

Potent inhibition of HIV-1 by TRIM5-cyclophilin fusion proteins engineered from human components

Martha R. Neagu,^{1,2,3} Patrick Ziegler,² Thomas Pertel,^{2,3} Caterina Strambio-De-Castilla,² Christian Grütter,⁴ Gladys Martinetti,⁵ Luca Mazzucchelli,⁶ Markus Grütter,⁴ Markus G. Manz,^{2,7} and Jeremy Luban^{1,2,3,8}

HINTERGRUND:

- HIV-Therapie mittels Gen-Therapie? → Unterdrückung der HIV-Replikation möglichst vor RT Aktivität (um Resistenzentwicklung zu verhindern) und IT Aktivität (Integration im menschlichen Genom)
- Tripartite motif-containing 5 (TRIM5) inhibiert HIV direkt nach dem Zell-Eintritt. Trim5 exprimiert ein C-terminal PRYSPRY Domain welches notwendig ist Capsid HIV zu binden
- Humanes TRIM5 α bindet HIV-1 nur schwach, aber Rhesus TRIM5 α bindet HIV-1 effektiv
- New owl monkey → TRIM5 Gen exprimiert ein Fusions-Protein zw. Protein TRIM5 α und Cyclophilin a → AoT5Cyp α verhindert HIV-Infektion
→ AoT5Cyp α ist kein humanes Protein und wirkt somit potentiell immunogen
- **Ziel:** Entwicklung eines humanen T5CypA, welches HIV Infektion verhindert

METHODEN

- Plasmide: hT5Cyp α Konstrukte wurden geklont mit überlappender PCR
- Zellen: HEK293T, CRFK feline kidney cells, Jurkat E6-1, H9, CEM-SS, and SUP-T1 T cell leukemia/lymphoma cell lines and U937 promonocytic lymphoma, and THP-1 monocytic leukemia cells
- Virusproduktion durch Transfektion von 293T Zellen, Two-part vectors → Co-Transfektion von Virus-Genom und VSV-G Plasmid à 7:1. Three-part vectors → Co-Transfektion von Virus-Genom, gag-pol, und VSV-G Plasmid à 4:3:1
- Infektionen: GFP Synthese wurde gemessen mittel Durchflusszytometrie
- Western Blot und Immunpräzipitation: Detektion von hT5Cyp α Inkubation mit anti-FLAG M2 monoklonaler AK → G-Sepharose beads → rabbit polyklonaler AK to CypA;
Co- Immunpräzipitation: Detektion von hT5Cyp mit HIV-1 CA → anti-FLAG M2 monoklonaler AK → G-Sepharose beads → rabbit polyklonaler anti-CypA AK + goat polyklonaler anti-HIV-1 CA

RESULTATE

Design von hT5Cyp Fusionsproteinen mit anti-HIV-Aktivität

- hCypA wurde direkt an hTRIM5 α fusioniert, an 11 verschiedenen Positionen entlang seiner linearen Sequence (Fig 1A)
- Generierung von stabilen Zell-Linien und dann Testung auf HIV-Restriktions-Aktivität
- 3 Konstrukte hatten vergleichbare Aktivität gg HIV wie AoT5Cyp α → eins wurde davon ausgewählt und von dann als hT5Cyp α bezeichnet (Fig 1B)

Strukturelle Bedingungen für anti-HIV-Aktivität

- hT5-M244-Cyp and hT5-T302-Cyp waren gut exprimiert hatten aber keine Restriktions Aktivität, Konstrukte mit hoher Restriktions Aktivität waren variabel exprimiert → moderate bis hohe Level (hT5-S309-Cyp and hT5-S322-Cyp) oder niedrige Level (hT5-A331-Cyp and AoT5Cyp) (Fig 2A)
- Korreliert die anti-HIV-1 Aktivität mit der Fähigkeit HIV-CA zu binden? → HIV-1 CA wurde von hT5-T302-Cyp -keine anti-HIV-1 Aktivität- genauso gebunden wie von hT5-S322-Cyp -hohe anti-HIV-1 Aktivität (Fig 2B)
- AoT5Cyp and alle 3 hT5Cyps mit hoher anti-HIV-1 Aktivität bilden Einschlusskörperchen (Fig 2D)

Die Bindung zw HIV-1 CA und CypA in hT5Cyp scheint notwendig für eine HIV-1 Restriktion

- feline fibroblast Zelllinie, welche kein endogenes TRIM5 exprimieren → wurde infiziert mit HIV-1 mit einer Mutation in CA (G89V), welches das Binden zu CypA verhindert → weder AoT5Cyp noch hT5Cyp haben diesen Virus inhibiert (Fig 3A)
- hT5Cyp mit CypA- H126Q Mutation bindet CA nicht → keine HIV-1 Restriktion (Fig 3 B)
- Cyclosporin A- ein kompetitiver Inhibitor von CypA-CA- verhindert HIV-1 Restriktion (Fig 3C)
- HIV-1-V86P/H87Q/I91V/M96I, eine natürlich vorkommende CA Variante in Menschen infiziert mit HIV-1, ist resistent gegenüber CsA und AoT5Cyp, aber nicht hT5Cyp (Fig 3D)
- Arsen inhibiert die TRIM5-vermittelte HIV-1 Restriktion → und ebenso die von AoT5Cyp und hT5Cyp (Fig 3E)

hT5Cyp bindet auch HIV-2, SIV, und FIV

- AoT5Cyp und hT5Cyp inhibieren HIV-1_{NL4-3}, HIV-2_{ROD}, SIV_{AGMtan}, und FIV_{PET} → sie alle exprimieren ein CA das CypA bindet (Fig 4A-D)
- CypA bindet nicht SIV_{MAC251} → weder AoT5Cyp noch hT5Cyp inhibieren SIV_{MAC251} (Fig 4E)

hT5Cyp ist potenter als rhTRIM5 α

- rhTRIM5 α ist potenter als hTRIM5 α bezüglich HIV-1 Restriktion \rightarrow Chimära zw rhTRIM5 α und hTRIM5 α (Residuen innerhalb der PRYSPRY Domäne) als potentielle Gen-Therapie-Kandidaten
- hT5Cyp etwa 10-Mal potenter als rhT5Cyp und die h-rhTRIM5 Chimära (Fig 5A)
- in Jurkat Zellen ist das Ergebnis sogar noch deutlicher (Fig 5B)
- rhTRIM5 α unterdrückt den Peak der Infektionsausbreitung um 8 d (Fig 5B), hT5Cyp und AoT5Cyp unterdrücken die Infektionsausbreitung von HIV-1 vollständig (Fig 5C+D)

HIV-1 Restriktion in primären humanen CD4-Zellen und Makrophagen

- Vektoren mit 2 Promotors konnten effektiver GFP produzieren (Fig 6A+6B)
- CD4 Zellen transduziert mit hT5CypH126Q erreichten Peak der HIV-1 Replikations an Tag 12, Transduktion mit hT5Cyp unterdrückte die HIV-1 Replikation komplett (Fig 6C)
- Das gleiche Resultat wurde mit einem primären HIV-1 Isolat beobachtet (Fig 6D)
- Das gleiche Resultat wurde beobachtet in Makrophagen (Fig 6E+6F)
- Dieses Ergebnis konnte auch reproduziert werden, wenn nur 25% der Zellen mit hT5Cyp transduziert waren, dabei hatten hT5Cyp-transduzierte Zellen eine höhere Zellviabilität (Fig 6 G)

hT5Cyp schützt vor HIV-1 Infektion in vivo

- Transferieren von humanen CD4 Zellen in Rag2 $^{-/-}$ γ c $^{-/-}$ mice (ohne B-, T- und NK-Zellen) \rightarrow CD4 Zellen waren entweder mit hT5Cyp oder hT5CypH126Q transduziert (Fig 7A)
- Die Mäuse wurden mittels Zytostatikum und Bestrahlung konditioniert (Fig 7B)
- 2 + 6 Wochen nach Engraftment wurde die Population an hCD45+CD4+GFP+ Zellen untersucht \rightarrow dabei waren 50-90% GFP positiv (Fig 7C)

Der Effekt von hT5Cyp in vivo

- Mäuse wurden mit HIV infiziert nachdem ihnen transduzierte CD4-Zellen injiziert wurden
- 2 Wochen nach der HIV Infektion machten die hT5Cyp-transduzierten CD4 Zellen 6% der PNC aus \rightarrow 34-Mal mehr als die hT5CypH126Q transduzierten CD4 Zellen (Fig 8A)
- 9-fache Reduktion viral load in hT5Cyp-transduzierten- gegenüber hT5CypH126Q Mäusen (Fig 8B)
- Untersuchung der Lymphorgane \rightarrow hT5Cyp-transduzierten T-Zellen waren kaum p24 $^{+}$, hingegen waren bis zu 6.5% der in hT5Cyp-transduzierten T-Zellen p24 $^{+}$ (Fig 8C)
- Es kam zu keiner Runterregulierung von CD4 Rezeptoren (Fig 8D)
- Anreicherung von CD4 $^{+}$ T Zellen transduziert mit hT5Cyp oder hT5CypH126Q war gleich (Fig 8E)
- Nach HIV Infektion konnte viel p24+ hT5CypH126Q transduzierte CD4 Zellen identifiziert werden, kaum aber p24+ hT5Cyp transduzierten CD4 Zellen (Fig 8E)

Diskussion/Zusammenfassung

- Die potente HIV-1 Replikation durch AoT5Cyp inspirierte das Design eines humanes Äquivalentes \rightarrow hT5Cyp blockiert HIV-1 in vitro und in vivo
- Nur 3 von 13 generierten hT5Cyp Fusionsproteinen hatten antivirale Aktivität (unabhängig von Protein-Level und CA- bindende Eigenschaften!)
- Die Fusion von hCypA an die Spitze der hTRIM5 α PRYSPRY Domain resultierte in eine antivirale Aktivität gegen HIV-1 \rightarrow whs koordiniert es das CA-Binden und die Effektordomänen von hTRIM5
- Antigenität \rightarrow hT5Cyp hat das niedrigste Potential das Immunsystem zu aktivieren und das höchste Potential HIV-1 zu inhibieren
- Bisher wurden noch keine hT5Cyp resistente HIV-1-Stämme identifiziert \rightarrow whs da der HIV-1-Block vor RT \rightarrow verhindert damit die Generierung von Mutationen, die zur Resistenzentwicklung beiträgt
- Man kann humane CD4+ Zellen mit hT5Cyp transduzieren und vermehren
- CD34+ Hematopoetische Stammzellen transduziert mit hT5Cyp zeigen ein gutes Engraftment in Mäusen \rightarrow aber transgene CD4+ Zellen welche sich in den Mäusen entwickeln zeigen sich inkonsistent