

Zusammenfassung

Das akzessorische HIV Protein Nef übernimmt eine Schlüsselfunktion im viralen Replikationszyklus, indem es das Virus vor der Entdeckung durch das Immunsystem schützt und die infizierte Zelle zu einer höheren Syntheseleistung aktiviert. Die Interaktion mit zellulären Proteinen der Signal- und Proteintransport-Maschinerie stellt dabei die Grundlage des Wirkmechanismus von Nef dar. Durch kurze hochkonservierte Aminosäuresequenzen auf Nef werden zelluläre Proteine gebunden und deren Funktion moduliert. Diese Aminosäuresequenzen oder Motive sind für die Funktion von Nef von wesentlicher Bedeutung.

Lange galt das Nef Protein als irrelevant für die Pathogenese von HIV. Doch die Studien der letzten Jahre ändern diese Bild und weisen auf eine erhebliche Beteiligung an entscheidenden Funktionen von HIV hin. Trotz dieser Erkenntnisse sind bisher nur wenige Versuche unternommen worden einen Inhibitor gegen HIV Nef zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wird das Konzept zu Entwicklung eines neuartigen Inhibitors zur Inaktivierung von HIV-1 Nef vorgestellt und charakterisiert. Ein Fusionsprotein aus zwei verschiedenen Domänen wurde konzipiert, das wichtige Signal- und Proteintransport-Motive auf Nef blockiert und so Nef-Zellprotein-Interaktion verhindert. Verwendet werden die Nef-bindenden Domänen der Hämatopoetischen Zell Kinase, des CD4 Proteins und die des Adaptorproteins 2. Insgesamt wurden drei Inhibitorclassen entwickelt und über ihre Affinität zu Nef schrittweise selektio- niert. Die Inhibitorclass 3, ein Fusionsprotein aus CD4 und SH3 Domäne, zeigte die besten Resultate. Es erwies sich, daß die Inhibitoren der Inhibitorclass 3 mit einer höheren Affinität an Nef binden, als bisher gezeigte natürliche Interaktions- partner. Die Wirkung dieser Inhibitoren wurde anschließend *in vivo* überprüft. Die *in vitro* bestimmte hohe Affinität führt auch in eukaryotischen Zellen zu einer Bin- dung zwischen Nef und Inhibitor. Dadurch kann die Nef-vermittelte Internalisierung von Oberflächenmolekülen wie MHCI, CD4 oder CCR5 verhindert werden. In Ge- genwart des Inhibitors kultivierte Viren stellten sich als weniger infektiös heraus als Wildtyp Viren. Hier wurde mit dem Inhibitor ein Molekül geschaffen, was wesentli- che Funktionen von Nef unterdrückt. Zusammenfassend ergibt sich für den Inhibitor das Bild eines Moleküls, das zusätzlich zur medizinischen Relevanz eine Bedeutung in Struktur-Funktions Studien erlangt.

Die bisher nur wenig verstandene Interaktion zwischen Nef und CD4 konnte durch isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) und Kernmagnetresonanz(NMR)-Experi- mente weitercharakterisiert werden. Es ergab sich eine Dissoziationskonstante (K_d) von 1.2 μ M für die Interaktion zwischen der cytoplasmatischen CD4 Domäne und Nef. Die Bedeutung der Aminosäuren Tryptophan 61 und Leuzin 62 in Nef wurde durch Mutation im ITC und NMR Spektroskopie gezeigt. Bei der Bindung öffnen sie eine Tasche auf der Kerndomäne von Nef, in die die cytoplasmatische Domäne des CD4 Proteins bindet. Neben der bekannten Bindungsstelle in Nef sind auch im

N-terminalen Anker von Nef Aminosäuren an der Bindung zu CD4 beteiligt.

Die Co-Expression von Nef und N-Myristoyltransferase in *E. coli* eröffnete die Möglichkeit, Studien mit myristoyliertem Nef durchzuführen. Das myristoylierte Nef Protein konnte isoliert werden und zeigte eine hohe Stabilität und ordentliche Faltung in Lösung.

Im Western Blot, analytischer Gelfiltration und Ultrazentrifugation ergaben sich wichtige Hinweise auf eine Myristoylierungs-abhängige Konformation von Nef. Das myristoylierte Nef erscheint kleiner und kompakter als das nicht-myristoylierte Nef. Zudem konnte gezeigt werden, daß myristoyliertes Nef vornehmlich monomer vorkommt, während nicht-myristoyliertes Nef Zustände in einem Gleichgewicht aus Monomeren, Dimeren und Trimeren annimmt.