induced the strongest reduction in surface HLA-E expression were chosen for further testing. Expression of single Nef or Vpu proteins in a T-cell line, as well as tail swap experiments exchanging the cytoplasmic tail of HLA-A2 with that of HLA-E, demonstrated that Nef modulated HLA-E surface levels and targeted the cytoplasmic tail of HLA-E. Furthermore, infection of primary CD4⁺ T cells with HIV-1 mutants showed that a lack of functional Nef (and Vpu to some extent) impaired HLA-E downmodulation. Taken together, the results of this study demonstrate for the first time that HIV-1 can downregulate HLA-E surface levels on infected primary CD4⁺ T cells, potentially rendering them less vulnerable to CD8⁺ T-cell recognition but at increased risk of NKG2A⁺ NK cell killing.

IMPORTANCE For almost two decades, it was thought that HIV-1 selectively downregulated the highly expressed HLA-I molecules HLA-A and HLA-B from the cell surface in order to evade cytotoxic-T-cell recognition, while leaving HLA-C and HLA-E molecules unaltered. It was stipulated that HIV-1 infection thereby maintained inhibition of NK cells via inhibitory receptors that bind HLA-C and HLA-E. This concept was recently revised when a study showed that primary HIV-1 strains reduce HLA-C surface levels, whereas the cell line-adapted HIV-1 strain NL4-3 lacks this ability. Here, we demonstrate that infection with distinct primary HIV-1 strains results in significant downregulation of surface HLA-E levels. Given the increasing evidence for HLA-E as an important modulator of CD8⁺ T-cell and NKG2A⁺ NK cell functions, this finding has substantial implications for future immunomodulatory approaches aimed at harnessing cytotoxic cellular immunity against HIV.

KEYWORDS HIV-1, HLA-E, Nef

Citation van Stigt Thans T, Akko JI, Niehrs A, Garcia-Beltran WF, Richert L, Stürzel CM, Ford CT, Li H, Ochsenbauer C, Kappes JC, Hahn BH, Kirchhoff F, Martrus G, Sauter D, Altfeld M, Hölzemer A. 2019. Primary HIV-1 strains use Nef to downmodulate HLA-E surface expression. *J Virol* 93:e00719-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00719-19>.

Editor Guido Silvestri, Emory University

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Angélique Hölzemer, angelique.hoelzemer@leibniz-hpi.de.

T.V.S.T. and J.I.A. contributed equally to this work.

Received 2 May 2019

Accepted 19 July 2019

Accepted manuscript posted online 2 August 2019

Published 30 September 2019

In most individuals, untreated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection progresses to severe acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) within about 5 to 10 years. However, a small percentage of infected individuals are able to efficiently control HIV-1 replication and prevent disease progression for longer periods, even in the absence of antiretroviral therapy. The HLA class I (HLA-I) locus is a major determinant of host genetic HIV-1 control (1–3), and certain HLA-I alleles are consistently associated with slower progression to AIDS (4–6). The beneficial effects of some HLA-I alleles have been mostly attributed to effective recognition by cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (reviewed in reference 7). These can recognize HLA-I-presented HIV-1 epitopes and kill virus-infected cells, causing the initial drop in peak viremia following acute infection (8, 9). Natural killer (NK) cells are also sensitive to changes in HLA-I expression and HLA-I-presented viral peptides (10–13), and NK cell receptors have been associated with delayed HIV-1 progression (14–16).

Consequently, HIV-1 has evolved multiple immune evasion mechanisms targeting the surface expression of HLA-I on infected cells (17–19) to evade immune cell recognition. On one hand, HLA-A and -B downregulation is mediated by the HIV-1 accessory protein Nef. A tyrosine-based motif in the cytoplasmic tail of HLA-I molecules enables Nef-dependent recruitment of the clathrin-associated adaptor protein complex AP-1 (a cellular trafficking protein), resulting in rerouting of HLA-I molecules to lysosomal degradation (19). HLA-C, which lacks a tyrosine at a similar position, is resistant to Nef-mediated downregulation (18). In addition, Nef intervenes with a large variety of cellular pathways to modulate signal transduction (20) and cell survival (21). Nef also downmodulates cell surface expression of CD4 (22, 23) and CXCR4 (24), counteracts the restriction factor SERINC5 (25), and enhances viral replication and infectivity (26).

On the other hand, HLA-C expression at the surface of HIV-1-infected cells is disrupted by the viral protein U (Vpu), which does not affect HLA-A or -B levels (17). Vpu of NL4-3 lacks HLA-C downregulation properties (17), which explains why this phenomenon was not observed in earlier studies (18, 19). Downregulation of HLA-C can impair adaptive and innate antiviral responses (17, 27). Interestingly, there is novel evidence that the capacity to decrease HLA-C levels of different Vpu proteins varies due to adaptation to host genetic HLA-C allotypes (28). Other important functions of Vpu are counteraction of the host restriction factor tetherin, which prevents budding of virions from the cell surface (29), and suppression of cellular antiviral responses through inhibition of NF- κ B during later stages of infection (20, 30). In summary, HIV-1 has developed intricate ways to disrupt classical HLA-I surface expression, but susceptibility to HLA-I downregulation varies among HLA-I molecules (31), as well as across different HIV-1 strains (32).

HLA-E is a ubiquitously expressed nonclassical HLA-I molecule that is well conserved among the human population. It mirrors the overall HLA-I content of a cell, as its surface expression is dependent on peptides derived from the signal sequences of other HLA-I molecules, which include a methionine at position –21 (33). This group includes HLA-A, HLA-C, and HLA-G, but only certain HLA-B allotypes (34, 35). Furthermore, presentation of viral peptides derived from cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), and hepatitis C virus (HCV) by HLA-E molecules to HLA-E-restricted T cells has been described (36–38). In rhesus macaques, RhCMV-based simian immunodeficiency virus (SIV) gag vectors surprisingly elicited a broad and protective HLA-E-restricted antiviral CD8⁺ T-cell response (39). In humans, HIV-1-specific HLA-E-restricted T cells have not been reported yet, but an increasing number of HIV-1-derived peptides that stabilize HLA-E expression have been identified (40–42). HLA-E is also important for NK cell development and function (33), and it engages the inhibitory NKG2A receptor, as well as its activating counterpart, NKG2C, in a peptide-dependent manner (43). NKG2A⁺ NK cells display high activity against HIV-1-infected cells (40, 44). Recent data implicate HLA-E as a potential determinant of antiviral control. For example, Ramsuran et al. reported an association between increased HLA-A levels in HIV-1-infected subjects and poor viral immune control. All HLA-A molecules encode an HLA-E-stabilizing leader peptide. Elevated HLA-A levels are thus correlated with higher HLA-E expression, which

inhibits the antiviral function of NKG2A⁺ NK cells (34). Thus, despite its low surface expression levels (45), HLA-E has important implications for both innate and adaptive anti-HIV-1 immune responses. So far, unchanged or upregulated levels of HLA-E expression on the surfaces of HIV-1-infected cells have been reported (39–41, 46–50). However, apart from a study using HIV-1 isolates from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of HIV-1-infected donors (41), mostly cell line-adapted HIV-1 strains have been investigated (18, 46, 48, 49).

In this study, using infectious molecular clones of primary HIV-1 strains, as well as cell line-adapted viruses, we investigated whether HIV-1 modulates HLA-E surface levels on infected primary CD4⁺ T cells. We demonstrated that infection with a subset of primary HIV-1 strains indeed resulted in reduced HLA-E levels on the surfaces of infected CD4⁺ T cells. The results further showed that the HIV-1 accessory protein Nef plays a major role in modulating HLA-E surface expression, although it might cooperate with other viral proteins for full effect. Taken together, the results of this study provide novel insights into HIV-1-mediated modulation of HLA-E surface expression, which may be relevant to immune recognition of HIV-1-infected cells by both CD8⁺ T cells and NK cells.

RESULTS

Reduced HLA-E levels on the surfaces of primary HIV-1-infected CD4⁺ T cells.

HIV-1-mediated modulation of HLA-E surface expression was investigated using a panel of cell line-adapted strains (NL4-3, SF162, SF2, and LAI [BRU]), as well as seven infectious molecular clones (IMCs) representing primary HIV-1 strains (CH293, CH107, CH164, CH185, CH236, CH077, and CH198). An HLA-E-specific monoclonal antibody (clone 3D12) (51) was used to measure HLA-E surface levels on HIV-1-infected primary CD4⁺ T cells. In addition, the capacity of viral strains to downregulate HLA-I was assessed by using a pan-HLA-I antibody (clone W6/32). HIV-1-mediated reduction of total HLA-I surface content as measured by W6/32 has been previously shown to correlate well with the extent of virus-induced HLA-A2 downregulation (32). However, W6/32 also captures HLA-I molecules less susceptible to HIV-1-induced degradation. HLA-E surface levels were measured 72 h after infection, when HLA-I modulation by HIV-1 is observed *in vitro*, as previously determined (52). HIV-1-infected CD4⁺ T cells were defined as being HIV-1 p24⁺ CD4^{dim}, and uninfected bystander cells within the same culture were defined as HIV-1 p24⁻ CD4⁺ (gating strategy displayed in Fig. 1A).

We observed that the cell line-adapted strains SF162 and SF2 did not affect HLA-E surface expression levels (Fig. 1B to D), in agreement with previous reports (40, 48). Similarly, infection with LAI, which has been reported to upregulate HLA-E on CEM×174 cells, the promonocytic cell line U-937 (46), and human CD4⁺ T cells (49), overall did not alter HLA-E levels on primary infected CD4⁺ T cells in our study, although slightly increased HLA-E levels were observed in two of the donors tested (Fig. 1C). The cell line-adapted strain NL4-3 induced only a marginal reduction in HLA-E surface expression levels (median relative change, infected versus uninfected, of –17% [interquartile range {IQR} = –24% to –12%]) (Fig. 1D).

The primary viruses tested in this study showed variable degrees of HLA-E downregulation (Fig. 1B to D). In particular, CH077 (subtype B) and CH198 (subtype C) mediated the strongest and significant reduction in HLA-E surface expression, with median relative changes of –35% (IQR = –43% to –31%) for CH077 and –40% (IQR = –51% to –30%) for CH198. Other HIV-1 primary strains were less effective in downregulating HLA-E (Fig. 1C and D), but some modulation of HLA-E was observed for almost all primary HIV-1 IMCs and was consistent across the donors tested. Only CH293 did not interfere with HLA-E surface expression (median relative change, –6% [IQR = –19% to 3%]). Altogether, a subset of primary HIV-1 strains (CH236, CH077, and CH198) downregulated HLA-E surface expression significantly, whereas this was not observed for cell line-adapted viruses.

HIV-1 CH077- and CH198-derived Nef proteins mediate HLA-E surface downregulation. Downregulation of classical HLA-I (HLA-A/B and –C) is mediated by the

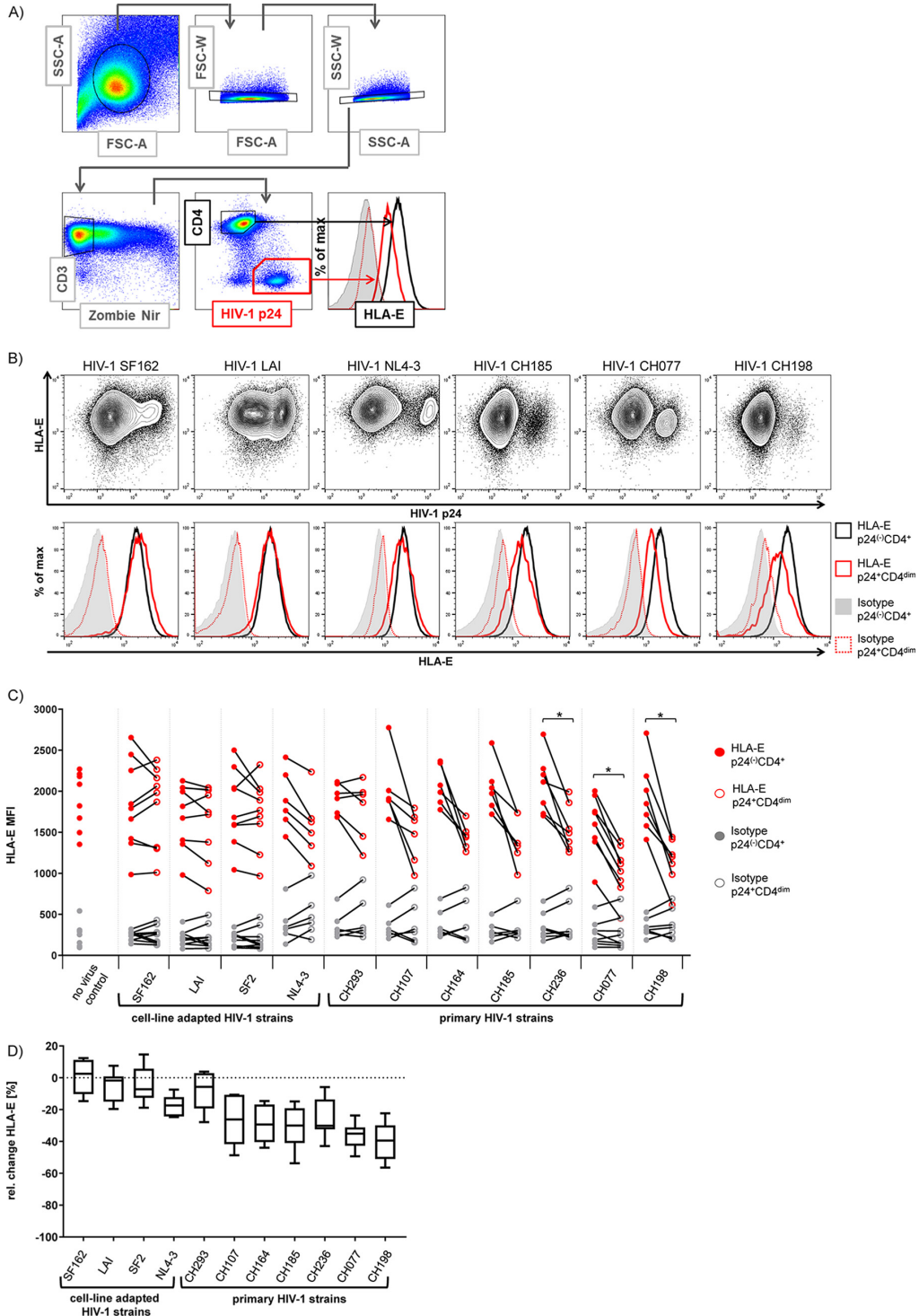


FIG 1 Infection with HIV-1 differentially modulates HLA-E surface levels on primary T cells. (A) Gating strategy for flow cytometric analyses of HLA-E staining on HIV-1-infected primary isolated CD4⁺ T cells. Lymphocytes were first defined by forward scatter area (FSC-A) and side (Continued on next page)

HIV-1 accessory proteins Nef and Vpu in order to counteract CD8⁺ T-cell recognition (17, 53). Thus, for further investigation into the mechanism underlying the downregulation of HLA-E on primary CD4⁺ T cells infected with HIV-1 IMCs, we generated lentiviral vectors coexpressing either Vpu with enhanced green fluorescent protein (eGFP) (Fig. 2A to C) or Nef with mCherry (Fig. 2D to F). For subsequent testing, lentiviral vectors containing Nef and Vpu proteins of three viral strains—CH077 and CH198, which displayed the highest degree of HLA-E downregulation and represent different subtypes of HIV-1 group M, as well as the cell line-adapted strain NL4-3—were transduced into a Jurkat T-cell line. Unstimulated Jurkat cells express very low HLA-E surface levels, rendering evaluation of HLA-E surface modulation difficult. Therefore, Jurkat cells were prestimulated with interferon gamma (IFN- γ) prior to flow cytometric staining, as IFN- γ is well known to strongly induce HLA-I expression, in particular, HLA-E (54). The functionality of Vpu and Nef was confirmed by staining tetherin (Fig. 2A and B) and HLA-I (Fig. 2D and E), respectively. Transduction of Jurkat cells with Vpu led to a nonspecific increase in HLA-E median fluorescence intensity (MFI) that was also observed in cells transduced with vector control alone (Fig. 2B), potentially due to a cellular response to lentiviral transduction with the vector. Thus, no specific effect of Vpu on HLA-E surface expression was observed in this T-cell line (Fig. 2C).

A minor reduction of HLA-E surface expression was observed on Jurkat cells transduced with NL4-3 Nef (median *n*-fold change, 0.91 [IQR = 0.87 to 0.95]) compared to mCherry vector alone (median *n*-fold change, 1.15 [IQR = 1.02 to 1.28]) (Fig. 2F). In contrast, transduction of Jurkat cells with both Nef proteins derived from CH077 and CH198 resulted in a significant reduction in HLA-E MFI (Fig. 2F). A higher degree of HLA-E surface downmodulation was observed for CH077-derived Nef (median *n*-fold change, 0.67 [IQR = 0.59 to 0.76]). The median *n*-fold change in HLA-E surface levels induced by CH198-derived Nef was 0.8 (IQR = 0.72 to 0.85). In summary, the presence of HIV-1 Nef proteins derived from CH077 and CH198 was sufficient to reduce HLA-E surface expression in Jurkat cells. In contrast, all three Vpu proteins tested here did not influence HLA-E surface levels.

Reduced HLA-E surface levels on HIV-1-infected CD4⁺ T cells are associated with downregulation of HLA-I expression. Given that—akin to downregulation of highly abundant HLA-A and -B—Nef caused downregulation of HLA-E in Jurkat cells, we assessed whether the ability of HIV-1 strains to modulate HLA-E surface expression parallels their ability to downregulate overall HLA-I expression from the cell surface. To this end, we reanalyzed the first data set (Fig. 1), where the pan-HLA-I antibody W6/32 was used to measure total HLA-I, which includes HLA-E. Nevertheless, HLA-E constitutes only a minor percentage of the total HLA-I content recognized, making pan-HLA-I

FIG 1 Legend (Continued)

scatter area (SSC-A) characteristics. After doublet exclusion using forward scatter width (FSC-W) and side scatter width (SSC-W), viable cells were identified as negative for Zombie NIR staining (viability dye) and positive for CD3. Subsequently, CD4 was plotted against HIV-1 p24 to gate on two subsets: HIV-1-infected cells, defined as p24⁺ CD4^{dim}, and HIV-1-uninfected bystander cells, defined as p24⁻ CD4⁺ subset of the same well. The gate for the p24⁻ CD4⁺ subset was set on the no-virus control (not shown). The histograms display the fluorescence intensities of HLA-E surface staining (clone 3D12) on HIV-1-infected cells (red) and uninfected bystander cells (black). Histograms of the respective isotype control stainings (dotted red line, HIV-1-infected cells; shaded gray histogram, HIV-1-uninfected cells) are overlaid. Staining was performed with antibody panel A (Table 2). (B) (Top row) Representative dot plots of primary CD4⁺ T cells infected with several HIV-1 strains ranging from no (left) to the highest (right) extent of HLA-E downregulation. HLA-E surface staining is plotted against HIV-1 p24 intracellular staining. (Bottom row) Histograms displaying fluorescence intensities of HLA-E surface staining following gating on HIV-1-infected cells (red) or on HIV-1-uninfected cells (black) with the respective isotype controls as indicated on the right. The gating strategy was the same as for panel A; the HIV-1 strains correspond to those in the top row. (C) Each pair of connected dots displays the median fluorescence intensity (MFI) of HLA-E (red) or isotype control (gray) on HIV-1-uninfected bystander cells (filled dots) and HIV-1-infected CD4⁺ T cells (empty dots) from the same donor. HIV-1 strains are indicated below the x axis, as well as the no-virus control. Differences in HLA-E MFIs on HIV-1-infected and -uninfected CD4⁺ T cells were analyzed using Wilcoxon signed rank test for paired data; significant *P* values (<0.05) are marked with asterisks. FDR-adjusted *P* values are as follows: for SF162, LAI, SF2, and CH293, *P* > 0.1; for NL4-3, CH107, CH164, and CH185, *P* = 0.059; for CH236, CH077, and CH198, *P* = 0.037. (D) HIV-1 cell line-adapted strains and HIV-1 primary strains (x axis) are ordered from weakest (SF162 and CH293, respectively) to strongest (NL4-3 and CH198, respectively) median relative change (percent) in HLA-E MFI (y axis). The relative change (percent) in HLA-E MFI was calculated as follows: (MFI infected – MFI uninfected)/MFI uninfected \times 100. The data are represented as box-and-whisker plots indicating IQRs and medians. In total, six to nine healthy donors were tested; samples with <150 infected CD4⁺ T cells were excluded, resulting in varying numbers of donors per viral strain (*n* = 6 to 9).

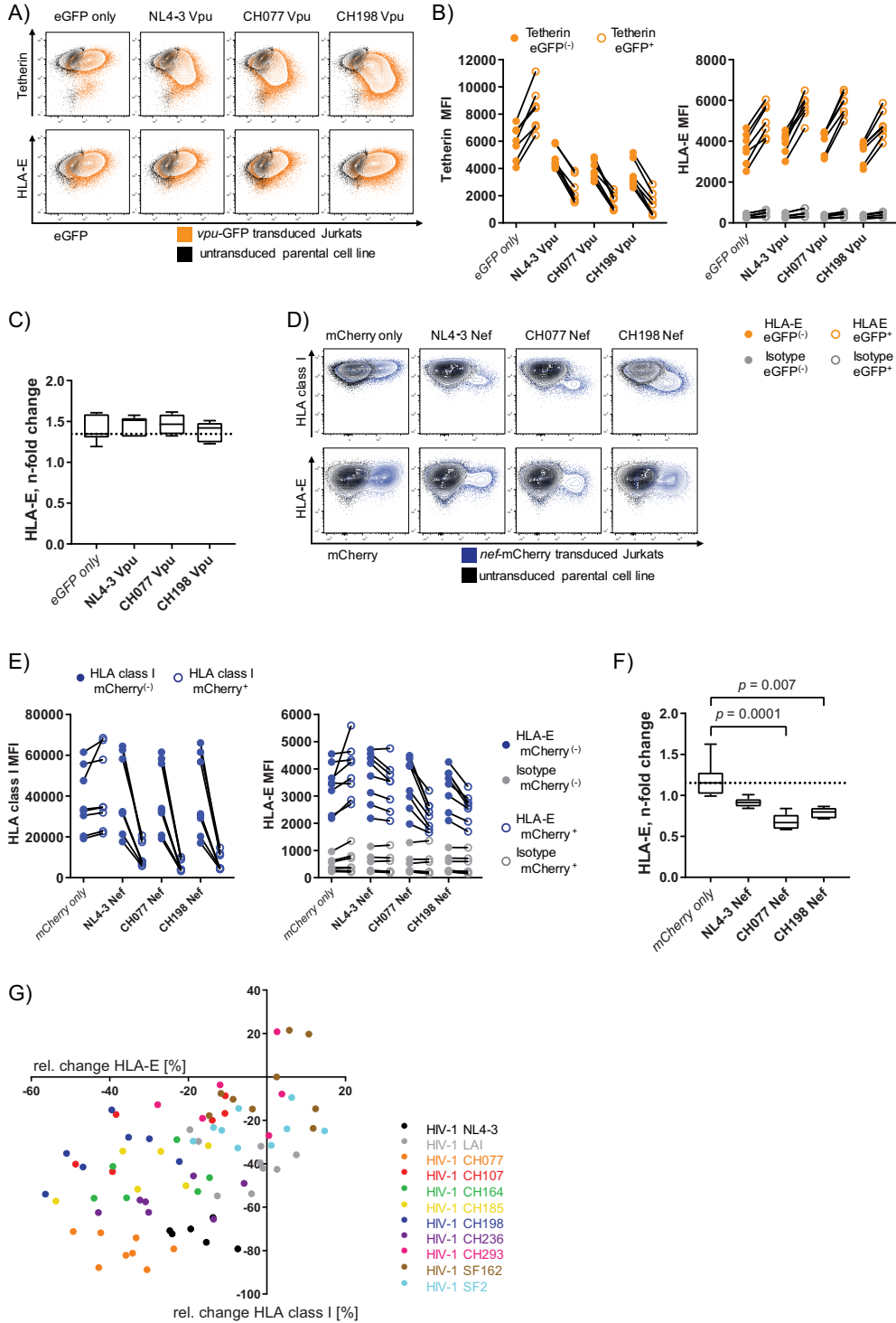


FIG 2 Nef proteins of HIV-1 CH077 and CH198 are sufficient to reduce HLA-E surface expression in Jurkat cells. (A) Flow plots displaying tetherin (top) and HLA-E (bottom) plotted against eGFP expression on vpu-eGFP-transduced Jurkat cells (orange). Untransduced Jurkat (Continued on next page)

staining levels more directly related to the highly expressed HLA-A and HLA-B molecules (32). Of note, in contrast to previous reports (48, 55), infection with HIV-1 SF162 did not reduce HLA-I surface levels in our experiments, a finding that may be ascribed to potential mutations accumulated during propagation of the viral stock (56). Employing a mixed-effect linear regression model, we observed that downregulation of HLA-I surface expression was significantly associated with reduced HLA-E surface levels on HIV-1-infected CD4⁺ T cells (for each +1% of HLA-E change, the mean surface HLA-I change was +0.72% [95% confidence interval, 0.44% to 0.99%; $P = 0.0001$]) (Fig. 2G). Color coding of HIV-1 strains indicated that this association was driven to a greater extent by differences between HIV-1 strains and less by interindividual donor differences upon infection with the same strain. CH077 (subtype B), which significantly downregulated HLA-E, displayed the greatest ability to reduce total HLA-I surface levels of all IMCs tested, in line with previous reports comparing subtype B and subtype C virus effects on HLA-I (57). Altogether, HIV-1 strains cluster according to their abilities to reduce HLA-E and total HLA-I levels from the surfaces of HIV-1-infected primary CD4⁺ T cells.

Nef targets the cytoplasmic tail of HLA-A*02:01 and HLA-E*01:03, but not that of HLA-C*04:01. HIV-1 Nef targets the cytoplasmic tail of HLA-A and -B, resulting in degradation of the HLA-I molecule (19). Here, we aimed to investigate the dependency of Nef on the cytoplasmic tail of HLA-E to mediate HLA-E surface downmodulation. To test this, we generated three recombinant Jurkat cell lines: (i) Jurkat-HLA-A2 cells, expressing the full HLA-A*02:01 molecule as a positive control; (ii) Jurkat-HLA-A2:E_{CYT} cells, expressing the extracellular and transmembrane domains of HLA-A2*02:01 fused to the cytoplasmic domain of HLA-E*01:03; and (iii) Jurkat-HLA-A2:C_{CYT} cells, expressing the extracellular and transmembrane domains of HLA-A*02:01 fused to the cytoplasmic domain of HLA-C*04:01 as a negative control. Since HLA-E is constitutively displayed at low levels on the cell surface and is highly dependent on the availability of peptides derived from signal sequences of other HLA-I, this approach allowed higher surface expression of the HLA-A2:E_{CYT} construct compared to physiological HLA-E expression. Surface expression of transduced HLA molecules was determined by staining for HLA-A2 on Jurkat cells, which naturally are negative for HLA-A2 (Fig. 3A). Jurkat-HLA-A2 and Jurkat-HLA-A2:E_{CYT} cells displayed similar levels of HLA-A2 surface expression, whereas surface HLA-A2 levels of Jurkat-HLA-A2:C_{CYT} cells were lower, as expected (58). Next, these cell lines were transduced with *nef*-mCherry constructs of NL4-3, CH077, and CH198, respectively. Surface expression levels of HLA-A2 in *nef*-transduced cells were compared to those in untransduced (mCherry⁻) cells of the same culture. To

FIG 2 Legend (Continued)

cells are overlaid in black to distinguish eGFP⁺ populations. (B) (Left) Graph displaying MFIs of tetherin staining on Jurkat cells. The dot-line graphs connect *vpu*-transduced (eGFP⁺, open orange dots) and eGFP⁻ cells of the same sample (filled orange dots) for all three constructs and the vector control (eGFP alone) as indicated on the x axis. (Right) Graph displaying HLA-E MFIs on *vpu*-eGFP⁺ (empty orange dots) and *vpu*-eGFP⁻ (filled orange dots) Jurkat cells from the same sample. The isotype control for HLA-E staining is depicted in gray. (C) *n*-fold change in HLA-E MFI following transduction with *vpu*-eGFP, calculated as the HLA-E MFI on *vpu*-eGFP⁺ divided by the HLA-E MFI on *vpu*-eGFP⁻ cells. The dotted line indicates the median *n*-fold change of the eGFP vector control. Differences were analyzed using Friedman test, and only significant FDR-adjusted *P* values are depicted. The data are derived from two independent experiments (once with three technical replicates and once with four technical replicates [$n = 7$]). (D) Flow plots depicting HLA-I (top) and HLA-E (bottom) surface levels plotted against mCherry (x axis) on *nef*-mCherry-transduced Jurkat cells (blue) and the untransduced parental cell line (black). (E) (Left) Graph displaying MFIs of HLA-I staining on Jurkat cells. The lines connect *nef*-transduced (mCherry⁺, empty blue dots) with mCherry⁻ cells from the same sample (filled blue dots) for all three constructs and the vector control. (Right) Graph displaying HLA-E MFIs derived from *nef*-mCherry⁻ cells (filled blue dots) and *nef*-mCherry⁺ cells (empty blue dots) from the same well. Isotype control staining for HLA-E is shown in gray. (F) Box-and-whisker plots (medians and IQRs) representing *n*-fold change in HLA-E MFI calculated as HLA-E MFI *nef*-mCherry⁺ divided by HLA-E MFI *nef*-mCherry⁻. The dotted line indicates the median *n*-fold change of the vector control. The data are derived from five independent experiments ($n = 8$, once with two and once with three technical replicates). Differences were analyzed using Friedman test; all *P* values shown are FDR adjusted, and only significant *P* values are displayed (<0.05). Staining was performed using antibody panel C (Table 2). (G) Association between HLA-E surface expression and HLA-I surface levels on HIV-1-infected primary CD4⁺ T cells. Each dot represents the relative change (percent) in the HLA-E MFI (clone 3D12) on the x axis and the relative change (percent) in HLA-I surface expression (clone W6/32) on the y axis for one specific donor/virus-strain combination. The relative change (percent) in MFI was calculated as follows: (MFI infected - MFI uninfected)/MFI uninfected $\times 100$. Color coding with the same color for the same HIV-1 strain used for infection of CD4⁺ T cells from different donors, as indicated on the right. The data are derived from the same experiments shown in Fig. 1 ($n = 6$ to 9).

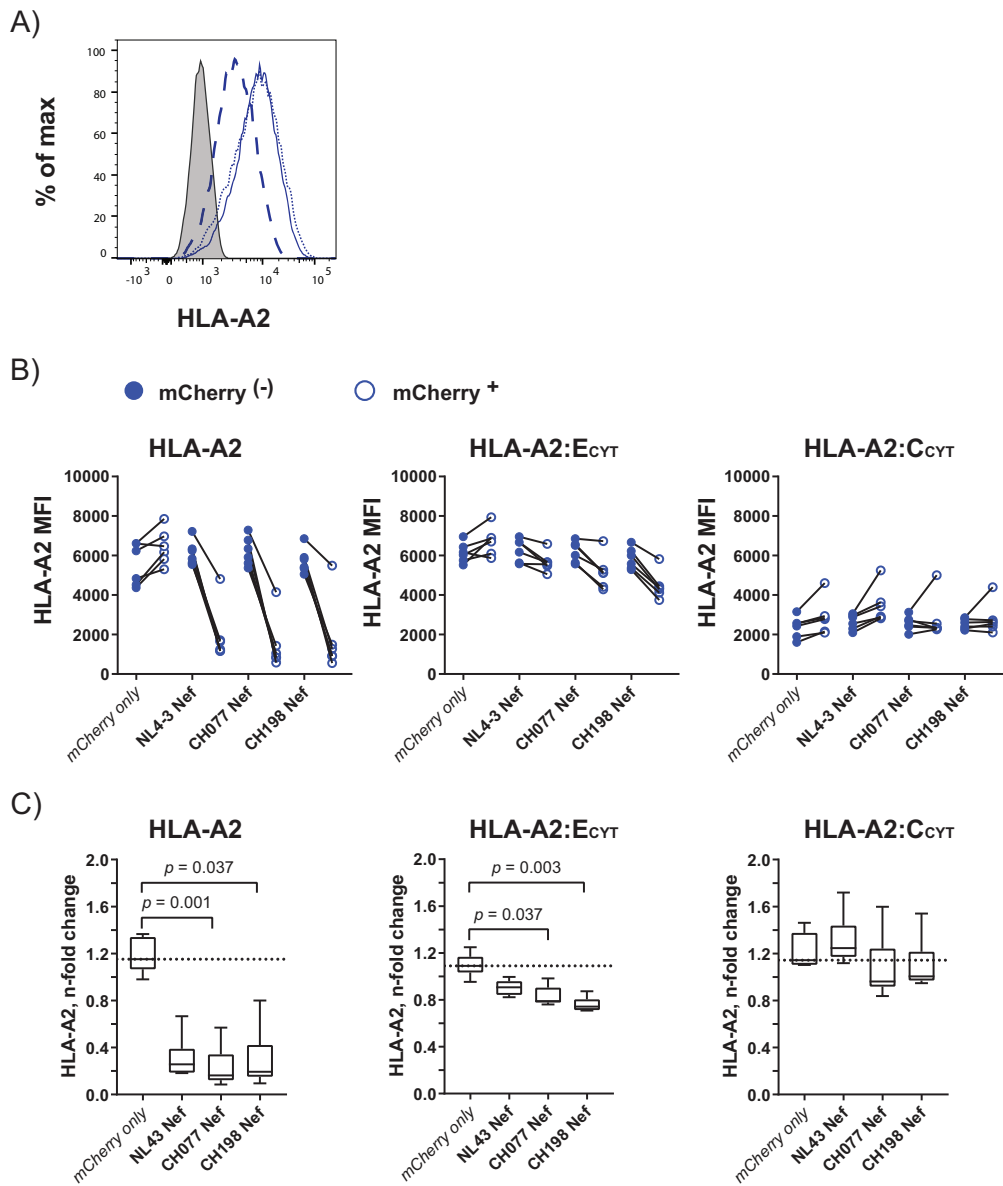


FIG 3 CH077 Nef and CH198 Nef target the cytoplasmic tail of HLA-A*02:01 and HLA-E*01:03, but not that of HLA-C*04:01. (A) Histograms displaying fluorescence intensities of HLA-A2 surface staining on Jurkat cells transduced with the full HLA-A*02:01 molecule (HLA-A2; dotted blue line) or the extracellular and transmembrane domains from HLA-A*02:01 fused to the cytoplasmic domain of HLA-E*01:03 (HLA-A2:E_{CYT}; blue line) or to the cytoplasmic domain of HLA-C*04:01 (HLA-A2:C_{CYT}; dashed blue line). The HLA-A2 expression of nontransduced parental Jurkat cells is depicted as a gray-shaded histogram. (B) MFIs of HLA-A2 staining in mCherry⁻ (filled blue dots) and mCherry⁺ (empty blue dots) Jurkat HLA-A2 (left), Jurkat HLA-A2:E_{CYT} (middle), and Jurkat HLA-A2:C_{CYT} (right) cells after transduction with *nef*-mCherry constructs or an mCherry vector control. Each dot represents one individual experiment, and each line connects MFIs from mCherry⁻ and mCherry⁺ cells within the same culture. (C) *n*-fold changes in HLA-A2 MFIs on mCherry⁺ and mCherry⁻ cells following transduction of Nef-derived constructs as indicated on the x axes, calculated as MFI HLA-A2 mCherry⁺ divided by MFI HLA-A2 mCherry⁻. The dotted line indicates the median *n*-fold change of the mCherry vector control for each cell line. Differences in HLA-A2 downregulation between *nef* constructs and the empty mCherry vector control were analyzed using Friedman test. Only significant FDR-adjusted *P* values are displayed ($P < 0.05$). Staining was performed with antibody panel D (Table 2). The data are derived from six independent experiments ($n = 6$).

control for nonspecific vector effects, a condition with mCherry alone was added. In agreement with previous studies, transduction of all three *nef*-mCherry constructs led to substantial downregulation of HLA-A2 surface levels in the Jurkat-HLA-A*02:01 cell line (Fig. 3B).

Lentiviral transduction of Jurkat-HLA-A2:E_{CYT} with mCherry control vector resulted in a minor increase in HLA-A2 (median *n*-fold change, 1.09 [IQR = 1.03 to 1.17]) (Fig. 3C, middle). In contrast, surface HLA-A2 levels of Jurkat-HLA-A2:E_{CYT} cells were significantly reduced when exposed to Nef derived from CH077 (median *n*-fold change, 0.79 [IQR = 0.78 to 0.9]) and CH198 (median *n*-fold change, 0.74 [IQR = 0.71 to 0.8]). NL4-3-derived Nef affected HLA-A2 surface staining only marginally (median *n*-fold change, 0.91 [IQR = 0.84 to 0.96]) (Fig. 3C). Notably, the Nef-mediated HLA-A*02:E_{CYT} downregulation did not reach the same extent as Nef-induced reduction of HLA-A*02:01 surface levels. In comparison, HLA-A2 surface levels of Jurkat-HLA-A2:C_{CYT} following transduction with Nef proteins did not display a significant difference from the mCherry control vector (mCherry, median *n*-fold change, 1.14 [IQR = 1.11 to 1.38]; NL4-3, median *n*-fold change, 1.25 [IQR = 1.17 to 1.44]; CH077, median *n*-fold change, 0.96 [IQR = 0.92 to 1.24]; CH198, median *n*-fold change, 1.01 [IQR = 0.97 to 1.22]). This indicated that no change is induced by Nef on expression of the HLA-A*02:01:C*04:01_{CYT} chimeric construct, in line with previous work (17). Altogether, the HLA tail swap experiments demonstrated the well-known ability of Nef to downregulate HLA-I via the cytoplasmic tail of HLA-A*02:01, but not HLA-C*04:01. The presence of the cytoplasmic tail of HLA-E was sufficient to allow HLA-E surface reduction, providing novel mechanistic insights into Nef-mediated HLA-E modulation.

Nef is necessary for downmodulation of HLA-E surface levels on HIV-1-infected primary CD4⁺ T cells. To validate the finding that HLA-E surface downregulation is mediated by Nef in primary CD4⁺ T cells, IMCs harboring Δ *nef* and Δ *vpu* mutants were used to generate mutant virus of the HIV-1 strains CH077 and CH198, with NL4-3 as a control (Fig. 4A). As Nef targets CD4 for degradation (22, 23), our previous gating strategy to identify HIV-1-infected cells was modified for CD4⁺ T cells infected with Δ *nef* mutant virus, where HIV-1-infected T cells were defined as HIV-1 p24⁺ tetherin^{dim} (Fig. 4B, top). The gating strategy for Δ *vpu* mutants is depicted in Fig. 4B (bottom). Loss of Nef and Vpu functions in mutant viruses was validated by analyzing the surface levels of HLA-I (downregulated by Nef) and tetherin (downregulated by Vpu). All Δ *nef* viruses exhibited a reduced ability to downregulate HLA-I surface expression compared to wild-type (WT) infection, demonstrating loss of Nef function (Fig. 4C). Furthermore, Δ *vpu* HIV-1 NL4-3 and CH077 derivatives were unable to downmodulate tetherin surface expression compared to their respective WT viruses (Fig. 4D). Interestingly, a reduction of tetherin levels—although less prominent than in WT infection—was still observed following infection with the Δ *vpu* mutant of CH198, indicating additional downregulation of tetherin independent of Vpu, potentially via Nef (59). In summary, we validated functional loss of Nef and Vpu in mutant viruses, enabling us to study the necessity of these HIV-1 accessory proteins for downregulation of HLA-E surface levels in primary T cells.

In assessing HLA-E levels following infection with viral mutants (Fig. 4E and F), we observed that HLA-E surface downregulation was completely lost following disruption of *nef* in CH198 (Fig. 4E), with a median relative change in HLA-E between Δ *nef* HIV-1-infected and uninfected bystander cells of +11% (IQR = -8% to +33%) compared to a median relative change in HLA-E of -50% in WT infection (IQR = -55% to -26%) (Fig. 4G). For CH077, disruption of *nef* resulted in diminished capacity of the mutant virus to downmodulate HLA-E surface expression (median relative change, -25% [IQR = -33% to -8%]) compared to the WT (-52% [IQR = -57% to -42%]). However, unlike the CH198 Δ *nef* mutant, loss of functional CH077-derived Nef did not fully restore HLA-E surface levels to the level of HIV-1-uninfected bystander CD4⁺ T cells (Fig. 4E). NL4-3 WT infection modulated HLA-E levels only marginally (Fig. 4A and E to G); therefore, no conclusions were drawn from changes in HLA-E surface levels of NL4-3 mutants compared to WT infection with regard to HLA-E downregulation.

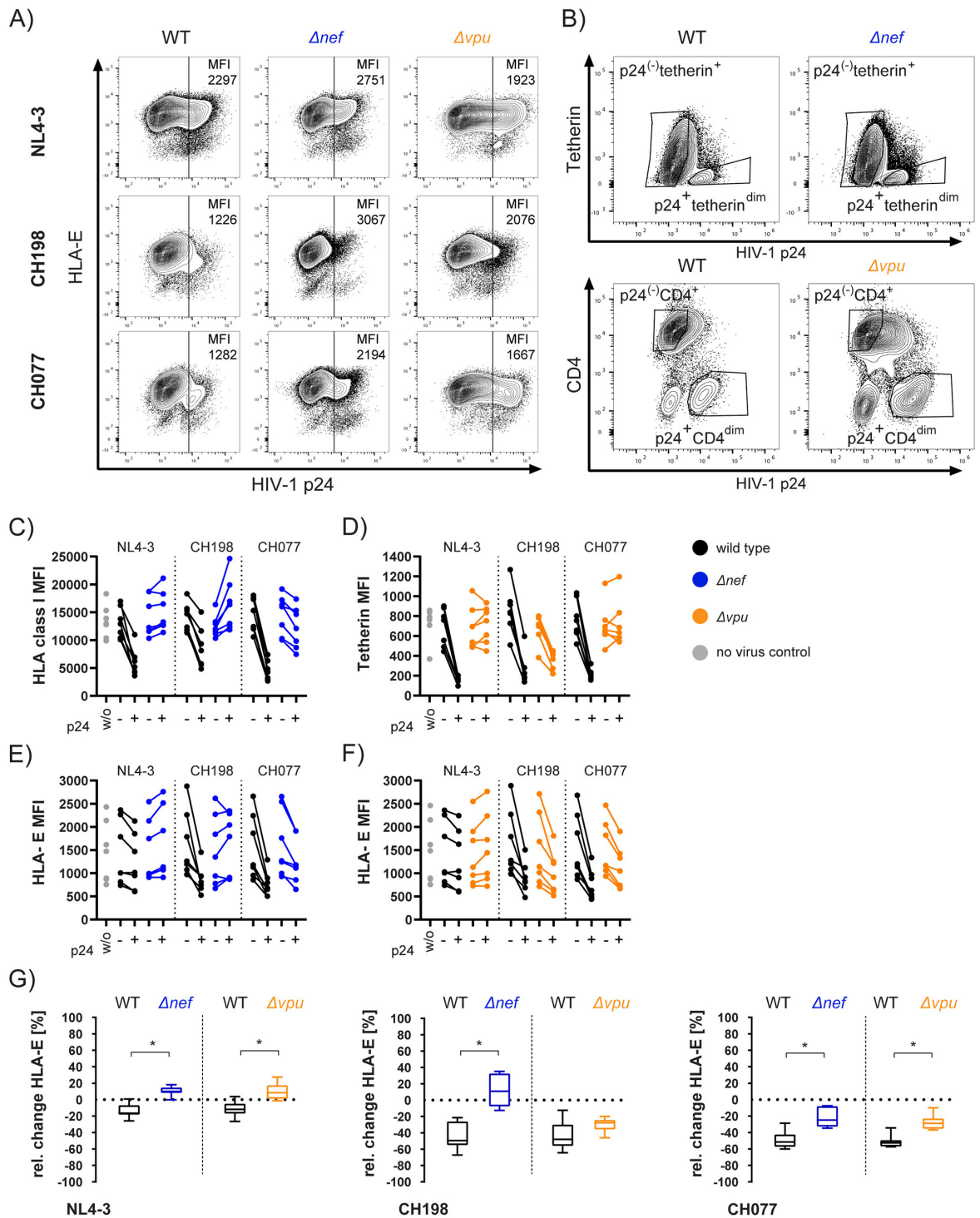


FIG 4 Δnef mutants exhibit less reduction of HLA-E surface levels on HIV-1-infected primary T cells. (A) Dot plots of primary CD4⁺ T cells infected with the WT and Δnef and Δvpu mutants of HIV-1 NL4-3 (top), HIV-1 CH198 (middle), and HIV-1 CH077 (bottom). HLA-E surface staining (clone 3D12) is plotted against HIV-1 p24. The HLA-E MFI is displayed for HIV-1 p24-positive cells (upper right corner). (B) Gating strategy for flow cytometric analyses of isolated CD4⁺ T cells infected

(Continued on next page)

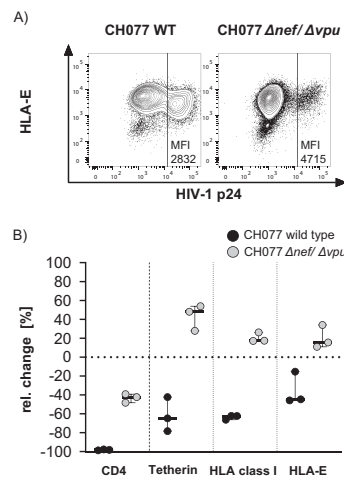


FIG 5 Loss of Nef and Vpu in CH077 disrupts HLA-E surface downregulation in HIV-1-infected primary T cells. (A) Dot plots of primary CD4⁺ T cells infected with CH077 WT or a mutant defective in HIV-1 accessory genes *nef* and *vpu* (CH077 Δ *nef*/ Δ *vpu*). HLA-E surface staining (clone 3D12) is plotted against HIV-1 p24 (clone KC57). The HLA-E MFI is displayed for the HIV-1 p24-positive cell subset (bottom right corner). (B) Relative changes (percent) in surface expression of the indicated proteins (x axis) upon infection of primary CD4⁺ T cells with CH077 WT (black dots) or the mutant virus CH077 Δ *nef* Δ *vpu* (gray dots). The MFI on HIV-1-infected CD4⁺ T cells (p24⁺ p24⁺) was compared to the MFI on HIV-1-uninfected bystander CD4⁺ T cells (p24⁻ p24⁻), and the relative change (percent) was calculated as follows: (MFI infected – MFI uninfected)/MFI uninfected \times 100. The data are presented as scatter plots with IQRs and medians and derived from three independent healthy donor infections ($n = 3$). Staining was performed with antibody panel E (Table 2).

Notably, for both primary HIV-1 strains, infection with the Δ *vpu* mutants still moderately reduced HLA-E levels on infected CD4⁺ T cells, albeit to a lesser degree than WT infection (Fig. 4F). The effect of Vpu knockout in CH198 was less pronounced (median relative change, –28% [IQR = –36% to –24%]), and—unlike the Δ *nef* mutant—did not fully restore HLA-E surface levels to HLA-E levels on uninfected bystander cells (Fig. 4G). However, the effect of CH077-derived Vpu knockout (median relative change, –29% [IQR = –35% to –23%]) was similar to the effect caused by loss of Nef protein in CH077 (–25% [IQR = –33% to –8%]) and significant compared to CH077 WT (–52% [IQR = –57% to –49%]) (Fig. 4G). Therefore, to investigate a potential additive effect of Nef and Vpu on HLA-E surface modulation, we tested the effect of a double mutant (Δ *vpu* Δ *nef*) of CH077 on HLA-E surface levels of infected primary T cells (Fig. 5A). As the CH077 Δ *vpu* Δ *nef* mutant was impaired in its ability to downregulate CD4, tetherin, and HLA-I (Fig. 5B), we stained with two different p24 antibodies (clone KC57 in fluorescein isothiocyanate [FITC] and clone 28B7 in allophycocyanin [APC]) and gated on the double-positive population, as described previously

FIG 4 Legend (Continued)

with Δ *nef* (top) or Δ *vpu* (bottom) mutants following doublet and dead cell exclusion. To identify the HIV-1-infected cell subset, CD4 or tetherin was plotted against HIV-1 p24 staining. HIV-1-infected T cells were defined as p24⁺ tetherin^{dim} for Δ *nef*-infected cells and as p24⁺ CD4^{dim} for Δ *vpu* virus infection. Staining was performed with antibody panel B (Table 2). (C and D) Functional loss of Nef and Vpu in HIV-1 mutants was validated by analyzing surface expression of HLA-I (C) and tetherin (D). To allow comparison of mutant viruses with the WT, CD4⁺ T cells infected with WT virus were gated as the mutant virus of interest. The dot-line graphs display the respective MFIs for HIV-1-uninfected bystander cells and HIV-1-infected CD4⁺ T cells from the same donor. Non-virus-exposed CD4⁺ T cells (w/o) are depicted in gray as a control. (E and F) MFIs of HLA-E following infection with Δ *nef* (E) or Δ *vpu* (F) mutants compared to the WT for HIV-1 NL4-3 (left), CH198 (middle), and CH077 (right). The data are represented as dot-line graphs displaying MFIs of HIV-1-uninfected, bystander, and HIV-1-infected subsets as indicated with + and – on the x axes. Non-virus-exposed CD4⁺ T cells (w/o) are depicted in gray as a control. (G) Relative change in HLA-E MFIs on the surfaces of Δ *nef*-infected (blue), Δ *vpu*-infected (orange), or WT-infected (black) CD4⁺ T cells. The HLA-E MFI on HIV-1-infected CD4⁺ T cells was compared to the HLA-E MFI on HIV-1-uninfected bystander CD4⁺ T cells, and the relative change (percent) was calculated as follows: (MFI infected – MFI uninfected)/MFI uninfected \times 100. The box-and-whisker plots display medians and IQRs ($n = 7$). Differences between WT and mutant viruses were analyzed using the Wilcoxon signed rank test for paired data (two tailed). Significant FDR-adjusted P values are marked with asterisks (*, $P = 0.037$); nonsignificant values ($P > 0.05$) are not shown in the graph. The data are derived from *in vitro* HIV-1 infection of primary CD4⁺ T cells from seven healthy donors ($n = 7$). MFIs are derived from measurements at two different analyzers (LSR Fortessa and FACSAria Fusion).

(60). Comparison of HIV-1-infected T cells (p24⁺ p24⁺) to uninfected bystander T cells (p24⁻ p24⁻) showed that infection with the double mutant defective in Nef and Vpu resulted in elevated HLA-E levels (Fig. 5B). Loss of Nef and Vpu completely abrogated HLA-E downregulation compared to the WT. In conclusion, these data show that the accessory HIV-1 proteins Nef and, to some extent, Vpu contribute to HLA-E downregulation in primary CD4⁺ T cells following HIV-1 infection.

DISCUSSION

HIV-1 has evolved an outstanding ability to escape immune cell recognition by controlling the display of surface ligands on HIV-1-infected cells (61–64). The concept of HLA-A and -B being selectively downregulated to avoid cytotoxic-T-cell recognition of HIV-1-infected cells while leaving HLA-C and -E on the surface to interact with inhibitory NK cell receptors was recently revised when primary virus strains were shown to downregulate HLA-C (17). Here, we investigated the impact of eleven HIV-1 strains on HLA-E surface levels upon infection of primary T cells. Unlike cell line-adapted viruses, a subset of primary strains—CH236, CH077, and CH198—showed significant downregulation of HLA-E. Transduction of CH077- and CH198-derived Nef into a T-cell line was sufficient to reduce HLA-E surface levels, also when only the cytoplasmic tail of HLA-E was present. Mutational analyses confirmed that lack of functional Nef reduced the efficiency of HLA-E downmodulation in primary T cells infected with mutants of CH077 and CH198. Notably, in primary CD4⁺ T cells, loss of Vpu in CH077 resulted in a lesser degree of HLA-E downmodulation, indicating that HLA-E downregulation can be multifactorial during HIV-1 infection.

Infection with HIV-1 primary strains reduced HLA-E surface staining on infected CD4⁺ T cells, albeit to varying degrees. In our study, HIV-1 strains clustered according to their abilities to modulate HLA-E and HLA-I expression. A previous study reported that this was not the case for HLA-C (32), in line with downregulation of HLA-A, -B, and -E being mediated by Nef and HLA-C downregulation being mediated by Vpu. Earlier work demonstrated that the property of Nef to downregulate HLA-I surface levels was decreased in viruses obtained from individuals who progressed to AIDS, indicating no selective advantage to maintain this Nef function at later stages of infection, when immune pressure is impaired (65). This may potentially explain why most cell line-adapted viral strains, which are adapted to conditions without immune pressure present and/or were isolated from AIDS patients (66), do not modulate HLA-E surface levels upon infection. Accordingly, the HIV-1 primary strain CH293, which was cloned from an HIV-1-infected individual at the chronic stage of infection (67), displayed only minor downregulation of HLA-I and no reduction in HLA-E surface expression. Increased HLA-E expression on CD4⁺ T cells from HIV-1-infected subjects has been shown to correlate with loss of CD4⁺ T cell counts (46). No difference in HLA-E (and also HLA-C) surface levels on infected CD4⁺ T cells was observed following HIV-1 reactivation from viremic patients (47). Interestingly, Bachtel et al. showed that the magnitude of HLA-C downregulation between HIV-1 strains varies to a higher degree than the overall well-preserved extent of HLA-A downregulation (28). Nattermann et al. reported elevated HLA-E levels upon HIV-1 infection when testing four HIV-1 isolates cultured from PBMCs of HIV-1-infected individuals (41). Together with the data presented here, this indicates that HLA-E downregulation may vary substantially between HIV-1 strains. Future studies will be needed to extend this investigation of HLA-E modulation to a larger panel of viruses, including IMCs sampled from different stages of HIV-1 infection.

In order to assess the mechanisms leading to reduced HLA-E expression by HIV-1 primary strains, we next investigated the role of the HIV-1 accessory proteins Nef and Vpu. Disruption of *nef* resulted in increased HLA-E surface levels compared to WT infection. Additionally, transduction of the Jurkat T-cell line with Nef derived from CH077 and CH198 was sufficient to reduce HLA-E surface levels. Early studies reported that Nef did not bind to the cytoplasmic tail of HLA-E (18, 61), but Nef in these initial studies was derived from NL4-3. Here, we exchanged the cytoplasmic tail of HLA-A*02:01 with that of HLA-E*01:03 and demonstrated that CH077- and CH198-derived

Nef proteins are able to disrupt HLA-E surface expression via its cytoplasmic tail. Recruitment of the adaptor protein AP-1 by Nef to the cytoplasmic tail of HLA-I, which then reroutes trafficking of newly synthesized HLA-A and -B molecules (19), has been established as an important mechanism of HLA-I downregulation across a range of cell types, including primary T cells (reviewed in reference 68). Other mechanisms include increased turnover of HLA-I molecules from the cell surface (69) and coatamer complex (β -COP)-dependent lysosomal degradation (70). Three amino acids in the HLA-I cytoplasmic tail are critical for binding of AP-1 (Y₃₂₀, A₃₂₄, and D₃₂₇) (71). The glutamic acid at position 324 alone (present in HLA-E) was shown to prevent coimmunoprecipitation of AP-1 (in the presence of NL4-3 Nef) with a mutated cytoplasmic tail of HLA-A2 (71). We did not observe a significant difference in Nef-mediated downregulation between a mutated cytoplasmic tail of HLA-E (HLA-A2:E_{CYT(Y320C, D327N)}) and the HLA-A:E_{CYT} construct in Jurkat cells (data not shown). Altogether, this indicates that involvement of AP-1 in Nef-dependent downregulation of the cytoplasmic tail of HLA-E is less likely, at least with regard to the known pathway targeting HLA-A and -B molecules. Further experimental data—including biochemical approaches, functional knockout of AP-1, and testing of a larger Nef panel—is needed to understand the mechanism of Nef-dependent HLA-E downregulation.

Structural studies have elucidated motifs in Nef that are critical for downregulation of HLA-A and -B. Residues that stabilize the transient interaction of AP-1 with the cytoplasmic tail of HLA-A or -B are (i) residues in the amino-terminal proximal α -helix, in particular, methionine at position 20 (M₂₀) and tryptophan at position 13 (W₁₃); (ii) a polyproline helix, P_{69/72/75/78} (PXXP motif); and (iii) an acidic cluster, E₆₂₋₆₅ (72). In addition, an RXR₁₇₋₁₉ motif in the proximal α -helix was reported to enhance HLA-I degradation via the β -COP-mediated pathway (70). M₂₀, which is the consensus subtype B amino acid, was replaced with consensus subtype C isoleucine (I₂₀) in the majority of subtype C HIV-1 strains tested here (namely, CH293, CH107, CH164, and CH198). Stronger downregulation of HLA-I by subtype B viruses (as observed for CH077) has been previously associated with this amino acid substitution (57, 73). W₁₃, the PXXP motif, the RXR₁₇₋₁₉ motif, and at least two acidic amino acids in the acidic cluster were present in all HIV-1 Nef sequences tested, indicating that sequence diversity in these particular motifs does not explain the variability in HLA-E and HLA-I downregulation observed between the investigated HIV-1 strains. However, previous studies highlighted the great difficulty of assigning functional Nef properties without considerable experimental data (74). Also, the ability to downregulate HLA-I was conserved in a variety of SIV- and HIV-derived Nef proteins, regardless of high sequence diversity in these regions (50). Here, we provide first evidence in a T-cell line that the HIV-1 protein Nef derived from two primary HIV-1 strains interferes with HLA-E surface expression by targeting its cytoplasmic tail via yet-unknown sequence motifs.

Despite Vpu not being sufficient to downregulate HLA-E in a Jurkat T-cell line, CH077-derived Vpu was partially necessary for HLA-E surface reduction in HIV-1-infected primary CD4⁺ T cells. There are several potential explanations. First, Jurkat T cells, as a tumor cell line, lack certain cellular factors (e.g., defects in T-cell receptor [TCR] signaling and O-linked glycosylation) (75), one of which may be necessary for Vpu to exert its effect on HLA-E. The rate of cellular HLA-I trafficking varies in general depending on the investigated cell type and may also be a contributing factor (68). Second, there may be an additive effect of HIV-1 (accessory) proteins in downregulating HLA-E surface levels, as was described for the downregulation of CD4 (76) and CD1d (77). In the case of the nonclassical HLA-I ligand CD1d, Vpu impairs recycling from endosomal compartments (77), whereas Nef potentially increases CD1d surface internalization (78), resulting in a cooperative effect of the two accessory proteins in reducing CD1d expression. Here, infection of primary CD4⁺ T cells with a double mutant of HIV-1 CH077 defective in *nef* and *vpu* fully disrupted tetherin, HLA-I, and HLA-E surface downregulation observed in WT infection, and HLA-E surface levels of infected primary T cells were slightly increased compared to HLA-E levels of HIV-1 uninfected bystander CD4⁺ T cells. In contrast, CD4 is modulated by three HIV-1

accessory proteins (Nef, Vpu, and Env) (76), and, in agreement with this, loss of Nef and Vpu did not fully restore CD4 surface levels. Finally, downregulation of HLA-E in the presence of CH077 Vpu in primary CD4⁺ T cells may be explained by a host cellular response to HIV-1 replication. A few studies have reported that endoplasmic reticulum (ER) stress results in posttranscriptional downregulation of surface HLA-E, but not of classical HLA-I levels. It was postulated that this selective loss of HLA-E may be due to HLA-E having a less stable tertiary structure than other classical HLA-I molecules and, thus, a shorter half-life at the plasma membrane (79). So far, few studies have investigated ER stress specifically in HIV-1, but it has been shown that an unfolded-protein response can be detected following *in vitro* HIV-1 infection of primary PBMCs (80). In conclusion, in addition to a direct effect of Nef on the cytoplasmic tail of HLA-E, Vpu may exert effects on HLA-E surface expression in a cell context-dependent manner.

Importantly, the effect of HLA-E downregulation by HIV-1 on the antiviral immune response remains to be investigated. In humans, no HLA-E-restricted T cells have been identified in HIV-1 infection to date. Human NKG2A⁺ NK cells show the highest functionality among NK cell subsets against HIV-1-infected cells (44), and high HLA-E levels result in impaired NKG2A⁺ NK cell activity (34). Perhaps a beneficial effect of HLA-E downregulation for HIV-1 is avoiding recognition via the activating NK cell receptor, NKG2C, which also recognizes HLA-E. Interestingly, SIV infection of rhesus macaques has been shown to induce an expansion of NK cells expressing NKG2C (81), and there is a high level of conservation of HLA-E and major histocompatibility complex class E (MHC-E) between humans and nonhuman primates (49). However, the role of NKG2C-mediated NK cell responses in HIV-1-infected cells is still unclear. Our finding that a subset of HIV-1 primary strains can downregulate HLA-E levels on HIV-1-infected primary CD4⁺ T cells may have implications for immune control of HIV-1. Further studies will be required to assess the functional impact of reduced HLA-E levels on HIV-1-infected CD4⁺ T cells for both innate immune recognition by NKG2A and/or NKG2C on NK cells and adaptive immune recognition by cytotoxic CD8⁺ T cells.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement. PBMCs were obtained from healthy donors of the Healthy Cohort Hansestadt Hamburg (HCHH). The study was approved by the Ethical Committee of the Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, and all donors gave written informed consent.

Cell culture. Jurkat cells (clone E6-1; American Type Culture Collection [ATCC]) are a T lymphocytic cell line first derived from a child suffering from leukemia (82). MT-4 cells (a lymphocytic laboratory-stable cell line) were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (83). Both nonadherent cell lines were cultured in RPMI 1640 L-glutamine medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated superior fetal bovine serum (FBS) (Biochrom AG). Adherent HEK 293T cells were obtained from ATCC and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Biochrom AG). All cell lines were maintained at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity.

Production of HIV-1 stock from infectious molecular clones. Plasmids harboring the proviral genome of infectious molecular clones representing the HIV-1 primary strains CH077, CH293, CH198, CH107, CH164, CH185, and CH236 were kindly provided by the Hahn laboratory; IMCs of CH077, CH198, CH107, CH164, CH185, and CH236 were cloned in the Kappes laboratory (67, 84, 85) (Table 1 lists viral characteristics). pCH107.c was constructed by the Kappes laboratory following a strategy essentially as described previously (67). Briefly, the transmitted/founder (T/F) nucleotide sequence from subject 705010107 was inferred essentially as described. The entire proviral genome was then synthesized in 3 overlapping fragments; the two overlaps encompassed naturally occurring unique restriction sites (EcoRV and DraIII); MluI and BamHI sites were added directly upstream and downstream of the 5' and 3' ends, respectively, of the proviral coding region. The three fragments were then ligated consecutively into pUC57 via the unique restriction sites. The resulting plasmid DNA of pCH107.c was sequence confirmed to represent the inferred T/F nucleotide sequence. The following plasmids encoding infectious molecular clones were used to produce full-length replication-competent HIV-1 virions and the respective mutants via transfection: pBR_HIV-1 NL4-3 (WT and Δnef and Δvpu mutants), pCH077.t (WT, Δnef , Δvpu , and $\Delta nef \Delta vpu$), pCH198.c (WT, Δnef , and Δvpu). The *vpu* and *nef* mutants were generated through insertion of premature stop codons using site-directed mutagenesis (86). For data included in Fig. 1, pNL4-3 (National Institutes of Health [NIH]; catalog no. 114, lot 140136) was used (87). Twelve micrograms of plasmid was diluted in Opti-MEM (Life Technologies) and used for Lipofectamine 2000-based transfection (Invitrogen) of HEK 293T cells in a T75 flask at 90% confluence according to the manufacturer's protocol. Following 4 h of incubation, the medium was carefully removed and exchanged for fresh culture medium. The lentiviral supernatant was collected at 48 to 72 h posttransfection. For purity, the

TABLE 1 Characteristics and origins of HIV-1

Group	Virus	Subtype	Source (reference)	Fiebig stage ^a	Coreceptor
Cell line-adapted virus	SF162	B	Viral stock (isolated from cerebrospinal fluid of an individual diagnosed with AIDS) (66)	NA	CCR5
	LAI (BRU)	B	Viral stock (first laboratory-isolated strain from an AIDS patient; 1983) (92, 93)	NA	CXCR4
	SF2	B	Viral stock (patient isolate from 1983) (94, 95)	NA	CXCR4/CCR5
	NL4-3	B	Infectious molecular clone (chimera of HIV-1 NY5 isolate [5'] and the HIV-1 LAV isolate [3']) (87)	NA	CXCR4
HIV-1 primary strains	CH293	C	Infectious molecular clone (chronic) (67)	NA	CCR5
	CH107	C	Infectious molecular clone (founder)	V	Unknown
	CH164	C	Infectious molecular clone (founder) (67)	IV	CCR5
	CH185	C	Infectious molecular clone (founder) (67)	I/II	CCR5
	CH236	C	Infectious molecular clone (founder) (84)	II/III	CCR5
	CH077	B	Infectious molecular clone (founder) (85)	II/III	CXCR4/CCR5
	CH198	C	Infectious molecular clone (founder) (67)	I/II	CCR5

^aThe Fiebig classification is used to describe six different stages of early HIV infection based on the results of standard diagnostic assays (99). NA, not applicable.

supernatant was centrifuged at $200 \times g$ for 5 min and filtered with a Whatman 0.45- μ l syringe filter (Sigma-Aldrich). Lentiviral aliquots were stored at -80°C until further use.

HIV-1 SF162 (catalog no. 276; lot 098300), HIV-1 SF2 (catalog no. 2525; lot 140081), and HIV-1 LAI (BRU) (catalog no. 2522; lot 110239) isolates were obtained through the NIH AIDS Reagent Program. Viral stocks were further propagated in MT-4 cells (1×10^6 cells/ml) were infected with HIV-1 (10 ng of p24) by spinfection (2 h at 37°C ; $1,200 \times g$) and then cultured for 72 to 96 h at 37°C , 5% CO_2 at 5×10^5 cells/ml before staining for HIV-1 p24 expression. The virus supernatant was harvested, centrifuged at $200 \times g$ for 5 min, and filtered with a Whatman 0.45- μ l syringe filter (Sigma-Aldrich).

Isolation and activation of CD4^+ T cells. PBMCs were isolated from EDTA-anticoagulated blood of healthy donors via density gradient centrifugation using Bicol (Biochrom). Subsequently, CD4^+ T cells were isolated from PBMCs through a negative-selection strategy using an EasySep human CD4^+ T-cell enrichment kit (Stem Cell Technology) according to the manufacturer's protocol. The cells were cultured at 3×10^6 cells/ml in RPMI containing 10% heat-inactivated FBS and 100 IU/ml human recombinant interleukin 2 (hrIL-2) (Peprotech). Isolated CD4^+ T cells were activated with anti- $\text{CD3}/\text{CD28}$ -coupled magnetic beads (Dynabeads; Human T-Activator $\text{CD3}/\text{CD28}$ [ThermoFisher]) at a bead-to-cell ratio of 1:1. The HIV-1 primary strains tested here largely depended on the CCR5 coreceptor for efficient entry (88), which has reduced expression after T-cell receptor triggering (89). In order to allow CCR5 reexpression, the beads were magnetically removed after 72 h, and the activated CD4^+ T cells were cultured in fresh IL-2-containing medium for 72 h prior to HIV-1 infection.

HIV-1 infection of primary CD4^+ T cells. CD4^+ T-cell blasts were resuspended in viral supernatant or cell culture medium (no-virus control) to perform spinfection for 2 h at $1,200 \times g$ and 37°C with acceleration/deceleration at 3. After spinfection, the medium was replaced with fresh RPMI supplemented with 10% FBS and IL-2 (100 U/ml). The infected CD4^+ T cells were cultured at 37°C , 5% CO_2 at a concentration of 3×10^6 cells/ml. HLA-E surface expression was assessed at 72 h postinfection.

Generation of Jurkat-HLA-A2 cell lines. Gene constructs for HLA-A*02:01_{EC2-TMD-CYT} (HLA-A2), HLA-A*02:01_{EC2-TMD}HLA-E*01:03_{CYT} (HLA-A2:E_{CYT}), and HLA-A*02:01_{EC2-TMD}HLA-C*04:01_{CYT} (HLA-A2:E_{CYT}) were ordered from GeneArt (Life Technologies). All constructs included the mammalian Kozak sequence (GCCACC) and were subjected to mammalian gene optimization. The constructs were cloned into the lentiviral vector pSIP (containing a spleen focus-forming virus [SFFV] promoter driving the gene of interest and an internal ribosomal entry site [IRES]), followed by a puromycin resistance gene (vector kindly provided by Thomas Pertel), using NEBuilder HiFi DNA assembly master mix (NEB). To produce lentiviral-like particles, HEK 293T cells (ATCC) were transfected using Lipofectamine 3000 (Life Technologies), a vesicular stomatitis virus G (VSV-G) envelope vector (pHEF-VSVg; NIH AIDS Reagent Program), an HIV-1 gag-pol packaging vector (psPAX2; NIH AIDS Reagent Program), and the lentiviral transfer vector encoding the specific HLA-A2 construct. After 72 h, the lentiviral supernatant was harvested and filtered. The filtered supernatant was used for transduction of Jurkat E6.1 cells, which were subsequently selected with puromycin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich).

Generation of virus-like particles containing nef or vpu of CH077, CH198, and NL4-3. Gene constructs of nef derived from NL4-3 and CH077 were ordered from GeneArt (Life Technologies). The constructs included the mammalian Kozak sequence, GCCACC, and EcoRI/NotI digestion sites. The nef gene derived from CH198 and vpu genes derived from NL4-3, CH077, and CH198 were amplified from the WT plasmids pBR-amp HIV-1 NL4-3, pCH077.t, and pCH198.c using primers with the Kozak sequence and EcoRI/NotI digestion sites. The nef constructs were cloned into the lentiviral vector pLVX-EF1 α -IRES-mCherry (Clontech) containing an EF1 α promoter and the IRES-driven fluorescent marker mCherry. The vpu constructs were cloned into the Lego-iG2 vector (90) (kindly provided by Boris Fehse) containing an SFFV promoter and the IRES-driven fluorescent marker eGFP.

Stimulation and lentiviral transduction of Jurkat cells with nef constructs. The resulting nef- or vpu-containing transfer vectors were transfected into HEK 293T cells together with a VSV-G envelope vector and the HIV-1 gag-pol packaging vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). As a vector

TABLE 2 Antibodies used in this study

Antibody	Clone	Fluorophore ^a	Manufacturer	Catalog no.	RRID ^b
Panel A					
LIVE/DEAD	Zombie NIR	APC Cy7	Biolegend	423105	
CD4	RPA-T4	BV711	Biolegend	300558	AB_2564393
CD3	UCHT1	BUV395	BD Biosciences	563546	AB_2744387
HLA class I	W6/32	APC	ThermoFisher Scientific	17-9983-42	AB_10733389
Tetherin	RS38E	PE	Biolegend	348406	AB_10564402
HLA-E	3D12	BV421	Biolegend	342612	AB_2721525
IgG1(κ) isotype control	MOPC 21	BV421	Biolegend	400158	AB_11150232
HIV-1 p24	KC57	FITC	Coulter	6604665	AB_1575987
Panel B					
LIVE/DEAD	Zombie NIR	APC Cy7	Biolegend	423105	
CD4	OKT4	BV711	Biolegend	317439	AB_11219404
HLA class I	W6/32	Pacific Blue	Biolegend	311418	AB_493669
Tetherin	RS38E	APC	Biolegend	348410	AB_2067121
HLA-E	3D12	PE	Biolegend	342603	AB_1659250
HIV-1 p24	KC57	FITC	Coulter	6604665	AB_1575987
CD3	UCHT1	BUV395	BD Biosciences	563546	AB_2744387
CD8	RPA-T8	BV605	Biolegend	301040	AB_2563185
IgG1(κ) isotype control	MOPC 21	PE	Biolegend	400111	AB_241956
Panel C					
LIVE/DEAD	Zombie NIR	APC Cy7	Biolegend	423105	
HLA-E	3D12	BV421	Biolegend	342612	AB_2721525
IgG1(κ) isotype control	MOPC-21	BV421	Biolegend	400158	AB_11150232
CD3	UCHT1	BUV395	BD Biosciences	563546	AB_2744387
Tetherin	RS38E	PE	Biolegend	348406	AB_10564402
HLA class I	W6/32	APC	ThermoFisher Scientific	17-9983-42	AB_10733389
Panel D					
LIVE/DEAD	Near-IR	APC-Cy7	ThermoFisher Scientific	L34975	
CD3	UHCT1	BUV737	BD Biosciences	564307	AB_564307
HLA-A2	BB7.2	FITC	Biolegend	343304	AB_1659245
Panel E					
LIVE/DEAD	Near-IR	APC-Cy7	ThermoFisher Scientific	L34975	
CD4	RPA-T4	BV711	Biolegend	300558	AB_2564393
CD3	UCHT1	BUV395	BD Biosciences	563546	AB_2744387
HLA class I	W6/32	PE-Cy7	Biolegend	311430	AB_2561617
Tetherin	RS38E	PE	Biolegend	348406	AB_10564402
HLA-E	3D12	BV421	Biolegend	342612	AB_2721525
IgG1(κ) isotype control	MOPC 21	BV421	Biolegend	400158	AB_11150232
HIV-1 p24	KC57	FITC	Coulter	6604665	AB_1575987
HIV-1 p24	28B7	APC	Medimabs	MM-0289-APC	

^aPE, phycoerythrin.^bRRID, research resource identifier.

control, transfection was performed using vectors without *nef* or *vpu* but containing the fluorescent marker. After 72 h, the supernatant containing lentiviral particles was collected and filtered as described above. The lentiviral particles were subsequently used to transduce Jurkat cells for stable expression of *nef* or *vpu* genes. Lentivirus-transduced Jurkat cells were stimulated overnight with 100 U/ml IFN- γ (PeproTech; catalog no. 300-02; lot no. 121527) prior to flow cytometric assessment of HLA-E surface levels. Lentivirus *nef*-transduced Jurkat-HLA-A2 cell lines were analyzed 72 h after transduction for downregulation of HLA-A2.

Flow cytometric assessment of surface markers and intracellular staining. All the antibody information used for flow cytometry staining is listed in Table 2, and the respective panel used is indicated in each figure legend. The following protocol was used for surface staining: 1×10^6 cells were resuspended in the respective LIVE/DEAD marker for 20 min at 4°C to allow LIVE/DEAD discrimination. After a washing step, the cells were resuspended in 100 μ l of surface antibody mixture for 30 min at 4°C. For intracellular detection of HIV-1 p24 Gag, cells were fixed and permeabilized using a Cytofix/Cytoperm solution kit (BD Biosciences) following the manufacturer's instructions but adding an additional step of 20 min incubation in permeabilization buffer prior to intracellular staining (Fig. 1). For the experiments shown in Fig. 4, Fix & Perm cell permeabilization kit (ThermoFisher) was used following the manufacturer's instructions for intracellular detection of HIV-1 p24. The cells were subsequently washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). In assays that did not include intracellular staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min prior to flow cytometric analysis. Flow cytometric

acquisition was performed using a BD LSR Fortessa cell analyzer and BD FACS Diva v.7.0. software or a BD FACS Aria fusion flow cytometer with BD FACS Diva v.7.0. software.

Data analysis, software, and statistics. FlowJo software (v.10.1) was used to analyze all acquired flow cytometry data. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (8) and SAS (v.9.3). The relative change (percent) was calculated as follows: (MFI infected – MFI uninfected)/MFI uninfected \times 100; *n*-fold change was calculated as follows: MFI transduced divided by MFI untransduced. To assess the association of relative change in HLA-E surface (percent) with the relative change in HLA-I content (percent), a mixed-effect linear regression model with a random intercept was employed, which takes into account the intradonor correlation (multiple measurements per donor). The data are reported as median and IQR (1st quartile to 3rd quartile) or in figures are displayed as median and IQR. For statistical testing, nonparametric paired tests were employed (the specific tests are indicated in the figure legends), and the test multiplicity for all tests was adjusted using the original false-discovery rate (FDR) method of Benjamini and Hochberg (91). All reported *P* values are FDR adjusted, and *P* values of <0.05 are significant.

Accession number(s). GenBank accession numbers are as follows: NL4-3, [AF324493.2](#); CH293, [KC156216.1](#); CH107, [MN202471](#); CH164, [KC156127.1](#); CH185, [KC156129.1](#); CH236, [MN202472](#); CH077, [JN944909.1](#); CH198, [KC156130.1](#).

ACKNOWLEDGMENTS

The following reagents were obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 SF162 and HIV-1 SF2 MC from Jay Levy, HIV-1 LAI from Jean-Marie Bechet and Luc Montagnier, HIV-1 NL4-3 infectious molecular clone (pNL4-3) from Malcolm Martin, MT4-cells from Douglas Richman (83, 96, 97), psPAX2 from Didier Trono, and pHEF-VSVG from Lung-Ji Chang (98). We are also thankful to Maja Ziegler for her help in generating viral stocks of the infectious molecular clones tested here. LeGO-iG2 (90) was a kind gift from Boris Fehse.

J.I.A., T.V.S.T., A.N., and A.H. performed the experiments and analyzed the data (T.V.S.T., Fig. 1 and 2; A.N., Fig. 3; J.I.A., Fig. 4; A.H., Fig. 5), and A.H. and M.A. designed the experiments. C.T.F. generated viral stocks from infectious molecular clones. L.R. performed the mixed-effect linear regression analysis and provided important statistical input. D.S., C.M.S., F.K., H.L., J.C.K., C.O., and B.H.H. generated mutant HIV-1 constructs, constructed/provided infectious molecular clones, and provided important intellectual input. W.F.G.-B., G.M., A.H., and M.A. interpreted the data. J.I.A., T.V.S.T., A.N., and A.H. wrote the manuscript.

C.T.F., D.S., and F.K. were supported by the DFG priority program Innate Sensing and Restriction of Retroviruses (SPP1923). F.K. is further supported by an ERC Advanced grant (Anti-Virome) and DFG SFB 1279. This work was supported by German Center for Infection Research (DZIF) grants to A.H., J.I.A., A.N., and M.A. (TI 07.002, TI 07.003, and TTU 04.810.) and by grants from the NIH to B.H.H. (R01 AI 114266 and UM1 AI 26620). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Work by J.C.K. and C.O. was supported by the NIH Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (CHAVI) (U01-AI067854).

REFERENCES

- Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M, Zhang K, Gumbs C, Castagna A, Cossarizza A, Cozzi-Lepri A, De Luca A, Easterbrook P, Francioli P, Mallal S, Martinez-Picado J, Miro JM, Obel N, Smith JP, Wyniger J, Descombes P, Antonarakis SE, Letvin NL, McMichael AJ, Haynes BF, Telenti A, Goldstein DB. 2007. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 317: 944–947. <https://doi.org/10.1126/science.1143767>.
- Kuniholm MH, Gao X, Xue X, Kovacs A, Anastos K, Marti D, Greenblatt RM, Cohen MH, Minkoff H, Gange SJ, Fazzari M, Young MA, Strickler HD, Carrington M. 2011. Human leukocyte antigen genotype and risk of HIV disease progression before and after initiation of antiretroviral therapy. *J Virol* 85:10826–10833. <https://doi.org/10.1128/JVI.00804-11>.
- Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, Telenti A, de Bakker PIW, Walker BD, Ripke S, Brumme CJ, Pulit SL, Carrington M, Kadie CM, Carlson JM, Heckerman D, Graham RR, Plenge RM, Deeks SG, Gianniny L, Crawford G, Sullivan J, Gonzalez E, Davies L, Camargo A, Moore JM, Beattie N, Gupta S, Crenshaw A, Burt NP, Guiducci C, Gupta N, Gao X, Qi Y, Yuki Y, Piechocka-Trocha A, Cutrell E, Rosenberg R, Moss KL, Lemay P, O'Leary J, Schaefer T, Verma P, Toth I, Block B, Baker B, Rothchild A, Lian J, Proudfoot J, Alvino DML, Vine S, Addo MM, Allen TM, Altfeld M, Henn MR, Le Gall S, Streeck H, Haas DW, Kuritzkes DR, Robbins GK, Shafer RW, Gulick RM, Shikuma CM, Haubrich R, Riddler S, Sax PE, Daar ES, Ribaud HJ, Agan B, Agarwal S, Ahern RL, Allen BL, Altidor S, Altschuler EL, Ambardar S, Anastos K, Anderson B, Anderson V, Andrad U, Antoniskis D, Bangsberg D, Barbaro D, Barrie W, Bartczak J, Barton S, Basden P, Basgoz N, Bazner S, Bellos NC, Benson AM, Berger J, Bernard NF, Bernard AM, Birch C, Bodner SJ, Bolan RK, Boudreaux ET, Bradley M, Braun JF, Brndjar JE, Brown SJ, Brown K, Brown ST, Burack J, Bush LM, Cafaro V, Campbell O, Campbell J, Carlson RH, Carmichael JK, Casey KK, Cavacuiti C, Celestin G, Chambers ST, Chez N, Chirch LM, Cimoch PJ, Cohen D, Cohn LE, Conway B, Cooper DA, Cornelson B, Cox DT, Cristofano MV, Cuchural G, Czartoski JL, Dahman JM, Daly JS, Davis BT, Davis K, Davod SM, DeJesus E, Dietz CA, Dunham E, Dunn ME, Ellerlin TB, Eron JJ, Fangman JJW, Farel CE, Ferlazzo H, Fidler S, Fleenor-Ford A, Frankel R, Freedberg KA, French NK, Fuchs JD, Fuller JD, Gaberman J, Gallant JE, Gandhi RT, Garcia E, Garmon D, Gathe JC, Gaultier CR, Gebre W, Gilman FD, Gilson I, Goepfert PA, Gottlieb MS, Goulston C, Groger RK, Gurley TD, Haber S, Hardwicke R, Hardy WD, Harrigan PR, Hawkins TN, Heath S, Hecht FM, Henry WK,

- Hladek M, Hoffman RP, Horton JM, Hsu RK, Huhn GD, Hunt P, Hupert MJ, Illeman ML, Jaeger H, Jellinger RM, John M, Johnson JA, Johnson KL, Johnson H, Johnson K, Joly J, Jordan WC, Kauffman CA, Khanlou H, Killian RK, Kim AY, Kim DD, Kinder CA, Kirchner JT, Kogelman L, Kojic EM, Korthis PT, Kurisu W, Kwon DS, LaMar M, Lampiris H, Lanzafame M, Lederman MM, Lee DM, Lee JML, Lee MJ, Lee ETY, Lemoine J, Levy JA, Llibre JM, Liguori MA, Little SJ, Liu AY, Lopez AJ, Loutfy MR, Loy D, Mohammed DY, Man A, Mansour MK, Marconi VC, Markowitz M, Marques R, Martin JN, Martin HL, Mayer KH, McElrath MJ, McGhee TA, McGovern BH, McGowan K, McIntyre D, McLeod GX, Menezes P, Mesa G, Metroka CE, Meyer-Olson D, Miller AO, Montgomery K, Mounzer KC, Nagami EH, Nagin I, Nahass RG, Nelson MO, Nielsen C, Norene DL, O'Connor DH, Ojikutu BO, Okulicz J, Oladehin OO, Oldfield EC, Olender SA, Ostrowski M, Owen WF, Pae E, Parsonnet J, Pavlatos AM, Perlmutter AM, Pierce MN, Pincus JM, Pisani L, Price LJ, Proia L, Prokesch RC, Pujat HC, Ramgopal M, Rathod A, Rausch M, Ravishanker J, Rhame FS, Richards CS, Richman DD, Rodes B, Rodriguez M, Rose RC, Rosenberg ES, Rosenthal D, Ross PE, Rubin DS, Rumbaugh E, Saenz L, Salvaggio MR, Sanchez WC, Sanjana VM, Santiago S, Schmidt W, Schuitemaker H, Sestak PM, Shalit P, Shay W, Shirvani VN, Silebi VI, Sizemore JM, Skolnik PR, Sokol-Anderson M, Sosman JM, Stabile P, Stapleton JT, Starrett S, Stein F, Stellbrink H-J, Sterman FL, Stone VE, Stone DR, Tambussi G, Tapitz RA, Tedaldi EM, Telenti A, Theisen W, Torres R, Tosiello L, Tremblay C, Tribble MA, Trinh PD, Tsao A, Ueda P, Vaccaro A, Valadas E, Vanij TJ, Vecino I, Vega VM, Veikley W, Wade BH, Walworth C, Wanidworanun C, Ward DJ, Warner DA, Weber RD, Webster D, Weis S, Wheeler DA, White DJ, Wilkins E, Winston A, Wlodaver CG, van't Wout A, Wright DP, Yang OO, Yuridin DL, Zabukovic BW, Zachary KC, Zeeman B, Zhao M. 2010. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330: 1551–1557. <https://doi.org/10.1126/science.1195271>.
4. Magierowska M, Theodorou I, Debré P, Sanson F, Autran B, Rivière Y, Charon D, Costagliola D. 1999. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* 93:936–941.
5. Flores-Villanueva PO, Yunis EJ, Delgado JC, Vittinghoff E, Buchbinder S, Leung JY, Ugliorlo AM, Clavijo OP, Rosenberg ES, Kalams SA, Braun JD, Boswell SL, Walker BD, Goldfeld AE. 2001. Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5140–5145. <https://doi.org/10.1073/pnas.071548198>.
6. Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, Rathnavalu P, Moore C, Pfafferott KJ, Hilton L, Zimbwa P, Moore S, Allen T, Brander C, Addo MM, Altfeld M, James I, Mallal S, Bunce M, Barber LD, Szinger J, Day C, Klennerman P, Mullins J, Korber B, Coovadia HM, Walker BD, Goulder P. 2004. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 432:769–775. <https://doi.org/10.1038/nature03113>.
7. Kløverpris HN, Leslie A, Goulder P. 2015. Role of HLA adaptation in HIV evolution. *Front Immunol* 6:665. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00665>.
8. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. 2010. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10:11–23. <https://doi.org/10.1038/nri2674>.
9. Frater AJ, Brown H, Oxenius A, Günthard HF, Hirschel B, Robinson N, Leslie AJ, Payne R, Crawford H, Prendergast A, Brander C, Kiepiela P, Walker BD, Goulder PJR, McLean A, Phillips RE. 2007. Effective T-cell responses select human immunodeficiency virus mutants and slow disease progression. *J Virol* 81:6742–6751. <https://doi.org/10.1128/JVI.00022-07>.
10. Chapel A, Garcia-Beltran WF, Hölzemer A, Ziegler M, Lunemann S, Martrus G, Altfeld M. 2017. Peptide-specific engagement of the activating NK cell receptor KIR2DS1. *Sci Rep* 7:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02449-x>.
11. Hölzemer A, Thobakgale CF, Jimenez Cruz CA, Garcia-Beltran WF, Carlson JM, van Teijlingen NH, Mann JK, Jaggernath M, Kang SG, Körner C, Chung AW, Schafer JL, Evans DT, Alter G, Walker BD, Goulder PJ, Carrington M, Hartmann P, Pertel T, Zhou R, Ndung'u T, Altfeld M. 2015. Selection of an HLA-C*03:04-restricted HIV-1 p24 Gag sequence variant is associated with viral escape from KIR2DL3+ natural killer cells: data from an observational cohort in South Africa. *PLoS Med* 12:e1001900-27. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001900>.
12. Van Teijlingen NH, Hölzemer A, Körner C, Garcia-Beltrán WF, Schafer JL, Fadda L, Suscovich TJ, Brander C, Carrington M, Evans DT, Van Baarle D, Altfeld M. 2014. Sequence variations in HIV-1 p24 Gag-derived epitopes can alter binding of KIR2DL2 to HLA-C*03:04 and modulate primary natural killer cell function. *AIDS* 28:1399–1408. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000284>.
13. Lunemann S, Martrus G, Hölzemer A, Chapel A, Ziegler M, Körner C, Garcia Beltran W, Carrington M, Wedemeyer H, Altfeld M. 2016. Sequence variations in HCV core-derived epitopes alter binding of KIR2DL3 to HLA-C*03:04 and modulate NK cell function. *J Hepatol* 65:252–258. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.03.016>.
14. Pelak K, Need AC, Fellay J, Shianna KV, Feng S, Urban TJ, Ge D, De Luca A, Martinez-Picado J, Wolinsky SM, Martinson JJ, Jamieson BD, Bream JH, Martin MP, Borrow P, Letvin NL, McMichael AJ, Haynes BF, Telenti A, Carrington M, Goldstein DB, Alter G, NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology. 2011. Copy number variation of KIR genes influences HIV-1 control. *PLoS Biol* 9:e1001208. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001208>.
15. Martin MP, Gao X, Lee J-H, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M. 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 31:429–434. <https://doi.org/10.1038/ng934>.
16. Martin MP, Naranbhai V, Shea PR, Qi Y, Ramsuran V, Vince N, Gao X, Thomas R, Brumme ZL, Carlson JM, Wolinsky SM, Goedert JJ, Walker BD, Segal FP, Deeks SG, Haas DW, Migueles SA, Connors M, Michael N, Fellay J, Gostick E, Llewellyn-Lacey S, Price DA, Lafont BA, Pym P, Saunders PM, Widjaja J, Wong SC, Vivian JP, Rossjohn J, Brooks AG, Carrington M. 2018. Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1 variation modifies HLA-B*57 protection against HIV-1. *J Clin Invest* 128:1903–1912. <https://doi.org/10.1172/JCI98463>.
17. Apps R, Del Prete GQ, Chatterjee P, Lara A, Brumme ZL, Brockman MA, Neil S, Pickering S, Schneider DK, Piechocka-Trocha A, Walker BD, Thomas R, Shaw GM, Hahn BH, Keele BF, Lifson JD, Carrington M. 2016. HIV-1 Vpu mediates HLA-C downregulation. *Cell Host Microbe* 19: 686–695. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.005>.
18. Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D. 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 10:661–671. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80065-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80065-5).
19. Roeth JF, Williams M, Kasper MR, Filzen TM, Collins KL. 2004. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *J Cell Biol* 167:903–913. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407031>.
20. Hotter D, Krabbe T, Reith E, Gawanbacht A, Rahm N, Ayoub A, Van Driessche B, Van Lint C, Peeters M, Kirchhoff F, Sauter D. 2017. Primate lentiviruses use at least three alternative strategies to suppress NF- κ B-mediated immune activation. *PLoS Pathog* 13:e1006598-28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006598>.
21. Greenway AL, McPhee DA, Allen K, Johnstone R, Holloway G, Mills J, Azad A, Sankovich S, Lambert P. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *J Virol* 76:2692–2702. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.6.2692-2702.2002>.
22. Ross TM, Oran AE, Cullen BR. 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol* 9:613–621. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80283-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80283-8).
23. Manrique S, Sauter D, Horenkamp FA, Lülfi S, Yu H, Hotter D, Anand K, Kirchhoff F, Geyer M. 2017. Endocytic sorting motif interactions involved in Nef-mediated downmodulation of CD4 and CD3. *Nat Commun* 8:442. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00481-z>.
24. Venzke S, Michel N, Allespach I, Fackler OT, Keppler OT. 2006. Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection. *J Virol* 80:11141–11152. <https://doi.org/10.1128/JVI.01556-06>.
25. Heigle A, Kmiec D, Regensburger K, Langer S, Peiffer L, Stürzel CM, Sauter D, Peeters M, Pizzato M, Learn GH, Hahn BH, Kirchhoff F. 2016. The Potency of Nef-Mediated SERINC5 antagonism correlates with the prevalence of primate lentiviruses in the wild. *Cell Host Microbe* 20: 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.004>.
26. Münch J, Rajan D, Schindler M, Specht A, Rucker E, Novembre FJ, Nerrienet E, Müller-Trutwin MC, Peeters M, Hahn BH, Kirchhoff F. 2007. Nef-mediated enhancement of virion infectivity and stimulation of viral replication are fundamental properties of primate lentiviruses. *J Virol* 81:13852–13864. <https://doi.org/10.1128/JVI.00904-07>.
27. Körner C, Simoneau CR, Schommers P, Granoff M, Ziegler M, Hölzemer A, Lunemann S, Chukwukelu J, Corleis B, Naranbhai V, Kwon DS, Scully EP, Jost S, Kirchhoff F, Carrington M, Altfeld M. 2017. HIV-1-mediated downmodulation of HLA-C impacts target cell recognition and antiviral activ-

- ity of NK cells. *Cell Host Microbe* 22:111–119.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.008>.
28. Bachtel ND, Umvilighozo G, Pickering S, Mota TM, Liang H, Del Prete GQ, Chatterjee P, Lee GQ, Thomas R, Brockman MA, Neil S, Carrington M, Bwana B, Bangsberg DR, Martin JN, Kallas EG, Donini CS, Cerqueira B, Doherty UTO, Hahn BH, Jones RB, Brumme L, Nixon DF, Apps R. 2018. HLA-C downregulation by HIV-1 adapts to host HLA genotype. *PLoS Pathog* 14:e1007257. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007257>.
 29. Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Münch J, Kim KA, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayouba A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatzioannou T, Kirchhoff F. 2009. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe* 6:409–421. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.10.004>.
 30. Langer S, Hammer C, Hopfensperger K, Klein L, Hotter D, De Jesus PD, Herbert KM, Pache L, Smith N, van der Merwe JA, Chanda SK, Fellay J, Kirchhoff F, Sauter D. 2019. HIV-1 Vpu is a potent transcriptional suppressor of NF- κ B-elicited antiviral immune responses. *Elife* 8:1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.41930>.
 31. Mahiti M, Toyoda M, Jia X, Kuang XT, Mwimanzi F, Mwimanzi P, Walker BD, Xiong Y, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. 2016. Relative resistance of HLA-B to downregulation by naturally occurring HIV-1 Nef sequences. *mBio* 7:e01516. <https://doi.org/10.1128/mBio.01516-15>.
 32. Ende Z, Deymier MJ, Claiborne DT, Prince JL, Monaco DC, Kilembe W, Allen SA, Hunter E. 2018. HLA class I downregulation by HIV-1 variants from subtype C transmission pairs. *J Virol* 92:e01633-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01633-17>.
 33. Horowitz A, Djaoud Z, Nemat-Gorgani N, Blokhuis J, Hilton HG, Béziat V, Malmberg K-J, Norman PJ, Guethlein LA, Parham P. 2016. Class I HLA haplotypes form two schools that educate NK cells in different ways. *Sci Immunol* 1:eaag1672. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aag1672>.
 34. Ramsuran V, Naranbhai V, Horowitz A, Qi Y, Martin MP, Yuki Y, Gao X, Walker-Sperling V, Del Prete GQ, Schneider DK, Lifson JD, Fellay J, Deeks SG, Martin JN, Goedert JJ, Wolinsky SM, Michael NL, Kirk GD, Buchbinder S, Haas D, Ndung'u T, Goulder P, Parham P, Walker BD, Carlson JM, Carrington M. 2018. Elevated HLA-A expression impairs HIV control through inhibition of NKG2A-expressing cells. *Science* 359:86–90. <https://doi.org/10.1126/science.aam8825>.
 35. Strong RK, Holmes MA, Li P, Braun L, Lee N, Geraghty DE. 2003. HLA-E allelic variants: correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J Biol Chem* 278:5082–5090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208268200>.
 36. Pietra G, Romagnani C, Mazzarino P, Falco M, Millo E, Moretta A, Moretta L, Mingari MC. 2003. HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10896–10901. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834449100>.
 37. Romagnani C, Pietra G, Falco M, Millo E, Mazzarino P, Biassoni R, Moretta A, Moretta L, Mingari MC. 2002. Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11328–11333. <https://doi.org/10.1073/pnas.172369799>.
 38. Schulte D, Vogel M, Langhans B, Krämer B, Körner C, Nischalke HD, Steinberg V, Michalk M, Berg T, Rockstroh JK, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. 2009. The HLA-E(R)/HLA-E(R) genotype affects the natural course of hepatitis C virus (HCV) infection and is associated with HLA-E-restricted recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8⁽⁺⁾ T cells. *J Infect Dis* 200:1397–1401. <https://doi.org/10.1086/605889>.
 39. Hansen SG, Wu HL, Burwitz BJ, Hughes CM, Hammond KB, Ventura AB, Reed JS, Gilbride RM, Ainslie E, Morrow DW, Ford JC, Selseth AN, Pathak R, Malouli D, Legasse AW, Axthelm MK, Nelson JA, Gillespie GM, Walters LC, Brackenridge S, Sharpe HR, López CA, Früh K, Korber BT, McMichael AJ, Gnanakaran S, Sacha JB, Picker LJ. 2016. Broadly targeted CD8⁺ T cell responses restricted by major histocompatibility complex E. *Science* 351:714–720. <https://doi.org/10.1126/science.aac9475>.
 40. Davis ZB, Cogswell A, Scott H, Mertsching A, Boucay J, Wambua D, Le Gall S, Planelles V, Campbell KS, Barker E. 2016. A conserved HIV-1 derived peptide presented by HLA-E renders infected T-cells highly susceptible to attack by NKG2A/CD94-bearing natural killer cells. *PLoS Pathog* 12:e1005421. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005421>.
 41. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Kupfer B, Ahlenstiel G, Feldmann G, Rockstroh J, Weiss EH, Sauerbruch T, Spengler U. 2005. HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. *Antivir Ther* 10:95–107.
 42. Hannoun Z, Lin Z, Brackenridge S, Kuse N, Akahoshi T, Borthwick N, McMichael A, Murakoshi H, Takiguchi M, Hanke T. 2018. Identification of novel HIV-1-derived HLA-E-binding peptides. *Immunol Lett* 202:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.08.005>.
 43. Llano M, Lee N, Navarro F, García P, Albar JP, Geraghty DE, López-Botet M. 1998. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* 28:2854–2863. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199809\)28:09<2854::AID-IMMU2854>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2854::AID-IMMU2854>3.0.CO;2-W).
 44. Lisovsky I, Isitman G, Song R, DaFonseca S, Tremblay-McLean A, Lebouché B, Routy J-P, Bruneau J, Bernard NF. 2015. A higher frequency of NKG2A⁺ than of NKG2A⁻ NK cells responds to autologous HIV-infected CD4 cells irrespective of whether or not they coexpress KIR3DL1. *J Virol* 89:9909–9919. <https://doi.org/10.1128/JVI.01546-15>.
 45. Apps R, Meng Z, Del Prete GQ, Lifson JD, Zhou M, Carrington M. 2015. Relative expression levels of the HLA class-I proteins in normal and HIV-infected cells. *J Immunol* 194:3594–3600. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403234>.
 46. Martini F, Agrati C, D'Offizi G, Poccia F. 2005. HLA-E up-regulation induced by HIV infection may directly contribute to CD94-mediated impairment of NK cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18:269–276. <https://doi.org/10.1177/039463200501800209>.
 47. Fogli M, Mavilio D, Brunetta E, Varchetta S, Ata K, Roby G, Kovacs C, Follmann D, Pende D, Ward J, Barker E, Marcanaro E, Moretta A, Fauci AS. 2008. Lysis of endogenously infected CD4⁺ T cell blasts by rIL-2 activated autologous natural killer cells from HIV-infected viremic individuals. *PLoS Pathog* 4:e1000101. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000101>.
 48. Bonaparte MI, Barker E. 2004. Killing of human immunodeficiency virus-infected primary T-cell blasts by autologous natural killer cells is dependent on the ability of the virus to alter the expression of major histocompatibility complex class I molecules. *Blood* 104:2087–2094. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0696>.
 49. Wu HL, Wiseman RW, Hughes CM, Webb GM, Abdulhaqq SA, Bimber BN, Hammond KB, Reed JS, Gao L, Burwitz BJ, Greene JM, Ferrer F, Legasse AW, Axthelm MK, Park BS, Brackenridge S, Maness NJ, McMichael AJ, Picker LJ, O'Connor DH, Hansen SG, Sacha JB. 2018. The role of MHC-E in T cell immunity is conserved among humans, rhesus macaques, and cynomolgus macaques. *J Immunol* 200:49–60. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700841>.
 50. Specht A, DeGottardi MQ, Schindler M, Hahn B, Evans DT, Kirchhoff F. 2008. Selective downmodulation of HLA-A and -B by Nef alleles from different groups of primate lentiviruses. *Virology* 373:229–237. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.11.019>.
 51. Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. 1998. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* 160:4951–4960.
 52. Martrus G, Niehrs A, Cornelis R, Rechten A, García-Beltrán W, Lütgehetmann M, Hoffmann C, Altfeld M. 2016. Kinetics of HIV-1 latency reversal quantified on the single-cell level using a novel flow-based technique. *J Virol* 90:9018–9028. <https://doi.org/10.1128/JVI.01448-16>.
 53. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391:397–401. <https://doi.org/10.1038/34929>.
 54. Gustafson KS, Ginder GD. 1996. Interferon-gamma induction of the human leukocyte antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT1alpha to a distinct interferon-gamma-responsive element. *J Biol Chem* 271:20035–20046. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.33.20035>.
 55. Ward J, Bonaparte M, Sacks J, Guterman J, Fogli M, Mavilio D, Barker E. 2007. HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts. *Blood* 110:1207–1214. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-028175>.
 56. Kiselyeva Y, Nedellec R, Ramos A, Pastore C, Margolis LB, Mosier DE. 2007. Evolution of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 SF162 is associated with two unique envelope mutations. *J Virol* 81:3657–3661. <https://doi.org/10.1128/JVI.02310-06>.
 57. Mann JK, Byakwaga H, Kuang XT, Le AQ, Brumme CJ, Mwimanzi P, Omarjee S, Martin E, Lee GQ, Baraki B, Danroth R, McCloskey R, Muzoora C, Bangsberg DR, Hunt PW, Goulder PJR, Walker BD, Harrigan PR, Martin JN, Ndung'u T, Brockman MA, Brumme ZL. 2013. Ability of HIV-1 Nef to

- downregulate CD4 and HLA class I differs among viral subtypes. *Retrovirology* 10:100–116. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-100>.
58. Shimizu Y, Geraghty DE, Koller BH, Orr HT, DeMars R. 1988. Transfer and expression of three cloned human non-HLA-A,B,C class I major histocompatibility complex genes in mutant lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:227–231. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.1.227>.
 59. Kluge SF, Mack K, Iyer SS, Pujol FM, Heigele A, Learn GH, Usmani SM, Sauter D, Joas S, Hotter D, Bibollet-Ruche F, Plenderleith LJ, Peeters M, Geyer M, Sharp PM, Fackler OT, Hahn BH, Kirchhoff F. 2014. Nef proteins of epidemic HIV-1 group O strains antagonize human tetherin. *Cell Host Microbe* 16:639–650. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.002>.
 60. Pardons M, Baxter AE, Massanella M, Pagliuzza A, Fromentin R, Dufour C, Leyre L, Routy J-P, Kaufmann DE, Chomont N. 2019. Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog* 15:e1007619. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007619>.
 61. Williams M, Roeth J, Kasper Fleis R, Przybycin C, Collins K. 2002. Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking. *Society* 76:12173–12184. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12173-12184.2002>.
 62. Cerboni C, Neri F, Casartelli N, Zingoni A, Cosman D, Rossi P, Santoni A, Doria M. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Gen Virol* 88:242–250. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82125-0>.
 63. Matusali G, Potestà M, Santoni A, Cerboni C, Doria M. 2012. The human immunodeficiency virus type 1 Nef and Vpu proteins downregulate the natural killer cell-activating ligand PVR. *J Virol* 86:4496–4504. <https://doi.org/10.1128/JVI.05788-11>.
 64. Sowrirajan B, Barker E. 2011. The natural killer cell cytotoxic function is modulated by HIV-1 accessory proteins. *Viruses* 3:1091–1111. <https://doi.org/10.3390/v3071091>.
 65. Carl S, Greenough TC, Krumbiegel M, Greenberg M, Skowronski J, Sullivan JL, Kirchhoff F. 2001. Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. *J Virol* 75:3657–3665. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3657-3665.2001>.
 66. Cheng-Mayer C, Levy JA. 1988. Distinct biological and serological properties of human immunodeficiency viruses from the brain. *Ann Neurol* 23(Suppl):S58–S61. <https://doi.org/10.1002/ana.410230716>.
 67. Parrish NF, Gao F, Li H, Giorgi EE, Barbian HJ, Parrish EH, Zajic L, Iyer SS, Decker JM, Kumar A, Hora B, Berg A, Cai F, Hopper J, Denny TN, Ding H, Ochsenbauer C, Kappes JC, Galimidi RP, West AP, Bjorkman PJ, Wilen CB, Doms RW, O'Brien M, Bhardwaj N, Borrow P, Haynes BF, Muldoon M, Theiler JP, Korber B, Shaw GM, Hahn BH. 2013. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6626–6633. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304288110>.
 68. Wonderlich ER, Leonard JA, Collins KL. 2011. HIV immune evasion disruption of antigen presentation by the HIV Nef protein. *Adv Virus Res* 80:103–127. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385987-7.00005-1>.
 69. Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2:338–342. <https://doi.org/10.1038/nm0396-338>.
 70. Schaefer MR, Wonderlich ER, Roeth JF, Leonard JA, Collins KL. 2008. HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. *PLoS Pathog* 4:e1000131. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000131>.
 71. Wonderlich ER, Williams M, Collins KL. 2008. The tyrosine binding pocket in the adaptor protein 1 (AP-1) μ 1 subunit is necessary for Nef to recruit AP-1 to the major histocompatibility complex class I cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 283:3011–3022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707760200>.
 72. Jia X, Singh R, Homann S, Yang H, Guatelli J, Xiong Y. 2012. Structural basis of evasion of cellular adaptive immunity by HIV-1 Nef. *Nat Struct Mol Biol* 19:701–706. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2328>.
 73. Mann JK, Omarjee S, Khumalo P, Ndung'u T. 2015. Genetic determinants of Nef-mediated CD4 and HLA class I down-regulation differences between HIV-1 subtypes B and C. *J Virol* 12:1–8. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0429-7>.
 74. O'Neill E, Kuo LS, Krisko JF, Tomchick DR, Garcia JV, Foster JL. 2006. Dynamic evolution of the human immunodeficiency virus type 1 pathogenic factor, Nef. *J Virol* 80:1311–1320. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1311-1320.2006>.
 75. Gioia L, Siddique A, Head SR, Salomon DR, Su AI. 2018. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics* 19:334. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4718-6>.
 76. Wildum S, Schindler M, Munch 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00252-06>.
 77. Moll M, Andersson SK, Smed-Sörensen A, Sandberg JK. 2010. Inhibition of lipid antigen presentation in dendritic cells by HIV-1 Vpu interference with CD1d recycling from endosomal compartments. *Blood* 116:1876–1884. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-243667>.
 78. Chen N, McCarthy C, Drakesmith H, Li D, Cerundolo V, McMichael AJ, Screaton GR, Xu X-N. 2006. HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef. *Eur J Immunol* 36:278–286. <https://doi.org/10.1002/eji.200535487>.
 79. Carlsten M, Namazi A, Reger R, Levy E, Berg M, St Hilaire C, Childs RW. 2019. Bortezomib sensitizes multiple myeloma to NK cells via ER-stress-induced suppression of HLA-E and upregulation of DR5. *Oncimmunology* 8:e1534664. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1534664>.
 80. Borsa M, Ferreira PLC, Petry A, Ferreira LGE, Camargo MM, Bou-Habib DC, Pinto AR. 2015. HIV infection and antiretroviral therapy lead to unfolded protein response activation. *J Virol* 12:77. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0298-0>.
 81. Ram DR, Manickam C, Hueber B, Itell HL, Permar SR, Varner V, Reeves RK. 2018. Tracking KLR2 (NKG2C)+ memory-like NK cells in SIV+ and rhesus macaques. *PLoS Pathog* 14:e1007104. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007104>.
 82. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. 1977. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19:621–626. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910190505>.
 83. Pauwels R, De Clercq E, Desmyter J, Balzarini J, Goubau P, Herdewijn P, Vanderhaeghe H, Vandeputte M. 1987. Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *J Virol Methods* 16:171–185. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(87\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0166-0934(87)90002-4).
 84. Fenton-May AE, Dibben O, Emmerich T, Ding H, Pfafferoth K, Aasa-Chapman MM, Pellegrino P, Williams I, Cohen MS, Gao F, Shaw GM, Hahn BH, Ochsenbauer C, Kappes JC, Borrow P. 2013. Relative resistance of HIV-1 founder viruses to control by interferon-alpha. *Retrovirology* 10:146–148. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-146>.
 85. Ochsenbauer C, Edmonds TG, Ding H, Keele BF, Decker J, Salazar MG, Salazar-Gonzalez JF, Shattock R, Haynes BF, Shaw GM, Hahn BH, Kappes JC. 2012. Generation of transmitted/founder HIV-1 infectious molecular clones and characterization of their replication capacity in CD4 T lymphocytes and monocyte-derived macrophages. *J Virol* 86:2715–2728. <https://doi.org/10.1128/JVI.06157-11>.
 86. Kmiec D, Iyer SS, Stürzel CM, Sauter D, Hahn BH, Kirchhoff F. 2016. Vpu-mediated counteraction of tetherin is a major determinant of HIV-1 interferon resistance. *mBio* 7:1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00934-16>.
 87. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59:284–291.
 88. Hu Q, Huang X, Shattock RJ. 2010. C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) utilization of transmitted and early founder human immunodeficiency virus type 1 envelopes and sensitivity to small-molecule CCR5 inhibitors. *J Gen Virol* 91:2965–2973. <https://doi.org/10.1099/vir.0.025270-0>.
 89. Minang JT, Trivett MT, Barsov EV, Del Prete GQ, Trubey CM, Thomas JA, Gorelick RJ, Piatak M, Ott DE, Ohlen C. 2011. TCR triggering transcriptionally downregulates CCR5 expression on rhesus macaque CD4+ T-cells with no measurable effect on susceptibility to SIV infection. *Virology* 409:132–140. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.10.005>.
 90. Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. 2008. A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* 16:698–706. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.6>.
 91. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser* 57:289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>.
 92. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautoguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868–871. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>.
 93. Wain-Hobson S, Vartanian J, Henry M, Chenciner N, Cheyner R, Delassus S, Martins L, Sala M, Nugeyre M, Guetard D. 1991. LAV revisited: origins

- of the early HIV-1 isolates from Institut Pasteur. *Science* 252:961–965. <https://doi.org/10.1126/science.2035026>.
94. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225:840–842. <https://doi.org/10.1126/science.6206563>.
95. Sanchez-Pescador R, Power M, Barr P, Steimer K, Stempien M, Brown-Shimer S, Gee W, Renard A, Randolph A, Levy J. 1985. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* 227:484–492. <https://doi.org/10.1126/science.2578227>.
96. Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N. 1985. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 229:563–566. <https://doi.org/10.1126/science.2992081>.
97. Larder BA, Darby G, Richman DD. 1989. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 243:1731–1734. <https://doi.org/10.1126/science.2467383>.
98. Chang L-J, Urlacher V, Iwakuma T, Cui Y, Zucali J. 1999. Efficacy and safety analyses of a recombinant human immunodeficiency virus type 1 derived vector system. *Gene Ther* 6:715–728. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300895>.
99. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, Heldebrandt C, Smith R, Conrad A, Kleinman SH, Busch MP. 2003. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 17(13):1871–1879. <https://doi.org/10.1097/00002030-200309050-00005>.

2 Zusammenfassende Darstellung der Publikation mit Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

2.1 Einleitung

2.1.1 Die HIV-Pandemie und ihre Entwicklung

Eine gesundheitliche Krise erreichte ihren Höhepunkt, als die Weltgesundheitsorganisation (WHO) das neuartige Virus SARS-COV-2 am 11.03.2020 als globale Pandemie bestätigte (WHO, 2020b). Die im Volksmund als „Corona-Pandemie“ bezeichnete Krankheit forderte bisher über 6,9 Millionen Todesfälle (Stand: 12.10.2023), die der WHO gemeldet wurden (WHO, 2020a). Viele Wissenschaftler:innen wissen, wie herausfordernd der richtige Umgang mit und die adäquate Behandlung einer pandemisch agierenden Krankheit ist. Dies spiegelt sich auch in der seit 1980 andauernde Pandemie durch die Gruppe M des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV)-1 wider (Hahn et al., 2000, Kirchhoff, 2010, Eisinger and Fauci, 2018). Die HI-Viruserkrankung forderte seit ihrer Entdeckung ca. 74.9 Millionen infizierte mit ca. 32 Millionen Verstorbenen und zählt damit zu den tödlichsten viralen Infektionen unserer Zeit (Moreno Álvarez, 2020). Die unbehandelte HIV-1-Infektion führt in einem Großteil der infizierten Individuen zu einem progredienten Verlust der adaptiven T-Helferzellantwort mit dem Endresultat einer Immunschwäche, welche durch die fehlende Kontrolle opportunistischer Infektionen oder Tumorerkrankungen meist tödlich endet.

Seit der Entdeckung des Virus durch Luc Montagnier vor 30 Jahren versuchen Forschende weltweit neue Therapien und Strategien zur Behandlung dieser Pandemie zu entwickeln. Die detaillierte Erforschung der Struktur und des Aufbaus des HI-Virus erwies sich als besonders effektiv (Arts and Hazuda, 2012). Es folgte die Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART), mit Hilfe derer sowohl der Ausbruch eines Erworbenen Abwehrschwäche-Syndroms (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) als auch eine transversale oder sexuelle Übertragung des Virus fast vollständig verhindert werden kann (Attia et al., 2009, De Cock et al., 2009, Palella Jr et al., 1998, Connor et al., 1994, Cohen et al., 2007). Hauptangriffspunkte der antiretroviralen Therapie sind wichtige Proteinprozesse der viralen Replikation.

Neben den kanonischen retroviralen Strukturgenen *gag*, *pol* und *env* und den regulatorischen Genen *tat* und *ref*, rückten die akzessorischen Gene *vif*, *vpu*, *vpr* und *nef* in den Interessensfokus der Forschung. Diese HIV-spezifischen Proteine sind nicht notwendig zur *in vitro* Replikation des Virus, aber erhöhen die Infektiosität *in vivo* deutlich. Sie wirken zellulären Restriktionsfaktoren entgegen und greifen in die Antigenpräsentation ein. Damit entkommen

sie der Erkennung durch die angeborene und erworbene Immunantwort (Malim and Emerman, 2008, Trono, 1995) und machen so einen Großteil der viralen Virulenz und Pathogenität aus. Neue Therapieansätze wie beispielsweise die direkte Inhibition des Nef Proteins zielen daher darauf ab, die Funktion akzessorischer Proteine zu unterdrücken (Betzi et al., 2007, Smithgall and Thomas, 2013). Da gegenwärtig noch kein protektiver Impfstoff gegen HIV entwickelt wurde, beruhen die derzeitigen Therapieerfolge auf einer adäquaten und lebenslangen Medikamenteneinnahme, die ein hohes Maß an Compliance der Patient:innen voraussetzt.

2.1.2 Die akzessorischen Proteine Nef und Vpu

Das HI-Virus hat viele verschiedene Wege und Mechanismen entwickelt, um dem menschlichen Immunsystem zu entkommen. Neben den drei Strukturgenen *gag* (kodiert für Proteine der äußeren Kernmembran, des Kapsidproteins und des Nukleokapsids) (Arbeitskreis Blut, 2004), *pol* (kodiert für Protease, reverse Transkriptase und Integrase) (Preston et al., 1988) und *env* (kodiert für Hüll –und Membranproteine) (Wyatt and Sodroski, 1998) sind speziell die viralen akzessorischen Proteine Vif, Vpu, Vpr, und Nef von entscheidender Bedeutung. Zwei der akzessorischen Proteine greifen in die Antigenpräsentation ein, das virale Protein Negativ Faktor (Nef) und das virale Protein U (Vpu). In dieser Arbeit wird der Schwerpunkt auf diese zwei akzessorischen Proteine gelegt.

Der Name Nef ergab sich fälschlicherweise aus der Annahme, das Protein habe durch sein 3' Ende des Long-Terminal-Repeat (LTR) überlappenden „Open-Reading Frame (ORF)“ einen negativen Effekt auf die virale Zellreplikation (Terwilliger et al., 1986, Ahmad and Venkatesan, 1988). Dies konnte im Laufe der Zeit widerlegt werden und die wichtige Rolle des Proteins, insbesondere zu Beginn des viralen Replikationszyklus wurde deutlich (Klotman et al., 1991, Kestier III et al., 1991). Das 27-35 kDa schwere Protein ist sowohl im Zytoplasma der befallenen Zelle als auch zu geringeren Anteilen an den zellulären Membranen lokalisiert, von wo aus es den Großteil seiner Funktionen ausführt. Strukturelle Analysen zeigten, dass Nef aus drei Hauptbestandteilen besteht: einer kugelförmigen Kernregion (Aminosäuren (AA) : 58-149, 181-206), einer flexiblen N-terminalen Region (AA: 1-57) und einer C-terminalen Schleife (AA: 150-180) (Sugden et al., 2016). Nef zeigt sich als hauptverantwortlich für die Unterbrechung wichtiger zellulärer Proteintransporte, insbesondere durch die Umleitung von sogenannten Clathrin-Coated Vesikeln (CCV). So wird CD4 beispielsweise durch einen Komplex aus Nef und dem Clathrin-assoziierten Adapter-Proteinkomplexes 2 (AP-2) sowie mithilfe von Clathrin-Coated Pits von der Plasmamembran internalisiert, in Vesikel verpackt, zum Lysosom geleitet und dort degradiert. Im Bereich des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN)

verhindert Nef mithilfe von AP-1 den Weitertransport des wichtigen Restriktionsfaktors Tetherin und leitet neu synthetisierte MHC-I Moleküle mithilfe der CCVs zur Degradierung im Lysosom um (Buffalo et al., 2019) (siehe Abbildung 1). Die vielen Fähigkeiten dieses wichtigen akzessorischen Proteins beruhen auf der Eigenschaft, mit Proteinen des intrazellulären Transportes zu interagieren; hierzu zählen, neben dem bereits erwähnten AP-1 und -2, auch das Phosphorine Acid Cluster Sorting Protein 1 und 2 (PACS-1/-2) und die Coatomer Subunit Beta (β -COP) (Wan et al., 1998, Piguet et al., 1999).

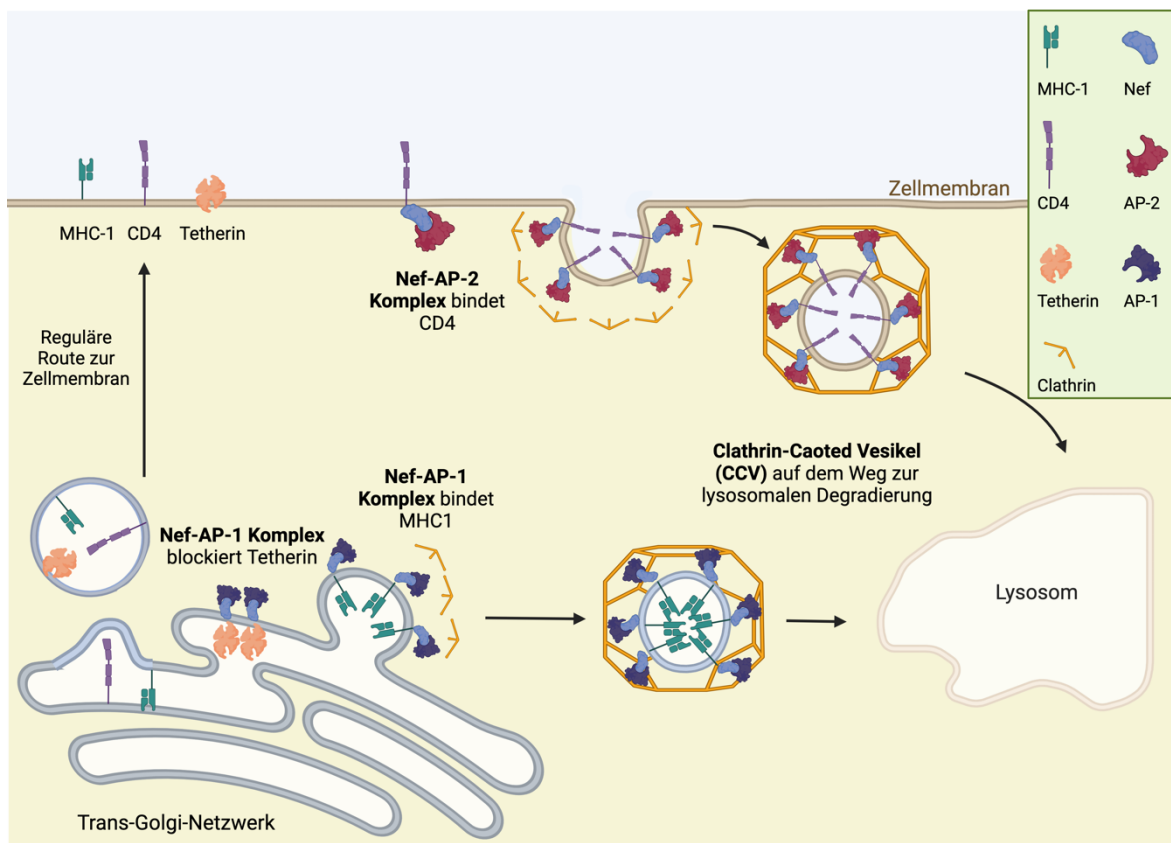


Abbildung 1: Nef unterdrückt wichtige antivirale Prozesse

Schematische Darstellung des akzessorischen Proteins Nef wie dieses zentrale antivirale Zellprozesse stört und dadurch die Immunantwort schwächt. Nef bildet mithilfe des Adapter-Protein-1 (AP-1) einen Komplex und blockiert den vesikulären Transport von neu synthetisiertem Tetherin an die Zelloberfläche durch Akkumulation im Trans-Golgi-Netzwerk. An die Zellmembran transportierte CD4-Moleküle werden durch Nef und AP-2 internalisiert und in CCV zum Abbau ins Lysosom geleitet. Zudem bindet der Nef-AP-1 Komplex neu synthetisierte MHC-I Moleküle im Trans-Golgi-Netzwerk und transportiert diese in CVV zur lysosomalen Degradierung. Strategisch unterbindet Nef auf diese Weise die zelluläre Antigenpräsentation von Virusbestandteilen, und schränkt damit die antivirale Immunantwort ein (In Anlehnung an (Buffalo et al., 2019)). Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com.

Das virale Proteine U (Vpu) hat eine Molekülmasse von 16-17 kDa und zählt zu den Typ-1 Membranproteinen. Es wird, ähnlich wie Env, aus einem Einzelstrang-Transkript (mRNA) zum Ende des Infektionszyklus translatiert (Schwartz et al., 1990). Interessanterweise bestimmt der vorliegende HIV-1 Subtyp die Lokalisation des Proteins in der Zelle. So liegt Vpu im Subtyp B der Gruppe M des HIV-1 vor allem vesikulär im TGN vor, im Subtyp C der selbigen Gruppe hingegen ist das Protein vor allem intrazellulär und an den Zellmembranen lokalisiert (Pacyniak et al., 2005). Zwar ist das *vpu*-Gen in dem HIV-1 und dem Simianen Immundefizienz-Virus des Schimpansen (SIVcpz) aufzufinden, in dem weniger virulenten HIV-2 und dem Simianen Immundefizienz-Virus des Rußmangabens *Cercocebus atys* (SIVsmm) ist es allerdings nicht vorhanden (Cohen et al., 1988, Strebel et al., 1988, Sugden et al., 2016). Strukturell besteht Vpu aus einer luminalen Domäne mit unbekannter Funktion und einer kurzen flexiblen N-terminalen Region, gefolgt von einer α -helikalen Transmembranregion, die als wichtige Bindungsstelle ein hochkonserviertes aa-51DSGxxS-56-Motiv besitzt (Sugden et al., 2016). Ähnlich wie Nef, besteht die Hauptaufgabe des Proteins in der Unterbrechung der zellulären Proteintransporte mit dem Ziel der proteosomalen Degradierung. Zu den weiteren Vpu Funktionen zählen die gezielte Degradierung des Oberflächenmoleküls CD4 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie das Außerkraftsetzen des antiviralen Proteins Tetherin (Van Damme et al., 2008). Als sekundärer Effekt in der fortgeschrittenen Infektion ist die Hemmung des NF- κ B-Signalweges durch die Unterbrechung des β TrCP-vermittelten Abbaus von I κ B, dem zellulären Inhibitor von NF- κ B, zu nennen (Bour et al., 2001). Zusammengefasst sind die akzessorischen Proteine Nef und Vpu ausschlaggebend an der effektiven Replikation des HI-Virus im Menschen beteiligt, und stellen somit eine wichtige Forschungsgrundlage dar.

2.1.3 Die Rolle des Humanen Leukozyten-Antigen-Systems (HLA) in der HIV-1-Infektion

Mit Beginn der epidemischen AIDS-Epoche wurde deutlich, dass die Kontrolle der HIV-1-Infektion interindividuell sehr variabel ist. Besonderes Augenmerk erlangte das Humane Leukozyten-Antigen-System (HLA), der Haupthistokompatibilitätskomplex beim Menschen. Dieser wird von Genen auf Chromosom 6 kodiert, dessen Genprodukte hochpolymorphe Zelloberflächenmoleküle sind (Study, 2010, Hindorff and MacArthur, 2011). Diese Zelloberflächenmoleküle sind darauf spezialisiert den T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen Antigen zu präsentieren (Kløverpris et al., 2016) und damit eine adaptive CD8⁺ T-Zellimmunantwort auszulösen. Gleichzeitig sind HLA-Klasse-I-Moleküle

wichtige Liganden für die Natürlichen Killerzellen (NK-Zelle), welche zu den zytotoxischen Zellen des angeborenen Immunsystems zählen. Diese Moleküle führen überwiegend zu einer Hemmung von NK-Zellen, können aber über aktivierende Rezeptoren auch eine antivirale NK-Zellantwort auslösen (Chapel et al., 2017, Van Teijlingen et al., 2014, Lunemann et al., 2016, Hölzemer et al., 2015). Kaslow et al. zeigte 1996 erstmalig, dass bestimmte HLA-Klasse-I-Moleküle eine modulierende Rolle zwischen HIV-Infektion und Zeitpunkt des Ausbruchs von AIDS einnahmen. Dabei zeigten die Allele *HLA-B*27* und *HLA-B*57* den größten protektiven Einfluss gegen ein schnelles Fortschreiten der Erkrankung (Kaslow et al., 1996). Heute ist bekannt, dass die HLA-Klasse-I-Moleküle maßgeblich an der Immunkontrolle des HIV beteiligt sind (Fellay et al., 2007, Kuniholm et al., 2011). Auch die Inzidenzen und Verläufe anderer Infektionskrankheiten, Autoimmunkrankheiten oder auch Tumorerkrankungen werden durch den Polymorphismus der HLA-Klasse-I-Moleküle moduliert (Hindorff and MacArthur, 2011).

Bei den HLA-Klasse-I-Molekülen werden klassische HLA-Klasse-I-Moleküle von nicht-klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen unterschieden. Die klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle werden auch Klasse-Ia-Antigene genannt und umfassen HLA-A, HLA-B und HLA-C. Sie zeichnen sich durch einen sehr hohen Polymorphismus aus, mit über >20.000 bislang beschriebenen Allelen (Robinson et al., 2015). Insbesondere bei der akuten HIV-Infektion zählt die Herunterregulierung dieser Oberflächenproteine zu einer effektiven Strategie des HI-Virus, da es die Erkennung virus-befallener Zellen durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen anhand der Antigenpräsentation reduziert und die infizierte Zelle so einer frühzeitigen Beseitigung entkommt (Collins et al., 1998, Study, 2010). Dabei reguliert Nef HLA-A und HLA-B von der Zelloberfläche herunter, während Vpu HLA-C herunterreguliert (Apps et al., 2016, Körner et al., 2017). Diese Tatsache ist erst 2016 entdeckt worden – vorher wurde angenommen, dass HIV die HLA-C Oberflächenexpression nicht verändert (Cohen et al., 1999, Roeth et al., 2004). Der Grund dafür war, dass der laboradaptierte HIV Strang NL4-3, der die Grundlage vieler experimenteller HIV-1 Studien bildete, nicht in der Lage ist HLA-C herunterzuregulieren, die von Apps et al. erstmals untersuchten primären Virusstränge indessen schon (Apps et al., 2016). Im Gegensatz zu den klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen sind die nicht-klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle deutlich weniger polymorph. Zu ihnen zählen HLA-E, HLA-F, HLA-G und MICA/B und das zuletzt entdeckte „HLA-H“, auch Hämochromatose-Gen (HFE) genannt (Feder et al., 1996).

2.1.4 Das nicht-klassische HLA-E-Molekül in der HIV-1-Infektion

Während der Zusammenhang der akzessorischen Proteine mit den klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen umfassend beschrieben wurde, bleibt das Wissen über die Interaktion mit den nicht-klassischen Molekülen beschränkt. HLA-E gehört zu den nicht-klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen und ist –verglichen mit klassischen HLA-Klasse-I Molekülen- konserviert im menschlichen Genom vorzufinden. Anders als die klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle ist es auch auf Trophoblasten exprimiert (King et al., 2000). HLA-E nimmt eine besondere Rolle in der Peptidpräsentation ein. Die Stabilisierung ist direkt abhängig von sogenannten Signalpeptiden (leader peptides) anderer HLA-Klasse-I Moleküle (Horowitz et al., 2016). Aus diesem Grund spiegelt HLA-E direkt die Expressionslevel klassischer HLA-Klasse-I-Moleküle wider und ist damit ein wichtiger inhibitorischer NK-Zellrezeptorligand mit überwiegend immunoregulatorischer Funktion. Neben dem inhibitorischen NKG2A Rezeptor, agiert HLA-E in geringerer Affinität als Ligand für den aktivierenden NKG2C Rezeptor. Die Präsentation von viralen Peptiden für die adaptive Immunantwort ist aufgrund der niedrigen Oberflächenlevels und der Besonderheiten im präsentierten Peptidrepertoire eher nebensächlich. Nichtsdestotrotz können Epitope des Zytomegalievirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV), Hepatitis-C-Virus (HCV) oder auch des HI-Virus die HLA-E Peptidbindungsstelle stabilisieren (Pietra et al., 2003, Romagnani et al., 2002, Schulte et al., 2009), und HCV-/CMV und EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit HLA-E Restriktion konnten *in vivo* nachgewiesen werden (Joosten et al., 2016). Folglich hat die Modulation von HLA-E möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Erkennung HIV-1-infizierter Zellen durch die adaptive oder angeborene zytotoxische Immunantwort. Bisher ist sowohl eine unveränderte als auch erhöhte HLA-E Expression auf HIV-1-infizierten Zellen beschrieben (Nattermann et al., 2005, Hansen et al., 2016, Davis et al., 2016, Martini et al., 2005, Fogli et al., 2008, Bonaparte and Barker, 2004, Wu et al., 2018, Specht et al., 2008). Cohen et al. testete die Auswirkung von NL4-3 Nef auf HLA-E im Zelllinienmodell 721.221 und beobachtete unveränderte HLA-E Expressionslevel auf der Oberfläche virusinfizierter Zellen. Er identifizierte veränderte Aminosäuresequenzen im zytoplasmatischen Schwanz von HLA-E, als Grund für die fehlende Herunterregulation durch Nef (Cohen et al., 1999). Die Auswirkung des akzessorischen Proteins Vpu unterschiedlicher HI-Virusstränge auf die HLA-E Oberflächenexpression infizierter Zellen, wurde bisher noch nicht untersucht.

2.1.5 Darstellung der Publikation

Gegenstand dieser Arbeit ist die experimentelle Erforschung zur Modulation des HLA-E auf der Zelloberfläche humaner CD4⁺ T-Zellen durch die HIV-Proteine Nef und Vpu unterschiedlicher Virusstränge. Die im Rahmen der Doktorarbeit erhobenen experimentellen Daten führten zu einer geteilten Erstautorschaft ‚Primary HIV-1 Strains Use Nef To Downmodulate HLA-E Surface Expression‘ im *Journal of Virology*, 2019, so dass es sich hier um eine Publikationspromotion handelt. In dieser konnte erstmals gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Zellkultur-adaptierten HIV-1 Strängen, primäre HIV-1 Stränge die Oberflächenlevel von HLA-E modulieren.

Der Schwerpunkt dieser Doktorarbeit fokussiert sich auf die Fragestellung, mit welchem Mechanismus HIV-1 die Oberflächenexpression von HLA-E ändert. Die zugrundeliegende **Hypothese** war, dass die akzessorischen Proteine Nef und Vpu die HLA-E Level auf der Oberfläche HIV-1–infizierter CD4⁺ T-Zellen beeinflussen.

2.2 Material und Methoden

Vermehrung lentiviraler Plasmide in E. Coli

Um das virale Plasmid der jeweiligen HIV-1 Stränge (inklusive Knockout-Viren) quantitativ zu vermehren wurde die Hitzeschock Methode angewendet, um die Transformation einer Bakterienkultur durchzuführen. Dabei optimierte ich die Anweisungen des Herstellerprotokolls, um eine Rekombination des Plasmids über die long terminal repeats (LTR) zu verhindern. Hierzu wurden stb13 Bakterien auf Eis aufgetaut, das Plasmid hinzugefügt und für 30 min inkubiert. Danach wurden die stb13 Bakterien für 45 s und 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert. Es wurde 250 µl warmes SOC Medium hinzugefügt und die Bakterien wurden erneut für 1 Std. bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator horizontal gelagert. Danach wurden 100 µl der Bakterienlösung auf einer Antibiotikum-beimpfte LB-Agarplatte (Ampicillin oder Kanamycin, abhängig von der vorliegenden Resistenz) titriert und über Nacht bei 26 °C inkubiert. Am Folgetag konnten die entstandenen Kolonien in Flüssigkulturen vermehrt werden. Dafür wurde unter sterilen Bedingungen eine passende Kolonie entnommen und ein 500 ml Flask mit 250 ml LB broth Maxi und 250 µl Antibiotikum beimpft. Die Kulturen wurden daraufhin für 40 Std. bei 20 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde aus den gewachsenen Kolonien die DNA mittels Maxi Prepkit (Qiagen) isoliert.

Die Plasmide enthielten das provirale Genom infektiöser molekularer Klone, welche zum einen für die Sequenz des laboradaptierten Virus NL4-3 kodierten, und zum anderen aus Sequenzen von Primärproben HIV-1-infizierter Patient:innen hergestellt wurden (Parrish et al., 2013, Fenton-May et al., 2013, Ochsenbauer et al., 2012). Sie wurden verwendet um replikationsfähige HIV-1 Virione und die zugehörigen Mutanten via Lipofectamin-basierter Transfektion von HEK392T Zellen herzustellen: pBR_HIV-1 NL4-3 (WT, Δnef und Δvpu), pCH077.t. (WT, Δnef und Δvpu), pCH198.c (WT, Δnef und Δvpu). Die genannten Plasmide erhielten wir freundlicherweise von unseren Kollaborationspartnern Prof. Dr. Frank Kirchhoff und Prof. Dr. Daniel Sauter.

Qualitätskontrolle mittels Restriktionsverdau

Nach der DNA-Isolierung wurden eine Rekombination der Plasmide mittels Restriktionsenzymverdau und Gelelektrophorese ausgeschlossen. Nachdem die Enzyme und Puffer für den Verdau ausgewählt wurden, wurde 1 μg DNA, 5 μl Puffer und 1 μl Enzym addiert und die fehlende Menge ddH₂O hinzugefügt um eine Gesamtmenge von 60 μl zu erreichen. Dieses Gemisch wurde für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Ein passendes Agarosegel mit einer Konzentration von 0,8 % wurde durch Zugabe von 150 ml TEA 1X, 1,8 g Agarose und 15 μl SYBR Safe hergestellt. Die Suspension wurde erwärmt und dann in die Gelkammer gegeben, um fest zu werden. Das DNA-Enzymgemisch wurde mit einer ausgewählten Menge an Ladefarbstoff (6x) versetzt und in die entsprechende Gelkammer gegeben. Der Lauf wurde bei 150 V für 45 Minuten durchgeführt. Im Anschluss konnte das Gel unter UV-Licht analysiert werden.

Lentivirus-Produktion in HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden so ausgesät, dass am Tag der Transfektion eine mindestens 90 % Konfluenz erreicht wurde. Ein Mastermix aus 12 μg der entsprechenden Plasmid-DNA wurde in OptiMEM gelöst um ein Endvolumen von 1,5 ml zu erreichen und für 5 min inkubiert. Das zuvor verdünnte Lipofectamin2000 wurde tropfenweise zu der verdünnten DNA-Mischung gegeben und danach für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zellmedium, auf den zuvor ausgesäten HEK293T-Zellen, wurde entfernt und die verbleibenden Zellen gewaschen. Danach wurden 9 ml OptiMEM vorsichtig auf die Zellen gegeben und die Lipofectamin2000/DNA-Lösung konnte hinzugegeben und für 4 Std. bei 37 °C inkubiert werden. Danach wurde das Medium mit 10 ml RPMI-1640 und 10 % FBS ersetzt und die Zellen darin erneute 48- 72 Std.

bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde der im Überstand befindlichen Virus zentrifugiert (5 min, 500 g) und gefiltert. Die einzelnen Virus-Aliquots wurden bei -80 Grad Celsius gelagert.

Isolierung, Aktivierung und Infektion von primären CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen wurden aus zuvor gewonnenen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) HIV-1-negativer Spender:innen mit Hilfe einer negativen Selektionsstrategie des EasySep humaner CD4 Zellen-Kits nach Anweisung des Herstellerprotokolls isoliert. Die gewonnenen Zellen wurden in 3×10^6 Zellen/ml RPMI, versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertes FBS und 100 IE/ml humanes rekombinantes Interleukin 2 (hrIL-2) (Peprotech), kultiviert. Für die Aktivierung der CD4⁺ Zellen wurden anti-CD3/CD28-bedeckte magnetische Beads in einer Bead-zu-Zell-Relation von 1:1 genutzt. Die durchgeführte Aktivierung führte zur Reduzierung der HIV-1 CCR5-Corezeptorexpression, sodass die Beads nach 72 Std. entfernt werden mussten und die Zellen für weitere 72 Std. vor der Infektion ruhten. Dies gewährleistete eine ausreichende Wiederherstellung der CCR5-Oberflächenexpression. Für die Infektion wurden die aktivierten CD4⁺ T-Zellen in viralem Überstand oder Zellkulturmedium (Negativkontrolle) resuspendiert und einer zweistündigen Spin-Infektion mit $1,200 \times g$ bei 37 °C, unterzogen. Danach wurde das Medium durch frisches RPMI (10 % FBS und 100U/ml IL-2) ersetzt und die infizierten CD4⁺ Zellen mit einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. 72 Std. nach Infektion wurde die HLA-E Expression mittels Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie untersucht.

Auswertung der Proteinoberflächenexpression durch Antikörperfärbung und durchflusszytometrische Analysen

Für die detaillierte Auflistung aller Antikörper verweise ich auf die Publikation. Das folgende Protokoll zum Anfärben der Oberflächenproteine wurde verwendet: Zur Unterscheidung der lebenden und toten Zellen wurde jeweils 1×10^6 der zuvor infizierten Zellen einer LIVE/DEAD Antikörperfärbung unterzogen. Danach wurden die Zellen mit 100 µl der Oberflächen-Antikörper-Mischung gefärbt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Um eine intrazelluläre Färbung für HIV-1 p24 Gag durchführen zu können, wurden die Zellen mittels „Fix and Perm Permeabilization Kit (Thermo Fischer)“ nach Anweisung des Herstellerprotokolls fixiert und permeabilisiert. Die Durchflusszytometrie wurde mittels BD LSR Fortessa, BD Analyse und FACS Divav.7.0. Software oder mittels BD FACS Aria Fusion Flow Cytometer mit BD FACS Diva 7.0. Software durchgeführt.

Statistische Auswertung und Datenanalyse

Für die detaillierte statistische Auswertung verweise ich auf die Publikation. Die gesamte Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde mit Hilfe der FlowJo (v10.1) Software durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism (8) verwendet.

Gating-Strategien

Zur Identifizierung der HIV-1-infizierten CD4⁺ T-Zellen wurden verschiedene Gating-Strategien verglichen. Nachdem Lymphozyten in dem Vorwärts (FSC-A) -und Seitwärts-Scattergate (SSC-A) gated wurden, wurden anschließend Doubletten durch FSC-W und SSC-W eliminiert. Lebende Zellen wurden identifiziert indem sie negativ für das Zombie NIR Staining und positiv für CD3 waren. Nicht infizierte, aber virus-exponierte Zellen (p24⁻, CD4⁺) wurden identifiziert indem ein Gating an der Negativkontrolle (uninfiziert, keine Virusexposition) vorgenommen wurde (Abb. 2A). Das Gate für die HIV-1-infizierten Zellen (p24⁺, CD4^{dim}) wurde an dem 2 % Contour-Gate der p24⁺ – CD4⁺ Zellen des jeweiligen Virusstrangs gesetzt. Im nächsten Schritt fuhr ich mit zwei verschiedenen Gating-Strategien, abhängig von dem infizierenden Virusstrang, fort. Für die infizierten Nef-Mutanten wurde aufgrund der Nef-bedingten CD4-Herunterregulierung eine Gating-Methode mit Tetherin angewendet. Ebenfalls eingerichtet am 2 % Contour-Gate der Zellen wurden die Δnef – infizierten Zellen als p24⁺ Tetherin^{dim} identifiziert. Bei einer Infektion durch den Wildtyp (WT) oder den Knockout-Virus Vpu (Δvpu) wurde CD4 gegen p24 aufgetragen und so virusinfizierte Zellen als p24⁺ CD4^{dim} definiert.

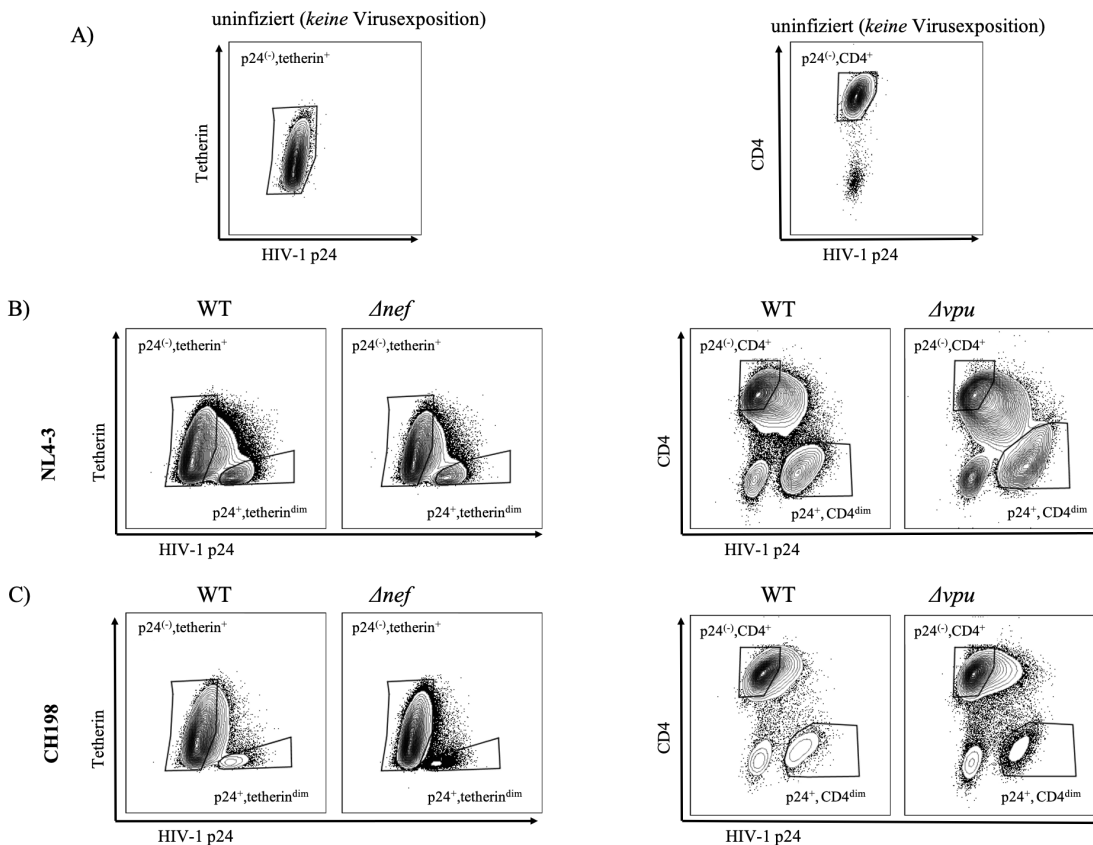


Abbildung 2: Gating-Strategien für die Analyse der HLA-E Oberflächenlevel auf infizierten und uninfizierten Zellen am Beispiel von NL4-3 und CH198

A) Das Gate für die uninfizierten Zellen wurde für jeden Spender individuell an der uninfizierten, nicht virusexponierten Kontrollprobe an dem 2 %-Konturplot festgelegt. Uninfizierte Zellen wurden als $p24^{-}$, Tetherin⁺ für das Tetherin - HIV-1 p24 Gating (links) und als $p24^{-}$, CD4⁺ für das CD4 - HIV-1 p24 Gating (rechts) definiert. (B, C) Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analysen von isolierten CD4⁺ T-Zellen, die mit Wildtyp (WT) oder Δnef -Mutanten (links) infiziert sind, und für CD4⁺ T-Zellen, die mit Wildtyp (WT) oder Δvpu -Mutanten (rechts) von HIV-1 NL4-3 (B) und CH198 (C) infiziert sind. Zur Identifizierung der HIV-1-infizierten Zellen wurde Tetherin oder CD4 gegen HIV-1 p24 aufgetragen. HIV-1-infizierte T-Zellen wurden als $p24^{+}$, tetherin^{dim} nach Δnef -Virusinfektion (links) und als $p24^{+}$, CD4^{dim} für Δvpu -Virusinfektion definiert.

Ethische Erklärung

Alle Spendenden haben eine schriftliche Einwilligung nach zuvor durchgeführter Aufklärung unterzeichnet. Das Protokoll wurde durch der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg zugelassen (PV4780). Ein besonderer Dank geht an die Spender:innen der „Healthy Cohort Hansestadt Hamburg“, die uns Blutproben zur Gewinnung der PBMCs zur Verfügung stellten.

2.3 Ergebnisse

Es folgt eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse der geteilten Erstautorschaftspublikation, mit besonderem Fokus auf den im Rahmen dieser Doktorarbeit generierten Ergebnissen. Für den ausführlichen Ergebnisteil verweise ich auf die Publikation.

Aus HIV-1-positiven Personen isolierte HIV-1 Sequenzen regulierten HLA-E nach *in vitro* Infektion von CD4⁺ T-Zellen herunter.

Initial wurde untersucht, wie verschiedene HI-Virusstränge die Oberflächenlevel von HLA-E auf infizierten CD4⁺ T-Zellen modulieren. Teil der untersuchten Viren waren sowohl laboradaptierte Virusstränge, nämlich NL4-3, SF162, SF2, LAI, als auch Infektiöse Molekulare Klone (IMC), welche aus Sequenzen von Primärproben HIV-1-positiver Patient:innen vorherig im Hahn-Labor generiert worden waren (CH293, CH107, CH164, CH185, CH236, CH077, CH198) (Ochsenbauer et al., 2012, Parrish et al., 2013, Fenton-May et al., 2013). Während die laboradaptierten Viren HLA-E Level kaum veränderten, variierten die HLA-E Level nach Infektion mit den unterschiedlichen Primärsträngen im Vergleich zu den HLA-E Leveln der nicht-infizierten CD4⁺ T-Zellen. Dabei zeigten die zwei HIV-1 Stränge CH077 und CH198 die stärkste HLA-E Herunterregulierung von der Zelloberfläche infizierter CD4⁺ T-Zellen mit einer durchschnittlichen Veränderung der detektierten HLA-E Expression von -35 % [Interquartilsabstand (IQA) = -43 % bis -31 %] für CH077 und -40 % [IQA = -51 % bis -30 %] für CH198. Basierend hierauf, führten wir die weiteren Experimente zur Identifizierung des Mechanismus der HLA-E Herunterregulierung mit diesen zwei Primärsträngen durch, welche ferner zwei unterschiedliche Subtypen der Gruppe M des HIV-1 repräsentieren (CH077, ein Subtyp B Virus und CH198, ein Subtyp C Virus). Zusätzlich schlossen wir den zellkulturadaptierten Virus NL4-3 in die folgenden Experimente als Kontrollvirus mit ein, da bisherige publizierte Daten zu HLA-E überwiegend auf Infektionen mit diesem Virusstrang basierten.

Funktionelle Validierung des Knockouts von Nef und Vpu.

Die Infektion von primären CD4⁺ T-Zellen wurde als *in vitro* Model der HIV-1 Infektion durchgeführt und bildet die Grundlage der nachfolgenden Experimente zur HLA-E Herunterregulierung durch die akzessorischen Proteine Nef und Vpu. Dafür wurden die im Kirchhoff-Labor generierten Knockouts der IMCs CH077 und CH198 und des Laborstrang NL4-3 in den akzessorischen Proteinen Nef (Δnef) und Vpu (Δvpu) genutzt. Diese Nef –und Vpu-Mutanten wurden im Kirchhoff-Labor durch vorzeitige Stopcodons mittels gezielter

Mutagenese generiert. Wir validierten den durch die Mutation erzeugten Protein-Funktionsverlust durch Färbung der Oberflächenmoleküle Tetherin, CD4 und HLA-I validiert (siehe Material und Methoden & Abb. 2). Bestätigend zeigte sich, dass die Nef-Virusmutanten die Fähigkeit verloren, HLA-Klasse-I-Moleküle herunterzuregulieren. Da die gesamt-HLA-I-Färbung mit den höher exprimierten HLA-A und -B Molekülen korreliert (Ende et al., 2018), führten wir die Reduktion in der gesamt-HLA-I-Färbung auf die Nef-vermittelte Herunterregulierung von HLA-A und -B zurück. Bei den Vpu-Mutanten zeigte sich ein Verlust der Fähigkeit Tetherin von der Zelloberfläche zu entfernen.

HLA-E Herunterregulierung auf infizierten CD4⁺ T-Zellen durch die akzessorischen Proteine Nef und Vpu.

Um die HLA-E Oberflächenlevel der infizierten Zellen zu quantifizieren, führten wir eine durchflusszytometrische Analyse durch. Dabei zeigte sowohl eine Infektion mit dem WT des Subtyp B Virus CH077 als auch mit dem WT des Subtyp C Virus CH198 eine signifikante Herunterregulierung von HLA-E auf den CD4⁺ T-Zellen (mediane relative Veränderung für CH077: -52 % [Interquartilsabstand (IQA) = -57 % bis -42 %] und für CH198: -50 % [IQA = -55 % bis -26 %]). Dies bestätigt erneut die Fähigkeit von CH077 und CH198 neben den klassischen HLA-A und -B auch die HLA-E Oberfläche zu modulieren.

CD4⁺ T-Zellen infiziert mit der Virus-Mutante Nef verloren die Fähigkeit dieser Herunterregulierung (mediane relative Veränderung für CH077: -25 % [IQA = -33 % bis -8 %] und für CH198: +11 % [IQA = -8 % bis +33 %]). Auch Zellen, die mit dem Vpu-Knockout-Virus infiziert wurden, erzielten nicht dasselbe Ausmaß der HLA-E Runterregulierung wie der entsprechende WT (mediane relative Veränderung für CH077: -29 % [IQA = -35 % bis -23 %], CH198: -28 % [IQA = -36 % bis -24 %]). Um eine genauere Aussage bezüglich eines möglichen Zusammenspiels dieser beiden Proteine auf die HLA-E Oberflächenexpression zu treffen, testeten wir den Effekt einer Doppel-Mutanten mit einem Knockout in sowohl Nef als auch Vpu für CH077. Es zeigte sich deutlich, dass die Infektion mit der doppelten Virusmutatante in CH077 zu einem vollständigen Verlust der HLA-E Herunterregulierung auf den infizierten CD4⁺ T-Zellen führte.

Zusammenfassend bestätigten unsere Daten die Hypothese einer Nef-induzierten HLA-E Herunterregulierung infizierter primärer CD4⁺ T-Zellen durch HIV-1 Primärstränge. Für Vpu-Virusmutanten zeigte sich, im Vergleich zum WT, eine geringere Fähigkeit der HLA-E Herunterregulierung.

2.4 Diskussion

HIV-1 Proteine Nef und Vpu modulieren die HLA-E Oberflächenexpression auf primären CD4⁺ T-Zellen

Die einzigartige Ausstattung des HI-Virus mit den akzessorischen Proteinen Nef, Vpu, Vpr und Vif, ermöglicht es dem Virus der Erkennung durch das humane Immunsystem zu entgehen. Insbesondere die Proteine Nef und Vpu spielen durch die Regulation spezifischer Immunrezeptorliganden auf der Zelloberfläche eine entscheidende Rolle um der zytotoxischen zellulären Immunantwort zu entkommen (Sugden et al., 2016, Cerboni et al., 2007). Wichtige Zielstrukturen dieser akzessorischen Proteine sind die HLA-Klasse-I-Moleküle auf den Zellen des Zielorganismus. Anders als zur HLA-A und -B Oberflächenexpression gibt es wenige Untersuchungen zur Veränderung der HLA-E Expression in der HIV-1-Infektion. Bisher wurden unveränderte (Cohen et al., 1999, Williams et al., 2002, Lisovsky et al., 2015, Ramsuran et al., 2018, Davis et al., 2016) oder auch erhöhte (Nattermann et al., 2005, Martini et al., 2005) HLA-E Level im Zusammenhang mit einer HI-Virusinfektion gezeigt. Cohen et al. beobachteten unveränderte HLA-E Level bei Infektion einer 721.221 Zelllinie mit dem laboradaptierten Virus NL4-3 (Cohen et al., 1999). Ebenso zeigten Davis et al., welche CD4⁺ T-Zellen mit den zwei laboradaptierten Virussträngen NL4-3 und SF162 infizierten, keine Veränderung der HLA-E Oberflächenexpression der infizierten Zellen (Davis et al., 2016). Entgegen der bisher erhobenen Datenlage, dass die HLA-E Oberflächenexpression nicht durch HIV-1 beeinflusst wird (Cohen et al., 1999, Williams et al., 2002, Davis et al., 2016, Lisovsky et al., 2015, Ramsuran et al., 2018) oder dass eine HIV-Infektion zu einer HLA-E Hochregulierung auf den infizierten Zellen führt (Nattermann et al., 2005, Martini et al., 2005), zeigten unsere Daten, dass die Modulation der HLA-E Oberflächenexpression auf infizierten Zellen vom Virusstrang abhängig ist. Dies geschieht analog zu der Modulation des Oberflächenmoleküls HLA-C. Hier zeigten Apps et al. in einer wichtigen Studie, dass die Regulierung abhängig von dem Virusstrang unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann (Apps et al., 2016). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig dargestellt werden, dass die HIV-Proteine Nef und Vpu zu einer Herunterregulierung des Oberflächenmoleküls HLA-E auf infizierten primären CD4⁺ T-Zellen führt. Nichtsdestotrotz bedarf es weiterführender Experimente, insbesondere der Testung verschiedener Primärviren in unterschiedlichen Stadien der Infektion, um das Ausmaß einer HLA-E Regulierung auch trotz veränderten immunologischen Gegebenheiten und Adaptation im Wirtorganismus richtig zu erfassen.

Die Rolle der zytoplasmatischen Domäne in der Nef-induzierten Herunterregulierung von HLA-E

Gezielt unterbindet Nef wichtige Zelltransporte des Wirtsorganismus, um so die HIV-Infektion voranzutreiben. Dabei spielt neben der Clathrin-vermittelten Endozytose an der Zellmembran auch die Nef-induzierte Umleitung neu synthetisierter Proteine am TGN eine entscheidende Rolle (Buffalo et al., 2019). Auch unsere Daten zeigen eine Nef-induzierte HLA-E Herunterregulierung. Allerdings unterscheidet sich HLA-E deutlich von den restlichen HLA-Klasse-I-Molekülen aufgrund der besonderen Eigenschaft der HLA-E Oberflächenexpression direkt abhängig von sogenannten Signalpeptiden zu sein (siehe Abbildung 3). Eine Änderung in dem Level der Signalpeptide durch vermehrte Translation von HLA-Klasse-I Molekülen könnte die HLA-E Oberflächenexpression in der HIV-1-Infektion möglicherweise indirekt beeinflussen. Die zweite Hypothese war, dass Nef die HLA-E Expression direkt durch Interaktion mit dem zytoplasmatischen Schwanz des Moleküls beeinflusst. Es stellt sich die Frage, welcher zugrundeliegende Mechanismus die HLA-E Regulierung zu verantworten hat. HLA-E bindet vorzugsweise Signalpeptide der Länge 3-11 AS von HLA-A, -B, -C, und -G, sein eigenes Peptid kann es jedoch nicht zur Verfügung stellen. Diese Peptide werden durch Signal-Peptid-Peptidasen (SPP) aus der Membran des ERs gelöst, durch das Protoasom zurechtgeschnitten und durch Antigenpeptid Transporter (TAP) an die spezifische Bindungsstelle im HLA-E Molekül gebunden (Lemberg et al., 2001, Bland et al., 2003). So wird die HLA-E Oberflächenexpression durch die Bindung dieser Signalpeptide ermöglicht (Braud et al., 1997, Braud et al., 1998). Die klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle werden in der HIV-1-Infektion gezielt durch Nef und Vpu von der Zelloberfläche rekrutiert und über AP-1 lysosomal degradiert (Roeth et al., 2004). Folglich geschieht diese Degradierung vor allem posttranslational und damit zeitlich nach der HLA-E Peptid-Beladung. Dies lässt ein zumindest nicht vermindertes Repertoire an verfügbaren Signalpeptiden für die HLA-E Beladung, trotz aktiver HIV-1-Infektion, annehmen.

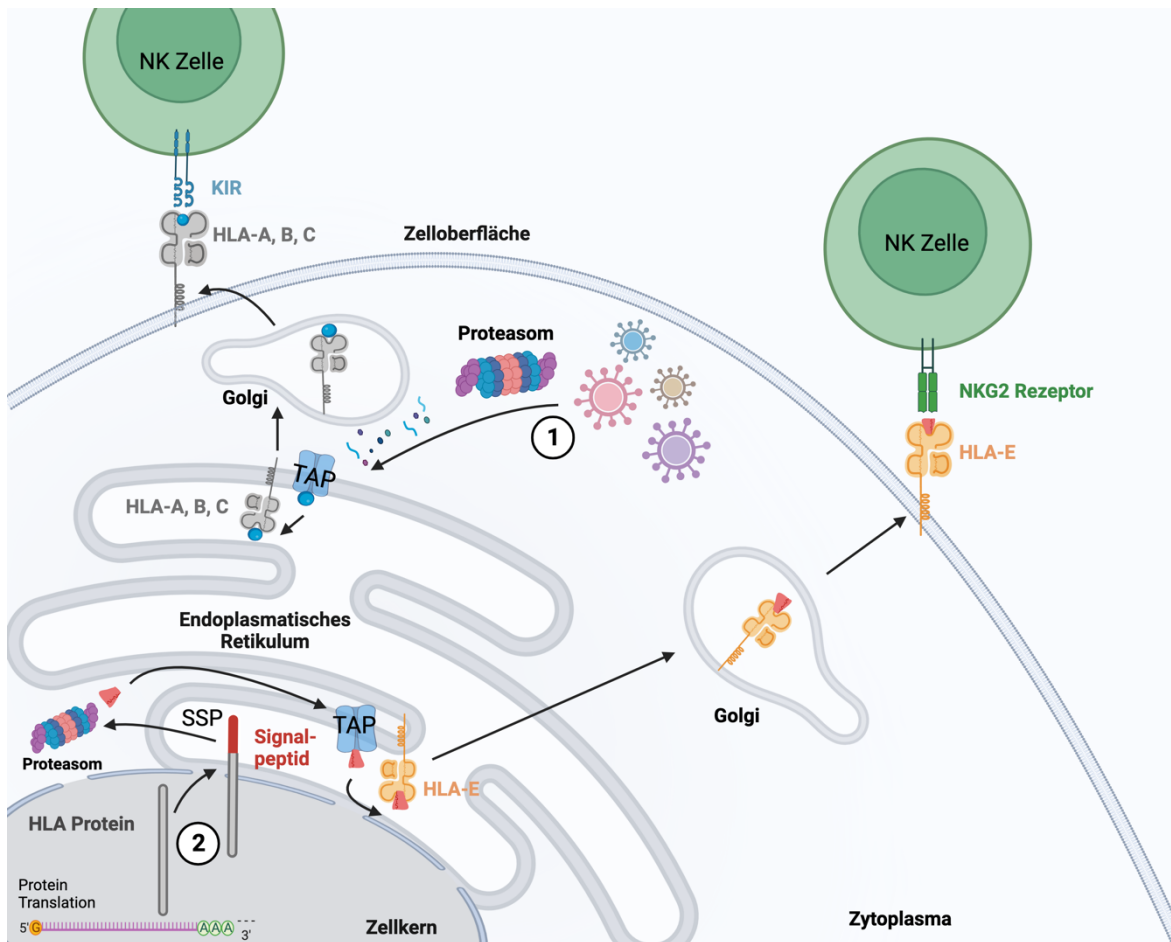


Abbildung 3: Modell zur HLA-E Oberflächenexpression mithilfe des Signalpeptids

Auf Ebene der Translation entsteht durch die gezielte Aneinanderreihung verschiedener Aminosäuren ein Repertoire an unterschiedlichen HLA-Klasse-I-Molekülen. Eine der Aufgaben der klassischen HLA-A, -B und -C Moleküle besteht in der Präsentation pathogener Virusbestandteile, welche zuvor durch das Proteasom zerkleinert wurden (1). An der Zelloberfläche interagieren sie beispielsweise mit den Killer Cell Immunoglobulin-like Rezeptoren (KIRs) der NK-Zellen und spielen so eine wichtige Rolle in der frühen Immunantwort des angeborenen Immunsystems. Das nicht klassische HLA-E Molekül hingegen benötigen ein sogenanntes Signalpeptid um zur Zelloberfläche zu gelangen (2). Dieses Signalpeptid kann beispielsweise eine bestimmte Aminosäuresequenz im Prozess der HLA-A, -B, oder -C-Produktion sein. Das Signalpeptid leitet das neu translatierte HLA-Molekül in das Endoplasmatische Retikulum, wo es dann durch Signal-Peptid-Peptidasen (SPPs) aus dem ER-Lumen heraus- und durch das Proteasom zurechtgeschnitten wird. Mithilfe von TAP wird das nun passende Peptid auf HLA-E geladen und das beladene HLA-E Molekül gelangt anschließend über das Trans-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche. Dort kann es mit

den CD94/NKG2 Rezeptoren der NK-Zellen interagieren. Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com.

Um zu prüfen, ob die beobachtete Nef-induzierte HLA-E Herunterregulierung ähnlich wie im Falle von HLA-A und -B, abhängig von dem zytoplasmatischen Schwanz des HLA-Klasse-I-Moleküls ist, ergänzten wir unsere Experimente mit einem sogenannten „Tail-Swap“ Experiment. Dafür transduzierten wir drei rekombinante Jurkatzelllinien: Jurkat-HLA-A2 Zellen, die das komplette HLA-A*02:01 Molekül als Positivkontrolle exprimieren, Jurkat-HLA-A2:ECYT Zellen, die sowohl die extrazelluläre Domäne und Transmembrandomäne von HLA-A*02:01 exprimieren aber verbunden mit der zytoplasmatischen Domäne von HLA-E*01:03 waren, und Jurkat-HLA-A2:CCYT, welche die extrazelluläre Domäne und Transmembrandomäne von HLA-A*02:01 und die zytoplasmatische Domäne von HLA-C*04:01 exprimierten. Wir konnten beobachten, dass Nef sowohl über den zytoplasmatischen Schwanz von HLA-A*02:01, als auch über den von HLA-E*01:03 eine Herunterregulierung herbeiführte, aber nicht mit dem von HLA-C*04:01 interagiert. Dies lässt einen Mechanismus ähnlich der HLA-Klasse-I-Molekül-Rekrutierung vermuten. Zugleich bestärkte es, dass die HLA-E Herunterregulierung unabhängig von HIV-1-induzierter Veränderung der in der Zelle vorhandenen Leader-Peptide ist.

Entscheidend für die Nef-induzierte Umleitung der HLA-A und -B Moleküle zur lysosomalen Degradierung ist die Interaktion mit AP-1 (Roeth et al., 2004). Neben AS in den Nef-Sequenzen sind auch bestimmte AS im zytoplasmatischen Schwanz der HLA-Moleküle für die AP-1 Bindung wichtig. So sind drei AS: Alanin (A)³²⁴, Tyrosin (Y)³²⁰ und Asparagin (D)³²⁷, ausschlaggebend an der Bindung des Nef-MHC-I-Komplexes durch AP-1 beteiligt (Wonderlich et al., 2008). Eine Mutation dort führte zu einer aufgehobenen Interaktion zwischen NL4-3 Nef und dem mutierten Schwanz von HLA-A2 (Mann et al., 2013). Diese wichtigen Aminosäuren fanden sich auch in HLA-E, zeigte in unseren Experimenten jedoch keinen signifikanten Unterschied in einer Nef-induzierten Herunterregulierung zwischen einem mutierten zytoplasmatischen Schwanz HLA-A2:ECYT(Y320C, D327N) und HLA-A:ECYT Konstrukt in Jurkatzellen. Obwohl die Struktur von HLA-E der gesamten Architektur der HLA-Klasse-Ia-Moleküle sehr ähnlich ist, weist dies auf Unterschiede in dem Interaktionsmechanismus mit Nef hin. Williams et al. demonstrierten, dass die HLA-Klasse-Ia Herunterregulierung durch NL4-3 Nef direkt über eine bestimmte AS-Sequenz (YSQAASS) im zytoplasmatischen Schwanz herbeigeführt wurde. Diese wichtige Sequenz unterschied sich jedoch in dem

zytoplasmatischen Schwanz von HLA-E in 3 AS (YSKAWES) und verhinderte eine Herunterregulierung von der Zelloberfläche (Williams et al., 2002). Solche Unterschiede in der zytoplasmatischen Schwanzregion könnten einen Erklärungsansatz für die unterschiedliche Stärke der Herunterregulierung der verschiedenen HLA-Klasse-I-Moleküle bieten. Unser Tail-Swap Experiment erlaubt zwar einen ersten Erklärungsversuch der beobachteten HLA-E Herunterregulierung, jedoch bedarf es weiterführender Experimente um den genauen Mechanismus der Interaktion von Nef mit HLA-E zu identifizieren. Diese weiterführenden Experimente könnten beispielsweise AP-1 Knockout-Experimente sein, um die Rolle von AP-1 in der Nef-induzierten Oberflächenänderung von HLA-E zu verstehen.

Unterschiede in Vpu-vermittelter HLA-E Suppression in Jurkatzellen und primären CD4⁺ T-Zellen

Die Knockout-Experimente mit HIV-1 zeigten die wichtige Rolle von Nef im HI-Virus für die HLA-E Herunterregulation. In den humanen CD4⁺ T-Zellen zeigte sich ebenfalls ein Effekt des Vpu Knockouts auf die HLA-E Oberflächenexpression. Im Gegensatz dazu führte die alleinige Präsenz von Vpu in einer Jurkat T-Zelllinie nicht zu einer Modulation von HLA-E. Eine mögliche Erklärung liegt in der Besonderheit der Jurkatzelllinie. So diente die 1977 isolierte Tumorzelllinie eines mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) erkrankten Patienten zwar als eine der ersten *in vitro* Systeme zur Erforschung diverser T-Zell Prozesse und lieferte die Grundlage vieler Entdeckungen und Publikationen (Schneider et al., 1977). Doch schon Anfang des 21. Jahrhunderts wurde diese Zelllinie als Repräsentant für T-Zell-Prozesse aufgrund fehlender Übereinstimmungen und zunehmender Mutationen in Frage gestellt (Astoul et al., 2001). Erst kürzlich lieferte Gioia et al. in einer Erhebung eine ausführliche Auflistung der unterschiedlichen Charakteristiken dieser T-Zelllinien und beschrieb neu auftretende Mutationen der Jurkatzellen. Dafür wurden neuste Technologien des Gesamt-Genom-Sequenzierung (engl. NGS) verwendet (Gioia et al., 2018). Es wurde gezeigt, dass vor allem Gene des T-Zell Rezeptor -Signalweges (*PTEN*, *INPP5D*, *CTLA4* und *SYK*), der Genom Stabilität (*TP53*, *BAX* und *MSH2*) sowie der O-Glykolisierung (*C1GALT1C1*) beschädigende Mutationen aufwiesen. Das HIV-akzessorische Proteine Vpu, welches in Vpu-Knockin-Experimenten in eine Jurkatzelllinie zu keiner Veränderung der HLA-E Expression führte, ist maßgebend an der Inhibierung zellinterner Transportprozesse beteiligt. Häufig sind bestimmte Zielstrukturen an den Proteinen eine wichtige Voraussetzung dieser Interaktion. Stark veränderte T-Zell-Strukturen, wie sie in den Jurkatzellen vorliegen, könnten diese notwendigen Zielstrukturen nicht mehr adäquat vorweisen und die HLA-E Herunterregulierung somit

beeinträchtigen. Des Weiteren könnte ein fehlender Trigger als Folge eines unterbrochenen T-Zell-Signalweges die Vpu-induzierte HLA-E Herunterregulierung inhibieren. Um konkrete Aussagen bezüglich der Rolle von Vpu in der HLA-E Oberflächenmodulation zu treffen, bedarf es daher einer weitergehenden Analyse in anderen Zellkulturmodellen und primären Zelltypen.

Ein anderer Erklärungsansatz könnte unser Experiment mit HIV-1 CH077 und Defekt in Nef und Vpu liefern. Die Daten des Doppel-Knockouts lassen einen synergistischen Effekt der HLA-E Regulierung vermuten. Schon länger ist bekannt, dass Nef und Vpu sich in ihren Funktionen ergänzen. So ist die Herunterregulierung von CD4 und CD1d ebenfalls ein Resultat aus dem Zusammenspiel dieser beiden Proteine (Wildum et al., 2006, Moll et al., 2010). Dabei spielt Nef vor allem in der frühen Infektion eine entscheidende Rolle und ist verantwortlich für die Internalisierung und die Umleitung von CD4 von der Zelloberfläche zur lysosomalen Degradierung (Aiken et al., 1994, Craig et al., 1998). Vpu hingegen wird aus einem mRNA-Transkript im späteren Lebenszyklus des Virus gebildet und verhindert den Transport von neu gebildetem CD4-Molekülen zur Zelloberfläche (Geleziunas et al., 1994, Willey et al., 1992). Diese aufeinander abgestimmten Prozesse verhindern eine Superinfektion und den frühzeitigen Zelltod, was wiederum genügend Zeit für die effektive Virusproduktion gewährleistet. Gleichmaßen könnte die HLA-E Herunterregulierung einem synergistischen Effekt dieser zwei Proteine unterliegen. Ähnlich der CD4- Rekrutierung scheint Nef dabei die dominierende Rolle zu übernehmen. Unsere Daten geben jedoch nur einen punktuellen Messzeitpunkt der HLA-E Expression nach akuter *in vitro* HIV-1-Infektion wieder und repräsentieren damit nicht den natürlichen zeitlichen Verlauf einer HI-Virusinfektion. Daher sind weiterführende Experimente mit verschiedenen Messzeitpunkten notwendig, um die Kinetik der HLA-E Modulation in der Infektion zu identifizieren und damit den Effekt von Vpu und Nef auf HLA-E im Zusammenspiel besser zu verstehen.

Mögliche funktionelle Auswirkungen einer HLA-E Herunterregulierung für die Erkennung HI-virusinfizierter Zellen durch NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen

HLA-E stellt als nicht-klassisches HLA-Klasse-I-Molekül einen wichtigen Liganden in der Immunmodulation von NK-Zellen und in der Erkennung von CD8⁺ T-Zellen dar. Durch eine Interaktion des Moleküls mit den CD94/NKG2 Rezeptoren der NK-Zelle kann es durch Inhibition (NKG2A) oder Aktivierung (NKG2C) direkt Einfluss auf die angeborene Immunantwort nehmen. Interessanterweise ist die Affinität von HLA-E zu CD94/NKG2A stärker ausgebildet als zum aktivierenden CD94/NKG2C Rezeptor (Béziat et al., 2011, Valés-

Gómez et al., 1999). Die Funktion der NKG2C⁺ NK-Zellen in der HIV-1-Infektion ist bisher nicht ausreichend bekannt und hat womöglich einen Einfluss auf die Erkennung und Tötung HIV-1 von infizierten T-Zellen durch NK-Zellen. Inwieweit die HLA-E Herunterregulierung einen Teil zum Evasionsmechanismus des HIV-1 beiträgt, ist daher Gegenstand weiterer Studien wie der Prüfung der NK-Zellaktivität mittels NK-Zellfunktionstests (NK-Killing-Assays) gegen CD4⁺ T-Zellen nach Infektion mit unterschiedlichen Virusstämmen.

Da immer mehr Daten auf die Wirksamkeit einer NKG2A Hemmung mittels Antikörper im Kampf gegen Tumore, Autoimmunerkrankungen und auch Infektionskrankheiten hinweisen, könnten weiterführende Experimente mit Antikörpern gegen NKG2A/C die Rolle von HLA-E in der HIV-Infektion besser identifizieren. Interessanterweise zeigen neue Studien, dass im Falle des Ovarial –und Zervix Karzinoms überwiegend NKG2A⁺ CD8⁺ T-Zellen den Tumor infiltrierten und ein Anti-NKG2A-Antikörper die Anti-Tumoraktivität der CD8⁺ T-Zellen deutlich erhöht (André et al., 2018, van Montfoort et al., 2018). Dient HLA-E als zentrale Drehscheibe der Immunabwehr? Als Hauptligand für CD94/NKG2A ist HLA-E sowohl für die NK-Zelle als auch für die CD8⁺ T-Zell -Aktivität von Bedeutung. Auch unsere Daten ziehen den Fokus neu auf das nicht-klassische HLA-E Molekül und seine Funktion in der HIV-1-Infektion und fordern vertiefte Forschung der genauen Interaktion zwischen virusinfizierter Zelle, HLA-E Expression und den Einfluss auf die antivirale Immunantwort vermittelt durch NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen.

2.5 Zusammenfassung

Geschickt umgeht das Humane Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) die antivirale Immunantwort der angeborenen und erworbenen Immunabwehr durch gezielte Modulation von Oberflächenproteinen, die von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und CD8⁺ T-Zellen zur Erkennung virusinfizierter Zellen genutzt werden. Dabei nutzt es eine spezielle Ausstattung HIV-Virus-spezifischer Proteine, die sogenannten akzessorischen Proteine. Insbesondere die gezielte Regulierung des humanen Leukozyten-Antigensystems (HLA) Klasse- I durch die akzessorischen Proteine Nef und Vpu verhindert eine effektive Immunantwort der zytotoxischen antiviralen Immunzellen gegen das HI-Virus im menschlichen Wirt. In dieser Arbeit wurde die Modulation des nicht-klassischen HLA-E durch das HI-Virus, mit besonderem Fokus auf die akzessorischen lentiviralen Proteine Nef und Vpu, untersucht.

Um die Modulation von HLA-E durch das HI-Virus besser verstehen zu können, testeten wir sowohl laboradaptierte Virusstränge als auch aus HIV-1-positiven Personen isolierte Virussequenzen und zeigten für letztere erstmalig eine verringerte HLA-E Oberflächenexpression auf infizierten CD4⁺ T-Zellen. Weiterführend konnte ich durch die Nutzung von Virusmutanten in Nef und Vpu zeigen, dass beide Proteine in die HLA-E Oberflächenlevel eingreifen, wobei der Effekt von Nef auf HLA-E stärker ausgeprägt war. Zuletzt wiesen „Tail-Swap“-Experimente auf eine Interaktion von Nef mit dem zytoplasmatischen Schwanz des HLA-E Moleküls hin. Zusammenfassend zeigen unsere Daten erstmalig eine Herunterregulierung des nicht-klassischen HLA-Klasse-I-Moleküls E auf primären CD4⁺ T-Zellen in der HIV-1-Infektion und identifizierten eine Interaktion der zytoplasmatischen HLA-E Domäne mit dem akzessorischen Protein Nef als möglichen Mechanismus. Diese Erkenntnisse gewährleisteten neue Einblicke in die komplexen Vorgänge der viralen Immunmodulation und betonen die Rolle akzessorischer Proteine als mögliche Zielstrukturen für neue Therapieansätze für eine verbesserte HIV-Immunkontrolle, da HLA-E als Ligand für sowohl Natürliche Killerzellen als auch zytotoxische CD8 T-Zellen dient.

Die Publikationspromotion basiert auf der Publikation: ‚Primary HIV-1 Strains Use Nef To Downmodulate HLA-E Surface Expression‘ im *Journal of Virology*, 2019 mit geteilter Erstautorenschaft und stellt meinen Eigenanteil an der zugrundeliegenden Veröffentlichung dar.

2.6 Summary

Infection with the human immune deficiency virus type 1 (HIV-1) result in most cases in fatal immunodeficiency, and research over the past decades has focussed on understanding the mechanisms of HIV-1 immunoevasion. Accessory proteins represent a unique feature of HIV-1 and play a crucial role in evasion of natural killer cell and CD8⁺ T cell-mediated antiviral immunity. In particular, the two accessory proteins Nef and Vpu are heavily researched structures of the virus as they enhance its pathogenicity and virulence by targeting the human leukocyte antigen system (HLA) class I and other relevant antiviral structures of the host organism. However, only a few studies have investigated the modulation of the non-classical HLA-E molecule during HIV-1-infection and literature presents inconsistent data on this.

To assess the effect of HIV-1 on HLA-E surface expression on infected cells, we infected primary CD4⁺ T cells. We used cell-culture adapted HIV and primary strains to study a diverse panel of viruses. Primary HIV-1 strains downregulated HLA-E during *in vitro* infection to various degrees whereas HLA-E levels after infection with cell-culture adapted viruses remained nearly unchanged. To identify the underlying mechanism of HLA-E downregulation in a next step, we used knockout mutant viruses with defective *nef* and *vpu* genes. As a result, we observed a loss of the ability to downregulate HLA-E from the surface of CD4⁺ T cells after infection with viruses having no functional Nef protein. Furthermore, our data showed that the accessory protein Vpu also plays a minor role in downregulating HLA-E, hinting at a potential synergistic effect of these two proteins. Subsequently, "tail-swap" experiments indicated that Nef interacted with the cytoplasmatic tail of HLA-E but not that of HLA-C.

These findings show for the first time that HLA-E is downregulated following infection with primary HIV strains in a Nef-dependent manner. Furthermore, our data reveal an underlying mechanism similar to the HLA-A and -B downregulation by Nef targeting the cytoplasmatic tail of HLA-E. In conclusion, these findings identified a novel target in the complex immune escape mechanism of HIV-1. Further studies will be needed to understand the functional outcome of HLA-E-downregulation for immune recognition and control of HIV-1 replication.

2.7 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
CCR5	C-C Chemokine Rezeptor 5
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Zytomegalievirus
EBV	Eppstein-Bar Virus
Env	Envelope
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Gag	Group specific gen
HAART	Hochaktive Antiretrovirale Therapie
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus-1
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen-System
IQA	Interquartilsabstand
LTR	Long terminal repeat
MFI	Median fluorescence intensity
MHC	Major Histocompatibility complex
mRNA	Messenger Ribunukleinsäure
Nef	Negative regulatory factor
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NKG2A	Natürliche Killerzellen Gruppe 2 A
NKG2C	Natürliche Killerzellen Gruppe 2 C
ORF	Open reading frame
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
Pol	Polymerase
Rev	Regulator of expression of virion proteins
B-TrCP	Beta-transducin repeats-containing proteins
TAP	Antigenpeptid-Transporter
Tat	Trans-activatingregulatory protein
Vif	Viral infectivity factor
Vpr	Virales Protein R
Vpu	Virales Protein U
WT	Wildtype

2.8 Literaturverzeichnis

- AHMAD, N. & VENKATESAN, S. 1988. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science*, 241, 1481-1485.
- AIKEN, C., KONNER, J., LANDAU, N. R., LENBURG, M. E. & TRONO, D. 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*, 76, 853-864.
- ANDRÉ, P., DENIS, C., SOULAS, C., BOURBON-CAILLET, C., LOPEZ, J., ARNOUX, T., BLÉRY, M., BONNAFOUS, C., GAUTHIER, L. & MOREL, A. 2018. Anti-NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells. *Cell*, 175, 1731-1743. e13.
- APPS, R., DEL PRETE, G. Q., CHATTERJEE, P., LARA, A., BRUMME, Z. L., BROCKMAN, M. A., NEIL, S., PICKERING, S., SCHNEIDER, D. K. & PIECHOCKA-TROCHA, A. 2016. HIV-1 vpu mediates HLA-C downregulation. *Cell host & microbe*, 19, 686-695.
- ARBEITSKREIS BLUT 2004. Humanes Immunschwächevirus (HIV)-Stellungnahme des Arbeitskreises Blut. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* [Online im Internet] URL: <https://doi.org/10.1007/s00103-003-0753-8> [zuletzt abgerufen am 12.10.2023 um 17.30 Uhr].
- ARTS, E. J. & HAZUDA, D. J. 2012. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2, a007161.
- ASTOUL, E., CANTRELL, D. A., EDMUNDS, C. & WARD, S. G. 2001. PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models. *Trends in immunology*, 22, 490-496.
- ATTIA, S., EGGER, M., MÜLLER, M., ZWAHLEN, M. & LOW, N. 2009. Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. *Aids*, 23, 1397-1404.
- BETZI, S., RESTOUIN, A., OPI, S., AROLD, S. T., PARROT, I., GUERLESQUIN, F., MORELLI, X. & COLLETTE, Y. 2007. Protein-protein interaction inhibition (2P2I) combining high throughput and virtual screening: application to the HIV-1 Nef protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19256-19261.
- BÉZIAT, V., HERVIER, B., ACHOUR, A., BOUTOLLEAU, D., MARFAIN-KOKA, A. & VIEILLARD, V. 2011. Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells. *Blood*, 117, 4394-4396.
- BLAND, F. A., LEMBERG, M. K., MCMICHAEL, A. J., MARTOGLIO, B. & BRAUD, V. M. 2003. Requirement of the proteasome for the trimming of signal peptide-derived epitopes presented by the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule HLA-E. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 33747-33752.
- BONAPARTE, M. I. & BARKER, E. 2004. Killing of human immunodeficiency virus-infected primary T-cell blasts by autologous natural killer cells is dependent on the ability of the virus to alter the expression of major histocompatibility complex class I molecules. *Blood*, 104, 2087-2094.
- BOUR, S., PERRIN, C., AKARI, H. & STREBEL, K. 2001. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF- κ B activation by interfering with β TrCP-mediated degradation of I κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 15920-15928.
- BRAUD, V., YVONNE JONES, E. & MCMICHAEL, A. 1997. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *European journal of immunology*, 27, 1164-1169.

- BRAUD, V. M., ALLAN, D. S., WILSON, D. & MCMICHAEL, A. J. 1998. TAP-and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Current Biology*, 8, 1-10.
- BUFFALO, C. Z., IWAMOTO, Y., HURLEY, J. H. & REN, X. 2019. How HIV Nef proteins hijack membrane traffic to promote infection. *Journal of virology*, 93.
- CERBONI, C., NERI, F., CASARTELLI, N., ZINGONI, A., COSMAN, D., ROSSI, P., SANTONI, A. & DORIA, M. 2007. Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Journal of General Virology*, 88, 242-250.
- CHAPEL, A., GARCIA-BELTRAN, W. F., HÖLZEMER, A., ZIEGLER, M., LUNEMANN, S., MARTRUS, G. & ALTFELD, M. 2017. Peptide-specific engagement of the activating NK cell receptor KIR2DS1. *Scientific reports*, 7, 1-12.
- COHEN, E. A., TERWILLIGER, E. F., SODROSKI, J. G. & HASELTINE, W. A. 1988. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature*, 334, 532-534.
- COHEN, G. B., GANDHI, R. T., DAVIS, D. M., MANDELBOIM, O., CHEN, B. K., STROMINGER, J. L. & BALTIMORE, D. 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity*, 10, 661-671.
- COHEN, M. S., GAY, C., KASHUBA, A. D., BLOWER, S. & PAXTON, L. 2007. Narrative review: antiretroviral therapy to prevent the sexual transmission of HIV-1. *Annals of internal medicine*, 146, 591-601.
- COLLINS, K. L., CHEN, B. K., KALAMS, S. A., WALKER, B. D. & BALTIMORE, D. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, 391, 397-401.
- CONNOR, E. M., SPERLING, R. S., GELBER, R., KISELEV, P., SCOTT, G., O'SULLIVAN, M. J., VANDYKE, R., BEY, M., SHEARER, W. & JACOBSON, R. L. 1994. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *New England Journal of Medicine*, 331, 1173-1180.
- CRAIG, H. M., PANDORI, M. W. & GUATELLI, J. C. 1998. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 11229-11234.
- DAVIS, Z. B., COGSWELL, A., SCOTT, H., MERTSCHING, A., BOUCAU, J., WAMBUA, D., LE GALL, S., PLANELLES, V., CAMPBELL, K. S. & BARKER, E. 2016. A conserved HIV-1-derived peptide presented by HLA-E renders infected T-cells highly susceptible to attack by NKG2A/CD94-bearing natural killer cells. *PLoS pathogens*, 12, e1005421.
- DE COCK, K. M., GILKS, C. F., LO, Y.-R. & GUERMA, T. 2009. Can antiretroviral therapy eliminate HIV transmission? *The Lancet*, 373, 7-9.
- EISINGER, R. W. & FAUCI, A. S. 2018. Ending the HIV/AIDS pandemic. *Emerging infectious diseases*, 24, 413.
- ENDE, Z., DEYMIER, M. J., CLAIBORNE, D. T., PRINCE, J. L., MÓNACO, D. C., KILEMBE, W., ALLEN, S. A. & HUNTER, E. 2018. HLA class I downregulation by HIV-1 variants from subtype C transmission pairs. *Journal of virology*, 92.
- FEDER, J., GNIRKE, A., THOMAS, W., TSUCHIHASHI, Z., RUDDY, D., BASAVA, A., DORMISHIAN, F., DOMINGO, R., ELLIS, M. & FULLAN, A. 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature genetics*, 13, 399-408.
- FELLAY, J., SHIANN, K. V., GE, D., COLOMBO, S., LEDERGERBER, B., WEALE, M., ZHANG, K., GUMBS, C., CASTAGNA, A. & COSSARIZZA, A. 2007. A whole-

- genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *science*, 317, 944-947.
- FENTON-MAY, A. E., DIBBEN, O., EMMERICH, T., DING, H., PFAFFEROTT, K., AASA-CHAPMAN, M. M., PELLEGRINO, P., WILLIAMS, I., COHEN, M. S. & GAO, F. 2013. Relative resistance of HIV-1 founder viruses to control by interferon-alpha. *Retrovirology*, 10, 1-18.
- FOGLI, M., MAVILIO, D., BRUNETTA, E., VARCHETTA, S., ATA, K., ROBY, G., KOVACS, C., FOLLMANN, D., PENDE, D. & WARD, J. 2008. Lysis of endogenously infected CD4+ T cell blasts by rIL-2 activated autologous natural killer cells from HIV-infected viremic individuals. *PLoS pathogens*, 4, e1000101.
- GELEZIUNAS, R., BOUR, S. & WAINBERG, M. A. 1994. Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1. *The FASEB Journal*, 8, 593-600.
- GIOIA, L., SIDDIQUE, A., HEAD, S. R., SALOMON, D. R. & SU, A. I. 2018. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC genomics*, 19, 334.
- HAHN, B. H., SHAW, G. M., DE, K. M. & SHARP, P. M. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, 287, 607-614.
- HANSEN, S. G., WU, H. L., BURWITZ, B. J., HUGHES, C. M., HAMMOND, K. B., VENTURA, A. B., REED, J. S., GILBRIDE, R. M., AINSLIE, E. & MORROW, D. W. 2016. Broadly targeted CD8+ T cell responses restricted by major histocompatibility complex E. *Science*, 351, 714-720.
- HINDORFF, L. & MACARTHUR, J. 2011. Wise A, Junkins HA, Hall PN, Klemm AK, Manolio TA: A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies.
- HÖLZEMER, A., THOBAGALE, C. F., JIMENEZ CRUZ, C. A., GARCIA-BELTRAN, W. F., CARLSON, J. M., VAN TEIJLINGEN, N. H., MANN, J. K., JAGGERNATH, M., KANG, S.-G. & KÖRNER, C. 2015. Selection of an HLA-C* 03: 04-restricted HIV-1 p24 gag sequence variant is associated with viral escape from KIR2DL3+ natural killer cells: data from an observational cohort in South Africa. *PLoS medicine*, 12, e1001900.
- HOROWITZ, A., DJAOUD, Z., NEMAT-GORGANI, N., BLOKHUIS, J., HILTON, H. G., BÉZIAT, V., MALMBERG, K.-J., NORMAN, P. J., GUETHLEIN, L. A. & PARHAM, P. 2016. Class I HLA haplotypes form two schools that educate NK cells in different ways. *Science immunology*, 1.
- JOOSTEN, S. A., SULLIVAN, L. C. & OTTENHOFF, T. H. 2016. Characteristics of HLA-E restricted T-cell responses and their role in infectious diseases. *Journal of immunology research*, 2016.
- KASLOW, R. A., CARRINGTON, M., APPLE, R., PARK, L., MUÑOZ, A., SAAH, A., GOEDERT, J. J., WINKLER, C., O'BRIEN, S. J. & RINALDO, C. 1996. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nature medicine*, 2, 405-411.
- KESTIER III, H. W., RINGLER, D. J., MORI, K., PANICALI, D. L., SEHGAL, P. K., DANIEL, M. D. & DESROSIERS, R. C. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*, 65, 651-662.
- KING, A., ALLAN, D. S., BOWEN, M., POWIS, S. J., JOSEPH, S., VERMA, S., HIBY, S. E., MCMICHAEL, A. J., WAI LOKE, Y. & BRAUD, V. M. 2000. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *European journal of immunology*, 30, 1623-1631.
- KIRCHHOFF, F. 2010. Optimale" Anpassung pandemischer HIV-1-Stämme an den Menschen. *BIOspektrum*, 2, 144-148.
- KLOTMAN, M. E., KIM, S., BUCHBINDER, A., DEROSI, A., BALTIMORE, D. & WONG-STAAAL, F. 1991. Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 5011-5015.

- KLØVERPRIS, H. N., LESLIE, A. & GOULDER, P. 2016. Role of HLA adaptation in HIV evolution. *Frontiers in immunology*, 6, 665.
- KÖRNER, C., SIMONEAU, C. R., SCHOMMERS, P., GRANOFF, M., ZIEGLER, M., HÖLZEMER, A., LUNEMANN, S., CHUKWUKELU, J., CORLEIS, B. & NARANBHAI, V. 2017. HIV-1-mediated downmodulation of HLA-C impacts target cell recognition and antiviral activity of NK cells. *Cell host & microbe*, 22, 111-119. e4.
- KUNIHOLM, M. H., GAO, X., XUE, X., KOVACS, A., ANASTOS, K., MARTI, D., GREENBLATT, R. M., COHEN, M. H., MINKOFF, H. & GANGE, S. J. 2011. Human leukocyte antigen genotype and risk of HIV disease progression before and after initiation of antiretroviral therapy. *Journal of virology*, 85, 10826-10833.
- LEMBERG, M. K., BLAND, F. A., WEIHOFEN, A., BRAUD, V. M. & MARTOGLIO, B. 2001. Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes. *The Journal of Immunology*, 167, 6441-6446.
- LISOVSKY, I., ISITMAN, G., SONG, R., DAFONSECA, S., TREMBLAY-MCLEAN, A., LÉBOUCHÉ, B., ROUTY, J.-P., BRUNEAU, J. & BERNARD, N. F. 2015. A higher frequency of NKG2A⁺ than of NKG2A⁻ NK cells responds to autologous HIV-infected CD4 cells irrespective of whether or not they coexpress KIR3DL1. *Journal of virology*, 89, 9909-9919.
- LUNEMANN, S., MARTRUS, G., HÖLZEMER, A., CHAPEL, A., ZIEGLER, M., KÖRNER, C., BELTRAN, W. G., CARRINGTON, M., WEDEMEYER, H. & ALTFELD, M. 2016. Sequence variations in HCV core-derived epitopes alter binding of KIR2DL3 to HLA-C* 03: 04 and modulate NK cell function. *Journal of hepatology*, 65, 252-258.
- MALIM, M. H. & EMERMAN, M. 2008. HIV-1 accessory proteins—ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell host & microbe*, 3, 388-398.
- MANN, J. K., BYAKWAGA, H., KUANG, X. T., LE, A. Q., BRUMME, C. J., MWIMANZI, P., OMARJEE, S., MARTIN, E., LEE, G. Q. & BARAKI, B. 2013. Ability of HIV-1 Nef to downregulate CD4 and HLA class I differs among viral subtypes. *Retrovirology*, 10, 100.
- MARTINI, F., AGRATI, C., D'OFFIZI, G. & POCCIA, F. 2005. HLA-E up-regulation induced by HIV infection may directly contribute to CD94-mediated impairment of NK cells. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 18, 269-276.
- MOLL, M., ANDERSSON, S. K., SMED-SÖRENSEN, A. & SANDBERG, J. K. 2010. Inhibition of lipid antigen presentation in dendritic cells by HIV-1 Vpu interference with CD1d recycling from endosomal compartments. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116, 1876-1884.
- MORENO ÁLVAREZ, A. 2020. *HIV/AIDS Study. Bibliographic review of the virus and mathematical models*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- NATTERMANN, J., NISCHALKE, H. D., HOFMEISTER, V., KUPFER, B., AHLENSTIEL, G., FELDMANN, G., ROCKSTROH, J., WEISS, E. H., SAUERBRUCH, T. & SPENGLER, U. 2005. HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. *Antivir Ther*, 10, 95-107.
- OCHSENBAUER, C., EDMONDS, T. G., DING, H., KEELE, B. F., DECKER, J., SALAZAR, M. G., SALAZAR-GONZALEZ, J. F., SHATTOCK, R., HAYNES, B. F. & SHAW, G. M. 2012. Generation of transmitted/founder HIV-1 infectious molecular clones and characterization of their replication capacity in CD4 T lymphocytes and monocyte-derived macrophages. *Journal of virology*, 86, 2715-2728.
- PACYNIAK, E., GOMEZ, M. L., GOMEZ, L. M., MULCAHY, E. R., JACKSON, M., HOUT, D. R., WISDOM, B. J. & STEPHENS, E. B. 2005. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the subtype B Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that is responsible for retention in the golgi complex and its absence in

- the Vpu protein from a subtype C HIV-1. *AIDS Research & Human Retroviruses*, 21, 379-394.
- PALELLA JR, F. J., DELANEY, K. M., MOORMAN, A. C., LOVELESS, M. O., FUHRER, J., SATTEN, G. A., ASCHMAN, D. J., HOLMBERG, S. D. & INVESTIGATORS, H. O. S. 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*, 338, 853-860.
- PARRISH, N. F., GAO, F., LI, H., GIORGI, E. E., BARBIAN, H. J., PARRISH, E. H., ZAJIC, L., IYER, S. S., DECKER, J. M. & KUMAR, A. 2013. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 6626-6633.
- PIETRA, G., ROMAGNANI, C., MAZZARINO, P., FALCO, M., MILLO, E., MORETTA, A., MORETTA, L. & MINGARI, M. C. 2003. HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 10896-10901.
- PIGUET, V., GU, F., FOTI, M., DEMAUREX, N., GRUENBERG, J., CARPENTIER, J.-L. & 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.
- PRESTON, B. D., POIESZ, B. J. & LOEB, L. A. 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, 242, 1168-1171.
- RAMSURAN, V., NARANBHAI, V., HOROWITZ, A., QI, Y., MARTIN, M. P., YUKI, Y., GAO, X., WALKER-SPERLING, V., DEL PRETE, G. Q. & SCHNEIDER, D. K. 2018. Elevated HLA-A expression impairs HIV control through inhibition of NKG2A-expressing cells. *Science*, 359, 86-90.
- ROBINSON, J., HALLIWELL, J. A., HAYHURST, J. D., FLICEK, P., PARHAM, P. & MARSH, S. G. 2015. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic acids research*, 43, D423-D431.
- ROETH, J. F., WILLIAMS, M., KASPER, M. R., FILZEN, T. M. & COLLINS, K. L. 2004. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *The Journal of cell biology*, 167, 903-913.
- ROMAGNANI, C., PIETRA, G., FALCO, M., MILLO, E., MAZZARINO, P., BIASSONI, R., MORETTA, A., MORETTA, L. & MINGARI, M. C. 2002. Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 11328-11333.
- SCHNEIDER, U., SCHWENK, H. U. & BORNKAMM, G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International journal of cancer*, 19, 621-626.
- SCHULTE, D., VOGEL, M., LANGHANS, B., KRÄMER, B., KÖRNER, C., NISCHALKE, H. D., STEINBERG, V., MICHALK, M., BERG, T. & ROCKSTROH, J. K. 2009. The HLA-ER/HLA-ER Genotype Affects the Natural Course of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and Is Associated with HLA-E-Restricted Recognition of an HCV-Derived Peptide by Interferon- γ -Secreting Human CD8⁺ T Cells. *The Journal of infectious diseases*, 200, 1397-1401.
- SCHWARTZ, S., FELBER, B., FENYÖ, E. & PAVLAKIS, G. 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *Journal of virology*, 64, 5448-5456.
- SMITHGALL, T. E. & THOMAS, G. 2013. Small molecule inhibitors of the HIV-1 virulence factor, Nef. *Drug Discovery Today: Technologies*, 10, e523-e529.

- SPECHT, A., DEGOTTARDI, M. Q., SCHINDLER, M., HAHN, B., EVANS, D. T. & KIRCHHOFF, F. 2008. Selective downmodulation of HLA-A and-B by Nef alleles from different groups of primate lentiviruses. *Virology*, 373, 229-237.
- STREBEL, K., KLIMKAIT, T. & MARTIN, M. A. 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science*, 241, 1221-1223.
- STUDY, I. H. C. 2010. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science*, 330, 1551-1557.
- SUGDEN, S. M., BEGO, M. G., PHAM, T. N. & COHEN, É. A. 2016. Remodeling of the host cell plasma membrane by HIV-1 Nef and Vpu: a strategy to ensure viral fitness and persistence. *Viruses*, 8, 67.
- TERWILLIGER, E., SODROSKI, J., ROSEN, C. & HASELTINE, W. 1986. Effects of mutations within the 3'orf open reading frame region of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) on replication and cytopathogenicity. *Journal of virology*, 60, 754-760.
- TRONO, D. 1995. HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell*, 82, 189-192.
- VALÉS-GÓMEZ, M., REYBURN, H. T., ERSKINE, R. A., LÓPEZ-BOTET, M. & STROMINGER, J. L. 1999. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *The EMBO journal*, 18, 4250-4260.
- VAN DAMME, N., GOFF, D., KATSURA, C., JORGENSEN, R. L., MITCHELL, R., JOHNSON, M. C., STEPHENS, E. B. & 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.
- VAN MONTFOORT, N., BORST, L., KORRER, M. J., SLUIJTER, M., MARIJT, K. A., SANTEGOETS, S. J., VAN HAM, V. J., EHSAN, I., CHAROENTONG, P. & ANDRÉ, P. 2018. NKG2A blockade potentiates CD8 T cell immunity induced by cancer vaccines. *Cell*, 175, 1744-1755. e15.
- VAN TEIJLINGEN, N. H., HÖLZEMER, A., RNER, C. K., GARCÍA-BELTRÁN, W. F., SCHAFFER, J., FADDA, L., SUSCOVICH, T., BRANDER, C., CARRINGTON, M. & EVANS, D. T. 2014. Sequence variations in HIV-1 p24 Gag-derived epitopes can alter binding of KIR2DL2 to HLA-C* 03: 04 and modulate primary NK cell function. *AIDS (London, England)*, 28, 1399.
- WAN, L., MOLLOY, S. S., THOMAS, L., LIU, G., XIANG, Y., RYBAK, S. L. & THOMAS, G. 1998. PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell*, 94, 205-216.
- WHO. 2020a. *WHO Corona Virus Disease(Covid-19)* [Online im Internet]. URL: <https://covid19.who.int> [zuletzt abgerufen am 12.10.2023 um 13.30 Uhr].
- WHO 2020b. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. [Online im Internet]. URL: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> [zuletzt abgerufen am 12.10.2023 um 22.30 Uhr].
- 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. *Journal of virology*, 80, 8047-8059.
- WILLEY, R. L., MALDARELLI, F., MARTIN, M. & STREBEL, K. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *Journal of virology*, 66, 226-234.
- WILLIAMS, M., ROETH, J. F., KASPER, M. R., FLEIS, R. I., PRZYBYCIN, C. G. & COLLINS, K. L. 2002. Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to

- the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking. *Journal of virology*, 76, 12173-12184.
- WONDERLICH, E. R., WILLIAMS, M. & COLLINS, K. L. 2008. The tyrosine binding pocket in the adaptor protein 1 (AP-1) μ 1 subunit is necessary for Nef to recruit AP-1 to the major histocompatibility complex class I cytoplasmic tail. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 3011-3022.
- WU, H. L., WISEMAN, R. W., HUGHES, C. M., WEBB, G. M., ABDULHAQQ, S. A., BIMBER, B. N., HAMMOND, K. B., REED, J. S., GAO, L. & BURWITZ, B. J. 2018. The role of MHC-E in T cell immunity is conserved among humans, rhesus macaques, and cynomolgus macaques. *The Journal of Immunology*, 200, 49-60.
- WYATT, R. & SODROSKI, J. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, 280, 1884-1888.

3 Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Als geteilte Erstautorin lege ich im Folgenden meinen Eigenanteil an der Publikation ‚Primary HIV-1 Strains Use Nef To Downmodulate HLA-E Surface Expression‘ im *Journal of Virology*, 2019 dar, auf der diese Publikationspromotion basiert. Ich generierte replikationsfähigen HI-Virus (Wildtype und Mutanten) mittels lentiviraler Transduktion nach Vermehrung der Plasmide durch bakterielle Transformation (siehe Material und Methoden für eine ausführliche Beschreibung). Ebenfalls etablierte ich das Protokoll zur Infektion von primären CD4⁺ T-Zellen mit CCR5-tropischen Viren und Virusvarianten, und validierte den Knockout der akzessorischen Proteine funktionell und auf Sequenzebene, und etablierte eine geeignete Gatingstrategie zur Analyse der durchflusszytometrischen Daten. Zusammengefasst sind die von mir durchgeführten Experimente, Datenanalysen und die Interpretation der Ergebnisse der Knockout-Viren-Experimente in Figur 4 der Publikation dargestellt. Es folgt der jeweilige Anteil der Co-Autor:innen: Thomas van Stigt Thans, Annika Niehrs und Angelique Hölzemer führten die Experimente, Datenanalysen und die Interpretation für Figuren 1, 2, 3, und 5 der Publikation durch. Christopher T. Ford half Virenbestand aus infektiösen molekularen Klonen zu produzieren. Laura Richert half bei der statistischen Datenanalyse. Christina M. Stürzel, Hui Li, Christina Ochsenbauer, John C. Kappes, Beatrice H. Hahn, Frank Kirchhoff und Daniel Sauter generierten stellten die infektiösen molekulare Klone zur Verfügung und generierten aus diesen die Nef- und Vpu Knockout-Virusmutanten. Darüber hinaus gaben sie wertvolle Hilfestellungen im Prozess der Datenanalyse. Wilfredo F. Garcia-Beltran, Glòria Martus, Marcus Altfeld und Angelique Hölzemer unterstützten die Daten im gesamten Kontext zu interpretieren. Am Verfassen des Manuskriptes waren Thomas van Stigt Thans, Annika Niehrs und Angelique Hölzemer beteiligt.

4 Danksagung

Ich möchte mit einem großen Dankeschön an Marcus Altfeld beginnen. Er gab mir die Möglichkeit meine Doktorarbeit im Rahmen eines Forschungsjahres in seinem Labor zu absolvieren. Die besonderen Erfahrungen die ich in dieser Zeit machen durfte, prägen mich noch heute. Es war nicht immer einfach neue Experimente zu konzipieren und die Ergebnisse richtig zu interpretieren, doch ich wusste, dass ich Marcus mit seinem umfangreichen wissenschaftlichen und medizinischen Wissen und seinem praktischen „Know-Hows“ immer um Rat fragen konnte. Er gab mir den nötigen Rückenwind, um sowohl die Publikation als auch meine Publikationspromotion fertigzustellen.

Zugleich möchte ich Angelique Hölzemer danken, die als meine Betreuerin jegliche Erwartung überstiegen hat. Zu jeder Tages- (und Nachtzeit) konnte ich sie mit Fragen und Problemen erreichen, ohne dass mich ein schlechtes Gewissen plagen musste. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft und ihr Interesse an der Forschung steckte mich förmlich an. Ohne ihr Investment, hätte ich in meinem Forschungsjahr nicht so viel erreichen können. Im richtigen Moment wusste sie mich herauszufordern, noch ein Stück weiterzudenken oder detaillierter nachzuforschen. Ihr Vorgehen, in äußerster Sorgfalt Dinge durchzuführen, prägen mich noch heute. Auch über das Jahr hinweg investierte sich Angelique mit ihrer Zeit und ihrem Wissen in meine Doktorarbeit und dafür bin ich ihr sehr dankbar!

Darüber hinaus möchte ich dem ganzen Altfeld-Laborteam danken! Es gab so viele die mir bei Fragen zu meinen Experimenten tatkräftig zur Seite standen. Ein besonderes Dank geht an Rebecca Cornelis, meine Laborpartnerin und Freundin. Sie hat meinen Laboralltag wirklich positiv geprägt und war einer der wissbegierigsten Menschen die ich kennenlernen durfte.

Sehr dankbar bin ich auch dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) für ihr MD Programm, an dem ich teilnehmen durfte (Verbundprojekt: TI 07.003 - FP2016: MD Programme Chukwukelu). Die finanziellen Mittel unterstützten mein Projekt maßgeblich.

Abschließen möchte ich mit einem Dank an meine Familie, die mich durch diese Zeit getragen haben. Als sich die Länge und Intensität des Prozesses der Doktorarbeit offenbarte, gaben sie mir die nötige Kraft nicht aufzugeben. Besonders danke ich meinem Ehemann Davin, der mir mit unserem Sohn Noel, die nötige Zeit freiräumte, um diese Doktorarbeit abschließen zu können. Seine Geduld und Ruhe sind mein Halt in all dem Tun.

-CHUKWU DAALU!

5 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

6 Publikationsliste

10/ 2019 Publikation mit Erstautorinnenschaft:

van Stigt Thans, T., Akko, J. I., Niehrs, A., Garcia-Beltran, W. F., Richert, L., Stürzel, C. M., ... & Hahn, B. H. (2019). Primary HIV-1 strains use Nef to downmodulate HLA-E surface expression. *Journal of virology*, 93(20), e00719-19

Eigenanteil: die Experimente, Datenanalysen und die Interpretation der Ergebnisse der Knockout-Viren-Experimente (Fig. 4 in der Publikation), sowie die Beteiligung am Verfassen des Manuskriptes

07/2017 Publikation mit Co-Autorinnenschaft

Körner, C., Simoneau, C. R., Schommers, P., Granoff, M., Ziegler, M., Hölzemer, A., ... & Kwon, D. S. (2017). HIV-1-mediated downmodulation of HLA-C impacts target cell recognition and antiviral activity of NK cells. *Cell host & microbe*, 22(1), 111-119.

Eigenanteil: Durchführung der Experimente insbesondere Optimierung des Infektionsprotokolls und Darstellung der Zelloberflächenmoleküle durch bestimmte Färbungen

Präsentationen

09/2018

Poster-Präsentation auf dem Natural Killer Cell Symposium 2018 in Hamburg
HIV-1 strains differentially interfere with surface levels of the NKG2A-receptor ligand HLA-E“

7 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift _____