

---

# Entwicklung eines gegen HIV-1 Nef<sub>SF2</sub> gerichteten Inhibitors

---

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der  
Fakultät für Chemie an der Universität Dortmund

vorgelegt von

**Sebastian Breuer**

aus Dortmund

26. Juni 2006

---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Januar 2003 - Juni 2006 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung für Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Leitung von Dr. Matthias Geyer angefertigt.

Erster Gutachter : Prof. Dr. M. Engelhard  
Zweiter Gutachter : Prof. Dr. R. Winter

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1	Das Nef Protein . . . . .	9
1.1.1	Historie des Nef Proteins . . . . .	9
1.1.2	Das <i>nef</i> -Gen und sein Expressionsprodukt . . . . .	9
1.2	Die Struktur des HIV-1 Nef Proteins . . . . .	11
1.3	Die Funktion des Nef Proteins . . . . .	12
1.4	Der derzeitige Stand der HIV-Therapie . . . . .	18
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	21
1.5.1	Die Entwicklung von Nef Inhibitoren . . . . .	21
1.5.2	Das Prinzip des Inhibitors . . . . .	22
1.5.3	Die Domänen des Inhibitors . . . . .	24
1.5.4	Das Arbeitsprogramm . . . . .	29
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>30</b>
2.1	Materialien . . . . .	30
2.1.1	Chemikalien . . . . .	30
2.1.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	30
2.1.3	Säulenmaterialien . . . . .	31
2.1.4	Farbstoffe . . . . .	31
2.1.5	Reagenziensätze „Kits“ . . . . .	31
2.1.6	DNA-Konstrukte . . . . .	31
2.1.7	Enzyme, Proteine und Antikörper . . . . .	32
2.1.8	Geräte . . . . .	33
2.1.9	Puffer und Lösungen . . . . .	34
2.1.10	Materialien für die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie	34
2.1.11	Mikroorganismen und Zelllinien . . . . .	35
2.2	Methoden . . . . .	36
2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	36
2.3.1	PCR-Mutagenese . . . . .	36
2.3.2	Restriktion von Plasmid-DNA . . . . .	36
2.3.3	Isolierung von DNA-Fragmenten . . . . .	36
2.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	37
2.3.5	Transformation von Bakterien . . . . .	37
2.3.6	Die Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	37
2.3.7	DNA-Sequenzierung . . . . .	37

2.3.8	Glycerindauerkulturen . . . . .	38
2.4	Proteinchemische Methoden . . . . .	38
2.4.1	Zellanzucht und Proteinsynthese im Expressionssystem <i>E.coli</i> . . . . .	38
2.4.2	Zellaufschluss . . . . .	38
2.4.3	Isolierung des rekombinanten Proteins . . . . .	38
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	40
2.4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford und OD <sub>280nm</sub> ) . . . . .	40
2.4.6	Western Blot . . . . .	41
2.4.7	Die Markierung mit 1,5-IAEDans . . . . .	41
2.5	Biophysikalische Methoden . . . . .	42
2.5.1	Isothermale Titrationskalorimetrie . . . . .	42
2.5.2	NMR Spektroskopie . . . . .	43
2.5.3	Gleichgewichts-Fluoreszenztitration . . . . .	44
2.5.4	Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie . . . . .	44
2.5.5	Analytische Gelfiltration . . . . .	45
2.5.6	Analytische Ultrazentrifugation . . . . .	45
2.5.7	Massenspektrometrie . . . . .	46
2.6	Zellbiologische Methoden . . . . .	46
2.6.1	Hefe-Zwei-Hybrid-System . . . . .	46
2.6.2	Transfektion von eukaryotischen Zellen . . . . .	47
2.6.3	Immunfluoreszenz . . . . .	47
2.6.4	Durchflußcytometrie (FACS) . . . . .	48
2.6.5	Infektiositäts-Assay (Blue Cell Assay) . . . . .	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>49</b>
3.1	Klonierung, Expression und Isolierung der Proteine . . . . .	49
3.1.1	Klonierung, Expression und Isolierung der Nef <sub>SF2</sub> Mutanten . . . . .	49
3.1.2	Klonierung, Expression und Isolierung der Inhibitoren . . . . .	52
3.2	Charakterisierung der Interaktion zwischen den Inhibitoren der Inhibitor- klassen 1, 2 und 3 und Nef <sub>SF2</sub> <i>in vitro</i> . . . . .	60
3.2.1	Charakterisierung der Interaktion zwischen den Inhibitoren der Inhibitor-klasse 1 (SH3 Domäne) und Nef <sub>SF2</sub> . . . . .	60
3.2.2	Charakterisierung der Interaktion zwischen Inhibitor-klasse 2 und Nef <sub>SF2</sub> . . . . .	62
3.2.3	Charakterisierung der Interaktion zwischen Inhibitor-klasse 3 und Nef <sub>SF2</sub> . . . . .	66
3.3	Charakterisierung der Interaktion zwischen den Inhibitor- klassen und Nef <i>in vivo</i> . . . . .	78
3.3.1	Die Lokalisation von Inhibitor A1-CD4 und Nef in der Zelle . . . . .	78
3.3.2	Die Assoziation von Inhibitor A1-CD4 und Nef in der Zelle . . . . .	79
3.4	Charakterisierung der Inhibitor-Wirkung auf Nef <i>in vivo</i> . . . . .	80
3.4.1	Inhibition der Nef-vermittelten Internalisierung von CD4, CCR5 und MHCI . . . . .	80
3.4.2	Proteasomentargeting des Nef-Inhibitor-Komplex durch das Ubiquitinylierungsmotiv . . . . .	82
3.4.3	Inhibition der Infektiosität von HIV . . . . .	83

3.5	Charakterisierung der Nef <sub>SF2</sub> -CD4 Interaktion . . . . .	84
3.5.1	Die Rolle von CQC und Dileuzin-Motiv auf CD4 . . . . .	85
3.5.2	Bestimmung der Dissoziationskonstante der Interaktion zwischen Nef <sub>SF2</sub> (AxxA) und der CD4 Domäne des Inhibitors . . . . .	87
3.5.3	Die Rolle des N-Terminus von Nef <sub>SF2</sub> für die Nef-CD4 Interaktion . . . . .	88
3.5.4	Die Rolle von W <sub>61</sub> und L <sub>62</sub> („WL-Motiv“) auf Nef <sub>SF2</sub> für die Nef-CD4 Interaktion . . . . .	91
3.5.5	Strukturelle Analyse der Nef <sub>SF2</sub> -CD4 Interaktion . . . . .	93
3.6	Charakterisierung des myristoylierten Nef <sub>SF2</sub> . . . . .	98
3.6.1	Kalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen myristoyliertem Nef <sub>SF2</sub> und nicht-myristoyliertem Nef <sub>SF2</sub> und zellulären Bindungspartnern . . . . .	98
3.6.2	Die Analyse von myrNef <sub>SF2</sub> mittels Western Blot . . . . .	100
3.6.3	Die Analyse von myrNef <sub>SF2</sub> mittels analytischer Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation . . . . .	101
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>104</b>
4.1	Die Entwicklung eines Inhibitors gegen Nef in einem medizinischen Kontext . . . . .	104
4.2	Die Entwicklung eines Inhibitors gegen Nef im Kontext der Grundlagenforschung . . . . .	107
4.2.1	Die biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nef Protein und der SH3 Domäne bzw. Inhibitorklasse 1 . . . . .	107
4.2.2	Die biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nef Protein und der Inhibitorklasse 2 . . . . .	108
4.2.3	Die biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nef Protein und der Inhibitorklasse 3 . . . . .	110
4.2.4	Die biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nef Protein und der cytoplasmatischen CD4 Domäne . . . . .	116
4.2.5	Die biochemische Untersuchung des myristoylierten Nef Proteins	121
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>124</b>
5.1	Grundlagen der Auswertung von Gleichgewichts-Fluoreszenztitration, isothermalen Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie und analytischer Gelfiltration . . . . .	124
5.1.1	Ermittlung der Dissoziationskonstanten aus Gleichgewichts-Fluoreszenztitrationen . . . . .	124
5.1.2	Ermittlung der Dissoziationskonstanten aus der isothermalen Titrationskalorimetrie . . . . .	127
5.1.3	Ermittlung der Dissoziationskonstanten aus der Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie . . . . .	130
5.1.4	Ermittlung der Molekularmasse aus der analytischen Gelfiltration . . . . .	131
5.2	Zusätzliche Ergebnis-Tabellen . . . . .	132
5.2.1	Die Molekularmassen der verwendeten Proteine . . . . .	132

5.2.2	Übersicht der mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie ermittelten Daten . . . . .	133
5.3	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	134
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>135</b>

# 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 selektioniert. 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 Interaktionspartner. Die Wirkung dieser Inhibitoren wurde anschließend *in vivo* überprüft. Die *in vitro* bestimmte hohe Affinität führt auch in eukaryotischen Zellen zu einer Bindung zwischen Nef und Inhibitor. Dadurch kann die Nef-vermittelte Internalisierung von Oberflächenmolekülen wie MHCI, CD4 oder CCR5 verhindert werden. In Gegenwart des Inhibitors kultivierte Viren stellten sich als weniger infektiös heraus als Wildtyp Viren. Hier wurde mit dem Inhibitor ein Molekül geschaffen, was wesentliche 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)-Experimente weitercharakterisiert werden. Es ergab sich eine Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von  $1.2 \mu\text{M}$  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.

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Das Nef Protein

#### 1.1.1 Historie des Nef Proteins

Das akzessorische Nef Protein des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) ist ein 24-35 kDa großes Protein, das essentiell für die Pathogenese von HIV-1, HIV-2 und SIV ist. Sein Gen ist am 3' Ende des HIV-Genoms lokalisiert, weswegen es in den Anfängen der Erforschung F(3'orf) Protein genannt wurde [93, 7]. Zunächst war noch nicht viel über dieses Protein bekannt und es konnte keine Relevanz für die Pathogenese von HIV festgestellt werden [194, 132]. Wie überhaupt die Rolle aller akzessorischen Proteine lange Zeit unterschätzt wurde [9, 208]. Letztendlich führte dies zu der heutigen Bezeichnung als Negativ Faktor (Nef).

Erst 1991 konnten Kestler et al. feststellen, daß ein defektes *nef*-Gen sich negativ auf die Viruslast und das pathogene Potential von SIV auswirkt [111]. Es folgten zahlreiche Studien, die die zentrale Rolle des Nef Proteins im viralen Replikationszyklus von HIV und SIV dokumentierten [90, 51, 6, 183]. Insbesondere die 1995 durchgeführte Studie an einer Gruppe von sogenannten Langzeitüberlebenden, Menschen die HIV-positiv sind jedoch keine Anzeichen des erworbenen Immunschwäche Syndroms (AIDS) entwickeln, erregte Aufmerksamkeit [115, 54]. Fast alle Patienten dieser Gruppe zeigten keine Symptome oder eine verlangsamte Progression von AIDS. Verantwortlich dafür waren Mutationen im *nef*-Gen, die die Produktion des funktionalen Nef Proteins verhinderten. Diese Entdeckung attestierte dem Nef Protein eine besondere Bedeutung und initiierte die bis heute andauernde intensive Erforschung des Proteins, welche auch Grundlage dieser Arbeit ist.

#### 1.1.2 Das *nef*-Gen und sein Expressionsprodukt

Das Gen des Nef Proteins liegt mit seinem ORF (Open Reading Frame) 3' nach dem *env*-Gen (envelope) kodiert und wird in größerer Menge in der frühen Phase der HIV-Replikation gebildet. Der kodierende Bereich überlappt dabei z.T. die U3 Region des anschließenden 3' LTR (Long Terminal Repeats). Das Nef Protein wird direkt bei der Translation modifiziert und durch die N-Myristoyltransferase (NMT) am N-terminalen Glyzin mit einem Myristoylanker lipidiert, weswegen es vor allem an Membranen lokalisiert ist. Die N-terminale Myristoylierung stellt mit der

Kopplung einer C14 Fettsäure die schwächste Form der Membranverankerung dar, was sich mit der Beobachtung deckt, daß nur ca. 60% des Nef Proteins Membran-gebunden vorliegen [147, 109, 64]. Der Rest befindet sich in der cytosolischen Fraktion [147, 64].

Nef kommt an der Plasmamembran assoziiert mit speziellen Membranformulierungen wie den Lipid Rafts vor [214]. Lipid Rafts sind Detergenz-unlösliche Mikrodomänen, die sich vor allem aus Sphingolipiden und Cholesterol zusammensetzen. Man vermutet ihre Beteiligung bei dem Zusammenbau von Virusbestandteilen (Virus-Assembly) zu funktionellen bzw. strukturellen Einheiten an der Plasmamembran und der Signaltransduktion. Der gerichtete Transport von Nef zu diesen Lipid Rafts wird möglicherweise über die Bindung an das virale Vorläuferprotein Gag-Pol gewährleistet [47]. Zudem wird eine Assoziation mit dem Cholesterol-Synthese-Pathway vermutet [213].

Im Virion kommt Nef nur in einer N-terminal verkürzten Form vor. An Position W<sub>61</sub> verfügt Nef über eine Schnittstelle der virale Protease, die Nef in ein 19 kDa Fragment verkürzt [200]. Die Funktion dieser verkürzten Nef Form ist jedoch noch umstritten und bisher konnte zwischen verkürztem Nef und Wildtyp Nef kein Unterschied in Bezug auf Infektiosität der Virionen festgestellt werden [156, 40].

Nef übernimmt eine Reihe von Funktionen, die nach der heutigen Vorstellung synergistisch zu der Pathogenität von HIV beitragen. Es erfüllt seine Funktion im Gegensatz zu anderen Virusproteinen nicht über einen enzymatischen Mechanismus, wie z.B. die reverse Transkriptase, sondern interagiert mit zellulären Proteinen und moduliert deren Aktivität. So wirkt Nef auf Prozesse der Signaltransduktion, Zellaktivierung und Endocytose ein, partizipiert an der Biosynthese von Viruspartikeln in der Zelle (Virusreplikation) und schützt das Virus vor der humoralen und zellulären Immunantwort. Die Mechanismen, derer sich das Nef Protein dabei bedient, sind weitestgehend voneinander unabhängig.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind eine ganze Reihe von Bindungspartnern des Nef in der Zelle identifiziert worden und die Anzahl scheint zu steigen. Vor allem umfangreiche Two-Hybrid-Screens haben eine Reihe von Bindungspartnern identifiziert, deren Relevanz in der Zelle jedoch zum Teil strittig ist [22]. Das CD1d Protein, ein Protein, das Antigen aus endocytotischen Kompartimenten präsentiert, der Dock2-Elmo1 Komplex, ein Aktivator der kleinen GTPase Rac, welcher indirekt die Chemotaxis verhindert und die T-Zell-Aktivierung fördert, und das Protein Eed, welches zusammen mit Lck einen Kinasekomplex ausbildet, sind hierbei die neusten Identifikationen [103, 39, 204].

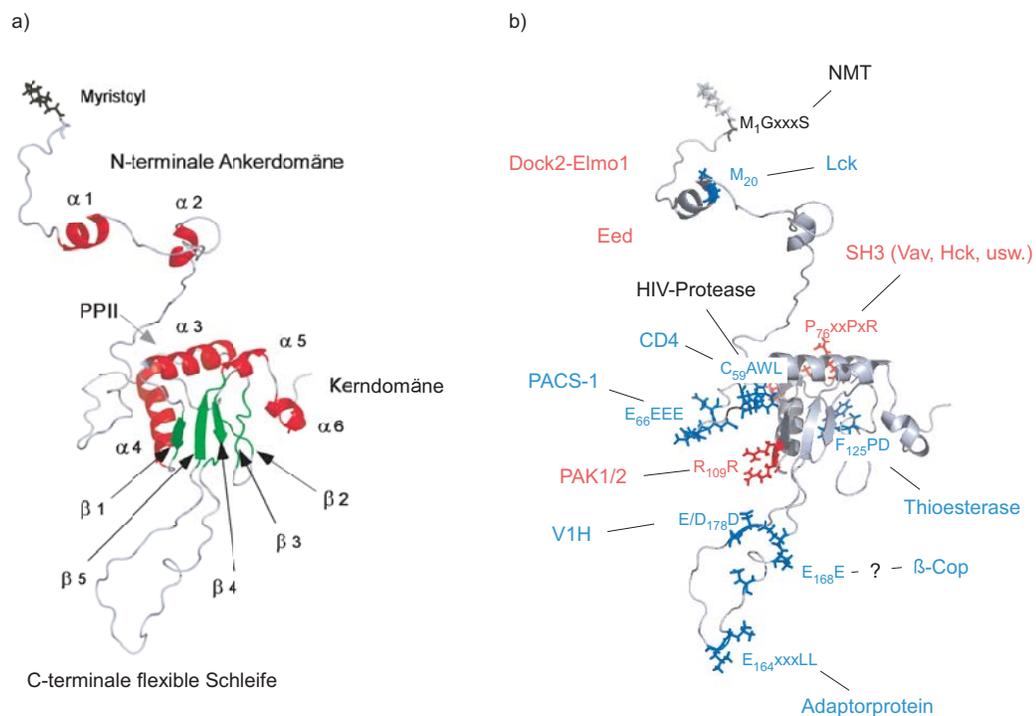
Die Nef Sequenz ist unter den HIV-1 Allelen relativ konserviert, während sich HIV-2 und SIV allein durch zusätzliche 30-50 Aminosäuren von HIV-1 Nef unterscheidet. Das am besten charakterisierte Isolat ist der artifizielle Stamm HIV-1 NL4-3, der bislang Gegenstand zahlreicher Studien war. NL4-3 stellt einen HIV-Stamm dar, der aus den beiden Isolaten NY5 und LAV AIDS RV zusammengesetzt ist und Grundlage der damals beginnenden HIV-Forschung war [1, 23, 18]. Die intensive Nutzung von NL4-3 begründet die nach ihm ausgerichtete Nomenklatur vieler HIV-Proteine, auch von Nef. In dieser Arbeit wurde mit dem Isolat Subtyp B SF2 (ARV2/SF2 ISOLATE Taxonomy ID: 11685) gearbeitet. Gegenüber HIV<sub>NL4-3</sub> hat der SF2 Stamm den Vorteil, daß er nicht künstlich ist und demnach insbesondere in *in vivo* Studien die

volle Wildtyp-Aktivität zeigt [135].

Obwohl die NL4-3-Nomenklatur die weitaus verbreitete Nomenklatur darstellt, wird hier die SF2-Nomenklatur benutzt, um eine Einheitlichkeit in der Arbeit zu erreichen.

## 1.2 Die Struktur des HIV-1 Nef Proteins

Nef<sub>SF2</sub> ist 4 Aminosäuren länger als Nef<sub>NL4-3</sub> und unterscheidet sich in 30 Aminosäuren. Eine Sequenzanalyse von 186 verschiedenen Nef Allelen veranschaulicht mit ca. 84% Sequenzidentität einen hohen Grad an Konservierung, der sich besonders in wichtigen, funktionellen Bereichen für die Proteininteraktion manifestiert [84]. In Abb. 1.1 ist ein Modell der Struktur von Nef dargestellt, das sich aus den unabhängig entstandenen NMR Datensätzen der Strukturlösung zweier Nef Konstrukte, myristoyliertes Nef<sub>NL4-3</sub> (1-57) und Nef<sub>BH10</sub> (56-206,  $\Delta$  159-172), zusammensetzt [83, 84, 91]. Die ersten Kristallstrukturen wurden 1996 und 1997 mit Nef<sub>NL4-3</sub> 54-205 im Komplex mit der Hck SH3 Domäne und Nef<sub>LAI</sub> 58-206 im Komplex mit der Fyn SH3 Domäne gelöst [13, 125].



**Abbildung 1.1:** a) Modell der Struktur des myristoylierten HIV-1 Nef<sub>NL4-3</sub> Proteins [84]. Die Sekundärstrukturelemente unterteilen sich in  $\alpha$ -Helices (rot) und  $\beta$ -Faltblätter (grün), die hauptsächlich die Kerndomäne bilden. N-terminal und C-terminal besteht Nef aus flexiblen Bereichen, der N-terminalen Ankerdomäne und der C-terminalen flexiblen Schleife. b) Die Signal- und Proteintransportmotive in der Nef Struktur und ihre zellulären und viralen Bindungspartner. Proteintransportmotive sind in blau, Signalmotive in rot und Modifikationsmotive in schwarz hervorgehoben. Die Nomenklatur erfolgt nach Nef<sub>SF2</sub>.

Nach den Daten aus der NMR Spektroskopie erscheinen fast 50% des Proteins als unstrukturiert und flexibel. Für das Protein wurde eine Oberfläche von 17 600 Å<sup>2</sup> berechnet, wobei nur 93 Aminosäuren aus den strukturierten Bereichen 31% der Oberfläche bilden, während die restlichen 69% durch unstrukturierte Bereiche entstehen [84].

Das globuläre  $\alpha$ - $\beta$  Protein unterteilt sich in eine flexible N-terminale Ankerdomäne (AS 1-60) mit zwei helikalen Bereichen, einer aus vier  $\alpha$ -Helices und fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehenden Kerndomäne (AS 61-210,  $\Delta$ 152-184) und der C-terminalen flexiblen Schleife (AS 152-184). Desweiteren weisen die strukturellen Daten aus dem Komplex von Nef und SH3 Domäne auf eine Konformation hin, die eine weitere Helix im Bereich AS 61-84 des N-Terminus ausbildet. Diese Helix wird als Poly-Prolin-Helix Typ II (PPII) bezeichnet, welche durch die Interaktion mit SH3 Domänen oder auch WW Domänen bekannt geworden ist [209].

Neben der strukturellen Übersicht sind in einer zweiten Darstellung in Abb. 1.1b besondere Aminosäuren auf der Oberfläche von Nef hervorgehoben. Dies sind Sequenzmotive, über die Nef mit Proteinen der Wirtszelle interagiert. Sie umfassen z.T. nur wenige Aminosäuren und sind oftmals hoch-konserviert, was deren Wichtigkeit für die „Aktivität“ des Nef Proteins unterstreicht. Aus den Interaktionspartnern und deren Modulierung ergibt sich eine Einteilung in Signalmotive und Proteintransportmotive, auf die in Kapitel 1.3 noch Bezug genommen wird.

Zusätzlich sind Motive identifiziert worden, die für die Myristoylierung (M<sub>1</sub>GxxxS), proteolytische Prozessierung C<sub>59</sub>AW↓LEA oder Dimerisierung (R<sub>109</sub>,D<sub>127</sub>) verantwortlich sind [73, 130]. Auch eine Phosphorylierung des Proteins an Position Threonin 15 durch die Protein Kinase C wurde beobachtet. Aber ebenso wie bei der proteolytischen Prozessierung ist deren Bedeutung unklar und für wichtige Funktionen z.T. unerheblich [77, 27].

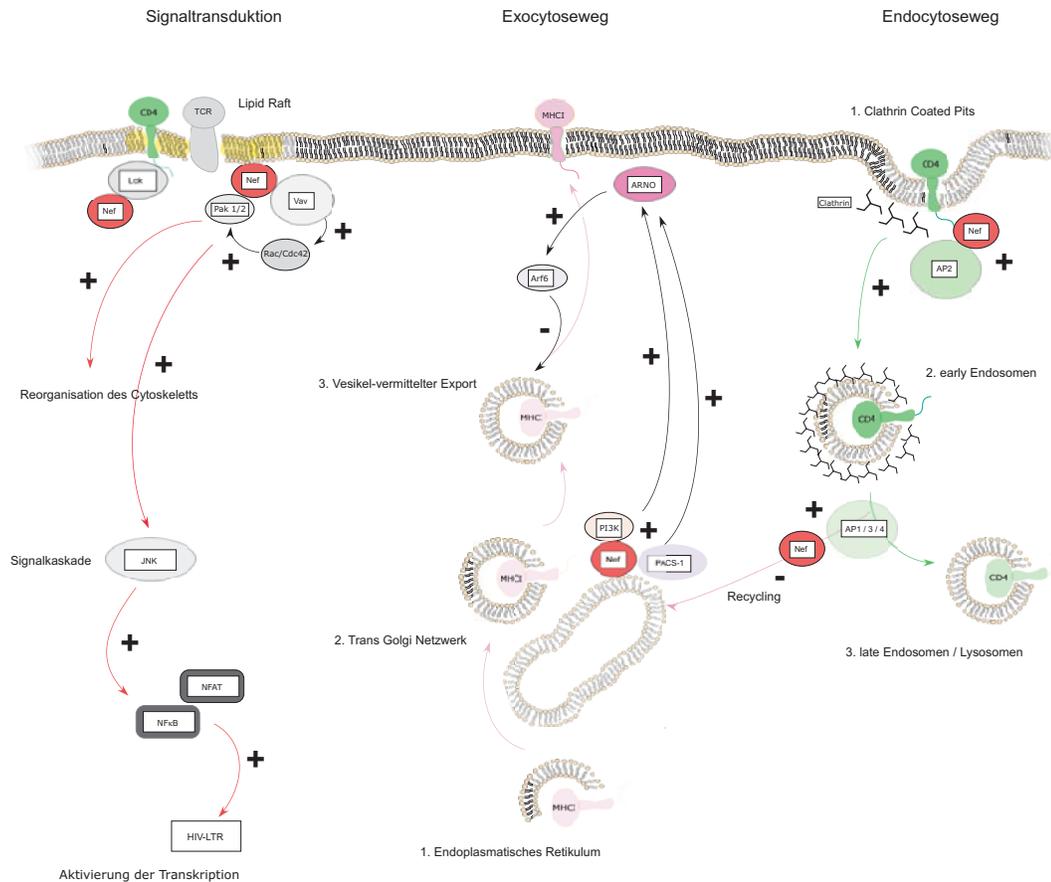
*In vivo* und *in vitro* wurde eine Tendenz zur Dimerbildung erkennbar, deren funktionale Bedeutung jedoch umstritten ist [130, 14, 34, 55]. Z.T. konnten auch höher oligomere Strukturen identifiziert werden [55, 75]. Aus NMR Experimenten unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen wurde gefolgert, daß die Bindung nicht durch Disulfidbrücken gebildet wird, also keine kovalenten Bindungsmechanismen eine Rolle spielen [91].

### 1.3 Die Funktion des Nef Proteins

Nef erfüllt eine Vielzahl von Funktionen, die sich im wesentlichen in Signaltransduktions- und Proteintransport-Prozesse einteilen lassen. Grundlegende Voraussetzung für alle diese Funktionen ist die Lokalisation von Nef an Membranen durch die N-terminale Myristoylierung [96, 81]. Das Myristoylierungsmotiv ist über alle Nef-Allele hinweg hoch-konserviert und Mutationsstudien zeigen, daß sich dessen Deletion signifikant auf die Funktionen von Nef auswirkt [158].

**Proteintransport:** Der Transport von Proteinen in der Zelle wird auch als „Trafficking“ bezeichnet und durch eine Vielzahl an Proteinen wie den Adaptorproteinen, Clathrinen oder COP I und II gesteuert. Es konnte gezeigt werden,

daß Nef mit entscheidenden Proteinen der Endocytosemaschinerie wie AP1, 2 und 3,  $\beta$ -Cop oder auch der Untereinheit H der vakuolären Membran-ATPase interagiert und dadurch den Transport zur und von der Plasmamembran beeinflusst [49, 105, 89, 107, 21, 104, 85]. Insbesondere die effektive Präsenz von Oberflächenrezeptoren wie CD4 oder auch MHCI wird hierdurch gestört, deren Bedeutung für das Virus in der Superinfektion und Antigenpräsentation liegt (siehe Seite 15). Jedoch auch viele weitere in Tab. 1.1 aufgeführte Oberflächenrezeptoren werden durch Nef moduliert.



**Abbildung 1.2: Modell der Nef Funktionen.** Die Funktionen von Nef unterteilen sich schematisch in die Modulation von Signaltransduktions- und Proteintransport-Prozesse. **Signaltransduktion:** Nef interagiert mit den Proteinen der TCR-Signalkaskade und induziert dadurch die Transkription viraler und zellulärer Proteine. Hierdurch wird die Zelle aktiviert und die virale Replikation gefördert. **Proteintransport:** Nef beeinflusst Endocytose- und Exocytosewege der T-Zelle durch die Verlinkung von Oberflächenrezeptoren mit regulatorischen Proteinen. Hierdurch werden Oberflächenrezeptoren wie CD4 internalisiert oder das Recycling bzw. der Export von MHC I gestört. Damit schützt Nef das Virus vor der Immunantwort und verhindert die Superinfektion durch weitere Viren.

Die Internalisierung des CD4 Glykoproteins erfolgt über einen Clathrin-abhängigen Endocytoseweg, der durch Nef induziert wird [88, 26]. Hierbei bindet Nef sowohl an die cytoplasmatische Domäne von CD4 als auch an Komponenten der Endo-

cytosemaschinerie wie die Adaptorproteine. Das hoch-konservierte Dileuzin-Motiv E<sub>164</sub>xxxLL, welches in einer zentralen Position in der C-terminalen flexiblen Schleife von Nef (siehe Abb. 1.1) präsentiert wird, spielt dabei eine entscheidende Rolle [88, 48, 33].

Durch die Ausbildung dieses ternären Komplexes wird anschließend die Dekoration mit Clathrinen und die Invagination der Plasmamembran induziert. Durch eine Prozessierung zu Lysosomen erfolgt der spätere Abbau des Proteins.

Die Internalisierung von MHCI unterscheidet sich grundlegend von der des CD4 Proteins. MHCI wird nicht durch einen Clathrin-abhängigen Endocytoseweg abgebaut sondern nach dem heutigen Modell versteht man die Internalisierung von MHCI eher als eine Nef-vermittelte Unterbrechung des MHCI Transports zur Plasmamembran [202, 26, 110, 171]. MHCI wird ausgehend von dem Endoplasmatischen Retikulum, wo es durch ein Antigen stabilisiert wird, via Golgi Netzwerk zur Membran geleitet. Über das E<sub>66</sub>EEE-Motiv bindet Nef an Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein-1 (PACS-1), ein Protein, das den Golgi-Endosomen-Transport kontrolliert. Es folgt anschließend die Aktivierung der kleinen GTPase Arf6 und die dadurch induzierte Störung des vesikulären Transports von MHCI. Neben dem E<sub>66</sub>EEE-Motiv sind zusätzlich das P<sub>76</sub>xxP-Motiv und ein Rest in der Ankerdomäne M<sub>20</sub> involviert [26, 88, 19].

Die Gruppe der durch Nef betroffenen Oberflächenrezeptoren ist sehr heterogen und die Zuordnung der Internalisierungsmechanismen gestaltet sich schwierig. Allem Anschein nach stehen für die Internalisierung von Oberflächenrezeptoren unterschiedliche Motive zur Verfügung. Während die Internalisierung von CD4, CD71 und CD74 durch das Dileuzin-Motiv erfolgt, wird die von MHCI, CCR5 und CD8 durch das PxxP-Motiv kontrolliert. CD1d wiederum weist zu beiden Internalisierungswegen, dem von CD4 und dem von MHCI, Parallelen auf und demnach spielen hier beide Motive, Dileuzin-Motiv und PxxP-Motiv, eine Rolle [39].

**Tabelle 1.1: Die von Nef internalisierten Oberflächenrezeptoren.**

Name	Funktion	Nef-Motiv	Referenz
CD1a,d	Antigen-Präsentation	PxxP; EEEE; ExxxLL	[39]
CD3	Co-Rezeptor des TZR-Komplexes	?	[190]
CD4	Co-Rezeptor MHCII, Rezeptor für HIV	ExxxLL	[88, 48, 33]
CD8	Co-Rezeptor MHC I	PxxP	[186]
CD28	Rezeptor CD80	?	[191]
CD40L	Rezeptor CD40	?	[192, 166]
CD71	Transferrinrezeptor	ExxxLL	[165]
CD74	MHC-Klasse II invariante Kette	?	[178]
CD80	Co-Stimulator	?	[38]
CD86	Co-Stimulator	?	[38]
MHCI	Antigen-Präsentation	EEEE; PxxP; M20	[26, 88]
MHCII	Antigen-Präsentation	EEEE; PxxP; ExxxLL	[178, 189]
CXCR4	Chemokinrezeptor, Co-Rezeptor HIV	?	[100]
CCR5	Chemokinrezeptor, Co-Rezeptor HIV	PxxP	[142]
HFE	?	?	[60]
DC-Sign	Adhäsionsmolekül	?	[182]

**Signaltransduktion:** Die Beteiligung an der Signaltransduktion innerhalb der Zelle ist die zweite wichtige Funktion, die Nef im HIV-Replikationszyklus übernimmt. Es interagiert mit Proteinen der Signaltransduktion und aktiviert oder inhibiert dadurch nachgeschaltete Signal-Kaskaden in der T-Zelle [20, 179, 198]. Der hauptsächlich davon betroffene Signalweg ist der des T-Zell-Rezeptorkomplexes (TZR), der nach exogener Stimulation die T-Zelle aktiviert. Nef beeinflusst diesen Signalweg, indem es die C-terminale SH3 Domäne des Guanin Nukleotid Austauschfaktors Vav über sein PxxP-Motiv bindet und anschließend die kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42 aktiviert [66].

Diese sind wiederum für die Aktivierung von Nef-assoziierten Kinasen wie PAK1/2 wichtig, die eine Umlagerung des Cytoskeletts hervorrufen und eine Signaltransduktionskaskade namens JNK/SAPK induzieren [50, 168, 65]. Die Umlagerung des Cytoskeletts ist ein phänotypisches Zeichen für den Übergang der Zelle in einen aktiven Zustand, der die Grundlage für eine optimale Virusreplikation bietet. Die angeschaltete JNK/SAPK Kaskade wirkt sich auf den HIV Promotor LTR aus und steigert damit die Transkriptionsleistung der HIV Gene [5].

Desweiteren reguliert Nef die Transkriptionsfaktoren Nuclear Factor of activated T-Cells (NFAT) und Nuclear Factor  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B), die auch die Expression des wichtigen Zytokins Interleukin-2 (IL-2) kontrollieren [68]. Exogenes IL-2 induziert die klonale Expansion der T-Zellen und steigert damit die Biosyntheseleistung der T-Zellen. Die Motive R<sub>109</sub>R und PxxP auf Nef und die Assoziation an Lipid Rafts stellen eine essentielle Grundlage für die Signaltransduktions-Funktion von Nef dar [139, 116]. Mehrere Studien konnten zeigen, daß Nef in Lipid Rafts akkumuliert und dort die Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptor-Komplexes direkt beeinflusst [68].

Neben Vav wurden zahlreiche andere Kinasen der Src Kinasen Familie identifiziert, deren SH3 Domänen an das PxxP-Motiv auf Nef binden [174, 13, 45, 19]. So wurde auch die erste Kristallstruktur im Komplex mit einer SH3 Domäne der Kinase Hck gelöst [125]. Die bekannten Bindungspartner der Signaltransduktion sind in Tabelle 1.2 aufgeführt.

**Tabelle 1.2: Die von Nef modulierten Signalproteine.**

Name	Funktion	Nef-Motiv	Referenz
PAK 2	Kinase	RR	[139, 149, 195]
Vav	GEF	PxxP	[66]
Hck	Kinase	PxxP	[174]
Fyn	Kinase	PxxP	[13]
Lyn	Kinase	PxxP	[174]
Lck	Kinase	PxxP; M20	[45, 19]
Dock2-Elmo1	Aktivator von Rac	PxxP	[103]
Eed	Kinase-Komplex mit Lck	?	[204]
NF-AT	Transkriptionsfaktor	?	[69, 71]
NF- $\kappa$ B	Transkriptionsfaktor	?	[69]
TCR $\zeta$	T-Zell-Rezeptorkomplex	?	[207]

**Immunmodulation:** Viele der oben beschriebenen Prozesse tragen gemeinsam zu einem Schutz vor einer antiviralen Reaktion des Immunsystems bei. MHCI, MHCII oder auch CD1a und d gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die Antigen auf der Oberfläche der Zelle präsentieren und damit die humorale oder zelluläre Immunantwort induzieren. MHCI präsentiert dabei cytosolisches Antigen, während MHCII und CD1a und d vesikuläres Antigen präsentieren. Durch die Internalisierung dieser Immunrezeptoren kann Nef vor allem die Antigenpräsentation gegenüber CD8-T-Killerzellen und natürlichen Killerzellen verhindern, die einer aufkommenden Virämie initial entgegen wirken [11]. Die Kontrolle des programmierten Zelltodes (Apoptose) ist ein zweiter wichtiger Mechanismus von Nef, um HIV vor der zellulären Immunantwort zu schützen. Nef induziert die Expression von beiden entscheidenden Signalen Fas (CD95) und Fas Ligand (CD95L) [207, 210]. Dies löst zum einen die Apoptose von cytotoxischen T-Zellen aus, die mit der infizierten Zelle interagieren und zum anderen wird die Apoptose der infizierten Zelle selbst unterbunden [152, 57]. Grundlage hierfür ist die Bindung von Nef an eine Kinase des Apoptose-Signal-Weges, der Apoptosis Signal Regulating Kinase (ASK1) [79]. Die humorale Immunantwort wird durch die Expression von Zytokinen wie Interleukin 4 (IL-4) und 10 (IL-10) sowie auch durch den CD40-Liganden (CD40L) reguliert. Durch ihre Expression und Sezernierung wird der Isotypenswitch, der Wechsel der Immunglobulinklasse von IgM auf IgG, IgA oder IgE, induziert. Im Gegensatz zur Immunglobulinklasse IgM sind die Immunglobuline IgG, IgA oder IgE weitaus spezifischer in ihrer antiviralen Wirkung und Affinität. Nef verhindert diesen effizienten Mechanismus des Immunsystems durch die Suppression der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6) sowie der Expression des Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS), welche die Expression der Zytokine und des CD40 Liganden regulieren [146, 166]. Ein weiterer Prozess in der Immunantwort, der durch Nef beeinflusst wird, ist der Signalweg des kostimulierenden Rezeptors CD28, der durch die Liganden B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86) aktiviert wird. Dieses Signal wirkt sich synergistisch mit dem TZR-Komplex-Signal auf die klonale Expansion der T-Zellen aus. Unter der klonalen Expansion versteht man die Proliferation von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten und die Ausbildung der Effektorfunktionen. Die Internalisierung der Chemokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4 spielt nicht nur für die unten beschriebene Virämie eine Rolle, sondern verhindert auch die Partizipierung der infizierten T-Zelle an chemotaktisch induzierten Migrationen zu inflammatorischen Zentren (Entzündungsherde) [191, 100]. Die erst kürzlich entdeckte Komplexbildung aus Dock2-Elmo1 und Nef unterstützt diesen Effekt ebenfalls durch Beeinflussung des Chemokin-Rezeptor-Signalweges [103].

**Progression der Virusreplikation und Virämie:** Der Pathogenesefaktor Nef interagiert an verschiedenen Punkten des viralen Replikationszyklus. Auf der einen Seite schützt es das Virus vor der antiviralen, zellulären und humoralen Immunantwort und auf der anderen Seite aktiviert es die Zelle zu einer höheren Biosyntheseleistung. Neben diesen Funktionen übernimmt Nef jedoch weitere Aufgaben, die der Progression der Virusinfektion dienen.

Spina et al. (1994) konnte *in vivo* zeigen, daß ein Defekt im *nef*-Gen dazu führt, daß die Replikationsrate und Viruslast von HIV zurückgehen [183]. Generell läßt sich die Infektiösität der Virionen durch eine Deletion des *nef*-Gens vermindern [41]. Eine quantitative Analyse der Virionen von Welker et al. (1996) konnte zeigen, daß Nef nicht nur bei dem Virus-Assembly beteiligt, sondern selbst mit 5 - 10 Molekülen in den Virionen enthalten ist [200]. Man vermutet einen Zusammenhang mit der Inkorporation von Nef-assoziierten Kinasen (NAK), die im Virion Strukturproteine wie das Matrixprotein phosphorylieren. Deren Phosphorylierung ist für die Entstehung von infektiösen Virionen wichtig [72, 53].

Der positive Effekt von Nef auf die Freisetzung der Virionen konnte von Benson et al. (1993) veranschaulicht werden [24, 129]. Hierbei spielt vor allem die Internalisierung des CD4 Rezeptors eine Rolle. Ca. 83% der CD4- und 26% der CCR5-Oberflächenpopulation werden durch Nef internalisiert [142]. Beide Rezeptoren sind für die Interaktion zwischen T-Zelle und HI-Virion von Bedeutung.

Als initialer Schritt der Virusinfektion einer Zelle interagiert das virale Glykoprotein 120 (gp120) mit dem CD4 Protein der T-Zelle. Begleitend ist die Präsenz des Co-Rezeptors CCR5 oder CXCR4 für die erfolgreiche Bindung des Virions an die Zelle wichtig.

Durch die Internalisierung der Rezeptoren verhindert Nef einen Prozeß, den man „Superinfektion“ nennt. Darunter versteht man die Penetration oder Infektion einer Wirtszelle durch mehr als eine Viruskopie. Die Superinfektion ist ein Prozeß, der sich negativ auf die Virusreplikation auswirkt. Er kann den vorzeitigen Zelltod auslösen und damit die Virusreplikation gefährden [28, 120]. HIV wie auch andere Viren, z.B. Hepatitis B Viren, verhindern die Superinfektion durch eine schnelle Internalisierung der Bindungsrezeptoren in der frühen Phase der Replikation.

2002 entdeckten Sol-Foulon et al. eine Nef-vermittelte Hochregulierung der DC-Sign Expression [182]. DC-Sign wird vorwiegend auf dendritischen Zellen exprimiert und gehört zur Familie der Typ C-Lektine, einem Adhäsionsmolekül, das die Bindung an T-Zellen und Antigenpräsentation fördert. Zudem spielen die Lektine eine wichtige Rolle bei der Migration der Lymphozyten in lymphatische Gewebe. Nef verhindert die Endocytose von DC-Sign und erhöht dadurch die Affinität der dendritischen Zelle zu T-Zellen. Nef steigert durch die Modulation der DC-Sign-Expression die Transmissionsrate von HIV. Die durch die dendritische Zelle gebundenen T-Zellen stehen neu entstandenen Virionen direkt nach Verlassen der dendritischen Zelle als Replikationssystem zur Verfügung. Ein weiterer vermuteter Effekt ist die wahrscheinliche Migration von HIV-infizierten dendritischen Zellen in periphere lymphatische Gewebe, wo es zu Sekundärinfektion von weiteren Zellen kommt [184]. Nef unterstützt dadurch die Ausbreitung der HIV-Infektion im Körper.

Nicht alle der hier beschriebenen Funktionen von Nef sind im ausreichenden Maße verstanden und insbesondere durch die enorme Vielfalt der Funktionen werden viele von ihnen kontrovers diskutiert. Zusammenfassend ergibt sich für Nef das Bild eines Pathogenesefaktors mit einem sehr komplexen Funktionsmechanismus, der für die HIV-Replikation von entscheidender Bedeutung ist.

## 1.4 Der derzeitige Stand der HIV-Therapie

Derzeit geht von der HIV-Pandemie für 40.3 Millionen eine direkte und für 6 Milliarden Menschen eine indirekte Bedrohung aus (Quelle: WHO/UNAIDS, Stand Dezember 2005). Mehr als 25 Millionen Menschen starben seit 1981 an den Folgen von AIDS. Dem steht eine Kombinationstherapie, die als Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) bezeichnet wird, entgegen, die zum heutigen Zeitpunkt aber nur für einen geringen Prozentsatz der Betroffenen verfügbar ist. HAART ist eine Medikation, die sich aus der Kombination von bis zu fünf antiviralen Mitteln zusammensetzt.

Obwohl fast jeder einzelne Schritt im viralen Replikationszyklus ein potentiell Ziel einer Therapie darstellt, wurden bis heute überwiegend die beiden Enzyme Reverse Transkriptase und die virale Protease inhibitorisch durch Nukleosidanaloga, Nicht-Nukleosidanaloga und Proteasehemmer attackiert. Einen neuen Ansatz stellte der im Mai 2003 auf dem Markt erschiene Fusionsinhibitor T-20 (Enfuvirtid, Fuzeon®) dar. Der erste Prototyp eines neuen „Entry-Inhibitors“ ist ein 36 Aminosäuren großes synthetisch hergestelltes Peptid, das subkutan oder intravenös appliziert (ca. 100 mg/Tag) wird [113]. Es bindet an eine Intermediärstruktur des HIV-Proteins gp41, die bei der Fusion von HIV mit der Zielzelle entsteht und verhindert damit den initialen Fusionsschritt zwischen HIV- und Zellmembran. In der ersten Studie wurde T-20 den HIV-Patienten als Monotherapie intravenös verabreicht. Die Wirkung auf die Viruslast war dosisabhängig und lag in der höchsten Dosis von 2 x 100 mg täglich im Median bei knapp 2 Logstufen [113]. Trotzdem wurde auch hier relativ schnell deutlich, daß T-20 als Monotherapeutikum nicht effizient sein würde [119]. Rinsky et al. (1998) konnten im gleichen Jahr der ersten Studien die Entwicklung von Fluchtmutanten unter einer T-20 Therapie beobachten [169]. Trotzdem verweist dieser neue Ansatz in der HIV-Therapie auf das hohe Potential von anderen viralen „Targets“, sogenannten Zielproteinen von Medikationen, und stellt mitunter auch eine Motivation für die in dieser Arbeit vorgestellte Studie dar.

In Tabelle 1.3 sind die neuartigen Entwicklungen und Produkte auf dem Gebiet der HIV-Therapie der letzten drei Jahre (2003-2006) zusammengefaßt.

**Tabelle 1.3: Zusammenfassung der HIV-Medikament-Entwicklungen 2003-2006.**  
 EI = Entry-Inhibitor; II = Integrase-Inhibitor; PI = Protease-Inhibitor; NNRI = Nicht-Nukleosidische RT-Inhibitoren; NRI = Nukleosidische RT-Inhibitoren API = akzessorische Protein Inhibitoren

Inhibitor	Bezeichnung	Target	Firma/Referenz
EI	Pro-542	gp120-CD4 Inter.	Progenics
EI	BMS-488043	gp120-CD4 Inter.	BMS
EI	TNX 355	gp120-CCR5 gp120-CXCR4 Inter.	Tanox Biosys.
EI	T-649	gp120-CD4 Inter.	[56]
EI	FP-21399	gp120-CD4 Inter.	Lexigen
EI	Sch-350634	CCR5-Ant./gp120-CCR5 Int.	Schering-Plough
EI	UK 427,857	CCR5-Ant./gp120-CCR5 Inter.	Pfizer
EI	873,140	CCR5-Ant./gp120-CCR5 Inter.	GSK
EI	TAK-2	CCR5-Ant./gp120-CCR5 Inter.	Takeda
EI	Pro-140	CCR5-Ant./ gp120-CCR5 Inter.	Progenics
EI	AMD 070	CXCR4-Ant./ gp120-CXCR4 Inter.	[163]
II	S-1368	Integrase/DNA-Integ.	Shionogi/GSK
II	L-870812	Integrase/DNA-Integ.	Merck
II	L-870810	Integrase/DNA-Integ.	Merck
II	V-165	Integrase/DNA-Integ.	Rega Institut (Belgien)
PI	Tipranavir	Protease	Boehringer
PI	TMC 114	Protease	Virco/Tibotec
PI	GW640385X	Protease	GlaxoSmithKline
PI	AG-001859	Protease	Pfizer
PI	SM-309515	Protease	Sumitomo Pharmac.
NNRI	Etravirin	Reverse Transkriptase	Tibotec
NNRI	Capravirine	Reverse Transkriptase	Pfizer
NNRI	Calanolide A	Reverse Transkriptase	Sarawak MediChem Pharmac.
NNRI	GW5634	Reverse Transkriptase	[37]
NRI	Elvucitabin	Reverse Transkriptase	Achillion Pharmac.
NRI	Reverset	Reverse Transkriptase	Pharmasset
NRI	SPD-754	Reverse Transkriptase	Shire Biochem
NRI	Racivir	Reverse Transkriptase	Pharmasset
NRI	Alovudin, FLT	Reverse Transkriptase	Boehringer Ingelheim
NRI	Stampidin	Reverse Transkriptase	Parker Hughes Institute
NRI	DAPD(Amdoxovir)	Reverse Transkriptase	Gilead
NRI	GS 7340	Reverse Transkriptase	Gilead
API	CNI-1493	REV	Heinrich Pette Inst.
-	Trim5a Inhibitor	Capsid-Protein	Dana Farber, NIAID
-	Interleukin-2	Immuntherapie	Chiron

Die aufgeführten Entwicklungen oder Verbesserungen von Medikamenten gegen HIV zeigen die Bemühungen, mit der die HIV-Therapie in den letzten Jahren vorangetrieben wurde (Quelle: [www.aidsinfonyc.org](http://www.aidsinfonyc.org); [www.retroconference.org](http://www.retroconference.org)). Besonders auffällig ist dabei die Intensität, mit der sich nun auf neue Targets unter den viralen Proteine konzentriert wird. Neben der Weiterentwicklung von T-20 wurden zahlreiche Ansätze zur Inhibition von anderen Co-Rezeptorinteraktionen wie CXCR4 oder CCR5 vorgestellt. Auch die Integrase zählt nun zu den enzymatischen Targets von Inhibitoren.

Neben diesen Entwicklungen gibt es erste Ansätze zur Verwendung von immunstimulierenden Medikamenten wie IL-2 oder IL-7, welche in Kombination mit HAART eingesetzt werden, um auch persistierende Viren zu bekämpfen [128, 150, 197]. Zudem tragen Studien wie die Entdeckung der Vif-APOBE3G Interaktion oder von dem antiviralen Protein TRIM 5- $\alpha$  zum tieferen Verständnis von Zell-eigenen antiviralen Mechanismen bei und unterstreichen die Bedeutung der akzessorischen Proteine als potentielle Targets [212, 138, 187, 63].

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie in Kapitel 1.3 dargestellt, nimmt Nef eine zentrale Stellung im Replikationszyklus von HIV ein. Damit bietet es sich als potentiell Ziel einer Inhibitorentwicklung an. Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines gegen HIV-1 Nef gerichteten Inhibitors. Neben dem inhibitorischen Profil für eine medizinische Applikation sollen zudem weiterführende Erkenntnisse über Funktion und Struktur des Nef Proteins erarbeitet werden. Im Vordergrund steht die Studie der Inhibitor-Nef-Interaktion mit Methoden der modernen Biochemie und Virologie. Die genaue Skizzierung der Ziele im einzelnen sowie das zu erarbeitende Programm befinden sich im Kapitel 1.5.4.

Im folgenden sollen zunächst die bisher unternommenen Ansätze und das hier zugrunde liegende Konzept zur Entwicklung eines Inhibitors gegen Nef dargestellt werden.

### 1.5.1 Die Entwicklung von Nef Inhibitoren

Obwohl die Relevanz von Nef für die Pathogenese von HIV spätestens seit der Studie von Kirchhoff et al. (1995) deutlich wurde, ist die Entwicklung eines Nef-Inhibitors eher zögerlich verfolgt worden [115].

- **2001** wurde in einer Studie eine Substanz Ikarugamycin (IKA), ein natürliches Antibiotikum aus *Streptomyces phaeochromogenes* Subspezies *ikaruganensis*, getestet, das die CD4-Internalisierung durch Nef verhindert. Zuvor ist die Substanz durch die inhibitorische Wirkung auf den Endocytoseweg des Low-Density Lipoproteins (LDL) in Makrophagen bekannt geworden. Durch die Zugabe von IKA konnte in Nef-exprimierenden Monozyten eine ca. zehnfach höhere CD4-Expressionsrate erzielt werden [134].
- **2004** wurde ein von Guanidin-Alkaloid-Analoga abgeleiteter Inhibitor *in vitro* erprobt und zeigte eine inhibitorische Wirkung auf die Interaktion zwischen Nef und der Kinase Lck. Die toxischen Eigenschaften der Analoga Batzellidin und Crambebescidin machten eine Weiterentwicklung zum Medikament jedoch unmöglich [153].
- Zudem wurde ein Ansatz der Inhibition mit Hilfe der siRNA-Technik (small interfering RNA) verfolgt, der teilweise erfolgreich verlief. Die Transkription des *nef*-Gens konnte durch die siRNA *in vitro* und im Mausmodell weitestgehend inhibiert und die HIV-Transkription gestört werden [154]. Eine wenig später veröffentlichte Studie über die Anwendung in Zellkultur berichtete jedoch gegenteilig über die schnelle Entstehung von Resistenzen gegenüber den siRNAs [52].

- **2005** wurde ein Inhibitor gegen das Bienengift Mellitin in Zellkultur gegen exogenes Nef erprobt und verhinderte die Nef-induzierte Apoptose. Als Grundlage dieses Ansatzes diente die Beobachtung einer gewissen Ähnlichkeit zwischen dem Bienengift und dem N-terminalem Anker von Nef [17].
- Im selben Jahr wurde ein weiterer Nef-Signaltransduktionsweg über einen monoklonalen Antikörper inhibiert und damit indirekt Nef als Target fokussiert [38].
- Aus einem Statusbericht der neusten HIV-Therapieansätze aus dem Frühjahr **2006** von Rob Camp (Antiretroviral Project Director) geht hervor, daß derzeit eine siRNA der Firma CombiMatrix in der Testphase steht.

### 1.5.2 Das Prinzip des Inhibitors

Für die Entwicklung eines Inhibitors sind die Erkenntnisse über die Funktionsweise des Zielproteins eine wichtige Grundlage. Hieraus ergeben sich Zielstrukturen wie z.B. das aktive Zentrum eines Enzyms, das durch einen Inhibitor blockiert werden kann oder Intermediärstrukturen einer Konformationsänderungen wie es bei der Entwicklung des Inhibitors T-20 der Fall war.

Wie bereits in Kapitel 1.3 dargestellt wurde, verfügt das Nef Protein über keine enzymatische Aktivität, sondern moduliert zelluläre Prozesse über seine Motive. Die Interaktion der Motive mit den Proteinen der Wirtszelle stellt daher eine Art Schlüsselmechanismus in der Funktion von Nef dar und dient als Ansatzpunkt des hier entwickelten Inhibitors. Das erarbeitete Konzept basiert auf der Störung der Interaktion zwischen Zellprotein und Nef durch die Blockierung der Bindungsmotive. Theoretisch betrachtet soll durch die Blockierung einzelner wichtiger Motive die Nef Funktion soweit gestört werden, daß zelluläre Signalkaskaden und Proteintransport-Prozesse nicht mehr betroffen sind. So könnte durch die synergistische Entkopplung weniger zentraler Interaktionen die gesamte Funktion von Nef gestört werden.

Das Blockieren der Motive soll dabei durch das Besetzen der Motive mit spezifischen Bindungsdomänen erfolgen, die von den natürlichen Bindungsdomänen aus der Zelle abgeleitet sind.

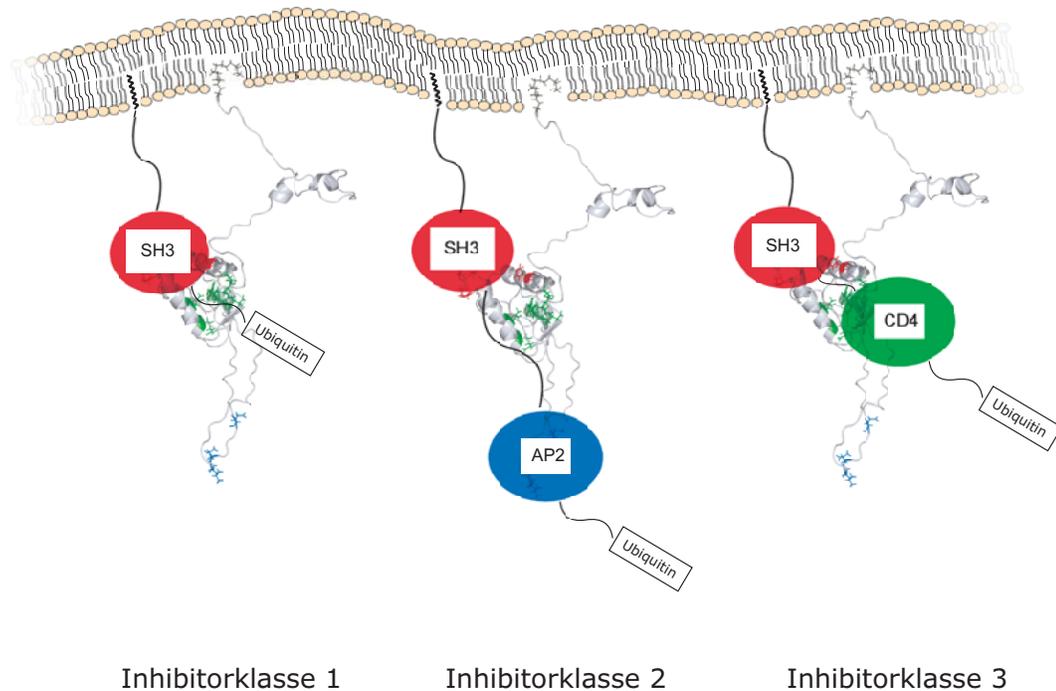
#### Der Aufbau des Inhibitors

Der Inhibitor besteht aus mehreren Bestandteilen mit verschiedenen Funktionen. Ein wesentlicher Bestandteil sind die Nef-bindenden Domänen, die zusammen mit funktionalen Motiven zu einem Protein fusioniert werden. Der Inhibitor ist also ein Fusionsprotein mit einer Mehrdomänenarchitektur.

In Abb. 1.3 wurde der Aufbau schematisch dargestellt. Insgesamt werden hier drei Inhibitorklassen unterschieden, die sich aus den verschiedenen Kombinationen der Domänen ergeben. Die Inhibitoren der **Inhibitorklasse 1** bestehen aus der SH3 Domäne, welche das PxxP-Motiv auf Nef bindet. Ausgehend von diesem Inhibitor

werden die beiden weiteren Inhibitorclassen entwickelt. Die SH3 Domäne dient dabei als Basisbaustein oder „Leadcompound“, der durch seine höhere Affinität möglicherweise zuerst Nef bindet und dadurch die Interaktion einer zweiten Domäne im Inhibitor erleichtert. Die **Inhibitorklasse 2** stellt eine Kombination aus der SH3 Domäne und einer Domäne des Adaptorprotein 2 Komplexes dar. Verbunden werden beide Domänen über einen kurzen flexiblen Linker, der größtenteils aus neutralen Glyzinen besteht. Durch die Domäne des Adaptorprotein 2 Komplexes soll das Dileuzin-Motiv in der flexiblen Schleife von Nef gebunden werden.

**Inhibitorklasse 3** setzt sich aus der SH3 Domäne und der cytoplasmatischen CD4 Domäne zusammen. Beide Domänen werden ebenfalls über einen kurzen Linker verbunden. Im Gegensatz zu den beiden anderen Domäne bindet die CD4 Domäne nicht an ein einziges Motiv sondern an einen größeren Bereich auf Nef.



**Abbildung 1.3: a) Aufbau der drei Inhibitorclassen.** Von links nach rechts sind die Inhibitorclassen 1, 2 und 3 schematisch im Komplex mit Nef an der Plasmamembran dargestellt. Die Inhibitoren sind über eine Lipidierung in der Plasmamembran der Zelle verankert und binden dort über die Domänen SH3, CD4 und AP2 das Nef Protein. Durch ein Ubiquitynylierungsmotiv wird der Abbau des Nef-Inhibitor-Proteinkomplex initiiert.

Neben den Bindungsdomänen ist der Membrananker ein weiterer wichtiger Bestandteil des Inhibitors. N-terminal oder C-terminal wurden in die Sequenz des Inhibitors Motive eingefügt, die *in vivo* die Lipidierung mit bestimmten Fettsäuren verursa-

chen. Diese Membrananker lokalisieren den Inhibitor an Membranen. Das Nef Protein wird über eine Myristoylierung ebenfalls in der Membran verankert. Durch eine ähnliche Membranverankerung soll erreicht werden, daß sich der Inhibitor und Nef an den gleichen Positionen in der Zelle aufhalten und dadurch leichter interagieren können. Wahlweise wurde eine Myristoylierung, Palmitoylierung oder Prenylierung eingeführt.

In einem zusätzlichen Ansatz wurde versucht den Inhibitor-Nef-Komplex zum Proteasomen oder Lysosomen zu dirigieren. Dies könnte den proteolytische Abbau des Komplexes induzieren. Hierfür wurde ein Ubiquitinylierungsmotiv in die C-terminale Sequenz des Inhibitors eingefügt.

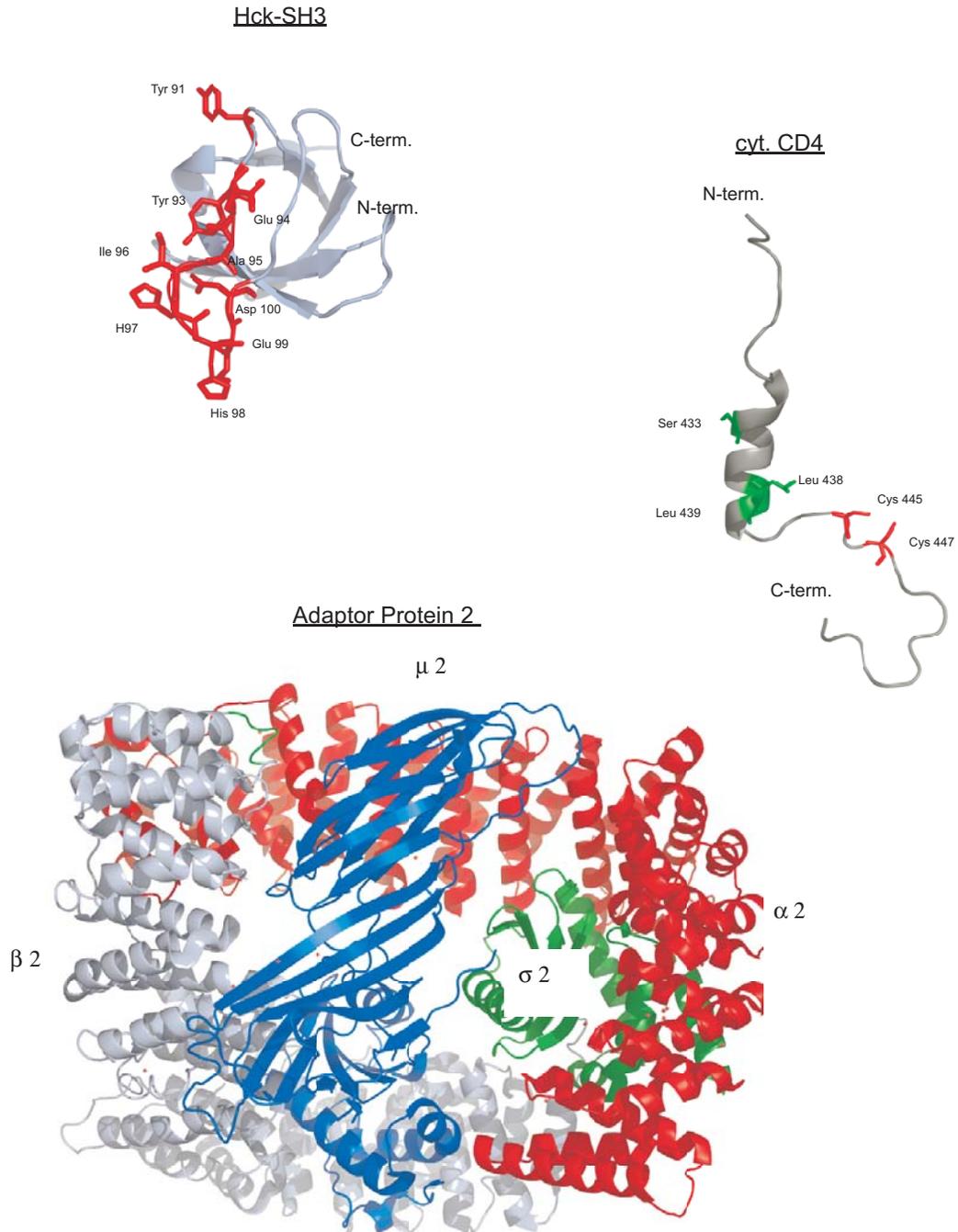
Die drei Inhibitorclassen repräsentieren die Kombinationen aus drei wichtigen Nef-Bindungsdomänen. Sie interagieren mit drei hoch-konservierten Signal- und Proteintransportmotiven und sollen dadurch die Nef Funktionen inhibieren. Die Kombination der Domänen soll nicht nur gleichzeitig zwei Funktionen simultan inhibieren, sondern auch die Spezifität des Fusionsproteins für Nef verbessern. Zudem wird durch Mutationstudien versucht, die Affinität der einzelnen Domänen zu verbessern und die Größe der Domänen auf die wesentlichen Reste zu beschränken. Potentiell stehen aufgrund der vielen Bindungsmotive in Nef diverse andere Domänen und Motive zur Verfügung. Hier beschränkt sich die Auswahl auf drei Domänen, deren Interaktionen mit Nef durch zahlreiche Studien besser charakterisiert sind.

Tabellen 1.1 und 1.2 zeigen prinzipiell eine Reihe von möglichen Inhibitor-domänen, jedoch sind nicht alle soweit untersucht worden, als daß sie sich so einfach einsetzen ließen.

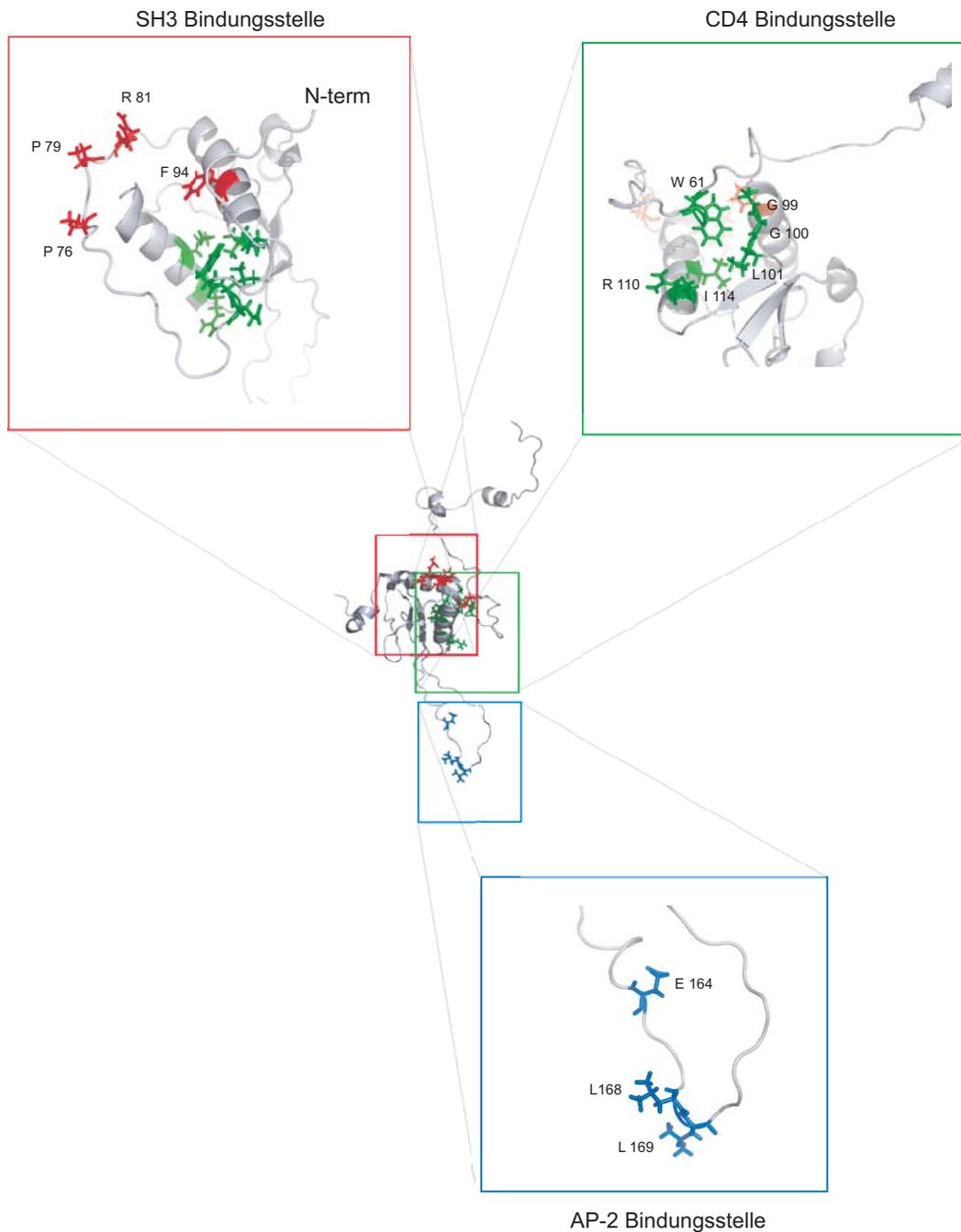
### 1.5.3 Die Domänen des Inhibitors

Im folgenden sind die Informationen zur Struktur und Funktionsbeziehung zwischen den drei Domänen und Nef zusammengefaßt.

Abb. 1.4 veranschaulicht zunächst die strukturellen Daten der Domänen, während in Abb. 1.5 die Signal- und Proteintransportmotive auf Nef dargestellt sind.



**Abbildung 1.4:** a) Die Domänen der Inhibitorklassen. Struktur der SH3 Domäne (pdb ID: 1BU1), der cytoplasmatischen CD4 Domäne (pdb ID: 1Q68) und des Adaptorproteins 2 (pdb ID: 1GW5) [13, 114, 46]. Mit Ausnahme des Adaptorproteins (nicht bekannt) sind in der Struktur jeweils die kritischen Aminosäuren farblich hervorgehoben, die für die Interaktion mit Nef eine Rolle spielen. Die Größe und Art der Sekundärstrukturelemente der Domänen sind sehr heterogen.



**Abbildung 1.5: a) Die Bindungsstellen der Inhibitor-Domänen auf Nef.** Die Signal- und Proteintransportmotive sind in der Struktur farblich hervorgehoben. SH3 und CD4 Domäne binden nahe der Kerndomäne von Nef an das PxxP-Motiv und eine hydrophobe Tasche (kein kontinuierliches Motiv sondern eher eine Bindungsstelle). Das Dileuzin-Motiv, an das eine Domäne des Adaptorprotein 2 Komplexes bindet, liegt in der C-terminalen flexiblen Schleife exponiert.

**Die SH3 Domäne** Die Src Homology-3 (SH3) Domäne ist ein ca. 7 kDa großes Protein, das eine stabile, überwiegend aus  $\beta$ -Faltblättern bestehende Konformation annimmt. Die orthogonalen  $\beta$ -Faltblätter sind über drei Schleifen verbunden,

die man in RT-Schleife, nSrc-Schleife und distale Schleife unterscheidet. Neben der  $\beta$ -Faltblattstruktur wurde ein kleiner helikaler Bereich nahe dem C-Terminus beschrieben. Die SH3 Struktur im Komplex mit Nef unterscheidet sich kaum von der hoch-konservierten SH3 Topologie anderer NMR oder Kristallographie-technischer Untersuchungen der SH3 Domäne alleine [13, 144, 148]. Die SH3 Domäne interagiert mit dem PxxP-Motiv in der Prolin-reichen Helix Typ II auf Nef. Die Interaktion gehört zu den wenigen auch strukturell untersuchten Interaktionen zwischen einem Zellprotein und Nef. Neben dem PxxP-Motiv sind auf Nef weitere Reste beteiligt, die jedoch im Gegensatz zum PxxP-Motiv eine untergeordnete Rolle spielen. Die Strukturdaten zeigen die Ausbildung einer hydrophoben Tasche zwischen  $\alpha$ -Helix 1 und 2, wo insbesondere das Phenylalanin 94, Tryptophan 117 und Leuzin 91 für die Bindung zur SH3 Domäne von Bedeutung sind [13, 125, 124]. In diesem Zusammenhang wird auch die Ursache für die hohe Affinität zu einer besonderen SH3 Domäne, der Hämatopoetischen Zell Kinase SH3 Domäne (Hck-SH3), diskutiert. Arold et al. (1998) konnten zeigen, daß von allen Kinasen der Src Familie die SH3 Domäne der Hck die höchste Affinität zu Nef besitzt. Die RT-Schleife der SH3 Domäne spielt dabei eine wichtige Rolle [15]. Die vergleichende Studie zeigt, daß in der RT-Schleife die Mutation zu Isoleuzin 96 und Histidin 97 die Affinität um den Faktor 10 (Unterschied zwischen Fyn und Hck) erhöht. Deutlich wird die Relevanz durch eine Mutationsstudie nach Hiipakka et al. (1999) [97]. Hier wurden zufällige Mutationen in die RT-Schleife der Hck-SH3 Domäne eingeführt und mit Hilfe der Phage-Display-Technik selektiert. Die Mutation der Wildtyp-Sequenz E<sub>94</sub>AIHHE zu VSWSPD (RRT.A1) oder YSPFSW (RRT.B6) hatte besonders signifikante Auswirkungen auf die Affinität zu Nef. Durch die Mutationen wurde die Affinität um den Faktor 35 erhöht. Statt einer Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von ca. 250 nM wurde für beide Mutanten eine Dissoziationskonstante von ca. 7 nM bestimmt. Aus diesen Erkenntnissen heraus wurden für die Entwicklung des Inhibitors beide Mutanten verwendet, um die Affinität der SH3 Domäne für Nef zu erhöhen.

**Die cytoplasmatische CD4 Domäne** Das Glykoprotein CD4 besteht aus vier extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Untereinheiten, einer transmembranen Helix und der cytoplasmatischen Domäne. Von dem Protein ist hier nur der 37 Aminosäuren große cytoplasmatische Teil nach einer Struktur von Kim et al. (2003) dargestellt [114]. Im NMR Spektrum zeigte sich die Domäne größtenteils ungefalted und bildet nur im Komplex mit Lck über die Koordination eines Zinkatoms einen helikalen Bereich aus. Wie auch Nef verfügt CD4 über ein Dileuzin-Motiv  $_p$ SxxxxLL in der cytoplasmatischen Domäne, über das es internalisiert wird. Dieses Motiv ist jedoch phosphorylierungsabhängig und wird im Zusammenhang mit der Bindung an Nef kontrovers diskutiert. 1994 erhielten Aiken et al. wichtige Hinweise auf die direkte Interaktion zwischen dem Dileuzin-Motiv und Nef [3]. Die Beteiligung des Serins ist dabei unklar. Eine Phosphorylierung ist für die CD4 Internalisierung durch Nef nicht notwendig und sogar eher störend [77, 108]. Im Gegensatz dazu vermuten Bentham et al. (2003) keine direkte Interaktion zwischen dem Dileuzin-Motiv und Nef [25]. Sie unterstützen eine Hypothese, wonach das Dileuzin-Motiv von CD4 sowie auch das Dileuzin-Motiv von Nef durch Adaptorproteine erkannt werden und die Internalisierung von CD4 hervorrufen. Die eigentliche Bindung zwischen Nef und

CD4 findet hiernach über andere Reste statt. Die Kinase Lck spielt bei der Internalisierung von CD4 durch Nef keine Rolle [87]. Nach Goldsmith et al. (1995) dissoziiert die Kinase Lck initial vor der Bindung an Nef ab [86].

Die Interaktion zwischen CD4 und Nef ist bisher nur unzureichend untersucht worden. Insbesondere auf molekularer Ebene fehlen hier wichtige Details über den Mechanismus der Bindung.

1996 konnten Grzesiek et al. wesentlich zu dessen Aufklärung beitragen, indem sie mittels NMR Spektroskopie auf Nef die Bindungsstelle für CD4 identifizierten [92]. Erste Studien des Komplexes stellten sich zunächst als schwierig heraus, da der Komplex aus der CD4 Domäne und Nef eher unlöslich war, aber schließlich gelang es mit einem verkürzten 13 Aminosäuren langem Peptid ( $M_{432}$ SQIKRLLSEKKT) der CD4 Domäne und Nef<sub>BH10</sub>  $\Delta$  2-39,  $\Delta$  159-173 eine Struktur zu lösen. Die Bindung des Peptids zeigte Verschiebungen im Bereich der Kerndomäne (Nef<sub>SF2</sub>:G<sub>99</sub>,G<sub>100</sub>,L<sub>101</sub>,R<sub>110</sub> und L<sub>114</sub>) und im flexiblen N-Terminus (Nef<sub>SF2</sub>:W<sub>61</sub>, L<sub>62</sub> und E<sub>63</sub>). Aus der Studie konnte eine schwache Dissoziationskonstante von 0.5 - 1 mM für die Nef-CD4 Bindung ermittelt werden. Eine Struktur zwischen der ganzen cytoplasmatischen Domäne und Nef wurde bisher aufgrund der Löslichkeitsproblematik nicht untersucht. Im Gegensatz zum PxxP-Motiv oder dem Dileuzin-Motiv deutet sich für die kritischen Aminosäuren der CD4-Interaktion eher eine Bindungsstellen-Struktur an. Wenn man in diesem Zusammenhang von einem Motiv reden will, so liegt es nahe von einem WL-Motiv zu reden, da gezeigt werden konnte, daß die Mutation dieser Aminosäuren die CD4-Internalisierung aufhebt [137].

**Adaptorprotein** Das Adaptorprotein 2 ist das wohl am besten charakterisierte Protein der vier Adaptorproteine AP1, AP2, AP3 und AP4. Die Struktur der 200 kDa großen Kerndomäne des Adaptorproteins 2 (AP2) wurde 2002 von Collins et al. gelöst. Es besteht aus den beiden großen  $\alpha$ -helikalen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  sowie den beiden kleineren Untereinheiten  $\mu$  und  $\sigma$  [46]. Die großen Untereinheiten werden auch als Adaptine bezeichnet.

Die 100 - 130 kDa großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  bestehen aus einer  $\alpha$ - $\alpha$ -superhelikalen Faltung. Insgesamt 28 bis 29  $\alpha$ -Helices unterteilen sich in kleinere Einheiten, so genannte HEAT-Repeats. Dies sind Faltungsmotive aus zwei aufeinander folgenden Helices, die in vielen eukaryotischen Proteinen vorkommen [11].

Zusammen bilden beide Untereinheiten oder Adaptine ein Dimer, welches die beiden kleineren Untereinheiten einschließt. Die Faltung der kleinen Untereinheiten enthält neben helikalen Anteilen auch  $\beta$ -Faltblätter. Alle zusammen bilden eine sehr kompakte Struktur.

AP2 ist ein Protein, das Proteintransportmotive im cytoplasmatischen Teil von Oberflächenrezeptoren erkennt, bindet und die Internalisierung via Clathrin-Coated Pits induziert. Im Zusammenhang mit diesem Protein wurde die Bindung des Proteintransportmotivs Yxx $\phi$  (Y Tyrosin, x beliebige AS,  $\phi$  hydrophobe AS) auf der Untereinheit  $\mu$  identifiziert [46, 155, 151]. AP2 ist für die Nef-vermittelte Internalisierung von Oberflächenrezeptoren essentiell [89]. Man vermutet, daß Nef wie eine Art „Linker“ den Kontakt zwischen Oberflächenrezeptor und Adaptorprotein vermittelt und damit die Kaskade der Endocytose auslöst. Neben AP2 zählen noch drei weitere Proteine AP1, AP3 und AP4 zu den Adaptorproteinen der Zelle, die potentiell im

Zusammenhang mit der Nef Bindung diskutiert werden [89, 105]. Bis heute ist nicht ganz klar welches dieser Proteine an Nef bindet oder ob möglicherweise alle Proteine involviert sind. Doch neuste Daten deuten eher auf AP2 hin [107].

Wie bereits erwähnt, kommt dem Dileuzin-Motiv auf Nef dabei eine besondere Bedeutung zu [88]. Im Gegensatz zum Yxx $\phi$ -Motiv wurde die Interaktion für das Dileuzin-Motiv mit einem Adaptorprotein noch nicht gezeigt. Bisher wurde vermutet, daß es ebenfalls auf  $\mu$ -Untereinheit binden könnte, jedoch sprechen viele neue Veröffentlichungen eher dagegen [170, 155]. Crosslinking-Versuche indizieren, daß das Motiv wahrscheinlicher auf der  $\beta$ -Untereinheit bindet [167]. Auch die Ähnlichkeit zwischen der Sekundärstruktur der  $\beta$ -Untereinheit und der regulatorischen Untereinheit H der Vacuolar ATPase weisen auf eine ähnliches Bindungsmuster hin [82]. Coleman schlägt einen kooperativen Bindungsmechanismus von  $\mu$ - und  $\beta$ -Untereinheit vor [44].

Für das Fusionsprotein (Inhibitor-2) wird hier die  $\beta$ -Untereinheit verwendet, die im folgenden als  $\beta$ -Adaptin bezeichnet wird.

#### 1.5.4 Das Arbeitsprogramm

1. Zunächst soll mit Hilfe molekularbiologischer Methoden eine Fusionsprotein hergestellt werden, das eine hoch-affine Bindung zu Nef aufweist. Nach dem oben aufgestellten Konzept wird zunächst die SH3 Domäne alleine getestet und anschließend mit der CD4 Domäne oder einer Untereinheit des Adaptorproteins kombiniert. Die Affinität zu Nef wird durch kalorimetrische oder spektroskopische Methoden (ITC, SPR, Gleichgewichts-Fluoreszenztitration) bestimmt.
2. Parallel zu den *in vitro* Daten werden die Inhibitoren *in vivo* getestet. Zur Verfügung stehen die Methoden der Fluoreszenzmikroskopie, Durchflußcytometrie (FACS) und Immunpräzipitation. Zudem werden HIV spezifische Versuche wie Infektions-Assays in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Oliver Fackler an der Universität Heidelberg durchgeführt. Hierdurch sollen die *in vitro* erzielten Ergebnisse bestätigt und erste Aussagen über Wirkung, Spezifität und Toxizität getroffen werden.
3. Neben der Charakterisierung des Inhibitors hinsichtlich einer Medikamentenentwicklung sollen weiterführende Erkenntnisse über die Interaktionen der einzelnen Domänen und Nef erörtert werden. Mit der NMR Spektroskopie oder auch der Kristallisation stehen Methoden zur Verfügung, die neue Informationen über die Struktur-Funktions-Beziehung des Nef Proteins ergeben. Insbesondere die Interaktion der cytoplasmatischen CD4 Domäne mit Nef ist von Interesse, sowie auch die Identifikation des Dileuzin-Motivs auf Adaptorprotein 2.
4. In der Arbeitsgruppe wurde die Möglichkeit etabliert, myristoyliertes Nef durch Co-Expression mit der N-Myristoyltransferase herzustellen [80, 122]. Mit Hilfe von biochemischen Methoden wie der analytischen Gelfiltration, analytischen Ultrazentrifugation und NMR Spektroskopie soll myristoyliertes Nef Protein untersucht werden.

## Kapitel 2

# Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Es wurden Chemikalien der folgenden Firmen verwendet:

- Aldrich (Steinheim)
- Boehringer Mannheim (Mannheim)
- Fluka (Neu-Ulm)
- Baker (Deventer, Niederlande)
- Merck (Darmstadt)
- Amersham Biosciences (Freiburg)
- Qiagen (Hilden)
- Roth (Karlsruhe)
- Serva (Heidelberg)
- Sigma (München)

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- PVDF-Membran (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Sensor Chip CM 5 Research Grade (BIAcore AB, Uppsala, Schweden)
- Dialyseschläuche (Roth, Karlsruhe)
- Elektroporationsküvetten (Invitrogen, Karlsruhe)
- Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Plymouth, U.K.)

- Ultrafiltrationseinheiten (Millipore Amicon, Witten)
- NMR Rörchen (Wilmad, Buena, USA und Shigemi Co., LTD Tokyo Japan)

### 2.1.3 Säulenmaterialien

- Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden)
- GSH 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Freiburg)
- S75 Hi Load<sup>TM</sup> Superdex<sup>TM</sup> S75 16/60 prep grade (Amersham Biosciences, Freiburg)
- PD 10 Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Q-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Superdex S75 (10/30) (Amersham Biosciences, Freiburg)

### 2.1.4 Farbstoffe

- 1,5-IAEDans (Molecular Probes, Eugene, OR)
- Gal-X (Bio Vectra<sup>TM</sup>)
- CPRG (Roche, Mannheim)

### 2.1.5 Reagenziensätze „Kits“

- QIAprep Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAprep Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAprep Plasmid Midiprep Kit (Qiagen, Hilden)
- ECL-Western-Blot-Detection-Kit (Amersham Biosciences, Freiburg)
- GST-Capture Kit (BIAcore AB, Uppsala, Schweden)

### 2.1.6 DNA-Konstrukte

#### Marker

- DNA LMW-Marker (Invitrogen, Karlsruhe)  
40000, 10000, 8144, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517/506 Bp

#### Oligonukleotide

- Primer (MWG Biotech, München)

## Vektoren

- pProEx-HTa (Invitrogen, Karlsruhe)
- pET-23d (Novagen, Darmstadt)
- pGEX-4T1 Tev-Site modifiziert (Amersham Biosciences, Freiburg)
- pGEX-2T Tev-Site modifiziert (Amersham Biosciences, Freiburg)
- pET-30a (Novagen, Darmstadt)
- pET-Duet (Novagen, Darmstadt)
- pRSF-Duet (Novagen, Darmstadt)
- pACT-2 (Clontech, Mountain View, USA)
- pAS2-1 (Clontech, Mountain View, USA)
- pEF-HA (Dr. Geyer, MPI Dortmund)

### 2.1.7 Enzyme, Proteine und Antikörper

#### Enzyme

- Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Schwalbach)
- DNase I (New England Biolabs, Schwalbach)
- Expand high Fidelity PCR System Polymerase (Roche, Mannheim)
- T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach)
- Trypsin (Roche, Mannheim)
- Elastase (Sigma, München)
- Tev-Protease (MPI-Dortmund)

#### Peptide

- Nef<sub>NL4-3</sub> Peptid; GENTSLLHP (BIOSYNTHAN GmbH, Berlin)
- CD4 LLAA Peptid; SAKQTAAQ (BIOSYNTHAN GmbH, Berlin)

#### Antikörper

- polyklonaler Kaninchen- $\alpha$ -His-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)
- monoklonaler Maus- $\alpha$ -Nef-Antikörper (Dr. Marc Harris, Universität Leeds, U.K.)

- Peroxidase-markierter  $\alpha$ -Maus-Antikörper (Amersham Biosciences, Freiburg)
- $\alpha$ -Kaninchen-Antikörper (Amersham Biosciences, Freiburg)
- HA-probe(F-7)mouse monoclonal IgG2a (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)
- AlexaFluor568 g  $\alpha$ -murine IgG (H+L) (Molecular Probes, Oregon, USA)
- APC  $\alpha$ -human CD4 (Becton Dickinson, Plymouth, U.K.)
- APC  $\alpha$ -human CCR5 (Becton Dickinson, Plymouth, U.K.)
- monoclonal mouse  $\alpha$ -human HLA-ABC Antigen/RPE clone W6/32 (DakoCytomation)
- $\alpha$ -GST-Antikörper (BIAcore AB, Uppsala, Schweden)

### Marker

- Proteinstandard für SDS-Page (Amersham Biosciences, Freiburg)  
97,000 Da Phosphorylase b, 66,000 Da Albumin, 45,000 Da Ovalbumin, 30,000 Da Carbonic Anhydrase, 20,100 Da Trypsin Inhibitor, 14,400 Da Lactalbumin
- Proteinstandard für analytische Gelfiltration (Amersham Biosciences, Freiburg)  
2,000,000 Da Blue Dextran 2000, 67,000 Da Bovine Serum Albumin, 43,000 Da Ovalbumin, 25,000 Da Chymotrypsinogen A, 13,700 Da Ribonuclease A
- Proteinstandard für analytische Gelfiltration (Bio-Rad, München)  
670,000 Da Thyroglobulin, 158,000 Da Bovine gamma-Globulin, 44,000 Da Chicken Ovalalbumin, 17,000 Da Equine Myoglobin, (1350 Da Vitamin B12)

### 2.1.8 Geräte

- Äkta<sup>TM</sup>prime (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Microfluidizer M-110S (Microfluidics Corp., Newton, U.K.)
- GenePulsers (Bio-Rad, München)
- Schüttler (Brunswick, Nürtingen)
- PCR-Express (Hybaid, Heidelberg)
- VP-ITC (Microcal, Northampton, U.K.)
- FluoroMax-3 Spectrofluorometer (SPEX Instruments, Edison, U.K.)
- BIAcore<sup>TM</sup> (BIAcore AB, Uppsala, Schweden)
- Varian Inova 600 Spektrometer (NMR) (Varian Inc., USA)

- Voyager-DE pro MALDI Massenspektrometer (Perseptive Biosystems, Weiterstadt)
- ESI-Massenspektrometer Agilent 1100 (Hewlett Packard, Texas, USA)
- Photometer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
- Zentrifuge 5810 R (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
- FACSCalibur (Becton Dickinson, Plymouth, U.K.)
- konfokales Mikroskop LSM (Zeiss, Göttingen)
- Semi-Dry Trans-Blot Apparatur (Biometra, Göttingen)
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 600S Controller, 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector, Waters 717plus Autosampler (Waters, Milford, USA)
- XLA analytischen Ultrazentrifuge (Coulter Beckman, Palo alto)

### 2.1.9 Puffer und Lösungen

- Die Zusammensetzung der einzelnen Puffer wird im jeweiligen Methodenteil oder Experimentteil aufgeführt.

### 2.1.10 Materialien für die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie

#### Medien und Zusätze eukaryotische Zellkultur:

- fötales Kälberserum, FCS (Sigma, München)
- Rockwell Park Memorial Institute Medium 1640, RPMI 1640 (GibcoBRL, Egenstein)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (GibcoBRL, Egenstein)
- Glutamin (GibcoBRL, Egenstein)

#### Medien und Zusätze prokaryotische Zellkultur:

- LB-Medium: je Liter 10 g Pepton(140)-Hydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1000 ml, pH 7.2
- Minimalmedium: je Liter 0.5 g NaCl, 1.3 ml Spurenelementelösung, 1 g Zitronensäuremonohydrat, 36 mg Eisencitrat, 4.02 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.96 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1ml Zink-EDTA Lösung, 2 ml  $\text{MgSO}_4$  1 g  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , 25 ml 20% Glukoselösung oder 2 bis 3 g  $^{13}\text{C}$ -Glukose
- Spurenelementelösung: 2.5 g/l Borsäure, 2.0 g/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 1.1 g/l  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 9.8 g/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 2.9 g/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

- Zink-EDTA Lösung 5 mg/ml EDTA, 8.4 mg/ml  $\text{Zn}(\text{Ac})_2$
- Myristinsäure-Lösung: Eine Lösung aus 5 mM Myristinsäure und 0.6 mM BSA (Fraktion V) wird langsam auf 50°C erhitzt und mit NaOH auf pH 9 eingestellt.

### Antibiotika

- Penicillin (GibcoBRL, Egenstein)
- Streptomycin (GibcoBRL, Egenstein)
- Ampicillin (Serva, Heidelberg)
- Kanamycin (Serva, Heidelberg)

## 2.1.11 Mikroorganismen und Zelllinien

### prokaryotische Zelllinien

- *E.coli*-Stamm **BL21 (DE3)** (Novagen, Darmstadt) [188]  
Genotyp: F- ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm rne 131 (DE3)
- *E.coli*-Stamm **TG1** (Zymo Research CA) [35]  
Genotyp: lac-pro, thi-1, supE, hsdD5, [F' traD36, proAB+, lacIQ, lacZ.M15]

### eukaryotische Zelllinien

- **AH109** = Hefezelllinie (Clontech)
- **CHO++** = Chinese Hamster Ovarien Zellen; exprimieren stabil die Rezeptoren hCD4 und hCCR5
- **HeLa** = Humane Zervix Karzinom Zelllinie
- **TZM Zellen** = HeLa Zellen; exprimieren stabil die Rezeptoren hCD4, hCCR5 und hCXCR4. Enthalten die Gene für  $\beta$ -Galaktosidase (*E.coli*) und Firefly-Luciferase, die unter der transkriptionellen Kontrolle des HIV-1 LTR stehen [199].
- **293T** = Humane embryonale Nierenfibroblasten Zelllinie [157]

## 2.2 Methoden

### 2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1 PCR-Mutagenese

Zur Generierung der Punktmutationen wurde die Mega-Primer Methode verwendet. In zwei getrennten Ansätzen werden dafür zunächst zwei große Oligonukleotide (Mega-Primer) durch PCR (PCR 1) amplifiziert. Der erste Ansatz enthält die Amplifikation der DNA-Sequenz bis zur Punktmutation, während der zweite Ansatz aus dem Bereich ab der Punktmutation bis zum Ende der DNA-Matrize besteht. Reverse-Primer des ersten Ansatzes und Forward-Primer des zweiten Ansatzes beinhalten die geänderte Basensequenz. In einer zweiten PCR (PCR 2) wird die DNA der beide Ansätze zusammen amplifiziert. Als Primer werden der Forward-Primer des ersten Ansatzes und der Reverse-Primer des zweiten Ansatzes verwendet. Die beiden Mega-Primer hybridisieren über den Bereich der Punktmutation und können so in der PCR komplementiert und amplifiziert werden.

Der 50  $\mu$ l Ansatz der PCR 1 enthält 38  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l zehnfach Expand-High-Fidelity-Puffer, 10 bis 50 ng Template DNA, 4  $\mu$ l 2.5 mM dNTPs, jeweils 1  $\mu$ l 10 pmol/ $\mu$ l des jeweiligen Oligonukleotid-Primers und 0.6  $\mu$ l Expand-High-Fidelity-Polymerase.

Der 50  $\mu$ l Ansatz der PCR 2 enthält 35  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l zehnfach Expand-High-Fidelity-Puffer, 2  $\mu$ l Mega-Primer 1 (Ansatz 1) und 2  $\mu$ l Mega-Primer 2 (Ansatz 2), 4  $\mu$ l 2.5 mM dNTPs, jeweils 1  $\mu$ l 10 pmol/ $\mu$ l des jeweiligen Oligonukleotid-Primers und 0.6  $\mu$ l Expand-High-Fidelity-Polymerase.

Die PCR-Reaktion erfolgt mit den Schritten: initialer Schritt 95°C (2 min) (Hold Step); 25 Zyklen a 95°C (15 s), 55°C (30 s), 72°C (45 s); 72°C (7 min); 16°C (Hold Step)

#### 2.3.2 Restriktion von Plasmid-DNA

Die Spaltung von doppelsträngiger DNA wurde unter den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt. Anschließend wurden die Restriktionsansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

#### 2.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese und die Verwendung von Gelelutions-Kits der Firma Qiagen. Entsprechend der Größe der Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 1% bis 2% in TBE-Puffer (89 mM Tris pH 8.9, 89 mM Borsäure, 0.9 mM EDTA und 0.006% Ethidiumbromid) verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA-Probenpuffer (10% Ficoll, 0.025% Bromphenolblau und 0.025% Xylencyanol in TBE-Puffer) versetzt. Als Größenstandard diente der DNA LMW-Marker der Firma Invitrogen. Die Elektrophorese erfolgte bei 110 Volt.

### 2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Plasmid-DNA erfolgt durch Inkubation von DNA-Fragment und linearisiertem Vektor bei RT für mehrere Stunden. Der 20  $\mu\text{l}$  Ligations-Ansatz enthält 6  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{l}$  zehnfach Ligation-Puffer (T4-DNA-Ligasepuffer, New England Biolabs), 1  $\mu\text{l}$  linearisierter Vektor (0.05 mg/ml DNA), 10  $\mu\text{l}$  DNA-Fragment (ca. 0.01 mg/ml DNA) 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase.

### 2.3.5 Transformation von Bakterien

Die Transformation in *E.coli* erfolgte durch die Hitzeschock-Methode oder Elektroporation. TG1 Zellen, hitzekompetente BL21(DE3) oder elektrokompente BL21(DE3) wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden ca. 50 bis 100  $\mu\text{l}$  dieser Bakterien-suspension mit 20  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz oder 1  $\mu\text{l}$  Mini-Prep-DNA vermischt und 30 bis 60 min auf Eis inkubiert.

**Hitzeschock:** Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 1 min. Anschließend wurde die Bakterien-suspension noch mal 5 min auf Eis inkubiert, mit 300 bis 500  $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt und 30 bis 45 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien-suspension wurde zur Selektion transformierter Bakterien auf LB-Platten mit dem Plasmid-entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

**Elektroporation:** Der Elektroschock erfolgte in einer Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm bei einem Puls von 1.5 kV, 25  $\mu\text{F}$  und einer Zeitkonstanten von 10 s durch einen GenePulser (Bio-Rad, München). Anschließend wurde die Bakterien-suspension mit 300 bis 500  $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt und 30 bis 45 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien-suspension wurde zur Selektion transformierter Bakterien auf LB-Platten mit dem Plasmid-entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.3.6 Die Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte durch die Verwendung der Mini-, Midi- und Maxi-Prep-Kits der Firma Qiagen nach entsprechenden Protokollen. Die Isolierung beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Fällung der Proteine durch Kalium-Dodecylsulfat und Auftrennung durch Ionenaustausch-Chromatographie. Die isolierte DNA wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  oder TE Puffer (Qiagen) aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt.

### 2.3.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode durch Zyklussequenzierung mit fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden nach Sanger et al. (1977) [177]. Hierzu wurde folgender PCR-Ansatz pipettiert: 40  $\mu\text{l}$  Terminator Reaction Mix (Applied Biosystems, ABI), 2  $\mu\text{l}$  Sequenzierpuffer, 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 3.3 ng Primer und 0.2  $\mu\text{g}$  DNA-Probe. Folgender PCR-Zyklus wird 25 mal durchlaufen:

96°C (15 s), 55°C (10 s), 60°C (4 min) Anschließend werden die Reaktionsprodukte mit Ethanol gefällt und das Pellet nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol an der Luft getrocknet. Die Gelelektrophorese und die Erstellung des Sequenzierungsprofils erfolgte in der zentralen Einrichtung für Biotechnologie im MPI.

### 2.3.8 Glycerindauerkulturen

Die Glycerindauerkultur wurde durch das Vermischen von 800  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$  mit 1200  $\mu\text{l}$  50% Glycerin und anschließendem Schockfrieren bei  $-80^\circ\text{C}$  hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Zellanzucht und Proteinsynthese im Expressionssystem *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt in LB-Medium in Reagenzgläsern oder Erlenmeyer-Kolben der Größe 5 bis 5 000 ml bei 20 bis  $37^\circ\text{C}$  und 150 bis 200 rpm. Für die Markierung mit den Isotopen  $^{15}\text{N}$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Andover, USA) oder  $^{13}\text{C}$  wurde ein spezielles Minimalmedien verwendet.

Die Kultivierung erfolgte in Gegenwart der Selektions-Antibiotika Ampicillin 100 mg/ml oder Kanamycin 35 mg/ml. Bei einer  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$  bis 0.8 wurden 0.2 bis 0.5 mM IPTG (Isopropyl-1-Thio-D-Galactopyranosid) hinzugegeben und die Expression der rekombinanten Proteine induziert. Zur Expression von myristoyliertem Nef wurden 20 Minuten vor der Induktion pro Liter Kultur 10 ml eine Lösung aus 5 mM Myristinsäure und 0.6 mM BSA pH 9.0 zugegeben.

### 2.4.2 Zellaufschluss

Zur Isolierung des rekombinanten Proteins wurden die Zellen durch einen Mikrofluidizer mechanisch aufgeschlossen. Hierfür erfolgte zunächst die Resuspendierung der Zellen im Lysepuffer (je nach Reinigungsprotokoll). Anschließend wurden die Zellen unter Hochdruck (1000 bar) im Mikrofluidizer behandelt. Durch Zentrifugieren (30 000 g, 45 min) wurden die Membranfraktion von cytosolischer Fraktion getrennt.

### 2.4.3 Isolierung des rekombinanten Proteins

**Nef:** Das Nef Protein wurde im Vektor pProEx-HTa (Invitrogen) oder pET-23d (Novagen) wahlweise mit einem N-terminalen oder C-terminalen Hexahistidin-tag (His-tag) exprimiert. Die Isolierung erfolgte durch  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitäts-Chromatographie an einer Äkta<sup>TM</sup>Prime (Amersham Biosciences). Nach dem Aufschließen der Zellen in Lysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 0.5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) wurde die Membranfraktion von der Cytosolfraction durch Zentrifugation getrennt (30 000 g, 45 min).

Anschließend wurde eine pre-äquilibrierte 10 ml  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitäts-Säule (Qiagen) mit dem Überstand beladen und mit 10 Säulenvolumen Lysepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 30 bis 250 mM Imidazol. Das Protein wurde auf seine Reinheit hin im SDS-Gel überprüft und gegebenenfalls durch Aus-

schlußchromatographie über eine S75 Hi Load<sup>TM</sup> Superdex<sup>TM</sup> S75 16/60 prep grade (Amersham Biosciences) Säule weiter gereinigt. Zur Vorbereitung der Versuche wurde die Probe konzentriert und der jeweilige Puffer oder der Lagerungspuffer (5 mM Tris/HCl pH 8.0) per Dialyse (15kDa Dialysemembran, Roth) eingestellt.

**Inhibitor:** Die Inhibitoren wurden im pGEX-4T1 Tev (Amersham Biosciences) oder pGEX-2T Tev (Amersham Biosciences) exprimiert. Die Isolierung erfolgte über GST-Affinitäts-Chromatographie an einer Äkta<sup>TM</sup>Prime (Amersham Biosciences). Nach dem Aufschließen der Zellen in Lysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 2 mM GSH, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTE) wurde die Membranfraktion von der Cytosolfraktion durch Zentrifugation getrennt (30 000 g, 45 min).

Anschließend wurde eine pre-äquilibrierte 5 ml GSH 4 Fast Flow Affinitäts-Säule (Amersham Biosciences) mit dem Überstand beladen und mit 10 Säulenvolumen Lysepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 2 bis 10 mM GSH. Das Protein wurde auf seine Reinheit hin überprüft und gegebenenfalls durch Ausschlußchromatographie über eine S75 Hi Load<sup>TM</sup> Superdex<sup>TM</sup> S75 16/60 prep grade (Amersham Biosciences) Säule weiter gereinigt. Zur Vorbereitung der Versuche wurde die Probe konzentriert und der jeweilige Puffer per Dialyse (3.5 oder 15kDa Dialysemembran, Roth) eingestellt.

Für die Fluoreszenzexperimente wurde der Inhibitor CD4-SQS-A1 im Vektor pProEx-HTa (Invitrogen) mit einem N-terminalen His-tag exprimiert und über die oben beschriebene Ni<sup>2+</sup>-Affinitäts-Chromatographie isoliert. Der Lysepuffer bestand aus 20 mM Tris/HCl pH 8.5, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0.05% Tween. Zur Vorbereitung der Versuche wurde die Probe nur bis ca. 0.06 mM konzentriert und der jeweilige Puffer per Dialyse (3.5 bis 7 kDa Dialysemembran, Roth) eingestellt.

Die Aktivität von Proteasen wurde initial im Aufschluß-Schritt per Mikrofluidizer durch die Zugabe von 1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride und eine konstante Arbeitstemperatur von 4°C inhibiert.

Vor den Experimenten 3.6.3 und 3.5.5 wurde der GST-tag oder His-tag von Inhibitor und Nef jeweils enzymatisch abgetrennt. Die enzymatische Reaktion erfolgte durch die Tev-Protease für eine Dauer von 12 h bei 4°C in 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA und einem molaren Verhältnis Tev-Protease/Protein von 1:200.

**$\beta$ -Adaptin:** Das Fragment des  $\beta$ 2-Adaptins wurde im Vektor pProEx-HTa (Invitrogen) exprimiert und zunächst wie oben beschrieben per Ni<sup>2+</sup>-Affinitäts-Chromatographie und Ausschlußchromatographie isoliert. Zusätzlich wurde der Reinheitsgrad durch eine Ionenaustauschchromatographie erhöht. Im Laufpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM DTE, 1 mM EDTA, 0.1% NP40) wurde das Protein auf eine 30 ml Q-Sepharose Anionenaustauscher-Säule (Amersham Biosciences) gegeben und durch einen Salzgradienten von 0 bis 1 M NaCl eluiert.

#### 2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Reinheitsgrad der rekombinanten Proteine wurde in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft [118]. Hierzu wurden 15% und 18%ige SDS-Gele hergestellt, die aus einem Sammelgel (675  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 250  $\mu\text{l}$  30% Acrylamid/Bisacrylamid, 312.5  $\mu\text{l}$  Tris/HCl pH 6.8, 12.5  $\mu\text{l}$  10% SDS, 0.6  $\mu\text{l}$  TEMED und 6.3  $\mu\text{l}$  APS) und einem Trenngel (z.B. 15% 1.2 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid, 1.25 ml Tris/HCl pH 8.8, 50  $\mu\text{l}$  10% SDS, 2.5  $\mu\text{l}$  TEMED und 25  $\mu\text{l}$  APS) bestehen.

Zur Analyse wurden ca. 5 bis 10  $\mu\text{g}$  Protein im SDS-Probenpuffer (0.06 M Tris/HCl pH 8.5, 2% SDS 25% Glycerin, 20%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.051% Bromphenolblau) 5 min lang bei 95°C erhitzt. Die denaturierte Probe wurde anschließend im Gel bei 200 V für 40 min im Laufpuffer (0.5 M Tris, 200 mM Glycerin und 0.1% SDS) elektrophoretisch aufgetrennt. Der verwendete Molekulargewichtsmarker der Firma Amersham Biosciences deckt einen Bereich von 14 bis 100 kDa ab. Gefärbt wurde mit einer Coomassie Lösung (0.1% Coomassie R 250, 40% Ethanol, 10% Essigsäure) und Entfärbelösung (10% Ethanol, 5% Essigsäure).

#### 2.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford und $\text{OD}_{280\text{nm}}$ )

Die Proteinkonzentrationen wurden im Bradford-Assay oder per optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt [31].

**Bradford-Assay:** 1  $\mu\text{l}$  Proteinprobe werden in 199  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  pipetiert und mit 800  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz (BioRad) vermischt. Nach 5 bis 10 min kann der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 595 nm beobachtet werden. Aus der gemessenen Absorption wird die Proteinkonzentration berechnet. Hierfür wird eine BSA-Standard-Eichgerade aufgenommen und die gemessene Absorption gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Die Ausgleichsgerade ergibt einen linearen Zusammenhang, der zur Berechnung der unbekannt Probe dient.

**$\text{OD}_{280\text{nm}}$ :** 5  $\mu\text{l}$  Proteinprobe werden mit 595  $\mu\text{l}$  6 M Guanidin Hydrochlorid, 20 mM  $\text{NaP}_i$  pH 6.5 gemischt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Mittels des Extinktionskoeffizienten erfolgt dann die Berechnung der Proteinkonzentration. Der Extinktionskoeffizient wurde mit Hilfe des Servers ExPASy ProtParam tool (<http://us.expasy.org/>) berechnet

$$C = \frac{\text{Absorption} \cdot 100}{\epsilon} \cdot MW \quad (2.1)$$

- C = Konzentration ( $\text{g l}^{-1}$ )
- $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient ( $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
- MW = Molekulargewicht ( $\text{g mol}^{-1}$ )

### 2.4.6 Western Blot

Durch den Western Blot wurden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennte Proteine spezifisch angefärbt. Der Nachweis erfolgte über Protein-spezifische monoklonale Antikörper. Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel und PVDF-Transfermembran (Amersham Biosciences) für 15 min in Transferpuffer (3.03 g/l Tris, 11.2 g/l Glyzin, 10% MeOH) äquilibriert. Der Transfer erfolgte elektrophoretisch für 30 min bei 144 V Semi-Dry Trans-Blot Apparat (Biometra) zwischen äquilibrierten Whatman-Filtern.

Nach dem Transfer wurde die Membran dreimal für 20 min in PBST (9 g/l NaCl, 0.272 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.78  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.05% Tween) gewaschen und übernacht bei 4°C mit 5% Magermilchpulver in PBST geblockt, das heißt Nitrocellulosefläche mit unspezifischem Protein abgesättigt. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschritte und die Inkubation für eine Dauer von 1 h mit dem ersten Antikörper. Für den hier durchgeführten Western Blot wurden 10 ml polyklonaler Kaninchen- $\alpha$ -His-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1:2000 in 5% Magermilchpulver in PBST verdünnt oder 10 ml monoklonaler Maus- $\alpha$ -Nef-Antikörper (Dr. Mark Harris, Universität Leeds) 1:2500 in 5% Magermilchpulver in PBST verdünnt verwendet. Durch drei Waschschritte in 5% Magermilchpulver in PBST wurde überschüssiger erster Antikörper von dem Blot entfernt und anschließend mit dem zweiten Antikörper für 1 h inkubiert. Der zweite Antikörper ist ein Peroxidase-markierter  $\alpha$ -Maus-Antikörper (Amersham Biosciences) oder Peroxidase-markierter  $\alpha$ -Kaninchen-Antikörper (Amersham Biosciences), der in einer Verdünnung 1:4000 in 10 ml 5% Magermilchpulver in PBST eingesetzt wird. Nach dem Waschschritt erfolgt die Detektion der Protein-Banden mit dem ECL-Western-Blot-Detection-Kit (Amersham Biosciences). Die Peroxidase induzierte Chemilumineszenz kann durch einen aufgelegten Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL, Amersham Biosciences) visualisiert werden.

### 2.4.7 Die Markierung mit 1,5-IAEDans

Für die Gleichgewichts-Fluoreszenztitration wurde Protein an einer spezifischen Aminosäure, Cystein, mit dem Fluorophor 1,5-IAEDans (5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphtalen-1-sulfonsäure (Molecular Probes) markiert. Dieses Fluorophor ist ein Umgebungs-sensitives Fluorophor und hat ein Exzitationsmaximum bei 336 nm und eine Emissionsmaximum bei 490 nm [101]. 50  $\mu\text{M}$  Protein wurden zunächst mit einem zehnfachen Überschuß an TCEP oder DTE 30 min lang vermischt und dadurch die Thiolgruppe des Cysteins reduziert. Anschließend wurde das Antioxidanz per Ausschlußchromatographie entfernt und die Proteinlösung übernacht bei 4°C mit einem zehnfachen Überschuß an 1,5-IAEDans in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl inkubiert. Überschüssiges 1,5-IAEDans wurden durch Ausschlußchromatographie entfernt und die Vollständigkeit der Markierung durch MALDI oder ESI überprüft. Die Markierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen (Argon-Schutzgas).

## 2.5 Biophysikalische Methoden

### 2.5.1 Isothermale Titrationskalorimetrie

Durch die isothermale Titrationskalorimetrie ist es möglich, das thermodynamische Profil einer Bindung zwischen Protein und Ligand zu erfassen [203]. Treten ein Protein und Ligand in Wechselwirkungen, so geht dies in der Regel mit einem meßbarem energetischen Prozeß einher. Die Meßgröße ist dabei die Wärmeänderung, die bei der Bindung zwischen Ligand und Protein entsteht. Gemessen wird diese Wärmeänderung in einer Meßzelle relativ zu einer Referenzzelle, die nur mit Puffer gefüllt ist. Das System aus Meßzelle und Referenzzelle ist von einem isolierenden Mantel umgeben und wird thermisch stabil gehalten (isotherm).

Während der Messung wird die Meßzelle mit einem Heizstrom über ein Feedbacksystem konstant auf einer Temperatur gehalten. Wird bei der Bindung zwischen Protein und Ligand Wärme frei, so manifestiert sich dies in einer niedrigeren Heizleistung, die nötig ist, um die Zelle konstant auf der vorgegebenen Temperatur zu halten. Relativ zur Referenzzelle wird so die Wärmeänderung indirekt detektiert.

In einem kalorimetrischen Experiment wird das Protein mit dem Liganden über eine Spritze schrittweise titriert. Die Wärmeänderungen, die bei einer Injektion des Liganden in die Meßzelle entstehen werden detektiert und das Integral der Wärmetönung gegen das molare Verhältnis Ligand (Injektant)/Protein (Molare Ratio) aufgetragen. Eine einfache Titration folgt einem sigmoidiale Kurvenverlauf, aus dem wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben die charakteristischen Parameter der Bindung  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ , Stöchiometrie und  $K_d$  bestimmt werden können.

Die freien Enthalpie  $\Delta G$  wird durch die Gibbs-Funktion beschrieben.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.2)$$

Die Beiträge der Wärmeänderung  $\Delta H$  und der Entropie  $\Delta S$  zur freien Enthalpie  $\Delta G$  können dabei sehr unterschiedlich sein. Die Wärmeänderung  $\Delta H$  setzt sich vor allem aus den nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Protein, Ligand und Lösungsmittel zusammen. Neben den bekannten Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, hydrophoben Wechselwirkungen, ionischen Wechselwirkungen, Van-der-Waals Kräfte) zwischen Ligand und Protein spielt auch das Aufbrechen der Solvathülle eine entscheidene Rolle [70, 159].

Aussagen über die Zusammensetzung von  $\Delta S$  hingegen sind eher schwierig. Zum einen erhöht das Auflösen der Hydrathülle in der Bindungsstelle die Entropie. Auf der anderen Seite werden durch die Komplexbildung dem System freie Partikel entzogen und deren Freiheitsgrade erheblich eingeschränkt. Frei bewegliche Seitenketten oder ganze Domänen werden durch eine Bindung beeinflusst und können sich durch eine negative Entropieänderung äußern [159, 106]. Allgemein spricht man von einer Konformationsentropie und Solvatisierungsentropie.

Die ITC-Experimente wurden hier mit einem VP-ITC der Firma Microcal durch-

geführt. Das Volumen der Meßzelle betrug 1.419 ml und das der Spritze 250  $\mu\text{l}$ . Die Titration erfolgte durch ca. 40 Injektionen von je 8  $\mu\text{l}$  im Abstand von 3 min bei einer konstanten Temperatur von 25°C oder 15°C. Vor der Messung wurden Proben und Puffer sterilfiltriert und vollständig entgast. Vor dem Experiment wurden beide Proben per Dialyse oder Gelfiltration in den gleichen Puffer überführt. Für die Interaktionen zwischen Nef und Inhibitor wurde die Zelle mit Nef und die Spritze mit Inhibitor befüllt. Durch Kontrollmessungen wurden Verdünnungseffekte berücksichtigt und korrigiert. Die Auswertung erfolgte durch die VP-ITC Software Origin 7.0.

### 2.5.2 NMR Spektroskopie

Die Magnetresonanz Spektroskopie oder auch NMR Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonanz) ist eine Methode, die strukturelle Informationen über ein Protein liefert. Diese umfassen die Struktur und Proteinfaltung, wie auch dynamische Prozesse, Konformationsänderungen und Wechselwirkungen mit anderen Molekülen.

Grundlage der Methode sind magnetisch aktive Atomkerne von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , und  $^{31}\text{P}$ . Die magnetischen Eigenschaften entstehen durch einen Kernspin oder Eigendrehimpuls  $\vec{J}$ , der einen magnetischen Dipol oder magnetisches Moment  $\vec{\mu}$  erzeugt. Dieser Spin wird zum vereinfachten Verständnis oft als Rotation eines Atomkerns um seine Achse gesehen. Die Frequenz dieser Bewegung wird als Lamor-Frequenz oder Resonanzfrequenz beschrieben.

Diese Frequenz ist von Kern zu Kern verschieden und ist von dem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  und der Stärke des äußeren magnetischen Feldes abhängig. Das gyromagnetische Verhältnis ist für jeden Kern charakteristisch und der Proportionalitätsfaktor des Spin/Drehmoment Verhältnisses.

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{J} = \gamma \cdot \hbar \sqrt{I(I+1)} \quad (2.3)$$

$\vec{\mu}$  = Drehmoment

$\vec{J}$  = Drehimpuls

$\gamma$  = gyromagnetischen Verhältnis

$\hbar$  = Planck-sches Wirkungsquantum

I = Kernspin Quantenzahl

Wird ein äußeres Magnetfeld angelegt, so koppelt das magnetische Moment des Kerns an dieses und richtet sich mit seiner Komponente in zwei energetischen Zuständen parallel (energetisch niedrig) oder antiparallel (energetisch hoch) dazu aus. Durch Einstrahlung eines kurzen Radiowellenpulses können Übergänge (Ausrichtung in xy-Richtung, Quermagnetisierung) zwischen diesen beiden energetischen Zuständen erzeugt werden, deren Relaxation in den Grundzustand gemessen wird. Ermittelt werden hier die Unterschiede in den Resonanzfrequenzen.

Die Resonanzfrequenzen hängen nicht nur von den Eigenschaften des Kerns ab, sondern auch von seiner chemischen Umgebung. Die räumliche Verteilung der Elektronen und die Art der chemischen Bindungen in der unmittelbaren Nähe zum Kern ändern die Resonanzfrequenz [164]. Diese Änderung wird als chemische Verschiebung relativ zu einem Referenzsignal (Tetramethylsilan) in ppm (parts per million)

angegeben.

Mit Hilfe der heteronuklearen NMR Spektroskopie lassen sich die Resonanzfrequenzen eines Proteins den einzelnen Aminosäuren zuweisen (Assignment). Dies geschieht in einer Reihe von verschiedenen NMR Experimenten und setzt die vollständige Isotopen-Markierung des Proteins mit  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  voraus.

Hier wurde nun die Interaktion zwischen zwei Proteinen im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum (Heteronuclear Single Quantum Coherence) untersucht. Im HSQC-Experiment wird nicht direkt der  $^{15}\text{N}$  Kern angeregt sondern das  $^1\text{H}$  Proton, welches ein wesentlich höheres gyromagnetisches Verhältnis hat und seine Magnetisierung auf den  $^{15}\text{N}$  Kern übertragen kann. In diesem 2D Spektrum wird also die Protonenfrequenz und die Stickstofffrequenz über eine kovalente Bindung zu einem zweidimensionalen Spektrum verknüpft. Die Signale eines  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrums repräsentieren überwiegend die Amidprotonen des Proteinrückgrats und die der Seitenketten von Asparagin, Glutamin, Histidin und Tryptophan.

Hier wurden  $^{15}\text{N}$ -markierte Proteine bei einer Konzentration von 0.4 mM und einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  im NMR Spektrometer (Varian Inc., USA) mit einer Feldstärke von 600 MHz oder in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Grzesiek an der Universität Basel an einem 800 MHz Spektrometer (Bruker) durchgeführt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software des Herstellers Bruker.

### 2.5.3 Gleichgewichts-Fluoreszenztitration

Die Gleichgewichts-Fluoreszenztitration ist eine Methode zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_d$ . Gemessen wird die Fluoreszenzänderung eines Fluorophor-markierten Proteins bei Titration mit einem Liganden. Voraussetzung ist, daß ein Protein selektiv an einer Position mit einem Fluorophor markiert werden kann und die Bindung des Liganden eine Änderung des Fluoreszenzsignals hervorruft. Die Änderung des Fluoreszenzsignals erfolgt durch eine Änderung der chemischen Umgebung des Fluorophors; z.B. durch Konformationsänderung des Proteins. Gemessen wurde die Fluoreszenz in einer 1 ml Quartzküvette unter konstanter Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  und konstanter Durchmischung in einem FluoroMax-3 Spectrofluorometer (SPEX Instruments). Die Titration erfolgte durch schrittweises Zugabe einer höher konzentrierten Ligandenlösung. Die Fluoreszenzänderung wurde um die Volumenzunahme korrigiert.

$$F_{\text{korrigiert}} = \frac{F_{\text{gemessen}} \cdot V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Anfang}}} \quad (2.4)$$

Die korrigierte Fluoreszenzänderung wurde gegen die molare Ligandenkonzentration aufgetragen und wie in Kapitel 5.1.1 mit Hilfe der Software Origin 7.0 ausgewertet.

### 2.5.4 Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (SPR) ist eine Methode zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_d$ . Primär wird jedoch zunächst die Assoziationsrate  $k_{\text{on}}$  und Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  bestimmt. Gemessen wird die Veränderung des Brechungsindex eines Sensorchips über ein optisches System. Auf die-

sem Gold-beschichteten Sensorchip wird ein GST-Fusionsprotein über einen  $\alpha$ -GST-Antikörper immobilisiert. Über ein kontinuierliches Flußsystem wird der Ligand hinzugegeben. Bindet der Ligand das immobilisierte Protein, so führt dies zu einer Massenzunahme der Schicht auf dem Sensorchip und damit zu einer Veränderung des Brechungsindex dieser Schicht.

Von unten wird der Chip mit polarisiertem Licht bestrahlt, das im Winkel der Totalreflektion auf den Chip einfällt. Ein Teil des Lichts dringt jedoch als sogenannte evaneszente Welle in die Goldschicht ein. Es kommt zu einem Phänomen, was man Oberflächenplasmonresonanz nennt. Bei einem bestimmten Einfallswinkel in Abhängigkeit von der optischen Dichte der Matrix (Goldschicht + Proteinschicht des Chips) induziert die evaneszente Welle Elektronenschwingungen des Elektronengases (Plasmon) der Goldschicht in Richtung der Grenzfläche.

Das im Winkel der Totalreflektion ausfallende Licht wird über einen Detektor aufgenommen, der dieses Phänomen in Form eines Intensitätsminimum bzw. SPR-Winkel (Surface Plasmon Resonance) des Lichts detektieren kann. Dies bedeutet, daß die Bindung zwischen Ligand und Protein die optische Dichte der Matrix verändert und damit den SPR-Winkel beeinflusst. Wiedergegeben wird dieser Winkel als Resonance Units (RU) [180]. Gemessen wurden jeweils 4 bis 5 Verdünnungen eines Liganden auf einem Sensorchip, der mit 0.4 mg/ml Protein beladen wurde. In einem separaten Experiment wurde mit einer 1 M Guanidiniumhydrochlorid Lösung die Dissoziation bestimmt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der BIAevaluation Software Version 2.1 (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) unter den in Kapitel 5.1.3 beschriebenen Gesichtspunkten.

### 2.5.5 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration (Größenausschlußchromatographie) ist eine Methode zur Bestimmung der Größe eines Proteins. Im Prinzip erfolgt eine Trennung von Proteinen nach den unterschiedlichen Stokes'schen Radien und nicht nach der Masse. Die Trennung wird dabei über eine Matrix (Superdex S75 (10/30), Amersham Biosciences) mit bestimmter Porengröße in einer HPLC (Waters, Milford) erreicht und das Elutionsvolumen über eine Detektion der Optischen Dichte bei 280 nm bestimmt. Bei einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min durchlaufen kleine Proteine einen längeren Weg durch die Poren, als große Proteine, die an den Poren vorbei durch das Gelbett fließen. Wird ein Proteinstandard mitanalysiert, so läßt sich das Elutionsvolumen des zu analysierenden Proteins mit den Werten des Standards korrelieren und die Proteinmasse bestimmen. Siehe Kapitel 5.1.4

### 2.5.6 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation ist eine Methode mit der Aussagen über den Oligomerisierungszustand eines Proteins getroffen werden können. Hierfür wird über Zentrifugation ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion eingestellt und mit Kenntnis der theoretischen Molekulargewichts der Oligomerisierungszustand eines Proteins berechnet. Die analytische Ultrazentrifugation bzw. Sedimentation-Diffusion-Gleichgewichtszentrifugation erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Urbanke an der Medizinischen Hochschule von Hannover.

Eine Probe mit einer Konzentration von 9  $\mu\text{M}$  wurde bei 5000 rpm in einem An-Ti Rotor in einer XLA analytischen Ultrazentrifuge (Coulter Beckman), die mit einer Scanner Optik ausgerüstet ist, bei 20°C untersucht. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SEDFIT [123].

### 2.5.7 Massenspektrometrie

Durch die Methoden der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) oder Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) kann die Masse eines Proteins ermittelt werden. Die beiden Verfahren unterscheiden sich durch ihr Ionisationsprinzip. Im Vergleich zum MALDI ist das Ionisationsverfahren des ESIs weitaus schonender.

**MALDI-TOF-MS:** Hier erfolgt die Ionisation der Probe über eine Matrix, in die das Protein der Probe eingebettet wird. Matrix und Probe werden auf einer Metallplatte vermischt und co-kristallisieren nach Verdunsten des Lösungsmittels. Anschließend wird das Matrix-Protein-Gemisch einem Laserimpuls (1- 10 ns, 337nm, N<sub>2</sub>-Laser oder 255nm Nd:YAG-Laser) ausgesetzt, der von der Matrix absorbiert wird und zur Desorbition und Ionisation des Gemisches führt. Die auftretenden Proteinmolekül-Ionen werden anschließend in einem elektronischen Feld im Hochvakuum beschleunigt und durch Flugzeit-Analyse (TOF= Time of Flight) das m/z Verhältnis kalkuliert. Als Matrix wurde Sinapisinische Säure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) in Acetonitril/Wasser und 0.1% Trifluoressigsäure (TFA) verwendet. Die Proteinproben wurden in Verdünnungen 1:1 mit der Matrix vermischt. Die Auswertung erfolgte durch die Voyager Software.

**ESI-MS:** Diese Methode ist im Gegensatz zum MALDI-MS sensitiver, jedoch auch gegenüber Salzen in der Probe empfindlicher. Daher wurde die Probe vor der Messung durch Aceton gefällt und mit Ethanol gewaschen oder per Gelfiltration entsalzt. Die Ionisation erfolgt hier über das Einsprühen der Probe in eine Kammer mit hohem elektrischem Potential. Die entstehende Dispersion der Flüssigkeit führt zu vielen kleinen geladenen Tröpfchen, in denen nach Verdunsten des Lösungsmittels protonierte Proteine in der Gasphase entstehen. Die Analyse erfolgt mit Hilfe der Ionenfalle.

## 2.6 Zellbiologische Methoden

### 2.6.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine Methode, um die relative Affinität zwischen zwei Proteinen zu bestimmen. Im Gegensatz zu den *in vitro* Methoden wird die Interaktion nicht direkt sondern über ein *in vivo* Reportersystem gemessen. Dieses Reportersystem ist die Transkriptionskontrolle des Gens der  $\beta$ -Galaktosidase. Die Transkription wird durch den Transkriptionsfaktor GAL4 gesteuert, welcher aus den beiden Domänen DNA-Bindungsdomäne und Transkriptions-Aktivator-Domäne besteht. Nur als Fusionsprotein mit beiden Domänen wird die Transkription aktiviert

und das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase gebildet. Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System werden die Gene der beiden Domänen getrennt und in Fusion mit den beiden Genen der zu analysierenden Proteine exprimiert. Binden die beiden Proteine in der Zelle, so erfolgt die Transkription des Enzyms. Die Affinität der Bindung und Folge für die Transkriptionsrate kann durch die Enzymaktivität ausgedrückt werden.

Nef wurde in den Vektor pAS2-1 (Clontech) und das Fragment des  $\beta$ 1-Adaptins in den Vektor pACT2 (Clontech) kloniert. Es erfolgte die selektive Expression im Hefestamm AH109 im Singledropout Medium -Leuzin -Trp (6.7 g/l Hefeextrakt ohne Aminosäuren, 20 g/l Agar, 100 ml zehnfach Aminosäure-Stammlösung (200 mg/ml L-Adenin, L-Arginin, L-Histidin, Methionin, Uracil, 300 mg/ml Isoleuzin, L-Lysin und L-Tyrosin, 2000 mg/ml L-Threonin, 1500 mg/ml L-Valin, 500 mg/ml L-Phenylalanin)) bei 30°C und 150 rpm. Sobald die transformierten Zellen eine optische Dichte  $OD_{600nm} = 0.5 - 0.8$  erreichten, wurden aus 3 ml Zellkultur die cytosolische Enzymfraktion durch Aufbrechen der Zellmembran per Einfrieren in flüssigen Stickstoff und die  $\beta$ -Galaktoseaktivität im Flüssigkultur-Assay durch den Farbstoff Chlorophenol Red- $\beta$ -D-Galactopyranosid (CPRG) bestimmt. Die Durchführung der Hefe-Transformation, ihre Kultivierung und der Liquid-Culture-Assay erfolgten nach dem Protokoll von Clontech (Yeast Protocols Handbook 2001). Der Farbumschlag des Farbstoffs wurde bei einer optischen Dichte der Wellenlänge 578 nm verfolgt und die  $\beta$ -Galaktosidaseeinheiten berechnet:

$$\beta GalU = \frac{1000 \cdot OD_{578nm}}{t \cdot 0.1 \cdot 5 \cdot OD_{600nm}} \quad (2.5)$$

t = Zeit nach der Zugabe des Farbstoffes CPRG (min)

$OD_{600nm}$  = Maß für die Zelldichte

$OD_{578nm}$  = Maß für die durch  $\beta$ -Galaktosidase umgesetzte Menge an CPRG

### 2.6.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Das Einschleusen von DNA in eukaryotische Zellen erfolgte durch Liposomen-vermittelte Transfektion mit Lipofectamine 2000. In der Regel wurden in 6 Well-Platten  $2.5 \cdot 10^5$  und in 24-Well-Platten  $1 \cdot 10^5$  Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach Transfektion bei 37°C in RPMI oder DMEM 10% FCS, 50 U/ml Penicillin, 50  $\mu$ g/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin 5% CO<sub>2</sub> 24 h lang inkubiert bevor sie weiter verwendet wurden.

### 2.6.3 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden  $1 \cdot 10^5$  HeLa Zellen auf Glasplättchen (Coverslips) in 24 Well-Platten ausgesät und mit 1  $\mu$ g DNA in Gegenwart von 0.5  $\mu$ l Lipofectamine 2000 nach Angaben der Herstellers transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 3% Paraformaldehyd 10 min lang bei RT fixiert. Nach Waschen mit PBS (9 g/l NaCl, 0.272 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.78 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) werden die Zellen durch 0.1% Triton X-100 10 min lang bei RT permeabilisiert. Es erfolgen zwei weitere PBS Waschrundungen und die Blockierung der Zellen durch 1% BSA, PBS. Für 30 min wird der

erste in einer 1:200 Verdünnung Antikörper  $\alpha$ -HA-Antikörper (HA-probe(F-7)mouse monoclonal IgG2a, Santa Cruz Biotechnology Inc.) in 1% BSA, PBS inkubiert und anschließend nicht-gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS abgetrennt. Durch den zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper (AlexaFluor568 g anti murine IgG (H+L), Molecular Probes) in einer 1:2000 Verdünnung erfolgt schließlich die Markierung des ersten Antikörpers. Nach einem finalen Waschschrift wurden die Zellen in einem konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM) untersucht.

#### 2.6.4 Durchflußcytometrie (FACS)

Für die Durchflußcytometrie wurden  $5 \cdot 10^5$  TZM Zellen oder CHO++ Zellen in 6 Well-Platten ausgesät und mit 6  $\mu$ g DNA in Gegenwart von 12  $\mu$ l Lipofectamine 2000 nach Angaben der Hersteller transfiziert. Nach Transfektion werden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min lang mit dem Antikörper inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit FACS Puffer (3% FCS, 0.05% NaN<sub>3</sub> in PBS), werden die Zellen auf im selbigen Puffer aufgenommen und im Fluoreszenz Aktivated Cell Sorter (FACS-Calibur, Becton Dickinson) gemessen. Selektiert („Gegated“) wurden 5000 Zellen; lebend sowie auch GFP-transfiziert. Es wurden die Antikörper  $\alpha$ -CD4-APC (APC  $\alpha$ -human CD4, Becton Dickinson) in der Verdünnung 1:20,  $\alpha$ -CCR5-APC (APC  $\alpha$ -human CCR5, Becton Dickinson) in der Verdünnung 1:20 und der  $\alpha$ -MHCI (monoclonal mouse  $\alpha$ -human HLA-ABC Antigen/RPE clone W6/32, DakoCytomation) in der Verdünnung 1:50 verwendet.

#### 2.6.5 Infektiositäts-Assay (Blue Cell Assay)

Um die Infektiosität von Virionen zu testen wurde ein Blue Cell Assay durchgeführt. Der Assay basiert auf speziellen TZM-HeLa Zellen, in denen das Reporter gen  $\beta$ -Galaktosidase direkt mit einem viralen Promotor gekoppelt ist und durch virale Transkriptionsfaktoren aktiviert werden kann. Sind die Viren infektiös, so wird in den infizierten Zellen das  $\beta$ -gal-Gen transkribiert und das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase gebildet. Durch die enzymatische Reaktion mit dem Farbstoff X-Gal können infizierte Zellen identifiziert werden. Die Anzahl der infizierten Zellen gibt das Infektiospotential der Viren wieder.

Zunächst wurden 3  $\mu$ g DNA provirale DNA und 3  $\mu$ g DNA Inhibitor DNA in  $2 \cdot 10^5$  293 T-Zellen mit 12  $\mu$ l Lipofectamine 2000 co-transfiziert und Virionen generiert. Die Virionen wurden aus dem Zellkulturüberstand per Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in 20% Saccharose isoliert und der Virionen-Gehalt per p24 ELISA ermittelt.

Zur Vorbereitung des eigentlichen Blue Cell Assays wurden  $10^4$  TZM Zellen in einer Vertiefung einer 96-Well-Platte ausgesät und bei 37°C unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. 24 h später wurden diese Zellen mit einer 1 ng p24CA entsprechenden Menge des Virusstocks infiziert und drei weitere Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem 1:1 Gemisch eiskaltem Methanol/Aceton 5 min lang fixiert. Es folgte die Färbung der Zellen durch die Zugabe von 100  $\mu$ l einer X-Gal Lösung pro Ansatz. Die relative Infektiosität in Prozent wird als Quotient der Anzahl der Zellen und Nanogramm Virionen ausgedrückt.

## Kapitel 3

# Ergebnisse

### 3.1 Klonierung, Expression und Isolierung der Proteine

Im folgenden wird die Präparation der rekombinanten Proteine beschrieben, die im Laufe des experimentellen Teils von Bedeutung sind. Alle zur Protein-Expression verwendeten Plasmide wurden mit Hilfe der im Methodenteil Kapitel 2.3 beschriebenen gentechnischen Methoden hergestellt und in der MPI-internen Sequenzierungseinrichtung sequenziert. Die hier beschriebenen Proteine wurden im *E.coli* Stamm K12 BL21(DE3) exprimiert und mit massenspektrometrischen Methoden wie MALDI-TOF-MS oder ESI-MS auf ihre korrekte Masse hin überprüft. Die Protein-Konzentration wurde per UV-Methode oder Bradford-Assay bestimmt. Der Extinktionskoeffizient, Molekulargewicht, pI, Aminosäure-Zusammensetzung und Atom-Zusammensetzung wurde mit Hilfe des Servers ExPasy ProtParam tool (<http://us.expasy.org/>) berechnet.

Im folgenden befindet sich jeweils eine in *in vivo* und *in vitro* unterteilte Beschreibung der Klonierung und Expression der Proteine, eine Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mutanten und eine Veranschaulichung der Proteinqualität.

#### 3.1.1 Klonierung, Expression und Isolierung der Nef<sub>SF2</sub> Mutanten

##### Klonierung und Expression der Nef Mutanten

Das *nef*-Gen basiert auf der genomischen Grundlage des HIV-1 Isolats SF2 CG (Gen Accession Code K02007) ARV-2/SF2 [176]. Das Gen wurde mit Hilfe des Graphical Codon Usage Analyzer (<http://gcua.schoedl.de/>) auf selten in *E.coli* benutzte Codons hin untersucht. Insgesamt wurden 13 seltene Codons vom Typ AGA, AGG oder CTA identifiziert und 10 von 13 Codons anschließend gegen häufig verwendete Codons ausgetauscht. Hierdurch konnte die Expression des Nef Proteins erheblich verbessert werden. Für weitere Information siehe Breuer et al. (2006) [34].

**in vitro :** Zur *in vitro*-Applikation wurde das Codon-optimierte *nef*-Gen in den Expressionsvektor pProEx-HTa kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C und ca. 120 rpm in LB Medium. Die Bakterienkultur wurde bei einer  $OD_{600} = 0.8 - 1.2$  mit 0.5 mM IPTG induziert und über einen Zeitraum von 5 Stunden zur Proteinexpression kultiviert. Das Protein wurde anschließend, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, über  $Ni^{2+}$ -Affinitäts-Chromatographie isoliert und für das jeweilige Experiment (siehe experimenteller Abschnitt) präpariert. Aus einem Kulturvolumen von einem Liter konnte ca. 100 mg Protein isoliert werden. Der His-tag der Konstrukte pProEx-HTa Nef (45-210), pProEx-HTa Nef (59-210) und pProEx-HTa Nef (85-210) wurde für die analytische Gelfiltration (siehe Kapitel 3.6.3) und NMR-Experimente (siehe Kapitel 3.5.5) enzymatisch durch die Tev-Protease abgetrennt und das Protein von nicht verdautem Protein und His-tag isoliert. Alle anderen Konstrukte wurden mit dem N-terminalen His-tag im Experiment eingesetzt.

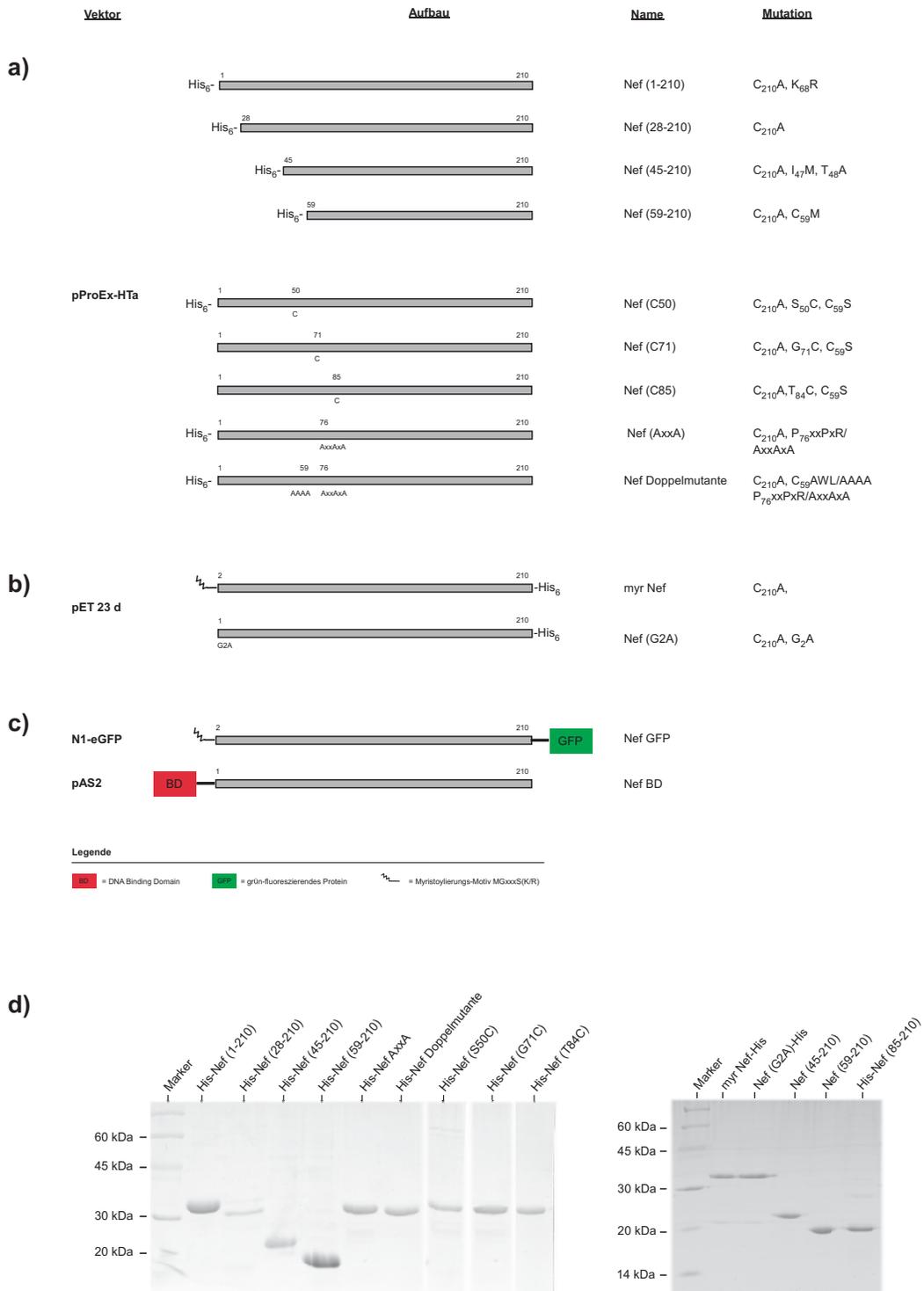
Zur Untersuchung von myristoyliertem Nef (siehe Kapitel 3.6) wurde das Nef Protein zusammen mit der humanen N-Myristoyltransferase (NMT) in *E. coli* co-exprimiert. Das *nef*-Gen wurde hierfür in den Expressionsvektor pET23d mit einem C-terminalen His-tag kloniert und zusammen mit dem pET30a hNMT Plasmid in BL21(DE3) Zellen transformiert.

Das Motiv MGxxxS(K/R) (x steht für eine beliebige Aminosäure) induziert durch die NMT eine Myristoylierung. Hierbei wird die unverzweigte Myristinsäure (C14-Fettsäure) amidisch an die Aminogruppe des N-terminalen Glycins gebunden ist. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C in LB Medium. Die Bakterienkultur wurde bei einer  $OD_{600nm} = 0.8 - 1.2$  mit 0.5 mM IPTG induziert. 20 Minuten vor der Induktion wurde pro Liter Kultur 10 ml einer Lösung, aus 5 mM Myristinsäure und 0.6 mM BSA pH 9.0 bestehend, zugegeben. Zur Proteinexpression wurden die Zellen bei ca. 120 rpm und 30°C 5 Stunden lang kultiviert.

Das Protein wurde anschließend, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, über  $Ni^{2+}$ -Affinitäts-Chromatographie isoliert und für das jeweiligen Experiment (siehe experimenteller Abschnitt) präpariert. Aus einem Liter Kultur wurden ca. 40 mg Protein isoliert. Die Myristoylierung wurde mit Hilfe von ESI-MS nachgewiesen (siehe Breuer et al. (2006) [34]). Die Co-Expression von Nef und NMT führt zu einer vollständigen Myristoylierung des gesamten Nef Proteins.

**in vivo :** Nef wurde zur Visualisierung in eukaryotischen Zellen mit einem C-terminalen grün-fluoreszierendem Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* konstruiert. Als eukaryotischer Expressionsvektor wurde der Vektor N1-eGFP verwendet.

Zur Applikation im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde das *nef*-Gen in den Hefe-Expressions-Vektor pAS2-1 kloniert. Dieser Vektor ist komplementär zum Vektor pACT2 und führt zur Expression eines Fusionproteins aus Nef und der GAL4BD (DNA Binding Domain).



**Abbildung 3.1:** a) Übersicht der *in vitro* verwendeten Nef Mutanten. b) Übersicht der myristoylierten *in vitro* verwendeten Nef Mutanten. c) Übersicht der *in vivo* verwendeten Nef Mutanten. Von links nach rechts sind die Expressionsvektoren, der Aufbau der Nef Mutante, die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung und die Mutationen aller *in vitro* und *in vivo* Konstrukte aufgeführt. d) Darstellung des Reinheitsgrades der in *E. coli* exprimierten Nef Mutanten. In einem 15% SDS-Gel wurden je 5 µg des Proteins aufgetragen. Der erreichte Reinheitsgrad des Proteins liegt bei 95%. Die im SDS-Gel und MALDI-TOF-MS bestimmten Massen entsprechen den kalkulierten Massen (siehe auch Tabelle 5.1).

### 3.1.2 Klonierung, Expression und Isolierung der Inhibitoren

#### Klonierung, Expression und Isolierung des Inhibitor Klasse 1

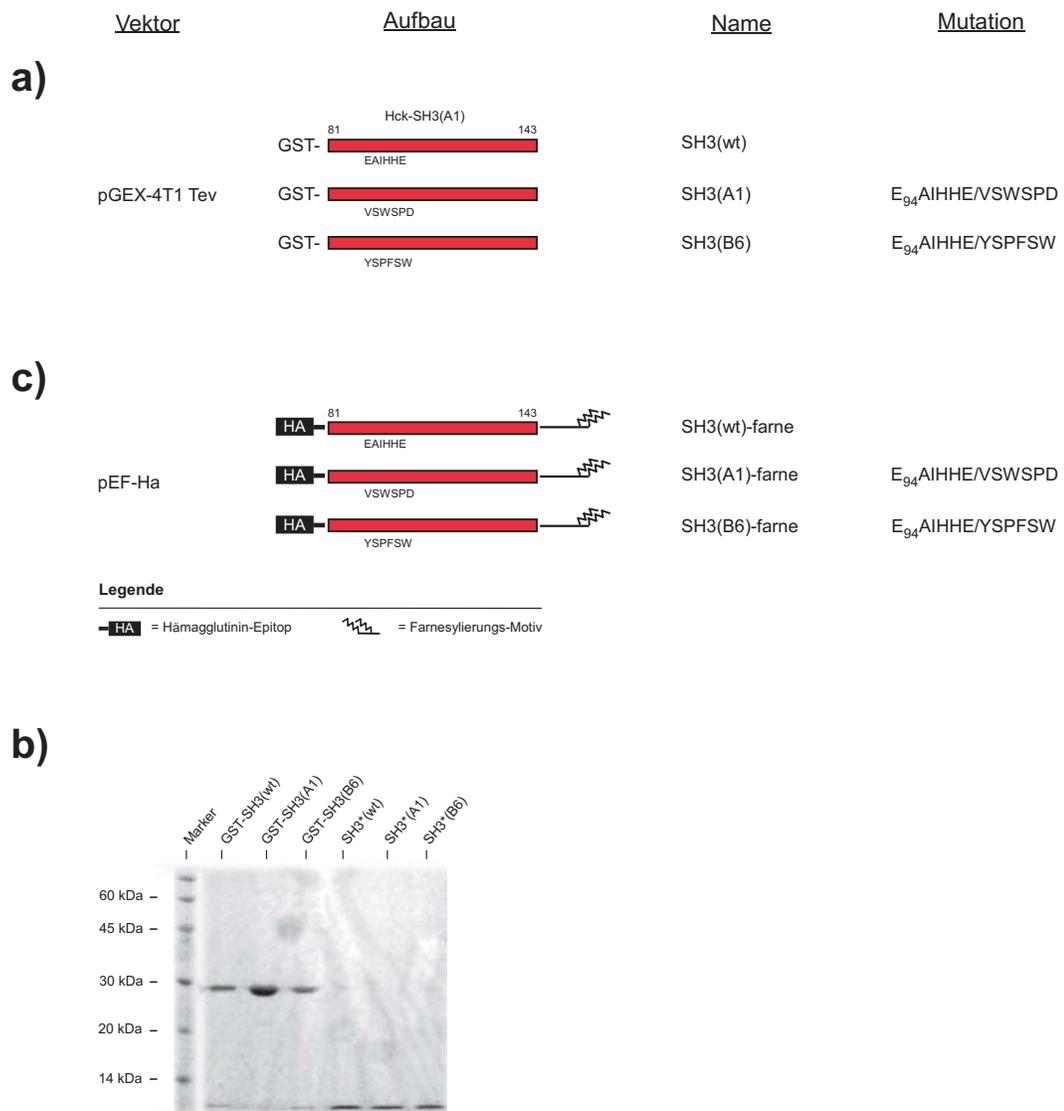
Grundlage der Klonierung der Inhibitor Klasse 1 ist die SH3 Domäne der humanen Tyrosinkinase Hck Klon lambda-a2/1a (Hemopoietic cell kinase) (Gen Accession Code M16591). Hieraus konnte das Gen für die SH3 Domäne amplifiziert und durch Mutagenese die beiden Mutanten mit den Änderungen in der RT-Schleife nach den Daten von Hiipakka et al. (1999) generiert werden [97].

*in vitro* : Als Expressionsvektor wurde der pGEX-4T1 Tev Vektor mit Tev-Site verwendet. Nach der Klonierung und Transformation in BL21(DE3) Zellen erfolgte die Kultivierung bei 30°C in LB Medium. Die Bakterienkultur wurde bei einer  $OD_{600} = 0.8 - 1.2$  mit 0.5 mM IPTG induziert und über einen Zeitraum von 5 Stunden zur Proteinexpression kultiviert. Das Protein wurde anschließend, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, über GST-Affinitäts-Chromatographie isoliert und für das jeweilige Experiment (siehe experimenteller Abschnitt) präpariert. Aus einem Liter Kultur wurden ca. 200 mg Fusionsprotein isoliert.

Der GST-tag wurde für die ITC-Messung in Kapitel 3.2.1 (siehe Abb. 3.6) enzymatisch durch die Tev-Protease abgetrennt und das Protein von nicht verdautem Protein und GST-tag isoliert. Die SH3 Mutante ohne GST-tag wird durch ein „\*“ gekennzeichnet.

*in vivo* : Die SH3 Domäne wurde zur Visualisierung in eukaryotischen Zellen mit einem N-terminalen HA-tag (HA= Hämagglutinin-Epitop) konstruiert. Mit einem fluoreszenzmarkiertem  $\alpha$ -HA-Antikörper konnte die Domäne in der Zelle lokalisiert werden. Als eukaryotischer Expressionsvektor wurde der Vektor pEF-HA verwendet.

Alle *in vivo* Konstrukte sind mit einem Motiv für einen C-terminalen Lipidanker generiert worden. Der C-Terminus (KLRKLNPPDESGPGCMSCCKVLS) enthält ein aus der GTPase Ras stammendes Motiv, die sogenannte CaaX-Box (C steht für Cystein, während a für eine aliphatische Aminosäure und X für eine beliebige Aminosäure steht), am C-Terminus wird das Protein in den eukaryotischen Zellen prenyliert. In diesem Falle wird durch die Position X ein Serin kodiert, was eine Veresterung der Thiol-Gruppe des Cysteins mit einer Farnesylrestes (C15-Fettsäure) durch die Farnesylproteintransferase induziert.



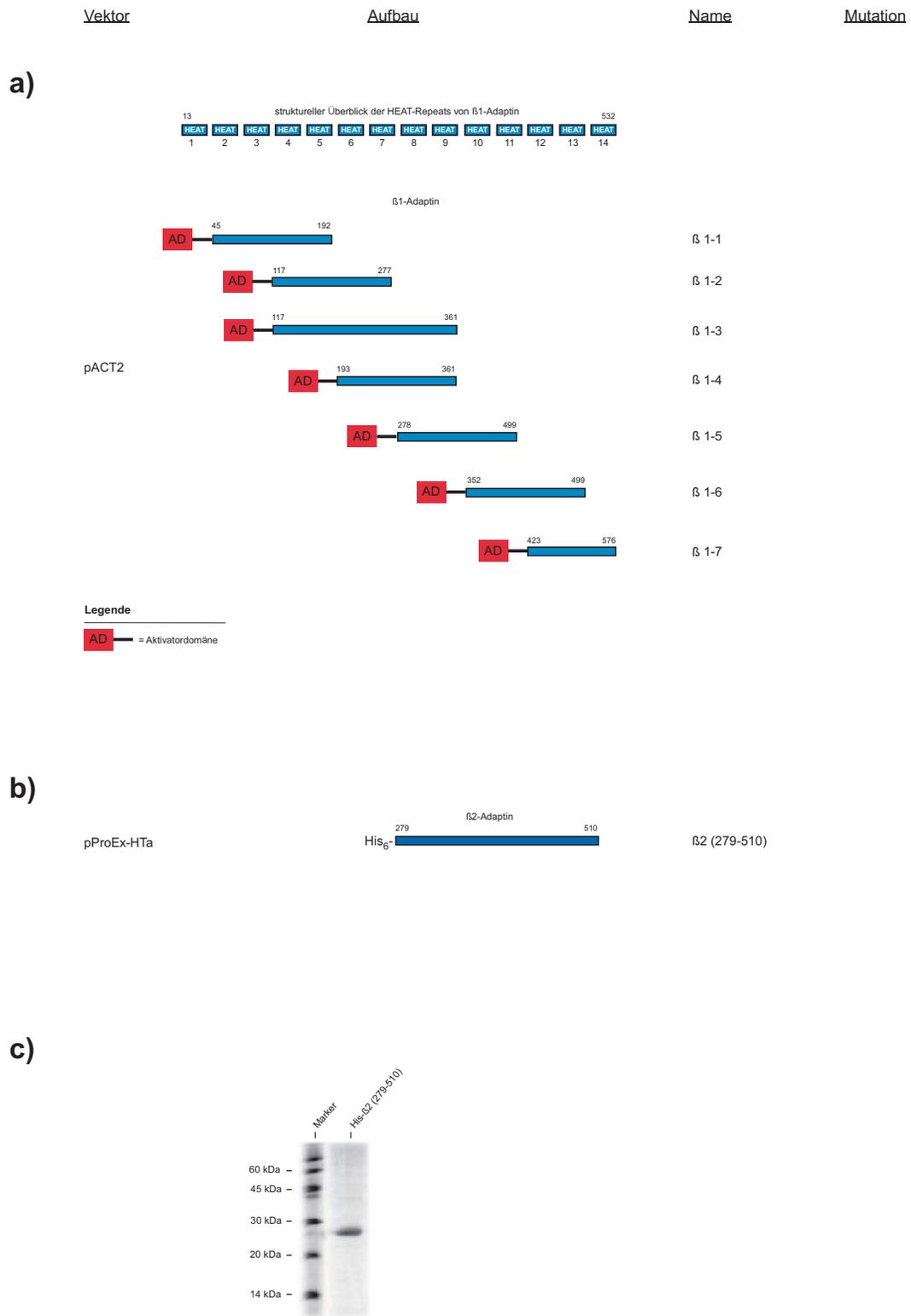
**Abbildung 3.2:** a) Übersicht der *in vitro* verwendeten SH3 Mutanten (Inhibitorklasse 1). b) Übersicht der *in vivo* verwendeten SH3 Mutanten. Von links nach rechts sind die Expressionsvektoren, der Aufbau der SH3 Mutante, die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung und die Mutationen aller *in vitro* und *in vivo* Konstrukte aufgeführt. c) **Darstellung des Reinheitsgrades der in *E. coli* exprimierten SH3 Mutanten** In einem 15% SDS-Gel wurden je 2.5  $\mu$ g des Proteins aufgetragen. Der erreichte Reinheitsgrad des Proteins liegt bei 95%. Die im SDS-Gel und MALDI-TOF-MS bestimmten Massen entsprechen den kalkulierten Massen (siehe auch Tabelle 5.1).

### Klonierung, Expression und Isolierung des $\beta$ -Adaptins aus dem Adaptor-Protein 1 & 2 Komplex

Grundlage der Klonierung des  $\beta$ -Adaptins aus den Adaptor-Protein Komplexen war das Adaptor-Protein 1 aus der norwegischen Ratte (Gen Accession Code M77245) und das humane Adaptor-Protein 2 (Gen Accession Code M34175). Hieraus konnte das Gen für die  $\beta$ 1-Adaptin und  $\beta$ 2-Adaptin amplifiziert und durch Mutagenese die Fragmente für das Hefe-Zwei-Hybrid-System und ITC-Experiment generiert werden.

*in vitro* : Zur Expression wurde das Gen des  $\beta$ 2-Adaptins in den pProEx-HTa Vektor kloniert und in BL21(DE3) Zellen transformiert. Die Kultivierung erfolgte bei 25°C in LB Medium. Die Bakterienkultur wurde bei einer  $OD_{600} = 0.8 - 1.2$  mit 0.25 mM IPTG induziert und über einen Zeitraum von 10 Stunden zur Proteinexpression kultiviert. Das Protein wurde anschließend, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, über  $Ni^{2+}$ -Affinitäts-Chromatographie, Gelfiltration und Anionenaustauscher-Chromatographie isoliert und für das jeweilige Experiment (siehe experimenteller Abschnitt) präpariert. Aus einer Kultur mit einem Volumen von einem Liter konnten 40 mg Protein isoliert werden.

*in vivo* : Zur Applikation im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde das Gen des  $\beta$ 1-Adaptins in den Hefe-Expressions-Vektor pACT2 kloniert. Dieser Vektor ist komplementär zum Vektor pAS2-1 und führt zur Expression eines Fusionproteins aus  $\beta$ 1-Adaptin und der GAL4-AD (Aktivator-domäne).



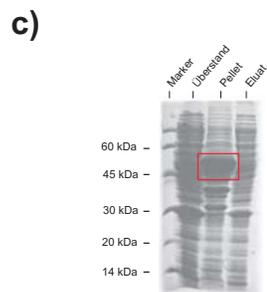
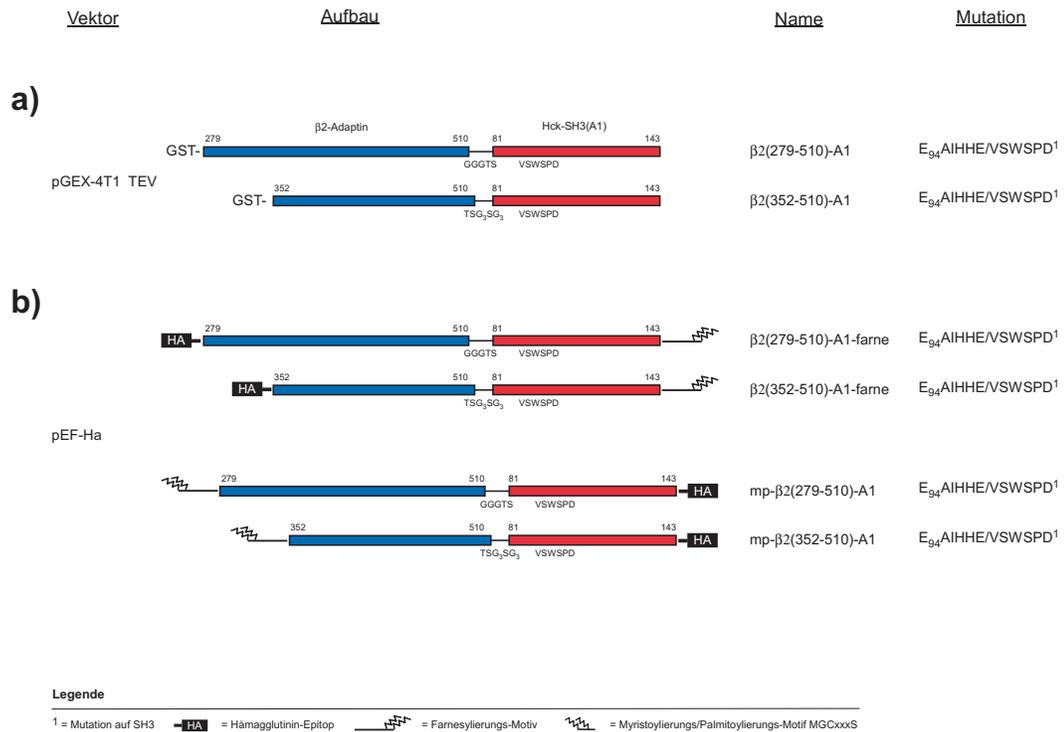
**Abbildung 3.3:** a) Übersicht der im Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendeten  $\beta$ 1-Adaptin Konstrukte. b) Aufbau der *in vitro* verwendeten  $\beta$ 2-Adaptin Mutante. Von links nach rechts sind die Expressionsvektoren, der Aufbau der  $\beta$ -Adaptin Mutanten, die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung und die Mutationen aller *in vitro* und *in vivo* Konstrukte aufgeführt. c) Darstellung des Reinheitsgrades der in *E.coli* exprimierten  $\beta$ 2-Adaptin Mutante In einem 15% SDS-Gel wurden je 5  $\mu$ g des Proteins aufgetragen. Der erreichte Reinheitsgrad des Proteins liegt bei 95%. Die im SDS-Gel und MALDI-TOF-MS bestimmten Massen entsprechen den kalkulierten Massen (siehe auch Tabelle 5.1).

## Klonierung, Expression und Isolierung der Inhibitor-Klasse 2

Die Inhibitoren der Inhibitor-Klasse 2 bestehen aus dem  $\beta$ 2-Adaptin und der SH3 Domäne RT-Schleife A1 (im folgenden nur noch durch A1 abgekürzt). Beide Proteine sind über einen kurzen flexiblen Linker, überwiegend aus Glycinen bestehend, mit einander verbunden.

*in vitro* : Zur Expression wurden beide Gene in den pGEX-4T1 Vektor kloniert und in BL21(DE3) Zellen zur Expression transformiert. Die Expression erfolgte bei 25°C in LB Medium. Die Bakterienkultur wurde bei einer  $OD_{600} = 0.8 - 1.0$  mit 0.5 mM IPTG induziert und über einen Zeitraum von 10 Stunden zur Proteinexpression kultiviert. Das Protein wurde anschließend, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, über GST-Affinitäts-Chromatographie und Gelfiltration isoliert und für das jeweilige Experiment (siehe experimenteller Abschnitt) präpariert.

*in vivo* Wie schon für die SH3 Domäne wurde hier der eukaryotische Expressionsvektor Vektor pEF-HA verwendet, der die Visualisierung per fluoreszenzmarkierten Antikörper erlaubt. Die Lokalisation an der Membran wurde durch ein C-terminales Farnesylierungsmotiv CaaX aus Ras oder ein N-terminales Myristoylierungs- und Palmitoylierungsmotiv (MGCxxxS) gewährleistet.



**Abbildung 3.4:** a) Übersicht der *in vitro* verwendeten Inhibitorklasse 2 Konstrukte. b) Übersicht der *in vivo* verwendeten Inhibitorklasse 2 Konstrukte. Von links nach rechts sind die Expressionsvektoren, der Aufbau des Inhibitors, die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung und die Mutationen aller *in vitro* und *in vivo* Konstrukte aufgeführt. c) Exemplarische Darstellung der Fraktionen aus der Isolierung des in *E.coli* exprimierten Inhibitors  $\beta 2(279-510)\text{-A1}$ . In einem 15% SDS-Gel wurden je 10  $\mu\text{l}$  der Überstand-, Pellet-, und Eluatfraktion aufgetragen. Der Inhibitor  $\beta 2(279-510)\text{-A1}$  befindet sich in der unlöslichen Pelletfraktion.

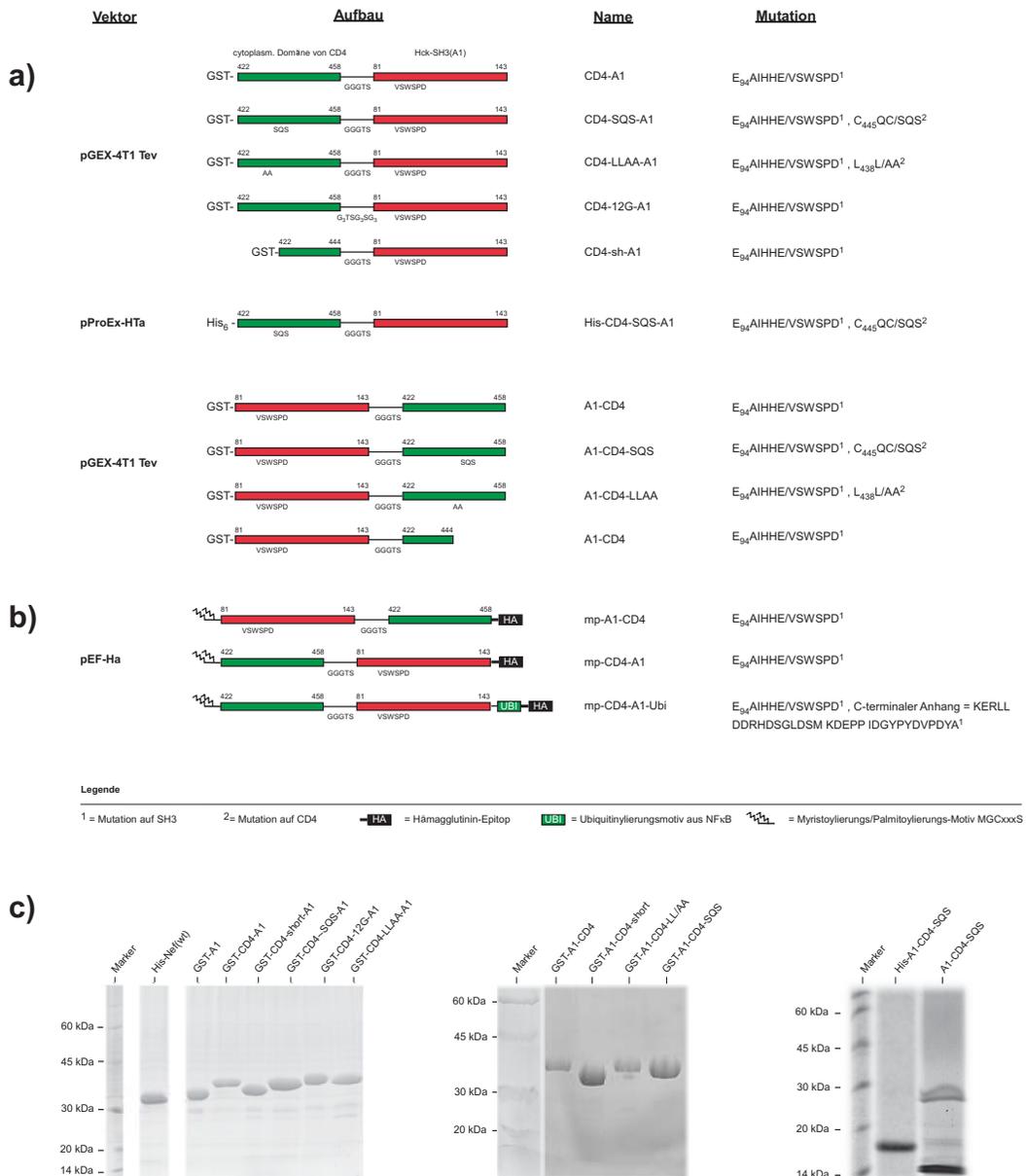
### Klonierung, Expression und Isolierung der Inhibitor-Klasse 3

Der Inhibitor der Inhibitor-Klasse 3 besteht aus der SH3(A1) Domäne und der cytoplasmatischen CD4 Domäne.

Grundlage der Klonierung der cytoplasmatischen Domäne von CD4 war das humane CD4 (Gen Accession Code M12807). Der cytoplasmatische Abschnitt von AS 422-458 wurde amplifiziert und zusammen mit dem Gen der SH3(A1) Domäne in den pGEX-4T1 Tev Vektor oder pProEx-HTa kloniert. Verbunden sind die beiden Fragmente über einen 5 Aminosäuren langen Linker (GGGTS).

*in vitro* : Die Expression erfolgte in BL21(DE3) Zellen bei 30°C in LB Medium. Die Bakterienkultur wurde bei einer  $OD_{600} = 0.8 - 1.0$  mit 0.5 mM IPTG induziert und für einen Zeitraum von 10 Stunden zur Proteinexpression kultiviert. Das Protein wurde anschließend, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, über GST-Affinitäts-Chromatographie und Gelfiltration isoliert und für das jeweilige Experiment (siehe experimenteller Abschnitt) präpariert. Die Ausbeute pro Liter Kultur betrug ca. 50 mg Protein. Zur Anwendung im Fluoreszenzexperiment wurde das Gen des Inhibitors in den pProEx-HTa Vektor kloniert und dort, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, exprimiert und isoliert. Die Isolierung der im pProEx-HTa Vektor exprimierten Mutanten stellte sich als schwierig heraus. Unabhängig von der Einstellung der Pufferbedingungen (Puffer, pH-Wert, Antioxidantien und Salz) konnte eine Konzentration von 0.06 mM nicht überschritten werden. Eine Konzentrierung über diesen Wert hinaus führt zur Aggregation des Proteins. Pro Liter Kultur konnten ca. 10 mg Protein isoliert werden.

*in vivo* Alle *in vivo* verwendeten Inhibitoren der Inhibitor-Klasse 3 wurden in den eukaryotischen Zellen durch ein N-terminales Myristoylierungs- und Palmitoylierungsmotiv (MGCxxxS) co-translational mit einem C14- und C16-Lipidanker modifiziert. Die Lokalisierung in den Zellen wurde durch den C-terminalen HA-tag möglich.



**Abbildung 3.5:** a) Übersicht der *in vitro* verwendeten Inhibitorklasse 3 Konstrukte. b) Übersicht der *in vivo* verwendeten Inhibitorklasse 3 Konstrukte. Von links nach rechts sind die Expressionsvektoren, der Aufbau des Inhibitors, die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung und die Mutationen aller *in vitro* und *in vivo* Konstrukte aufgeführt. c) **Darstellung des Reinheitsgrades der in *E. coli* exprimierten Inhibitorklasse 3 Konstrukte** In einem 15% SDS-Gel wurden je 5 µg des Proteins aufgetragen. Der erreichte Reinheitsgrad des Proteins liegt mit Ausnahme von A1-CD4-SQS bei 95%. Die im SDS-Gel und MALDI-TOF-MS bestimmten Massen entsprechen den kalkulierten Massen (siehe auch Tabelle 5.1).

## 3.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen den Inhibitoren der Inhibitor Klassen 1, 2 und 3 und Nef<sub>SF2</sub> *in vitro*

Die Charakterisierung der Interaktion zwischen Nef und Inhibitor stellt einen wesentlichen Bestandteil der Inhibitor-Entwicklung dar. Dies umfaßt zum einen die Interaktion zwischen Nef und den einzelnen Bestandteilen (SH3 Domäne,  $\beta$ -Adaptin und cytoplasmatische CD4 Domäne) und zum anderen die Charakterisierung der Interaktion zwischen Nef und Kombinationen der Untereinheiten als Fusionsproteine.

Hier wird zunächst mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC), Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie und Gleichgewichts-Fluoreszenztitration die Affinität zwischen Nef und Inhibitor bestimmt. Später werden basierend auf den Erkenntnissen *in vivo* Experimente durchgeführt.

Ein wesentlicher Teil der Charakterisierung wurde hier mittels der isothermaler Titrationskalorimetrie durchgeführt. Diese Methode bietet die Möglichkeit der direkten Bestimmung nicht nur der Bindungskonstanten,  $K_d$  und  $K_a$ , sondern auch der Enthalpie ( $\Delta H$ ), Entropie ( $\Delta S$ ) und Stöchiometrie ( $n$ ) einer Bindung mit nur einer Messung. Es ist also möglich das thermodynamische Profil einer Bindung zu erfassen.

Durch die Auswertung dieser Parameter wird es möglich den Inhibitor so zu gestalten, daß er klein, effizient und spezifisch für Nef ist.

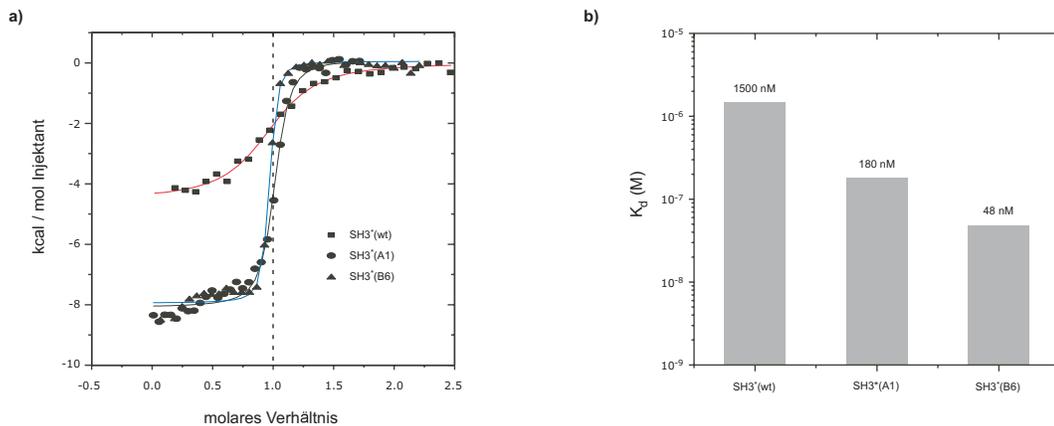
Dies beinhaltet die Bestimmung und Erhöhung der Affinität zu Nef, die Identifikation der kritischen Aminosäuren in der Bindungsstelle und Reduktion auf diese und die Bestimmung der optimalen Konformation des Inhibitors.

### 3.2.1 Charakterisierung der Interaktion zwischen den Inhibitoren der Inhibitor Klasse 1 (SH3 Domäne) und Nef<sub>SF2</sub>

Die Bindung zwischen Nef und der SH3 Domäne stellt die wohl am besten verstandene Interaktion unter den Nef-Wirtszellprotein-Interaktionen dar. Die SH3 Domäne ist daher im Inhibitor eine Art Basis-Baustein, auf den aufbauend der Inhibitor in seinen verschiedenen Varianten konzipiert wurde. Arold et al. (1998) konnten feststellen, daß aus der Tyrosinkinase-Familie die SH3 Domäne der Hämatopoetischen Zell Kinase die höchste Affinität für das Nef Protein aufweist [15]. In Anlehnung an die Arbeit von Hiipakka et al. (1999) wurden hier ähnliche Mutanten in der RT-Schleife verwendet, die dort eine erhöhte Affinität zu Nef zeigten [97]. Diese Mutanten beschränken sich auf die 6 Aminosäuren E<sub>94</sub>AIHHE in der RT-Schleife, die zu V<sub>94</sub>SWSPD (RRT.A1) oder Y<sub>94</sub>SPFSW (RRT.B6) mutiert wurden. Bezeichnet werden sie, wie in Kapitel 3.2 dargestellt, mit SH3(wt), SH3(A1) und SH3(B6).

Die bisher veröffentlichten Daten beschreiben die Interaktion zwischen Nef<sub>NL4-3</sub> oder Nef<sub>LAI</sub> und der SH3 Domäne. Hier wird zunächst kalorimetrisch die Interaktion zwischen Nef<sub>SF2</sub> und der humanen Hck-SH3 Domäne untersucht. Für diese Messungen

wurde der GST-tag der SH3 Domänen enzymatisch abgetrennt, um eine höhere Vergleichbarkeit mit den Daten aus den Veröffentlichungen zu erreichen. Die SH3 Domäne ohne GST-tag wird durch ein „\*“ gekennzeichnet.



**Abbildung 3.6:** Kalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen Inhibitorklasse 1 und Nef<sub>SF2</sub>. a) ITC-Experiment der Bindung der Hck-SH3\* Mutanten wt, A1 und B6 an Nef (45-210). Zu einer Konzentration von 50  $\mu$ M Nef (45-210) wurde eine zehnfach höher konzentrierte SH3-Lösung im ITC bei 25°C in 10 mM Tris/HCl pH 8.0 und 100 mM NaCl zutitriert. b) Vergleich der im ITC-Experiment ermittelten Dissoziationskonstanten. Die Mutation in der RT-Schleife führt zu einer erhöhten Affinität der SH3 Domäne für Nef.

**Tabelle 3.1:** Tabellarische Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter der Interaktion zwischen Nef<sub>SF2</sub> und Hck-SH3 Mutanten. Alle im ITC-Experiment bestimmten kalorimetrischen Daten wurden, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, ausgewertet.

	$K_d$ (nM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n
SH3*(wt)	1500	-7.931	-4.503	0.0115	3.428	0.97
SH3*(A1)	180	-9.169	-8.161	0.0035	1.008	0.99
SH3*(B6)	47	-9.924	-7.985	0.0067	1.939	0.95

In Tabelle 3.1 sind die Daten aus der Anpassung (Gleichung 5.20) an die im ITC ermittelten Daten zusammengefaßt. Hieraus lassen sich nun folgende Aussagen über das Bindungsprofil der Interaktion zwischen den SH3 Mutanten und Nef treffen.

SH3 und Nef binden in einer 1 : 1 Stöchiometrie aneinander, was bedeutet, daß pro Molekül Nef nur ein Molekül SH3 komplexiert wird. Wie in Tabelle 3.1 zu sehen, setzt sich die Energie der Bindungen überwiegend aus großen, günstigen Enthalpieänderungen (d.h. negativen) und Entropieänderungen (d.h. positiven) zusammen. Die aus den ITC-Daten ermittelte Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) der Bindung zwischen der SH3(wt) Domäne und Nef liegt bei 1.5  $\mu$ M. Durch die Mutationen in der RT-

Schleife, SH3(A1) und SH3(B6), wird die Affinität um den Faktor 8 und Faktor 30 im Vergleich zum Wildtyp gesteigert. Damit wird der Bereich der  $K_d$ -Werte aus dem mikromolaren in den nanomolaren Bereich optimiert. Die in der Literatur [15] ermittelten Daten für Nef<sub>LAI</sub> konnten hier für Nef<sub>SF2</sub>(wt) bestätigt werden. Gleiches gilt für die von Hiipakka et al. (1999) in einem eigenen kompetitiven 96-Well-Platten-Bindungs-Assay (für nähere Information siehe [97]) aufgestellten Daten für die Bindung der Mutanten RRT.A1 und RRT.B6 an Nef<sub>NL4-3</sub> [97].

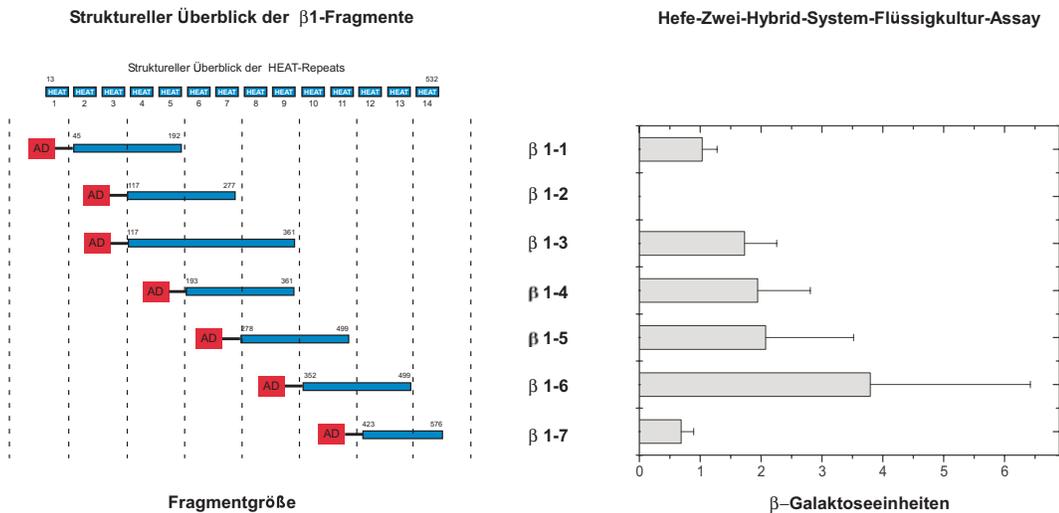
Obwohl die SH3(B6) Mutante eine höhere Affinität zu Nef zeigt als die SH3(A1) Mutante, wird im folgenden für das Fusionsprotein der Inhibitorclassen 2 und 3 die SH3(A1) Mutante als Basis-Baustein verwendet. Zugrunde liegt hier die Überlegung, daß die erzielte Spezifität des Inhibitors für Nef nicht alleine durch die SH3 Domäne erreicht werden soll. Hier ist zu vermuten, daß durch die SH3 Domäne nicht nur das PxxP-Motiv auf Nef erkannt wird, sondern auch die PxxP-Motive anderer zellulärer Proteine. Um möglichst wenig Interaktion zwischen Inhibitor und Nicht-Targetprotein zu haben, wird daher zunächst die SH3(A1) Mutante verwendet, bis geklärt ist, ob die Mutation in der RT-Schleife generell die Affinität für PxxP-Motive erhöht oder ob dies nur für Nef zutrifft.

Desweiteren wird die Affinität zwischen Nef und Inhibitor weiterhin mit der isothermalen Titrationskalorimetrie bestimmt. Um im Meßbereich dieser Methode eine Verbesserung der Affinität festzustellen, sollte die Dissoziationskonstante zwischen  $10^{-2}$  -  $10^{-9}$  M liegen. Da die Dissoziationskonstante der SH3(B6) Mutante bereits bei 50 nM liegt, könnte das Fusionsprotein mit einer Affinität binden, die außerhalb dieser Methode liegt. Daher wird zunächst das Protein SH3(A1) als aufbauender Bestandteil der weiteren Fusionsproteine verwendet.

### 3.2.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen Inhibitorklasse 2 und Nef<sub>SF2</sub>

Die Inhibitoren der Inhibitorclassen 2 sind als Fusionsprotein aus der SH3(A1) Domäne und dem  $\beta$ -Adaptin konzipiert. Das  $\beta$ -Adaptin ist die große  $\beta$ -Untereinheit des Adaptorprotein Komplexes und bindet vermutlich Dileuzin-Motive, wie es auch in der C-terminalen flexiblen Schleife auf Nef vorkommt [167]. Zusätzlich zur SH3 Domäne soll es im Inhibitor die Affinität zu Nef erhöhen, indem das C-terminale Dileuzin-Motiv auf Nef gebunden wird.

Zunächst wurde versucht, denjenigen Bereich des  $\beta$ -Adaptins einzugrenzen, der an das Dileuzin-Motiv bindet. Hierfür wurden jeweils Fragmente in einer Größe von 4 HEAT-Repeats in Hefezellen exprimiert und im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf die Bindung an Nef untersucht. Die Affinität wurde im Flüssigkultur-Assay bestimmt und in  $\beta$ -Galaktoseeinheiten ausgedrückt.

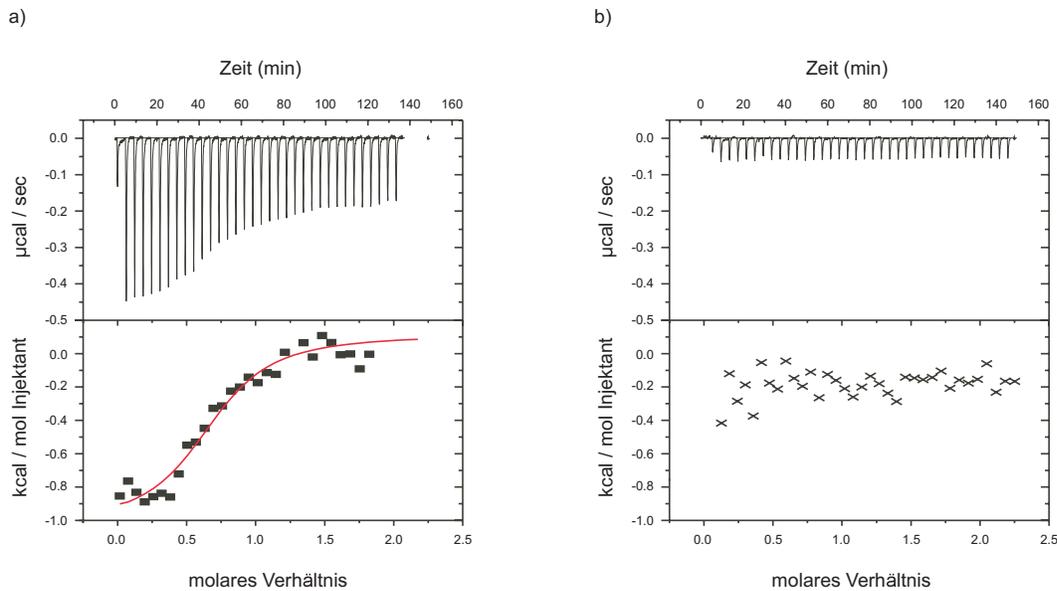


**Abbildung 3.7: Analyse der Interaktion zwischen  $\beta$ 1-Adaptin und Nef<sub>SF2</sub> im Hefe-Zwei-Hybrid-System-Flüssigkultur-Assay.** Die Gene der  $\beta$ 1-Fragmente und Nef<sub>SF2</sub> wurden in die Vektoren des Hefe-Zwei-Hybrid-System kloniert und in AH109 Hefezellen transfiziert und 12 h kultiviert. Anschließend wurde die Zellen lysiert und die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase durch den Farbumschlag des Farbstoffs CPRG photometrisch bestimmt. Das Fragment  $\beta$ 1-6, das die HEAT-Repeats 10 bis 13 umfaßt, zeigte die höchste Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase.

Das Fragment  $\beta$ 1-6 von Aminosäure 352 bis 499 zeigt die höchste Affinität im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Zusammen mit der ebenfalls höheren Affinität des Fragments  $\beta$ 1-5 ergibt sich ein Bindungsbereich von Nef auf dem  $\beta$ 1-Adaptin von Aminosäure 278 bis 500. Alle anderen Fragmente zeigten eine schwächere Bindung. Das Fragment  $\beta$ 1-2 konnte nicht exprimiert werden und wurde durch das Fragment  $\beta$ 1-3 ersetzt, das den Bereich von  $\beta$ 1-2 mit abdeckte.

Aus diesen Ergebnissen in Verbindung mit den strukturellen Daten nach Collins et al. (2003) wurde nun ein Fragment des  $\beta$ -Adaptins ( $\beta$ 2 (279-510)) ausgewählt, das aus den Aminosäuren von 279 bis 510 besteht [46]. In diesem Fall wurde dieses  $\beta$ 2-Adaptin aus AP2 verwendet, da hierfür strukturelle Daten vorliegen [46].

In einer kalorimetrischen Messung wurde anschließend die Bindung zwischen  $\beta$ 2 (279-510) an Peptiden mit Dileuzin-Motiven erprobt.



**Abbildung 3.8:** Kalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen  $\beta 2$ -Adaptin und Peptiden mit Dileuzin-Motiven aus Nef und CD4. a) ITC-Experiment der Bindung des Dileuzin-Motivs aus Nef<sub>NL4-3</sub> (GENTSLLHP) und  $\beta 2$  (279-510) b) ITC-Experiment der Bindung der LLAA Mutante aus CD4 (SAKQTAAQ) an  $\beta 2$  (279-510). Eine  $50 \mu\text{M}$  Peptid-Lsg. wurden mit einer zehnfach höher konzentrierten  $\beta 2$  (279-510)-Lsg. im ITC bei  $25^\circ\text{C}$  in  $50 \text{ mM}$  Tris/HCl pH 8.0,  $150 \text{ mM}$  NaCl,  $2 \text{ mM}$  EDTA titriert.  $\beta 2$  (279-510) bindet mit einer Dissoziationskonstante von  $2.9 \mu\text{M}$  an das Peptid mit dem Dileuzin-Motiv. Ein Peptid mit einer Mutation von LL zu AA aus der cytoplasmatischen Domäne von CD4 bindet hingegen nicht.

**Tabelle 3.2:** Tabellarische Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter der Interaktion zwischen  $\beta 2$ -Adaptin und Peptiden mit Dileuzin-Motiven aus Nef<sub>SF2</sub> und CD4. Alle im ITC-Experiment bestimmten kalorimetrischen Daten wurden, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, ausgewertet.

	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n
Nef Peptid	2.9	-7.338	-1.028	0.0219	6.310	0.7
CD4 LLAA Peptid	-	-	-	-	-	-

Die kalorimetrischen Daten der Interaktion zwischen dem Peptid mit einem Dileuzin-Motiv aus Nef (GENTSLLHP) und dem Fragment  $\beta 2$  (279-510) des  $\beta 2$ -Adaptins sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Ein Peptid mit dem Dileuzin-Motiv binden mit einem  $K_d$ -Wert im mikromolaren Bereich an  $\beta 2$  (279-510).

Die Enthalpieänderung ist dabei verhältnismäßig klein. Ein großer Teil der Energie der Bindung wird durch eine günstige Entropieänderung hervorgerufen. In einer weiteren Messung wurde ein Peptid untersucht, welches dem Dileuzinmotiv aus der cytoplasmatischen Domäne von CD4 entspricht. Allerdings wurden hier nun die beiden Leuzine des Dileuzinmotivs zu Alanin (SAKQTAAQ) mutiert. Dieses Peptid zeigte in der isothermalen Titrationskalorimetrie keine Bindung an das Fragment des  $\beta 2$ -Adaptins.

Die Stöchiometrie der Bindung liegt bei 0.69. Bisher existieren keine Daten über die Anzahl der Bindungsstellen für ein Dileuzinmotiv auf  $\beta 2$ -Adaptin. Die Stöchiometrie würde darauf hindeuten, daß durch ein  $\beta 2$  (279-510) Fragment mehr als ein Petid gebunden wird. Hier wird jedoch vermutet, daß nicht das gesamte Protein  $\beta 2$  (279-510) in einem gefaltetem, „aktiven“ Zustand vorliegt und daher die Stöchiometrie nicht auf einen 1 : 1 Komplex hindeutet. Das  $\beta 2$ -Adaptin befindet sich normalerweise in einem Komplex mit drei weiteren Untereinheiten (siehe Abb. 1.4). Sehr wahrscheinlich tragen die Untereinheiten untereinander zur Stabilität der Struktur bei. Da hier nur ein kleines Fragment einer Untereinheit verwendet wurde, könnte teilweise die Faltung davon beeinflusst werden. Eine Proteolyse durch Proteasen wurde nicht beobachtet (siehe Abb. 3.3)

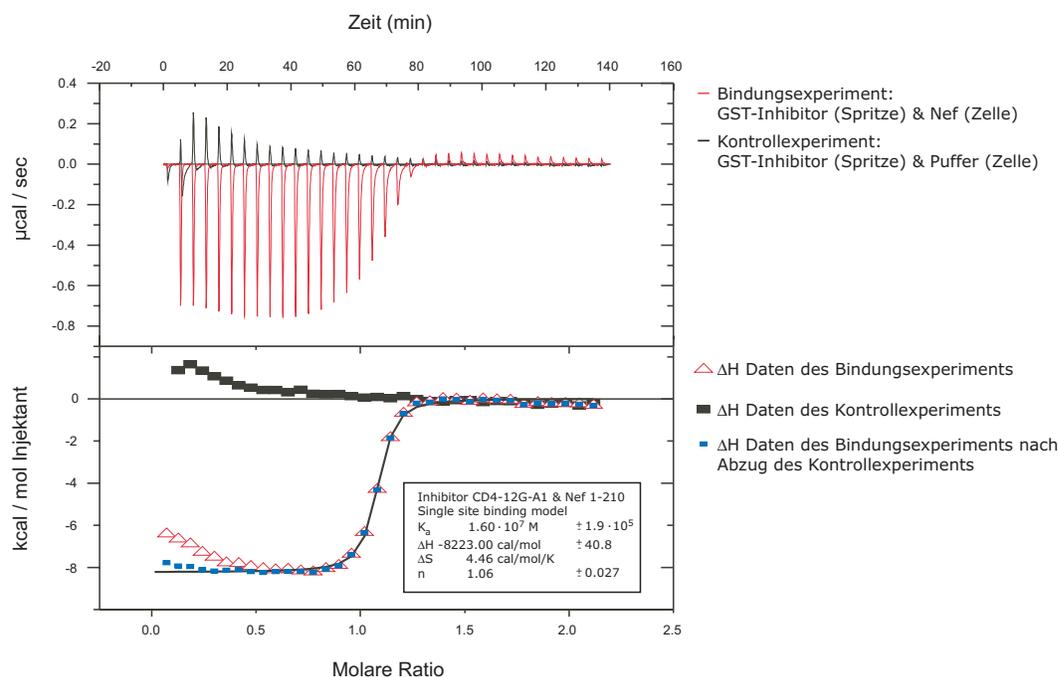
Zusammenfassend ergibt sich hier eine Bestätigung der Interaktion zwischen dem Dileuzin-Motiv von Nef und dem zuvor im Hefe-Zwei-Hybrid-System bestimmten Bereich auf dem  $\beta$ -Adaptin.

Mit Hilfe dieser Daten wurde anschließend die Inhibitorklasse 2 entwickelt. Für das  $\beta$ -Adaptin wurden zwei Domänengrenzen 279-510 oder 352-510 gewählt und mit der SH3(A1) Domäne kombiniert. In *E.coli* wurden beide Varianten exprimiert. Das Protein wurde in der unlöslichen Membranfraktion identifiziert. Eine Isolierung für die *in vitro* Verwendung gelang nicht (siehe Abb. 3.4). Vermutlich destabilisiert die Fusion beider Domänen das Fusionsprotein soweit, daß das  $\beta$ -Adaptin in den *E.coli* Zellen zur Aggregation tendiert.

### 3.2.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen Inhibitor Klasse 3 und Nef<sub>SF2</sub>

Die Inhibitoren der Inhibitor Klasse 3 sind ein Fusionsprotein aus der SH3(A1) Domäne und der cytoplasmatischen CD4 Domäne. Nachdem es mit dem  $\beta$ -Adaptin nicht möglich war, einen stabilen Inhibitor zu produzieren, wurde nun eine weitere Domäne als Baustein einer weiteren Inhibitor Klasse gesucht. Wie schon in Abb. 1.4 gezeigt wurde und im Kapitel 3.5 näher erläutert wird, ist die CD4 Domäne wesentlich kleiner und unstrukturierter als das  $\beta$ -Adaptin. In der Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente mit einem synthetisch hergestellten Peptid der CD4 Domäne [122] und Daten aus Veröffentlichungen [92] zeigten, daß bei der Interaktion zwischen dieser Domäne und Nef Präzipitate entstehen. Die Fusion der CD4 Domäne mit der SH3 Domäne und der Glutathion-S-Transferase (GST) im Inhibitor wirkte jedoch stabilisierend auf die Ausbildung des Komplexes mit Nef und erlaubte nun die Messung der Interaktion im ITC ohne die Entstehung von Präzipitaten.

Zunächst ist in Abb. 3.9 exemplarisch ein kompletter Datensatz einer ITC-Messung zwischen Nef und einem Inhibitor der Inhibitor Klasse 3 dargestellt.



**Abbildung 3.9:** Beispiel einer kalorimetrischen Analyse der Interaktion zwischen einem Inhibitor der Inhibitor Klasse 3 und Nef<sub>SF2</sub>. **Oberes Feld:** Auftragung der Wärmeänderung bei Titration von Nef durch den Inhibitor gegen die Zeit. Die Injektion eines kleinen Volumens (8 µl) des Liganden (Injektant) führt zu einer Wärmeänderung, die über die Zeit aufgenommen wird. Die Fläche eines Peaks repräsentiert die gesamte Wärmeänderung, die durch die kleine Menge an Ligand induziert wird. **Unteres Feld:** Auftragung der Wärmeänderung gegen das molare Verhältnis Injektant zu Protein in der Zelle. Die blauen Werte stellen die um die Kontrolle korrigierten Messdaten der Bindung zwischen Nef (1-210) und CD4-12G-A1 dar. Die schwarze Kurve ist eine Anpassung der Gleichung 5.20 unter der Annahme einer Bindungsstelle.

Eine 40  $\mu\text{M}$  Lösung Nef (1-210) (Zelle) wurde mit einer 400  $\mu\text{M}$  Lösung Inhibitor CD4-12G-A1 (Spritze) in 8  $\mu\text{l}$  Schritten bei einer konstanten Temperatur von 15°C in 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl und 0.5 mM Mercaptoethanol titriert. Bei jedem Titrationsschritt verursacht die Interaktion zwischen Nef und Inhibitor eine Wärmeänderung, die über die Zeit aufgenommen wird (siehe Abb. 3.9 oben). Die Fläche eines Peaks repräsentiert die gesamte entwickelte Wärme, die bei der Interaktion während eines Injektionsschrittes entsteht. Aus der Integration dieser Fläche wird die Bindungsenthalpie  $\Delta H$  eines Schrittes berechnet und in der Auftragung  $\Delta H$  gegen molares Verhältnis Injektant/Protein in der Zelle dargestellt (siehe Abb. 3.9 unten). Durch Angleichen der Gleichung 5.20 können nun die thermodynamischen Parameter wie  $\Delta H$  und  $\Delta S$ , die Assoziationskonstante  $K_a$  und die Stöchiometrie ermittelt werden, was dann, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, zur Berechnung von  $K_d$  und  $\Delta G$  dient.

Abb. 3.9 beinhaltet nun zwei Messungen; das Bindungsexperiment der Interaktion zwischen Inhibitor und Nef und das Kontrollexperiment der Injektion von Inhibitor in Puffer. Wie in Kapitel 2.5.1 erwähnt, werden zur Kontrolle die Verdünnungseffekte, die bei Titration auftreten, aufgenommen.

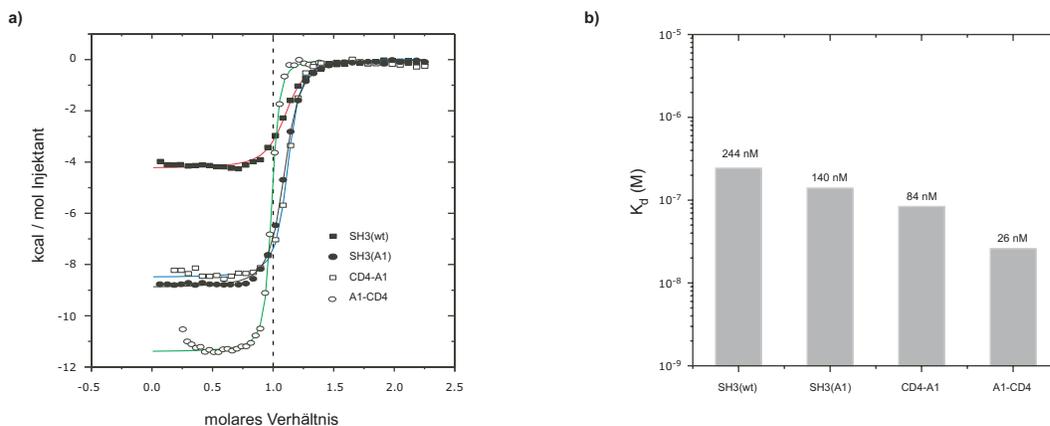
Die Injektion von Puffer in die mit Nef Protein gefüllte Zelle zeigt keine Änderung (nicht dargestellt) der Wärme. Die Injektion des Inhibitors in die Puffer gefüllte Zelle hingegen zeigt eine endotherme Wärmeänderung, die durch die Eigenschaften des Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins Inhibitor erklärt werden können.

Die N-terminale Glutathion-S-Transferase verbessert die Löslichkeitseigenschaften des Inhibitors in dem Konzentrationsbereich, der für die ITC-Messung nötig ist. Daher wird der Inhibitor für die *in vitro* Anwendung als GST-Fusionsprotein exprimiert. Die Glutathion-S-Transferase tendiert in höheren Konzentrationen zur Dimerbildung, die sich bei der Titration in die Meßzelle durch Verdünnen auflösen, was sich in einem endothermen Signal manifestiert [74]. Die detektierten Werte ergeben zusammen eine Dissoziationskurve. In Abb. 3.9 wird deutlich, daß sich dieser Effekt nur auf die ersten 5 bis 8 Titrationsschritte beschränkt und durch einfach Subtraktion einer Kontrollmessung korrigieren läßt. Der korrigierte Datensatz läßt sich dann, wie oben beschrieben, problemlos auswerten. Eine Interaktion zwischen Nef und Glutathion-S-Transferase wurde in einem Kontrollexperiment ebenfalls überprüft. Eine Bindung zwischen der Glutathion-S-Transferase und Nef konnte nicht festgestellt werden (nicht dargestellt).

Zunächst wurde vergleichend untersucht, wie sich die zusätzliche Bindungsdomäne im Inhibitor auf die Affinität zu Nef auswirkt. Da der Inhibitor mit GST-tag löslicher ist, wurde er nicht enzymatisch abgetrennt. Ebenso wurden die SH3 Domänen mit dem GST-tag eingesetzt, um eine höhere Vergleichbarkeit zu erreichen. Im ITC-Experiment konnten nun die Bindungsdaten der Interaktionen ermittelt werden und sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt. Wie schon zuvor in Kapitel 3.2.1 gezeigt, erhöht sich die Affinität der SH3 Mutanten zu Nef durch die Mutation in der RT-Schleife; allerdings weniger stark als zuvor beobachtet. Eventuell schränkt hier der GST-tag die Wirkung der Mutation ein.

Der Inhibitor wurde hier in zwei Varianten eingesetzt. Einmal wurde die CD4 Domäne N-terminal vor die SH3 Domäne (CD4-A1) gesetzt, in der zweiten Variante folgt sie

C-terminal der SH3 Domäne (A1-CD4). Wie in Abb. 3.10 und Tabelle 3.3 zu sehen ist, hat dieses deutliche Auswirkungen auf die Affinität zu Nef. Während die Affinität bei CD4-A1 gerade mal um den Faktor 1 - 2 erhöht wird, geschieht dieses bei A1-CD4 um den Faktor 6. Die Bindung wird dabei vorwiegend durch eine günstige Enthalpieänderung getrieben. Die Änderung der Entropie ist eher ungünstig. Für die Interaktion zwischen Nef und A1-CD4 wurde eine Dissoziationskonstante von 26 nM festgestellt.



**Abbildung 3.10: Kalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen den Inhibitoren der Inhibitorclassen 1 und 3 und Nef<sub>SF2</sub>.** a) ITC-Experiment der Bindung der Inhibitoren SH3(wt), SH3(A1), CD4-A1 und A1-CD4 an Nef. Eine 40  $\mu$ M Nef (1-210)-Lsg. wurde mit einer zehnfach höher konzentrierten Liganden-Lösung im ITC bei 15°C in 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl und 0,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol titriert. b) Vergleich der im ITC-Experiment ermittelten Dissoziationskonstanten. Die Verwendung der Mutante SH3(A1) in Kombination mit der cytoplasmatischen Domäne von CD4 führt zu einer hochaffinen Bindung an Nef. Für den Inhibitor A1-CD4 wird die höchste Affinität ( $K_d = 26$ nM) detektiert.

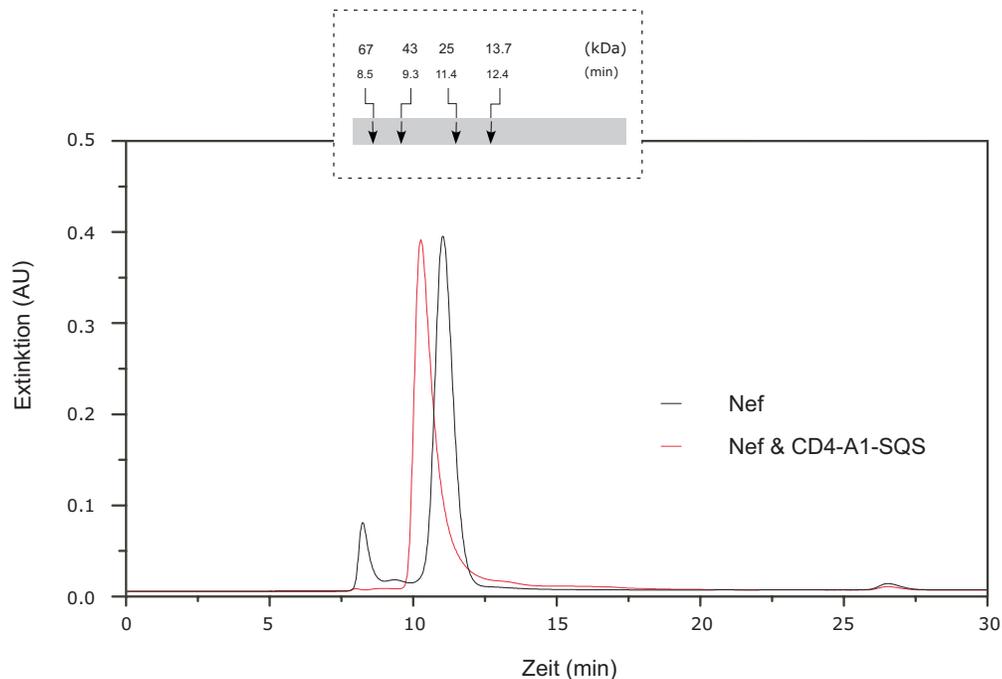
**Tabelle 3.3: Tabellarische Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter der Interaktion zwischen Inhibitorclassen 3 und Nef<sub>SF2</sub>.** Alle im ITC-Experiment bestimmten kalorimetrischen Daten wurden, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, ausgewertet.

	$K_d$ (nM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n
SH3(wt)	244	-8.706	-4.240	0.0155	4.466	1.08
SH3(A1)	140	-9.035	-8.897	0.00048	0.138	1.07
CD4-A1	84	-9.327	-8.506	0.00285	0.821	1.09
A1-CD4	26	-10.011	-11.400	-0.00482	-1.388	0.97

Auch die Bindung zwischen Inhibitorclassen 3 und Nef erfolgt in einer 1:1 Stöchiometrie.

In einem zusätzlichen Experiment wurde die Größe des Nef-Inhibitor-Komplexes mittels der analytischen Gelfiltration untersucht. Es wurde eine Größe von ca. 35 kDa ermittelt, was im Rahmen der Meßgenauigkeit der kalkulierten Masse von 39

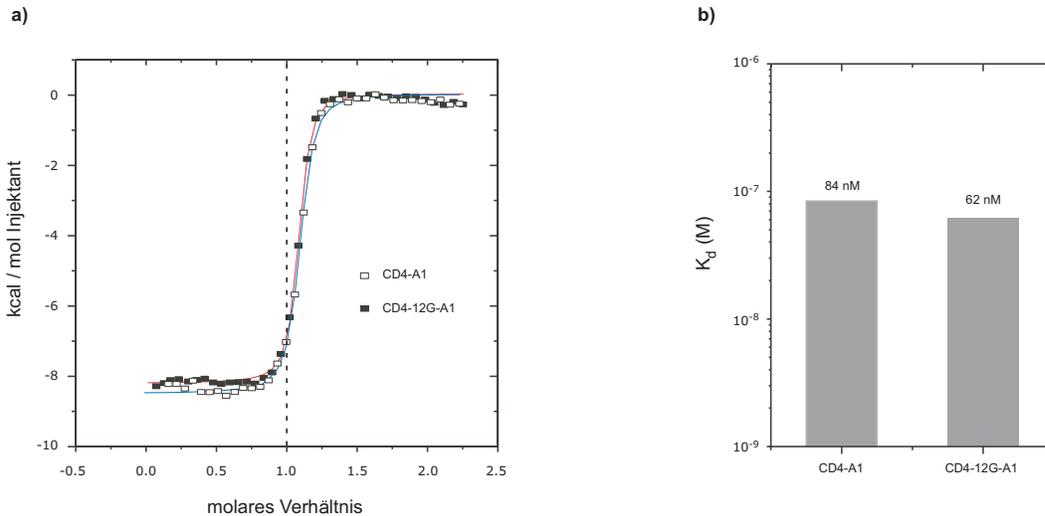
kDa entspricht. Zum Vergleich wurde das Nef Protein alleine in der analytischen Gelfiltration untersucht. Den Erwartungen entsprechend eluiert es aufgrund seiner geringeren Größe später als der Komplex. Es wurde eine Größe von 23 kDa bestimmt. Hier wird deutlich, daß die Bindungsdomänen des Fusionsproteins beide an ein Nef-Molekül binden und nicht in „trans“ an ein zweites Molekül.



**Abbildung 3.11: Analyse des Nef-Inhibitor Komplexes mittels der analytischen Gelfiltration.** 90  $\mu$ l einer 1 mg/ml Lsg. Nef (1-210) und Komplex aus Nef (1-210) und A1-CD4-SQS wurden auf einer Superdex S75 (10/30) mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min photometrisch ( $OD_{280nm}$ ) in 20 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl untersucht. Die Bestimmung der globulären Größe erfolgte, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, anhand eines Protein-Standards (Amersham Biosciences). Der Komplex hat demnach eine Größe von 34,9 kDa und Nef (1-210) 22,6 kDa.

### Die Anordnung der Domänen in der Inhibitor-Klasse 3

Im ITC-Experiment zeigt der Inhibitor A1-CD4 eine höhere Affinität zu Nef als der Inhibitor CD4-A1. Dies deutet darauf hin, daß die Reihenfolge einer N-terminalen SH3(A1) Domäne und einer C-terminalen CD4 Domäne die optimale Anordnung darstellt. In dem anschließenden Experiment wurde überprüft, ob das Verlängern des Linkers von 5 auf 12 Aminosäuren zwischen CD4 und SH3 Domäne die Affinität erhöht. Würde die Hypothese der optimalen Anordnung stimmen, so könnte die Flexibilität und Länge eines erweiterten Linkers ebenfalls die Nef-CD4-Interaktion im Inhibitor CD4-A1 verbessern.



**Abbildung 3.12: Kalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen CD4-12G-A1 und Nef<sub>SF2</sub>.** a) ITC-Experiment der Bindung des Inhibitors CD4-12G-A1 und CD4-A1 an Nef. Eine 40  $\mu$ M Nef (1-210)-Lsg. wurde mit einer zehnfach höher konzentrierten Liganden-Lösung im ITC bei 15°C in 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl und 0.5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol titriert. b) Vergleich der im ITC-Experiment ermittelten Dissoziationskonstanten. Die Verlängerung des Linkers zwischen SH3 Domäne und CD4 Domäne steigert die Affinität zu Nef (siehe auch Tabelle 5.2).

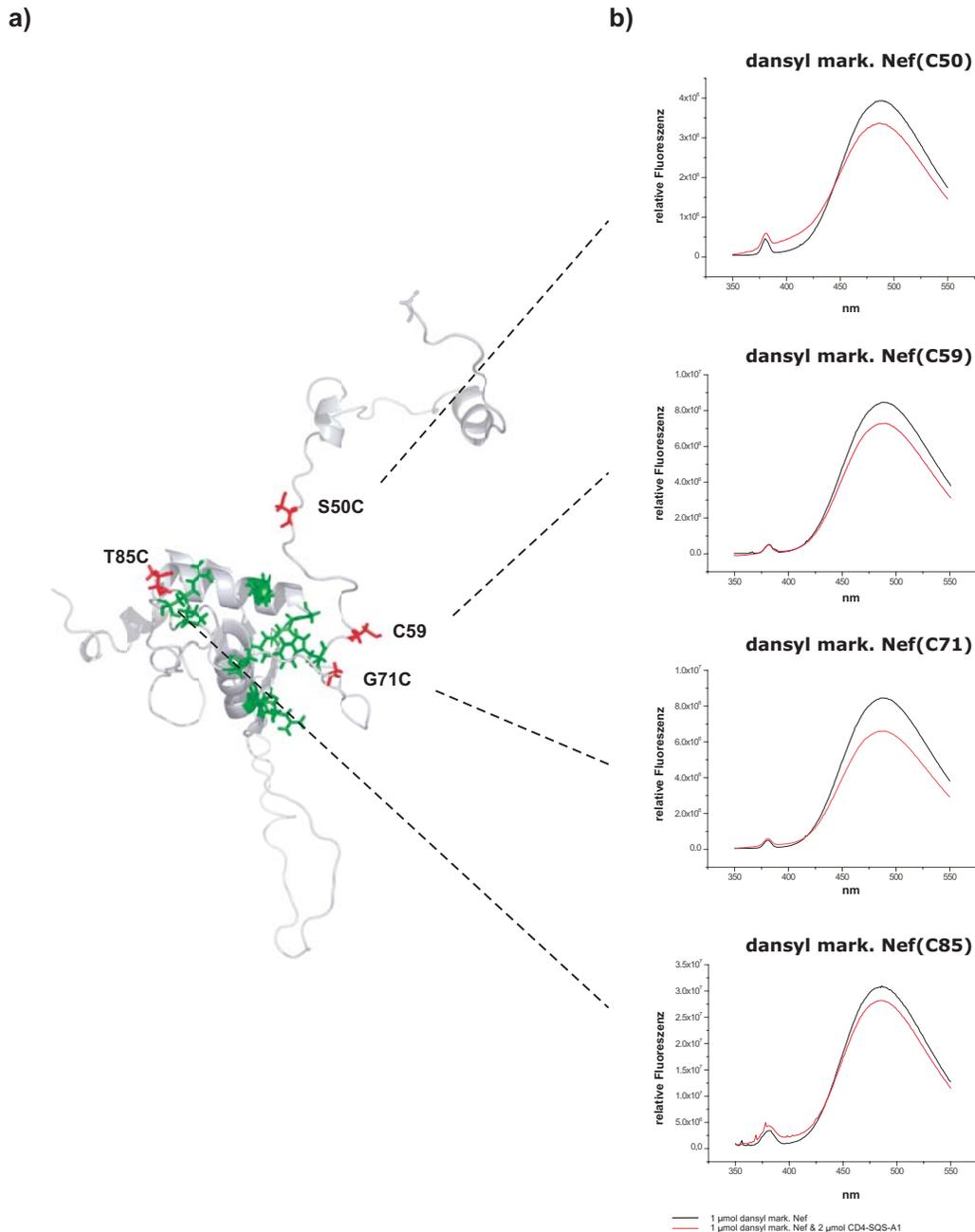
Abb. 3.12 deutet darauf hin, daß sich die Affinität erhöhen läßt, indem der Linker verlängert wird. Allem Anschein nach wirken sich die zusätzlichen Aminosäurenlängen positiv auf die Interaktion zwischen Nef und CD4 aus. Die erzielte Erhöhung der Affinität ist jedoch nur sehr gering, was vermuten läßt, daß der Linker entweder nicht lang genug ist oder auch die notwendige Flexibilität nicht erreicht wird.

### Die Bestätigung der Interaktion zwischen Inhibitorklasse 3 und Nef<sub>3F2</sub> in der Gleichgewichts-Fluoreszenztitration und Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie

**Gleichgewichts-Fluoreszenztitration:** Um durch eine zweite Methode die im ITC bestimmten  $K_d$ -Werte zu bestätigen, wurde der Versuch unternommen das Nef Protein selektiv mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. So wäre eine Messung der Interaktion zwischen Nef und verschiedenen Inhibitor-Konstrukten in der Gleichgewichts-Fluoreszenztitration möglich und stünde als weiteres Messsystem neben der ITC zur Verfügung.

Das Nef Protein wurde hierfür an verschiedenen Positionen nahe den Bindungsstellen von CD4 und SH3 selektiv mit dem Farbstoff 1,5-IAEDans, einem Farbstoff der selektiv an die Thiogruppe von Cysteinen bindet, markiert. Hierfür wurde an den entsprechenden Stellen ein Cystein durch Mutation eingefügt, während alle übrigen frei zugänglichen Cysteine auf die gleiche Art und Weise entfernt wurden.

In Abb. 3.13a sind diese Positionen in der Nef-Struktur dargestellt. Alle Positionen befinden sich im N-Terminus von Nef nahe den Bindungsstellen von CD4 und SH3. Die Proteine wurden, wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben, markiert, im MALDI-TOF-MS überprüft und deren Emissionspektren vor und nach Zugabe von His-CD4-SQS-A1 gemessen. Das 1,5-IAEDans ist ein Umgebungs-sensitiver Fluoreszenz-Farbstoff. Ändert die Interaktion zwischen Inhibitor und Nef die chemische Umgebung des Fluorophors, so sollte sich dies in einer Änderung des Emissionsspektrums zeigen. Abb. 3.13b und Tabelle 3.4 zeigen, daß sich leider nur die Amplitude des Maximums bei einer Wellenlänge von ca. 490 nm ändert, nicht aber die Wellenlänge des Maximums. Diese Amplitudenänderung wird hier durch die Volumenänderung hervorgerufen. Für eine Gleichgewichts-Fluoreszenztitrations-Messung ist eine Änderung von mindestens 10% wünschenswert. Nach der in Kapitel 2.5.3 beschriebenen Berechnung der um die Volumenänderung korrigierten Fluoreszenzänderung ergeben sich jedoch nur Werte zwischen 2 und 5 %.

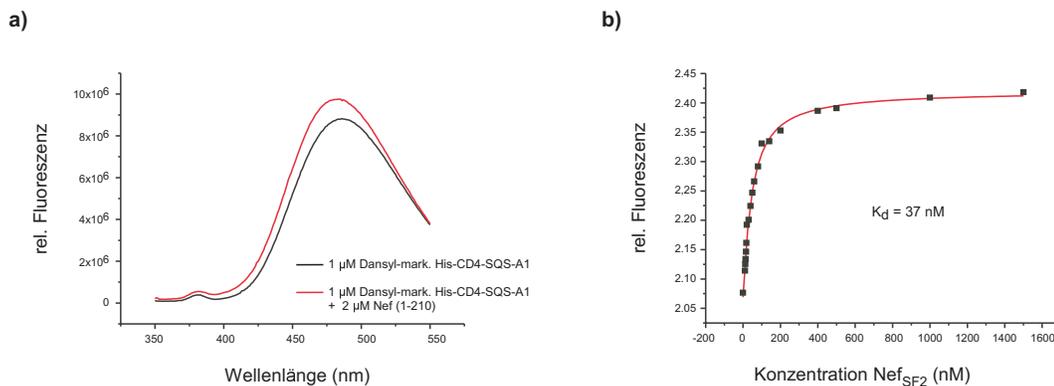


**Abbildung 3.13:** Analyse der Interaktion zwischen dem Inhibitor CD4-SQS-A1 und fluoreszenzmarkiertem Nef<sub>SF2</sub> mittels der Gleichgewichts-Fluoreszenztitration. **a)** Darstellung der Positionen der fluoreszenzmarkiertem Aminosäuren in der Struktur des Nef Proteins. Die fluoreszenzmarkierten Aminosäuren sind in rot dargestellt. Die grünen Aminosäuren stellen die Bindungsstellen für CD4 und SH3 dar. **b)** Emissionsspektren der Dansyl-markierten Nef Mutanten vor und nach Zugabe von His-CD4-SQS-A1. Jeweils 1 ml einer 1  $\mu\text{M}$  Dansyl-markierten Nef Lösung wurde mit einer Exzitationswellenlänge von 337 nm vor und nach Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  His-CD4-SQS-A1 gemessen.

**Tabelle 3.4:** Tabellarische Zusammenfassung der Fluoreszenzänderung der Interaktion zwischen CD4-SQS-A1 und Dansyl-markiertem Nef(C50), Nef(C59) (eigentlich Nef(1-210)), Nef(C71) und Nef(C85).

	Fluoreszenzänderung in %
Nef(C50)	2
Nef(C59)	3.3
Nef(C71)	5
Nef(C85)	4.3

Aus diesen Erkenntnissen resultierend wurde davon abgesehen weitere Positionen im Nef Protein zu markieren. Stattdessen konnte die  $K_d$ -Werte exemplarisch für den Inhibitor CD4-SQS-A1 annähernd in SPR und Gleichgewichts-Fluoreszenztitrations Experimenten bestätigt werden. Zur Anwendung im Fluoreszenz-Experiment wurde der Inhibitor mit dem Fluoreszenzfarbstoff 1,5-IAEDans an Position 455 in der CD4 Domäne markiert. Da der Farbstoff selektiv an die Thiogruppe der Aminosäure Cystein bindet, eignete sich nur der Inhibitor His-CD4-SQS-A1 mit der Mutation des  $C_{445}QC/SQS$  und einem N-terminalen His-tag um das Cystein 455 zu markieren. Die Markierung wurde, wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben, durchgeführt und im MALDI-TOF-MS überprüft.

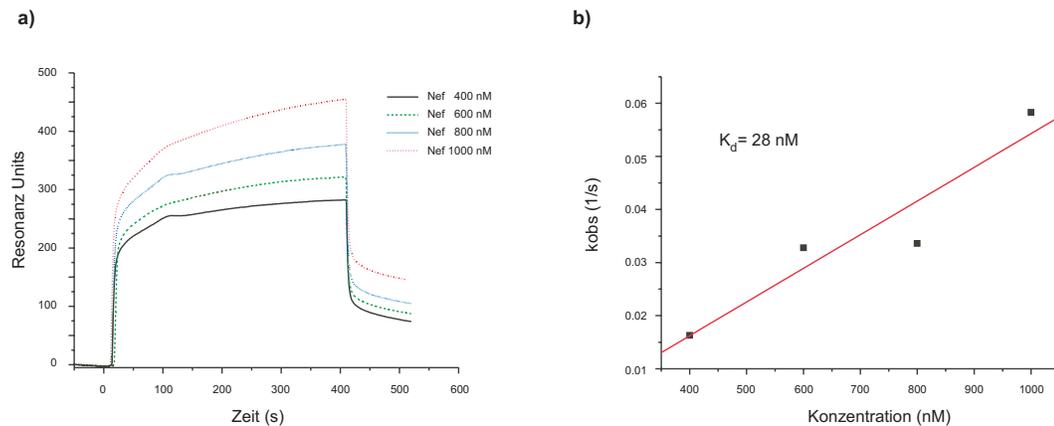


**Abbildung 3.14:** Analyse der Interaktion zwischen Inhibitor CD4-SQS-A1 und Nef<sub>SF2</sub> in der Gleichgewichts-Fluoreszenztitration. **a)** Emissionsspektrum von Dansyl-markiertem His-CD4-SQS-A1 vor und nach Zugabe von Nef (1-210). 1 ml einer 0.1  $\mu\text{M}$  Dansyl-markierte His-CD4-SQS-A1 Lsg. wurde mit einer Exzitationswellenlänge von 337 nm vor und nach Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Nef (1-210) gemessen. **b)** Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von Dansyl-markiertem His-CD4-SQS-A1 mit Nef (1-210). Eine 1  $\mu\text{M}$  Dansyl-markierte His-CD4-SQS-A1 Lsg. wurde mit Nef (1-210) in 20 mM Tris/HCl pH 7.0, 50 mM NaCl titriert. Exzitationswellenlänge = 337 nm und Emissionswellenlänge = 490 nm. Durch Anpassung der quadratischen Gleichung 5.9 wurde eine Dissoziationskonstante von 37 nM bestimmt.

In Abb. 3.14 ist nun die Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von Dansyl-markiertem His-CD4-SQS-A1 durch Nef (1-210) dargestellt. Zunächst zeigt sich im Emissionsspektrum bei einer Exzitation mit Licht der Wellenlänge 337 nm, daß sich das Spektrum nach Zugabe der doppelten Menge Nef (1-210) nicht nur in der Amplitude um ca. 10% erhöht, sondern in einen kurzwelligeren Bereich verschiebt. Die Änderung

wurde um die Volumenänderung, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, korrigiert. Diese Änderung erlaubt nun die Messung der Fluoreszenzsignales bei schrittweiser Sättigung von Dansyl-markiertem His-CD4-SQS-A1 durch Nef (1-210) wie es in Abb. 3.14b dargestellt ist. Durch Anpassen der Gleichung 5.9 ergibt sich eine Dissoziationskonstante von 37 nM für die Interaktion zwischen Nef (1-210) und Dansyl-markiertem His-CD4-SQS-A1.

**Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (SPR):** Wie im Gleichgewichts-Fluoreszenztitration Experiment konnte in der SPR nur die weniger Cysteinereiche Inhibitor Mutante CD4-SQS-A1 verwendet werden. Wie in Kapitel 2.5.4 erwähnt, basiert das Experiment auf der Fixierung des einen Proteins an einen Trägerchip über  $\alpha$ -GST-Antikörper. Höhere Mengen Antioxidantien wie DTE, TCEP oder  $\beta$ -Mercaptoethanol zerstören die Disulfid-verbrückten leichten und schweren Ketten des Antikörpers und destabilisieren damit das Protein auf dem Chip. CD4-SQS-A1 verfügt nur über ein freies Cystein und hat demnach nur die Möglichkeit Dimer-Komplexe zu bilden. Daher konnte hier auf die Zugabe von Antioxidantien verzichtet werden. Im SPR-Experiment wurden der CM5-Chip mit (0.4 mg/ml) CD4-SQS-A1 beladen und mit 4 verschiedenen Konzentrationen (400 - 1000 nM) Nef (1-210) in 10 mM HEPES pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.005% IGEPAL im BIAcore-1000 analysiert. Die Daten wurden anschließend durch Anpassen der Gleichung 5.23 analysiert und, wie in Kapitel 5.1.3 beschrieben, ausgewertet. Für die Interaktion zwischen Nef (1-210) und CD4-SQS-A1 wurde im SPR eine Dissoziationskonstante von 28 nM bestimmt.



**Abbildung 3.15:** Analyse der Interaktion zwischen Inhibitor CD4-SQS-A1 und Nef<sub>SF2</sub> in der Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie. a) Auftragung der Resonanzänderung gegen die Zeit. b) Auftragung der  $k_{obs}$  gegen die Konzentration Nef (1-210) Ein CM5-Sensorchip wurde mit einer 0.4 mg/ml Lsg. CD4-SQS-A1 beladen und mit 4 Konzentrationen 400 - 1000 nM Nef (1-210) in 10 mM HEPES pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.005% IGEPAL im BIAcore-1000 analysiert. Der Inhibitor CD4-SQS-A1 bindet mit einer Dissoziationskonstanten von 28 nM an Nef (1-210).

**Tabelle 3.5:** Vergleich der in der ITC, SPR und Gleichgewichts-Fluoreszenztitration ermittelten Dissoziationskonstanten der Interaktion zwischen CD4-SQS-A1 und Nef.

Methode	$K_d$ (nM)
ITC	87
SPR	28
Gleichgew.-Fluoreszenztitration	37

In beiden Bindungs-Experimenten, Gleichgewichts-Fluoreszenztitration und SPR, konnte eine höhere Affinität zwischen dem Inhibitor und Nef festgestellt werden als im ITC-Experiment. Der Unterschied ist angesichts der unterschiedlichen Methodik mit einem Faktor 2 bis 3 eher gering.

### Zusammenfassung der Charakterisierung der Interaktion zwischen Inhibitor-3 und Nef<sub>5F2</sub>

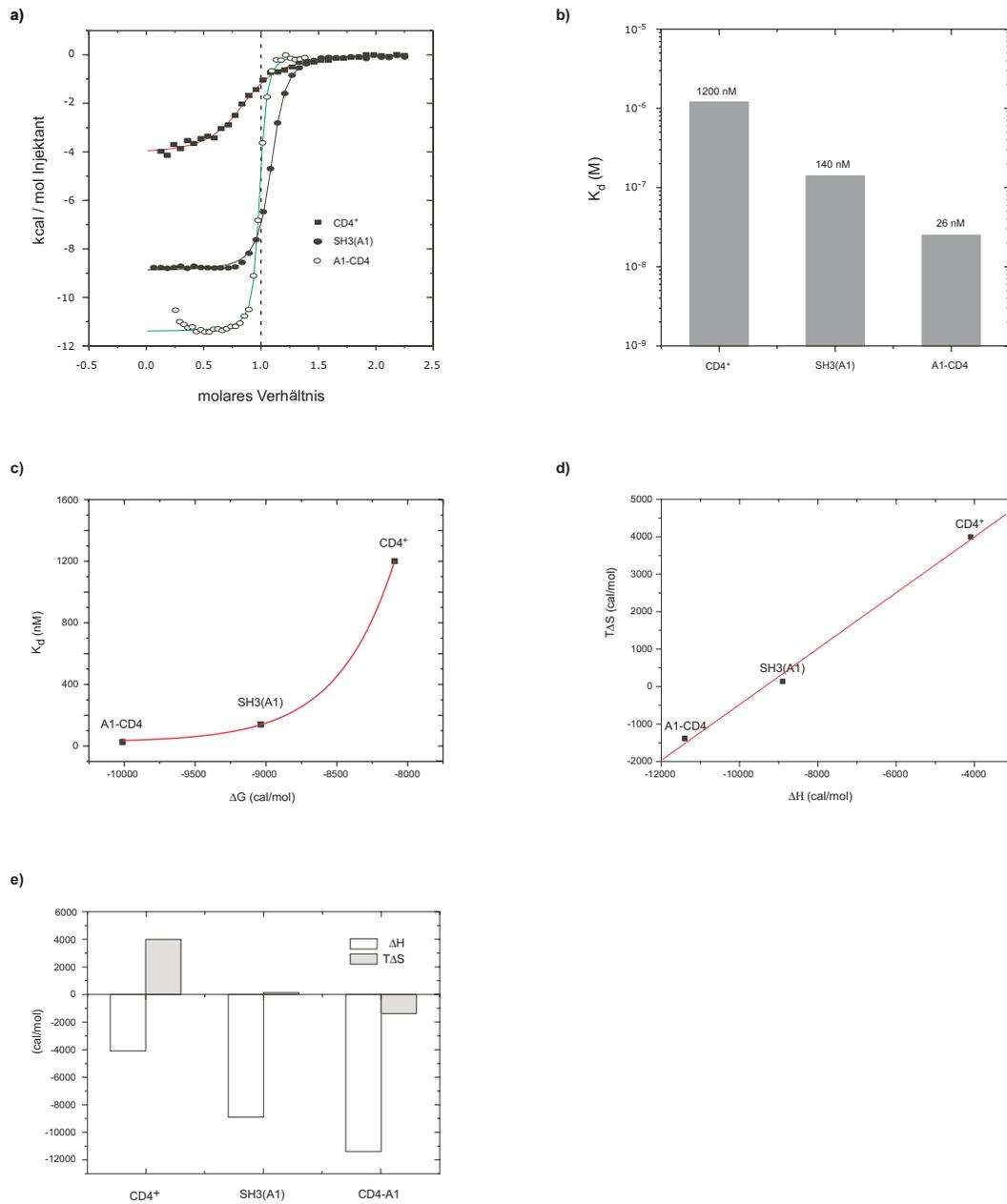
In den oben aufgeführten Daten wurde das Design eines hoch-affinen gegen Nef gerichteten Inhibitors vorgestellt. Zusammenfassend werden hier nun die Beiträge der einzelnen Bausteine, CD4 und SH3 Domäne, zur hohen Affinität in einer Abbildung dargestellt (siehe Abb. 3.16) .

CD4 und SH3 Domäne binden an zwei separaten Stellen auf Nef, was auch in Kapitel 3.5 durch gezielte Mutation der Bindungsmotive deutlich wird [86]. In Abb. 3.16 zeigt sich, daß die CD4 Domäne mit  $K_d$ -Werten im mikromolaren Bereich an Nef bindet (CD4<sup>+</sup> Daten stammen aus Kapitel 3.5.2), während die SH3 Domäne mit der Mutation in der RT-Schleife A1 bereits in nanomolaren Konzentrationen interagiert. In Kombination entsteht eine Affinität zwischen Nef und dem Inhibitor mit  $K_d$ -Werten im unteren nanomolaren Bereich. Damit wurde ein Fusionsprotein geschaffen, das von allen Interaktionspartnern bisher die höchste gemessene Affinität zu Nef aufweist.

Die Analyse der thermodynamischen Daten ist in Abb. 3.16c-d dargestellt. Die Auftragung der  $K_d$  gegen  $\Delta G$  zeigt gemäß Gleichung 5.14 einen exponentiellen Zusammenhang. Kleine Änderung der  $\Delta G$ -Werte haben eine große Änderung des  $K_d$ -Wertes zur Folge. Die geringe Änderung der  $K_d$  wiederum erklärt sich durch die Betrachtung der beiden thermodynamischen Parameter  $\Delta H$  und  $\Delta S$ .

Aus der Auftragung  $T\Delta S$  gegen  $\Delta H$  ergibt sich ein linearer Zusammenhang. In dem Maße, wie sich die Enthalpie günstig entwickelt, nimmt die Entropie ab. Würden sich beide Parameter absolut gleich entwickeln, würde die Steigung bei 1 liegen. Die Änderung des  $\Delta G$  Wertes wäre dann gleich 0. Die Steigung der linearen Gleichung von 0.74 jedoch zeigt, daß sich die beiden Parameter nicht absolut gleich entwickeln und dadurch kompensieren. Die Enthalpieänderung ist demnach die treibende Kraft der Bindung des Inhibitors. Die Kompensation der günstigen Enthalpieänderung durch eine ungünstige Entropieänderung wird als ein thermodynamisches Phänomen beschrieben, welches man als Enthalpie-Entropie-Kompensation bezeichnet [133]. Dieses Phänomen wird häufig bei Wechselwirkungen zwischen Liganden und Protein beobachtet und in Zusammenhang mit „extrathermodynamischen“ Ursachen, Ursachen, die sich nicht durch die Gesetze der Thermodynamik beschreiben lassen, kontrovers diskutiert.

Insbesondere bei Mutationsstudien konnte das Phänomen häufig beobachtet werden [62]. Die Untersuchung solcher Phänomene in Hinsicht auf „extrathermodynamische“ Ursachen gilt jedoch als umstritten und deren Aussagekraft bleibt unklar [181]. Daher wurde von einer Untersuchung unter diesen Gesichtspunkten hier abgesehen.



**Abbildung 3.16:** Überblick der Einzelbeiträge an der Interaktion zwischen dem Inhibitor der Inhibitorklasse 3 und Nef<sub>SF2</sub>. a) Vergleich der ITC-Daten von CD4<sup>+</sup> (siehe Kapitel 3.5.2), SH3(A1) und A1-CD4. b) Vergleich der im ITC-Experiment ermittelten Dissoziationskonstanten. c) Auftragung von  $\Delta G$  gegen  $K_d$ . d) Auftragung von  $\Delta H$  gegen  $T\Delta S$ . e) Vergleich von  $\Delta H$  gegen  $T\Delta S$ . Die thermodynamischen Daten zeigen unterschiedliche Beiträge der einzelnen Domänen zur Affinität zwischen dem Inhibitor und Nef. Insgesamt ergibt die Kombination aus beiden Domänen ein Fusionsprotein mit einer hohen Affinität ( $K_d = 26$  nM). Für die Änderung der Relation  $T\Delta S$  zu  $\Delta H$  ergibt sich eine lineare Korrelation.

### 3.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen den Inhibitorklassen und Nef *in vivo*

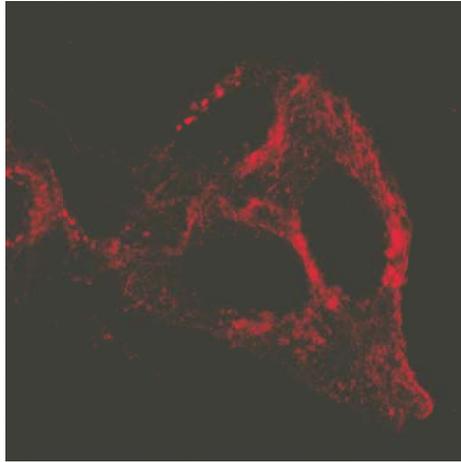
Parallel zur *in vitro* Analyse wurden die Inhibitoren der Inhibitorklassen 1, 2 und 3 im eukaryotischen Zellsystem getestet. In verschiedenen Zelllinien wurden die Inhibitor-konstrukte zusammen mit Nef transfiziert und mit mikroskopischen Methoden oder in der Durchflußcytometrie untersucht. Im Fokus standen hier vor allem die Untersuchung der Inhibitoren hinsichtlich der Stabilität in den Zellen und die Lokalisation in Anwesenheit oder Abwesenheit von Nef. Nef wurde in den Zellen als Fusionsprotein mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) exprimiert und über die Fluoreszenz nachgewiesen. Die Inhibitoren wurden hingegen indirekt über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert. Dazu wurden wahlweise am N- oder C-Terminus des Inhibitors ein HA-tag (Hemagglutinin-Epitop) exprimiert (siehe Kapitel 3.1), der durch den Antikörper gebunden wird. Bis auf die Inhibitorklasse 2 zeigten alle Inhibitoren eine gute Expressionsrate und keine Anzeichen von Toxizität in HeLa und CD4- und CCR5-positiven CHO (CHO++) Zellen. Aufgrund der geringen Expression wurde von einer *in vivo* Analyse der Inhibitorklasse 2 abgesehen. Die Inhibitoren wurden jeweils zur Kontrolle auch einzeln transfiziert und beobachtet. Für alle Inhibitoren gilt, daß eine deutliche Interferenz mit dem Phänotyp der Wildtyp-Zellen nicht auftrat.

In dem folgenden Abschnitt wird nun insbesondere die *in vivo* Analyse des Inhibitors A1-CD4 dargestellt. Aus Kapitel 3.2.3 geht hervor, daß dieser Inhibitor *in vitro* die besten Ergebnisse zeigte.

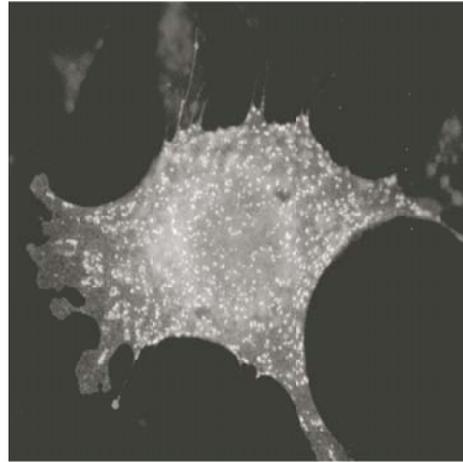
#### 3.3.1 Die Lokalisation von Inhibitor A1-CD4 und Nef in der Zelle

Zunächst wurden zur Kontrolle der Inhibitor A1-CD4 und Nef jeweils separat in HeLa Zellen transfiziert und durch konfokale Mikroskopie untersucht. Abb. 3.17 links zeigt eine repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahme von drei HeLa Zellen unter Fluoreszenzlicht, die mit dem Inhibitor mp-A1-CD4 transfiziert wurden. Die Visualisierung erfolgte durch den fluoreszenzmarkierten  $\alpha$ -HA-Antikörper, wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben. In allen drei Zellen liegt der Inhibitor überwiegend an Membranen vor. Neben der Plasmamembran scheinen auch cytosolische, punktar-tige Strukturen und perinukleäre Bereiche betroffen zu sein. Dies sind vermutlich Vesikel oder auch Akkumulationen des Inhibitors.

Die Verteilung von Nef ist nur teilweise ähnlich zu der des Inhibitors. Neben der Plasmamembran können ebenfalls kleinere vesikuläre Strukturen und Membranen im perinukleären Bereich nachgewiesen werden, die mit Nef besetzt sind. Abb. 3.17 rechts zeigt diese Verteilung deutlich. Eine genaue Beschreibung der Kompartimente durch Marker (z.B. Endosomen-Marker) war nicht erfolgreich.



mp-A1-CD4

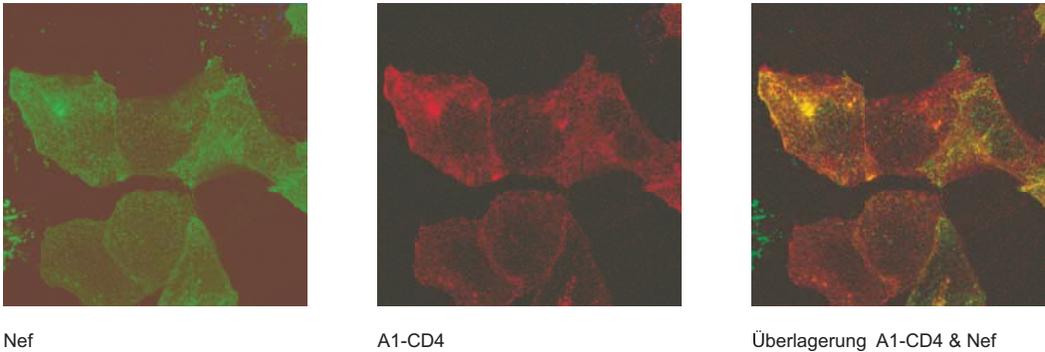


Nef-GFP

**Abbildung 3.17: Lokalisation von Nef und Inhibitor A1-CD4 in der eukaryotischen Zelle. Links:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen des Inhibitors mp-A1-CD4-HA unter Fluoreszenzlicht in HeLa Zellen. Die Verteilung des Inhibitors zeigt eine Lokalisation an Membranen im perinukleärem Bereich und der Plasmamembran. **Rechts:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Nef-GFP unter Fluoreszenzlicht in HeLa Zellen. Nef ist überwiegend an der Plasmamembran, in vesikulären Strukturen im Cytoplasma und im perinukleärem Membranraum lokalisiert.

### 3.3.2 Die Assoziation von Inhibitor A1-CD4 und Nef in der Zelle

Durch Co-Transfektion von Inhibitor und Nef in HeLa Zellen wurde der gegenseitige Einfluß auf die Lokalisation untersucht. Abb. 3.18 zeigt drei konfokalmikroskopische Aufnahmen unter Fluoreszenzlicht einer HeLa Zelle. Die linke und mittlere Aufnahme repräsentieren die beiden unterschiedlichen Fluoreszenzkanäle, die linke für die Wellenlänge von GFP und die mittlere für die des Antikörper-Fluorophors. Durch distinkte Exzitationswellenlängen lassen sich Inhibitor und Nef Protein getrennt voneinander in einer Zelle zeigen. Die rechte Abbildung zeigt die Überlagerung der Fluoreszenzsignale. Die gelb gefärbten Bereiche verdeutlichen die Positionen, wo Nef und Inhibitor zusammen vorliegen. Dies deutet auf eine *in vivo* Bindung zwischen Inhibitor und Nef hin.



**Abbildung 3.18: Co-Lokalisation von Nef und Inhibitor A1-CD4 in der eukaryotischen Zelle.** Links: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Nef-GFP unter Fluoreszenzlicht in HeLa Zellen nach Co-Transfektion mit dem Inhibitor. Mitte: Konfokalmikroskopische Aufnahmen des Inhibitors mp-A1-CD4 unter Fluoreszenzlicht in HeLa Zellen nach Co-Transfektion mit Nef. Rechts: Überlagerung der Fluoreszenzsignale der linken und mittleren Aufnahme. Es zeigt sich an einigen Stellen eine additive Färbung (gelb), wo Nef-GFP und mp-A1-CD4 in der Zelle gebunden vorkommen.

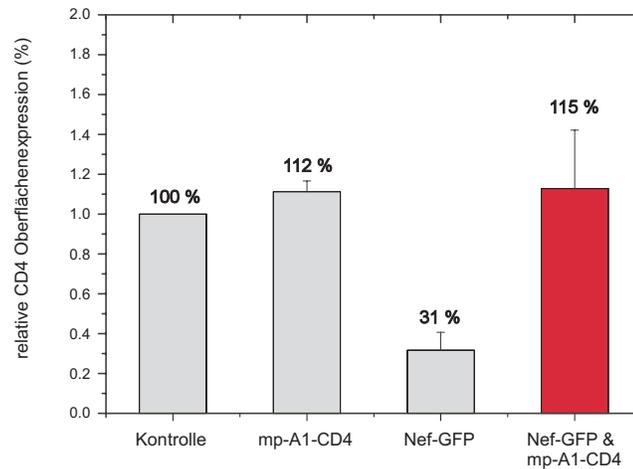
### 3.4 Charakterisierung der Inhibitor-Wirkung auf Nef *in vivo*

#### 3.4.1 Inhibition der Nef-vermittelten Internalisierung von CD4, CCR5 und MHCI

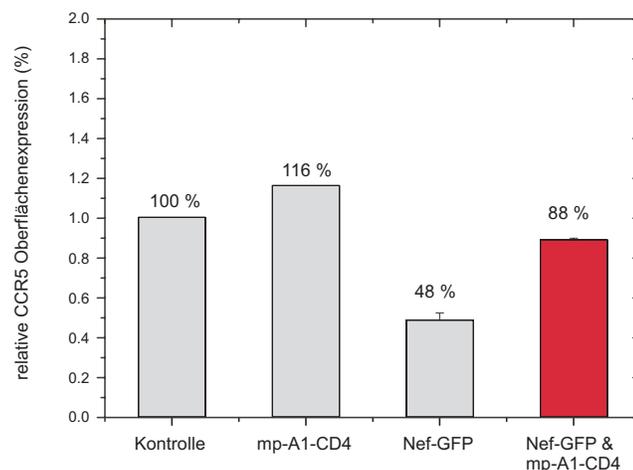
Die Internalisierung der Oberflächenrezeptoren CD4, MHCI und CCR5 von der Plasmamembran gehört zu den wichtigen Funktionen des Nef Proteins [88, 26, 142]. Z.T. ist die Bezeichnung „Internalisierung“ nicht ganz zutreffend, da sich die Reduktion der Protein-Oberflächendichte wie im Falle von CD4 nicht nur aus einem endocytotischen Mechanismus sondern auch aus einer Unterbindung von Recycling-Prozessen ergibt. Trotzdem wird der Einfachheit halber einheitlich der Begriff „Internalisierung“ für die Reduktion der Oberflächendichte verwendet.

Anhand der Durchflußcytometrie ist es möglich diese Nef Funktion zu beobachten. Nach Markieren der Oberflächenrezeptoren mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern können sie im FACS quantifiziert werden. Dadurch werden Aussagen über die Nef-vermittelte Internalisierung von MHCI, CD4 und CCR5 möglich. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Simone Giese der Arbeitsgruppe von Dr. Oliver Fackler an der Universität Heidelberg durchgeführt.

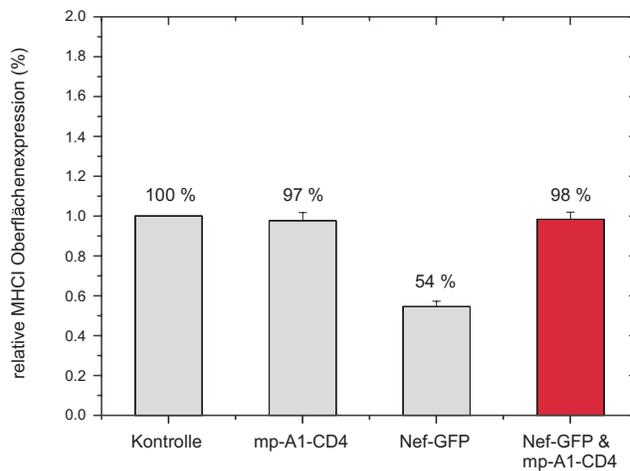
Abb. 3.19, 3.20 und 3.21 zeigen die Quantifizierung dieser Oberflächenrezeptoren in Gegenwart von Nef und in Gegenwart des Inhibitors.



**Abbildung 3.19: Die Wirkung des Inhibitors auf die Nef-vermittelte CD4-Internalisierung.** Im Durchflußcytometer wurde die Expression von CD4 in Gegenwart von Nef und Inhibitor auf CD4- und CCR5-positiven CHO Zellen untersucht. Der Inhibitor mp-A1-CD4 stört die Nef Funktion. In Gegenwart von mp-A1-CD4 wird die Nef-vermittelte CD4-Internalisierung erfolgreich inhibiert. Die Werte stellen das Mittel aus unabhängigen Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung dar.



**Abbildung 3.20: Die Wirkung des Inhibitors auf die Nef-vermittelte CCR5-Internalisierung.** Im Durchflußcytometer wurde die Expression von CCR5 in Gegenwart von Nef und Inhibitor auf CD4- und CCR5-positiven CHO Zellen untersucht. Der Inhibitor mp-A1-CD4 stört die Nef Funktion. In Gegenwart von mp-A1-CD4 wird die Nef-vermittelte CCR5-Internalisierung größtenteils inhibiert.



**Abbildung 3.21: Die Wirkung des Inhibitors auf die Nef-vermittelte MHC I-Internalisierung.** Im Durchflußcytometer wurde die Expression von MHC I in Gegenwart von Nef und Inhibitor auf MHC I-positiven CHO Zellen untersucht. Der Inhibitor mp-A1-CD4 stört die Nef Funktion. In Gegenwart von mp-A1-CD4 wird die Nef-vermittelte MHC I-Internalisierung inhibiert.

Die Gegenwart des Inhibitors mp-A1-CD4 wirkt sich signifikant auf die Proteintransport-Funktionen von Nef aus. Wie in Abb. 3.19 deutlich wird, verhindert der Inhibitor die CD4-Internalisierung durch Nef. Wird Nef alleine transfiziert, so reduziert es die Oberflächenexpression von CD4 um ca. 70%. Wird Nef mit mp-A1-CD4 co-exprimiert, so kann der Effekt aufgehoben werden und zudem nimmt die Oberflächendichte an CD4 zu. Diese Steigerung läßt sich bis jetzt nicht erklären. Sie liegt allerdings im Fehlerbereich des Experiments. Ähnlich verhält es sich bei der Wirkung des Inhibitors auf die Oberflächenexpression von CCR5. Nef reduziert die Oberflächendichte des Co-Rezeptors CCR5 um ca. 50%. In Gegenwart von mp-A1-CD4 sinkt diese Aktivität auf ca. 10%.

In Abb. 3.21 ist der Effekt von Nef auf die Oberflächendichte von MHC I veranschaulicht. Wie schon zuvor inhibiert mp-A1-CD4 die Nef-Funktion und erhält damit die Oberflächendichte an MHC I auf den Zellen. Abb. 3.19-3.21 sind Auswertungen aus unabhängigen Dreifachbestimmungen. In Kontrollversuchen mit Oberflächenrezeptoren, die nicht durch Nef internalisiert werden, wurde eine Beeinflussung des Zelltransports durch den Inhibitor nicht beobachtet. Die Versuche zeigen, daß die Präsenz des Inhibitors die Funktion von Nef im Bereich des Proteintransports signifikant stören kann.

### 3.4.2 Proteasomentargeting des Nef-Inhibitor-Komplex durch das Ubiquitynylierungsmotiv

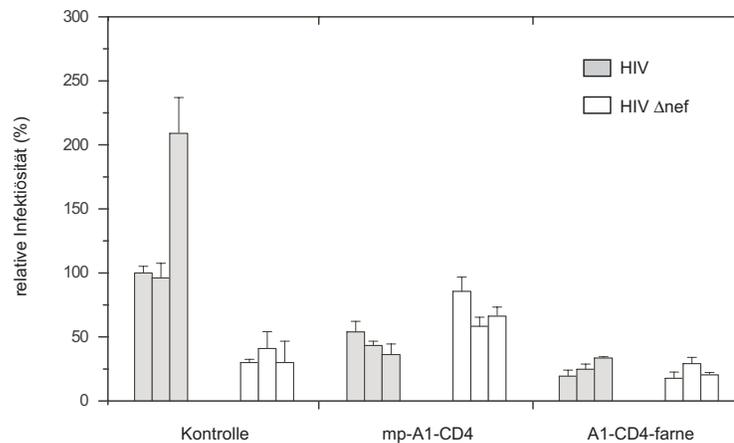
Durch ein zusätzliches Ubiquitynylierungsmotiv, das aus NF- $\kappa$ B abgeleitet wurde, sollte der Versuch unternommen werden, den Nef-Inhibitor-Komplex von der Membran weg zum proteolytischen Abbau im Lysosomen oder am Proteasomen zu dirigieren. Hierfür wurde C-terminal das Motiv in die Sequenz des Inhibitors eingefügt. Dadurch, daß die Entwicklung dieses Inhibitors zeitlich parallel zu den Versuchen aus Kapitel 3.2.3 durchgeführt wurde, entstand der Inhibitor noch in der Reihen-

folge der Domänen CD4-A1. Der Inhibitor mp-CD4-A1-Ubi wurde in Zellen auf Co-Lokalisation und Wirkung auf CD4-Expression hin in Gegenwart von Nef getestet.

Im Vergleich mit mp-A1-CD4 konnte jedoch kein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Der Versuch den Nef-Inhibitor-Komplex am Proteasomen zu lokalisieren war nicht erfolgreich.

### 3.4.3 Inhibition der Infektiosität von HIV

Das Nef Protein ist für die Steigerung der Infektiosität von HI-Viren wichtig [41, 183]. Daher wurde der Inhibitor auch hier hinsichtlich seiner Wirkung überprüft. Wildtyp und  $\Delta$ nef Viren wurden in Gegenwart des Inhibitors produziert. Dies erfolgte durch die Co-Transfektion von proviraler DNA und dem Gen des Inhibitors in 293T-Zellen. Die aus diesem Replikationszyklus entstandenen Virionen wurden anschließend geerntet und TZM-Zellen mit der 1 ng p24CA entsprechenden Menge des Virusstocks infiziert. Die TZM-Zellen tragen ein entsprechendes Reporter-gen-System, das auf einem  $\beta$ -Laktamase induzierten Farbumschlag basiert, der sich quantifizieren läßt. Hieraus läßt sich die Infektiosität der eingesetzten Virionen ermitteln.



**Abbildung 3.22: Die Wirkung des Inhibitors auf die Nef-vermittelte Infektiosität der Viruspartikel.** Im Infektionsassay wurden die Inhibitoren mp-A1-CD4 und ein farnesylierter Inhibitor A1-CD4-farne getestet. Durch Co-Transfektion von proviraler DNA und Inhibitor wurde ein Virusstock hergestellt, mit dem TZM-Zellen infiziert wurden. Aus dem Farbumschlag der  $\beta$ -Galaktosidasefärbung der Zellen wurde die relative Infektiosität berechnet. Gezeigt wurde der Mittelwert der Dreifachbestimmung und Standardabweichung für je 3 unabhängige Ansätze.

Abb. 3.22 zeigt die Auswertung dieses Infektions-Assays. Neben dem Inhibitor mp-A1-CD4 wurde ein zweiter Inhibitor erprobt, der statt des N-terminalen Myristoyl-Palmitoyl-Membranankers einen C-terminalen Farnesyl-Membrananker trägt. Beide Inhibitoren, mp-A1-CD4 und A1-CD4-farne, hemmen die Nef-vermittelte Infektiosität der Wildtyp Virionen vergleichbar gut. Die Kontrolle zeigt die normale Infektiosität durch Nef und den Einfluß der Deletion des nef-Gens, die die Infektiosität der Virionen reduziert. In Gegenwart des Inhibitors wird die Infektiosität der Wildtyp Virionen auf ein ähnliches Niveau reduziert. Dies indiziert eine starke Störung

der Nef Funktion, die maßgeblich durch den Inhibitor verursacht wird. Interessanterweise scheint der farnesylierte Inhibitor eine etwas stärkere inhibitorische Wirkung zu haben.

Zusammen mit den zuvor gezeigten Effekten des Inhibitors auf die Proteintransportfunktion von Nef ergibt sich hier nun das Bild eines Moleküls, das gezielt Nef Funktionen *in vivo* inhibieren kann.

### 3.5 Charakterisierung der Nef<sub>SF2</sub>-CD4 Interaktion

Die Interaktion zwischen Nef und CD4 stellt für das HI-Virus einen wichtigen Mechanismus dar. Zu Beginn der HIV-Infektion einer Zelle interagiert das Virus mit dem CD4 Glykoprotein und den Co-Rezeptor CCR5 oder CXCR4. Diese Interaktion ermöglicht den anschließenden Eintritt in die Zelle. Nach der Infektion der Zelle ist dessen Präsenz auf der Zelloberfläche jedoch eher nachteilig für das Virus. Superinfektion und die Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems behindern dessen Replikationszyklus. Nef übernimmt daher die Funktion das CD4-Protein zu internalisieren.

Wie bereits erwähnt, zählt diese Nef Funktion zu den sehr früh entdeckten Funktionen von Nef. Trotzdem ist dessen Charakterisierung bis heute jedoch nur teilweise gelungen und wird noch immer kontrovers diskutiert. Bisherige Bindungsstudien zeigen, daß der Komplex aus der cytoplasmatischen CD4 Domäne und Nef *in vitro* instabil ist und präzipitiert. Eine Analyse der Interaktion in Bindungs-Assays wie ITC, SPR oder Gleichgewichts-Fluoreszenztitration ist somit schwierig. Grzesiek et al. (1996) war es nur mit einem Teil der CD4 Domäne von Aminosäure 432 bis Aminosäure 444 möglich im NMR-Spektrum eine Bindung an Nef<sub>BH10</sub> zu zeigen [92]. Hier wurde eine Affinität mit einer Dissoziationskonstanten von 0.5 - 1 mM festgestellt, was einer sehr schwachen Interaktion entspricht.

Der in Kapitel 3.2.3 entwickelte Inhibitor der Inhibitorklasse 3 stellen nun ein stabiles und lösliches Fusionsprotein aus CD4 Domäne und SH3 Domäne dar, das auch im Komplex mit Nef *in vitro* nicht präzipitiert. Die präzipitierende Wirkung der Nef-CD4 Interaktion kommt hier weit weniger zum Tragen. Damit ist nun erstmalig die Möglichkeit gegeben, die Nef-CD4 Interaktion genauer zu studieren.

### 3.5.1 Die Rolle von CQC und Dileuzin-Motiv auf CD4

Wie in Abb. 1.4 bereits gezeigt, besteht die cytoplasmatische CD4 Domäne aus 37 AS (422 - 458), die in das Cytoplasma der T-Zelle hineinragen. In Abb. 3.23 ist die cytoplasmatische Domäne nochmal dargestellt. Das diese Domäne derjenige Teil des CD4-Proteins ist, der für die Internalisierung von CD4 verantwortlich ist, konnte bereits Aiken et al. (1994) und Anderson et al. (1994) zeigen [3, 10]. Hierbei wird dem Dileuzin-Motiv ( $p$ SxxxxLL) als Internalisierungsmotiv auf CD4 eine besondere Bedeutung beigemessen. Durch Mutagenese wurden diese Reste zu Alanin mutiert und die Inhibitor Mutante A1-CD4-LLAA entwickelt und im ITC-Experiment auf ihre Affinität hin zu Nef getestet.

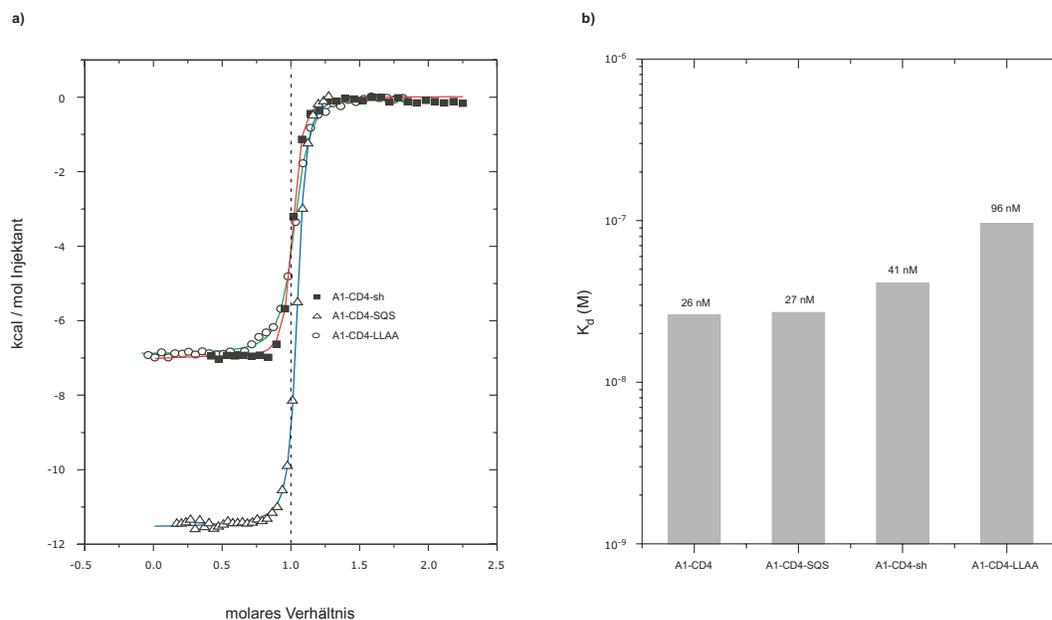


422SRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTCQCPHRFQKTCSP1458

**Abbildung 3.23: Übersicht über die Aminosäuresequenz und Struktur der cytoplasmatischen CD4 Domäne.** In Grün sind die potentiellen Bindungsstellen für Nef, die Aminosäuren Leuzin 438 und 439, sowie in Rot die beiden Cysteine 445 und 447, dargestellt.

Bei weiterer Betrachtung der in Abb.3.23 dargestellten Aminosäuresequenz kann spekuliert werden, daß zwei Cysteine an Position 445 und 447 neben dem Dileuzin-Motiv eventuell auch an der Bindung an Nef beteiligt sind. Diese Cysteine binden normalerweise über einen intermolekularen Zinkfinger die Tyrosinkinase Lck und wirken bei der Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptorkomplexes mit [114]. Auch hier wurden die Reste mutiert, in diesem Fall zu Serin, um möglichst den Charakter der Struktur aufrechtzuerhalten, und in der ITC kalorimetrisch auf die Affinität zu Nef getestet.

Die dritte Mutante des Inhibitors, die hier untersucht wurde, ist eine Verkürzung der CD4 Domäne A1-CD4-short (A1-CD4-sh). Die CD4 Domäne wurde C-terminal um 14 Aminosäuren verkürzt. Damit sollte untersucht werden können, ob weitere Reste C-terminal vom Dileuzin-Motiv zur Affinität zu Nef beitragen. Sollte der C-terminale Teil der CD4 Domäne keine Rolle für die Nef-CD4 Interaktion spielen, so würde dies die Möglichkeit eröffnen, den Inhibitor weiter zu verkleinern.



**Abbildung 3.24: Kalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen Inhibitor A1-CD4-SQS, A1-CD4-LLAA und A1-CD4-sh und Nef<sub>SF2</sub>.** a) Die ITC-Experimente. Eine 4  $\mu\text{M}$  Nef (1-210)-Lsg. wurde mit einer zehnfach höher konzentrierten Liganden-Lsg. im ITC bei 15°C in 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl und 0.5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol titriert. b) Vergleich der im ITC ermittelten Dissoziationskonstanten. Im Gegensatz zur Mutation der Cysteine und Verkürzung des C-Terminus wirkt sich die Mutation des Dileuzin-Motivs deutlich auf die Affinität zu Nef aus.

**Tabelle 3.6: Tabellarische Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter der Interaktion zwischen Nef<sub>SF2</sub> und Inhibitor A1-CD4-SQS, A1-CD4-LLAA und A1-CD4-sh.** Alle im ITC-Experiment bestimmten kalorimetrischen Daten wurden, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, ausgewertet.

	$K_d$ (nM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n
A1-CD4-SQS	27	-9.978	-11.500	-0.0053	-1.521	1.03
A1-CD4-sh	41	-9.737	-7.035	0.00938	2.702	0.98
A1-CD4-LLAA	96	-9.253	-6.910	0.00815	2.348	1.1

In Abb. 3.24 sind die Daten der ITC-Messungen dargestellt und in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Die Mutation der Cysteine zu Serin hat keine Auswirkung auf die Affinität zwischen dem Inhibitor A1-CD4-SQS und Nef. Die Verkürzung des C-Terminus von CD4 wirkt sich nicht signifikant auf die Affinität zwischen Nef und Inhibitor aus, jedoch wird eine kleine Abnahme der Affinität ermittelt.

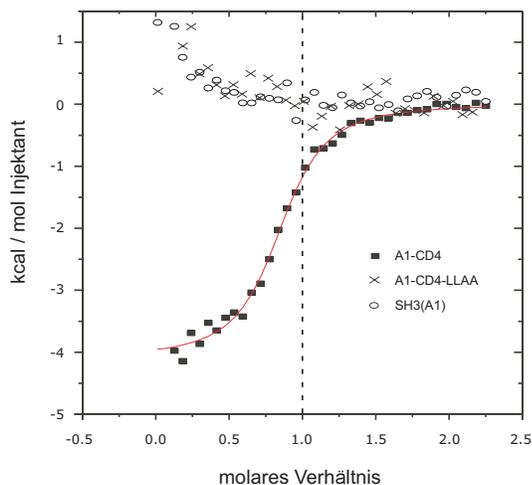
Die Mutation des Dileuzin-Motivs hingegen führt zu einem Affinitätsverlust. Statt 25 nM liegt die Dissoziationskonstante nur noch bei 96 nM. Das lässt vermuten, daß das Dileuzin-Motiv aus CD4 direkt an der Bindung an Nef beteiligt ist und nicht nur indirekt bei der Internalisierung von CD4 eine Rolle spielt. Diese Vermutung konnte im folgenden Abschnitt nochmals in der einzelnen Interaktion zwischen Nef

und CD4 bestätigt werden.

### 3.5.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante der Interaktion zwischen Nef<sub>SF2</sub>(AxxA) und der CD4 Domäne des Inhibitors

Bisher wurden bei der Interaktion zwischen Nef und dem Inhibitor die Beiträge beider Domänen, CD4 und SH3, in der Summe als Fusionsprotein betrachtet. Die Nef-SH3 Interaktion ist weitgehend charakterisiert, doch die der CD4 Domäne nicht. Es stellt sich nun die Frage, ob sich die Nef-CD4 Interaktion näher untersuchen läßt, wenn die Nef-SH3 Interaktion unterbunden wird. Wirkt die SH3 Domäne auch ohne Bindung an Nef stabilisierend auf die Nef-CD4 Interaktion?

Durch Mutation des PxxP-Motivs auf Nef zu Alanin (eigentlich PxxPxR zu AxxA-xA) wurden die SH3 Bindungsstelle auf Nef mutiert. Wie in Abb. 3.25 zu sehen, bindet die SH3(A1) Domäne nicht an Nef(AxxA). In dem anschließenden ITC-Experiment wurde die Interaktion zwischen Nef(AxxA) und dem Inhibitor A1-CD4 gemessen. Durch Anpassung der Gleichung 5.20 an die Titrationsdaten konnte eine Dissoziationskonstante von 1.2  $\mu$ M bestimmt werden. Dieser Wert weist im Gegensatz zu dem in der Literatur für das CD4-Peptid beschriebenen Wert auf eine Bindung mit  $K_d$ -Werten im unteren mikromolaren Bereich hin [92].



**Abbildung 3.25: Kalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen Inhibitor A1-CD4, A1-CD4-LLAA und SH3(A1) Domäne und Nef<sub>SF2</sub>(AxxA).** Zu einer Konzentration von 0.04 mM Nef(AxxA) wurde eine zehnfach höher konzentrierten Liganden-Lösung im ITC bei 25°C in 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl und 0.5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol zutitriert. Der Inhibitor A1-CD4 bindet mit einer Dissoziationskonstanten von 1.2  $\mu$ M an Nef(AxxA). Die Mutante A1-CD4-LLAA und die SH3(A1) Domäne zeigen keine Bindung an Nef(AxxA).

**Tabelle 3.7: Tabellarische Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter der Interaktion zwischen Inhibitor A1-CD4, A1-CD4-LLAA und SH3(A1) Domäne und Nef<sub>SF2</sub>(AxxA).** Alle im ITC-Experiment bestimmten kalorimetrischen Daten wurden, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, ausgewertet.

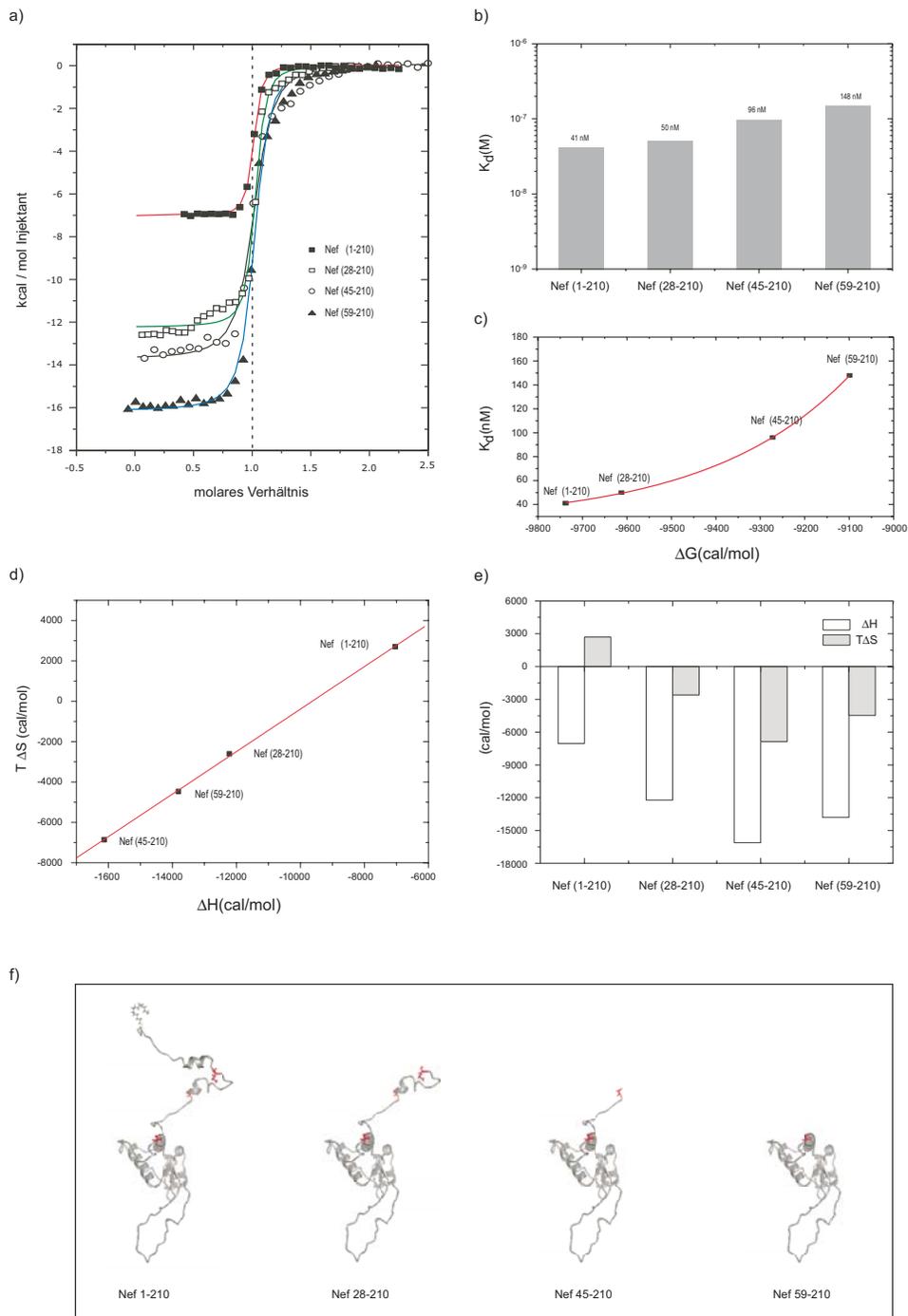
	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n
A1-CD4	1.2	-8.091	-4.096	0.0134	3.995	0.85
A1-CD4-LLAA	-	-	-	-	-	-
SH3(A1)	-	-	-	-	-	-

### 3.5.3 Die Rolle des N-Terminus von Nef<sub>SF2</sub> für die Nef-CD4 Interaktion

Die Struktur des N-Terminus von Nef wurde erstmalig 1999 mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gelöst [83]. 1997 konnten Grzesiek et al. in einem NMR-Titrations-Experiment auf Nef die Bindungsstelle von CD4 lokalisieren, wie es auch in Abb. 1.5 dargestellt und beschrieben wurde. Die für die Interaktion kritischen Reste befinden sich einerseits auf der Kerndomäne von Nef in einer Art Bindungstasche (Nef<sub>SF2</sub>:G<sub>99</sub>,G<sub>100</sub>,L<sub>101</sub>, R<sub>110</sub> und L<sub>114</sub>) und zudem in dem flexiblen N-Terminus (Nef<sub>SF2</sub>:W<sub>61</sub>, L<sub>62</sub> und E<sub>63</sub>). Die Daten in der Veröffentlichung von Grzesiek et al. (1997) wurden mit einem verkürztem Nef ohne flexible N- und C-terminale Schleifen (Nef<sub>BH10</sub>  $\Delta$  2-39,  $\Delta$  159-173) aufgenommen. Folglich ist es nicht auszuschließen, daß N-terminal von Aminosäure 39 noch weitere Aminosäuren an der Bindung zu CD4 beteiligt sind.

Hier wurde nun mit Hilfe des Inhibitorproteins untersucht, ob der N-Terminus eine Rolle bei der CD4-Bindung spielt. Durch Mutagenese wurden N-terminal verkürzte Nef Mutanten generiert und mit dem Nef Wildtyp verglichen. Als vergleichender Parameter wurde hier die Affinität zum Inhibitor mittels ITC ermittelt.

Die strukturellen Daten der Nef-SH3 Interaktion zusammen mit der Studie von Arold et al. (1998) lassen keinen Einfluß der Nef-Länge auf die Affinität, die durch die SH3-Bindung hervorgerufen wird, vermuten [15, 125, 13]. Demnach befinden sich keine kritischen Reste im N-Terminus von Nef, die mit der SH3 Domäne interagieren. In der von Arold et al. (1998) durchgeführten Studie wurden lediglich geringe Unterschiede zwischen Nef( $\Delta$ 1-57) und unverkürztem Nef beschrieben [15]. Hier wird vermutet, daß der flexible N-Terminus von Nef durch die Bindung der SH3 Domäne etwas weniger flexibel wird.



**Abbildung 3.26: Kalorimetrische Charakterisierung der CD4-Bindungsstelle auf Nef durch Analyse der Bindung zwischen N-terminal verkürzten Nef Mutanten und Inhibitor A1-CD4-sh.** a) ITC-Experiment der Bindung zwischen Inhibitor A1-CD4-sh und Nef (1-210), Nef (28-210), Nef (45-210) und Nef (59-210). Eine  $40 \mu\text{M}$  Nef-Lsg. wurde mit einer zehnfach höher konzentrierten Liganden-Lsg. im ITC bei  $15^\circ\text{C}$  in  $10 \text{ mM}$  Tris/HCl pH 8,0,  $100 \text{ mM}$  NaCl und  $0,5 \text{ mM}$   $\beta$ -Mercaptoethanol titriert. b) Vergleich der im ITC-Experiment ermittelten Dissoziationskonstanten der Nef-Varianten. c) Auftragung von  $K_D$  gegen  $\Delta G$ . d) Auftragung von  $\Delta H$  gegen  $T \Delta S$ . e) Vergleich von  $\Delta H$  gegen  $T \Delta S$ . f) Strukturelle Darstellung der Nef Mutanten. Die Verkürzungen im N-Terminus von Nef verringern die Affinität zum Inhibitor.

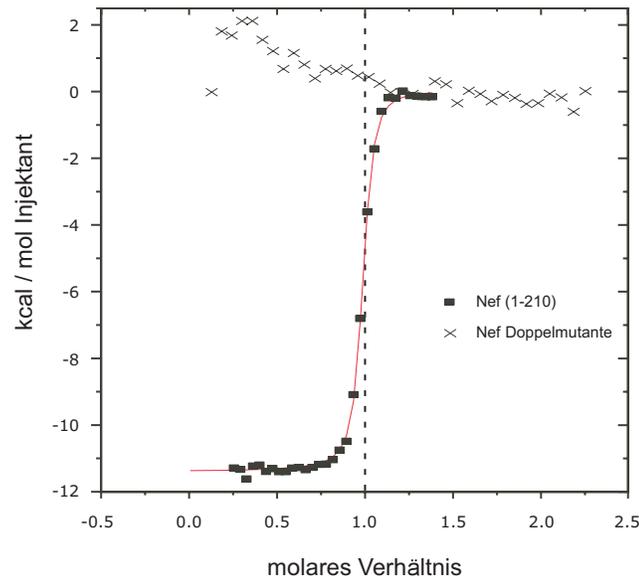
**Tabelle 3.8: Tabellarische Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter der Interaktion zwischen den verkürzten Nef<sub>SF2</sub> Mutanten und dem Inhibitor A1-CD4-sh.** Alle im ITC-Experiment bestimmten kalorimetrischen Daten wurden, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, ausgewertet.

	$K_d$ (nM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n
Nef (1-210)	41	-9.737	-7.035	0.00938	2.702	0.98
Nef (28-210)	50	-9.612	-12.220	-0.00905	-2.607	1.00
Nef (45-210)	96	-9.272	-16.130	-0.0238	-6.857	1.06
Nef (59-210)	148	-9.099	-13.810	-0.0151	-4.472	0.98

In Abb. 3.26 sind die ITC-Daten dargestellt und in Tabelle 3.8 zusammengefaßt. Aus dem Vergleich der ermittelten Dissoziationskonstanten wird ersichtlich, daß der N-Terminus eine Rolle für die Affinität zwischen Nef und CD4 spielt. Je weiter der N-Terminus verkürzt wird, desto mehr nimmt die Affinität zum Inhibitor ab. Signifikant wird der Effekt ab Aminosäure 28. Nef (45-210) und Nef (59-210) zeigen eine zweifach bis dreifach geringere Affinität zum Inhibitor als Nef (1-210). Der Verlust an Affinität erklärt sich aus dem Verlust an freier Enthalpie bei Verkürzung des N-Terminus. Die Änderung der  $\Delta G$ -Werte ist nur gering, was sich jedoch durch den exponentiellen Zusammenhang deutlich auf die  $K_d$ -Werte auswirkt (siehe Abb. 3.26c). Aus der Auftragung  $T \Delta S$  gegen  $\Delta H$  wird deutlich, daß sich ein linearer Zusammenhang ergibt, der eine Enthalpie-Entropie-Kompensation erkennen läßt (siehe Kapitel 3.2.3). Hier ist es vor allem der Entropieverlust, der die energetisch ungünstige Entwicklung ausmacht (Steigung = 1.05). Das Fehlen von strukturellen Informationen über die Nef-CD4 Interaktion macht eine Interpretation der Daten schwierig. Allerdings könnte der Entropieverlust ein Indiz dafür sein, daß die Solvathülle der CD4 Domäne, die sonst durch die Interaktion mit Nef teilweise aufgelöst wird, bestehen bleibt, sodaß freiwerdende H<sub>2</sub>O Moleküle nicht zum Entropiegewinn beitragen können. Generell lassen sich Aussagen über die Ursachen der Entropieänderung nicht eindeutig treffen [159]. Insbesondere bei negativen Werten ist eine Interpretation nicht einfach (siehe Material und Methoden Kapitel 2.5.1). Ein positiver Wert, wie er bei der Interaktion von Nef (1-210) und Inhibitor auftritt, ist jedoch ein deutlicher Hinweis auf eine Desolvatisierung [106].

### 3.5.4 Die Rolle von W<sub>61</sub> und L<sub>62</sub> („WL-Motiv“) auf Nef<sub>5F2</sub> für die Nef-CD4 Interaktion

Die Aminosäuren Tryptophan 61 und Leuzin 62 in Nef wurden oft mutiert, um die Interaktion zwischen CD4 und Nef zu deletieren [81]. Mangasarian et al. (1999) konnten beobachten, daß die Mutation die CD4 Internalisierung in 293T-Zellen hemmt [137]. Nach heutiger Vorstellung bindet die cytoplasmatische CD4 Domäne nicht direkt an diese Aminosäuren sondern in die hydrophobe Tasche auf der Kerndomäne von Nef. Es ist anzunehmen, daß das hydrophobe Tryptophan 61 des „WL-Motivs“ in Wechselwirkung mit der hydrophoben Umgebung der Bindungstasche steht und durch die cytoplasmatische CD4 Domäne aus dieser Bindungstasche verdrängt wird. Im Kapitel 3.5.2 wurde die Interaktion zwischen CD4 und Nef mittels isothermaler Titrationskalorimetrie analysiert. Hier wird nun untersucht welche Auswirkungen die Mutation der beiden Aminosäuren auf diese Bindung hat. Wie in Kapitel 3.5.2 wird zudem das SH3-Bindungsmotiv PxxP mutiert und eine Doppelmutante Nef CAWL/AAAA & PxxPxR/AxxAxA generiert.



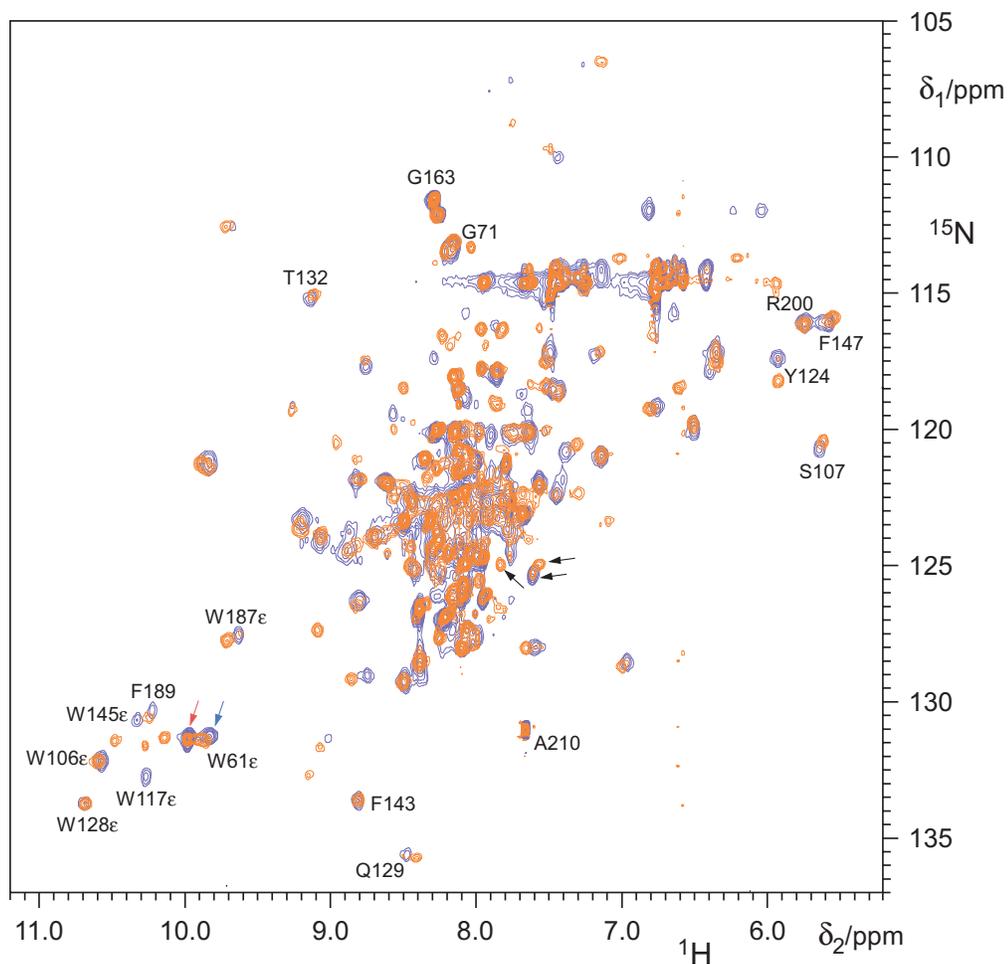
**Abbildung 3.27: Kalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen Inhibitor CD4-A1 und der Doppelmutante Nef CAWL/AAAA & PxxPxR/AxxAxA.** Eine 50  $\mu$ M Lösung der Nef Doppelmutante wurde mit einer zehnfach höher konzentrierten Liganden-Lösung im ITC bei 25°C in 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl und 0,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol titriert. Zum Vergleich wurde ein ITC-Experiment der Interaktion zwischen A1-CD4 und Nef (1-210) dargestellt. Die Mutation des WL-Motivs auf Nef in Kombination mit der Mutation des PxxP-Motivs verhindert die Bindung des Inhibitors A1-CD4 an Nef vollständig.

Abb. 3.27 zeigt die Interaktion zwischen dem Inhibitor CD4-A1 und der Nef Doppelmutante im Vergleich mit der Bindung des Nef Wildtyps (Nef (1-210)). Die Titration der Doppelmutante durch CD4-A1 führt zu keiner thermodynamischen Bindungskurve. Nach Abzug der Pufferkontrolle, CD4-A1 wurde in 10 mM Tris/HCl pH 8,0,

100 mM NaCl und 0.5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol titriert, zeigt sich keine signifikante exotherme Abweichung von der Basislinie. Die anfängliche endotherme Reaktion ergibt sich aus den statistisch normalen Abweichungen der Proteinkonzentrationsbestimmung zwischen der Pufferkontrolle und der Messung (siehe Kapitel 2.5.1). Die Mutation des „WL-Motivs“ auf Nef führt zu einer Deletion der Bindung zwischen Nef und CD4. Das läßt vermuten, daß dieses Motiv an der Bindung zu CD4 beteiligt ist und eine wesentliche Rolle bei der Bindung spielt.

### 3.5.5 Strukturelle Analyse der Nef<sub>SF2</sub>-CD4 Interaktion

Bisher wurde die Interaktion zwischen Nef und CD4 durch eine Bindungsanalyse charakterisiert und die Beteiligung von einzelnen Aminosäuren untersucht. Diese Daten sollen in dem nun folgenden Teil durch eine strukturelle Studie ergänzt werden. Hierfür wurde Nef (45-210) mit stabilen  $^{15}\text{N}$  Isotopen, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, markiert und mit Hilfe der heteronuklearen 2D-Spektroskopie untersucht. Die Betrachtung der NMR-Spektren von Nef Varianten verschiedener Länge deutete darauf hin, daß sich der flexible N-Terminus negativ auf die Signalaufösung auswirkt. Daher wurde die strukturelle Untersuchung der CD4-Bindung an Nef mit N-terminal verkürztem Nef (45-210) durchgeführt. Die Konzentration der Probe wurde auf 0.4 mM eingestellt, da ähnlich wie bei Grzesiek et al. (1997), Nef bei einer Konzentration von ca. 1 mM Nef zur Aggregation tendiert [91].



**Abbildung 3.28:**  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von Nef (45-210) und Nef (45-210)-SH3(A1) Komplex. 250  $\mu\text{l}$  einer 0.4 mM Lsg.  $^{15}\text{N}$ -markiertes Nef (45-210) wurden im 5 mM Tris/HCl Puffer pH 8.0 und 8%  $\text{D}_2\text{O}$  bei 25°C und einer Feldstärke von 600 MHz vor (blau) und nach (orange) Zugabe der SH3(A1) Domäne (0.8 mM) untersucht. Die Bindung der SH3 Domäne induziert die Verschiebung von Resonanzsignalen der Aminosäuren auf Nef (45-210).

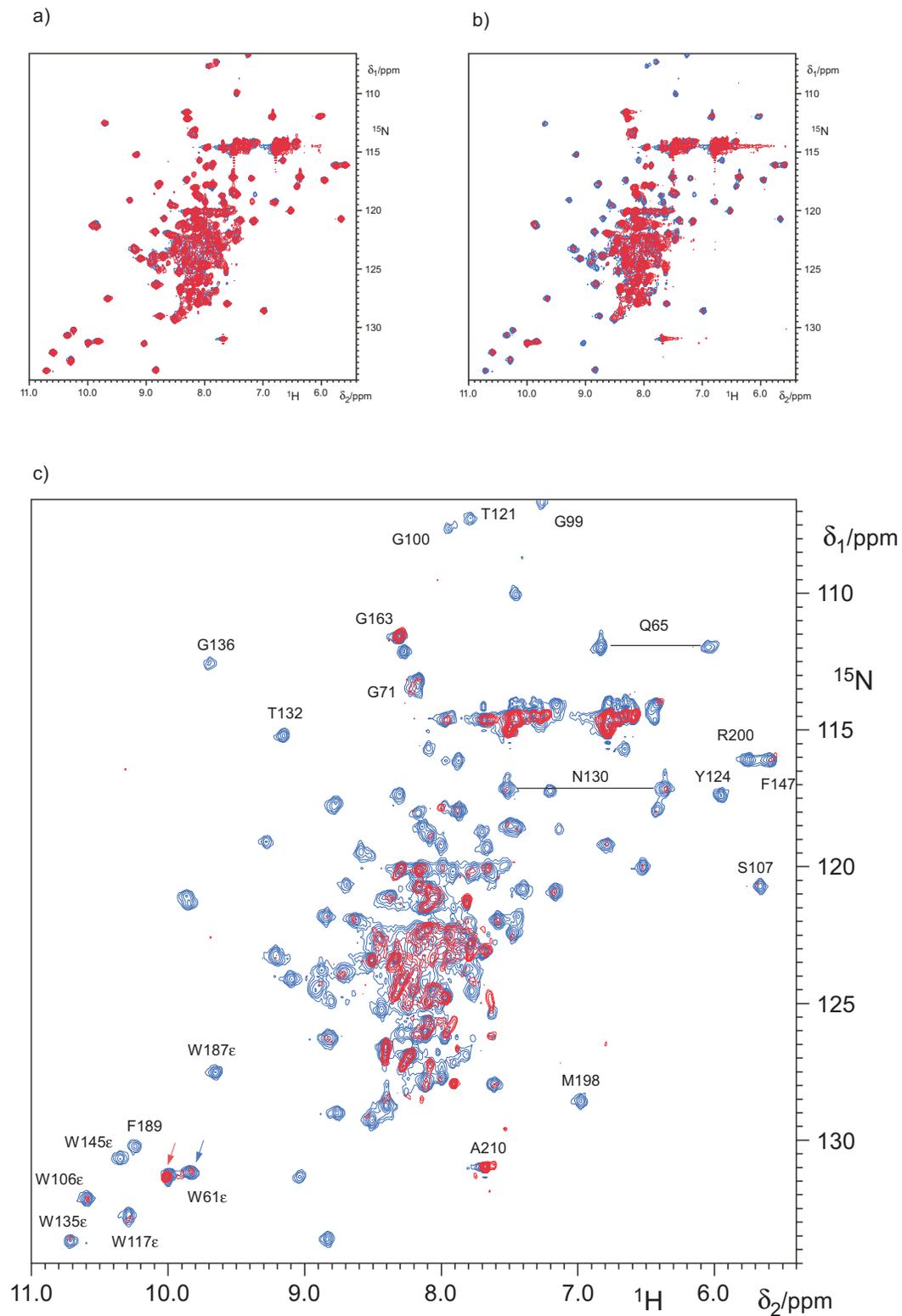
Zunächst wurde ein  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von ungebundenem Nef (45-210) aufgenommen. Anschließend wurde die SH3(A1) Domäne zutitriert und das Experiment wiederholt. Übereinander gelagert sind die HSQC-Spektren in Abb. 3.28 dargestellt. Das Spektrum in blau ist das Grundspektrum der  $^{15}\text{N}$ -markierten Nef (45-210) Probe ohne Zugabe eines Liganden. Die Auflösung und Verteilung der Peaks weist auf ein Protein hin, das aus strukturierten Bereichen und Aminosäuren in „Random coil“ Position (Bereich 120 ppm  $^{15}\text{N}$  und  $8.2 \pm 0.3$  ppm  $^1\text{H}$ ) besteht, wie es für Nef typisch ist. Sie spiegeln unter anderem die gefalteten Bereiche der Kerndomäne und die flexiblen Bereiche der beiden Schleifen (44-74 und 152-184) wieder. Die Auflösung zeigt ungefähr 80% der erwarteten Resonanzsignale. Aus der Zuordnung der Resonanzsignale durch Grzesiek et al. (1997) für Nef<sub>BH10</sub> lassen sich hier einige der Peaks den Aminosäuren von Nef<sub>SF2</sub> zuordnen [91].

Die Bindung der SH3 Domäne an Nef induziert die Verschiebung von ca. 20 Peaks. Eine genaue Analyse der beteiligten Aminosäuren befindet sich in den Veröffentlichungen von Lee et al. (1996) und Arold et al. (1997) [125, 13]. Im Prinzip verschieben sich hier die Peaks der Aminosäuren aus dem Bereich der Prolin-reichen Region (75-81) und Bereiche, die die Konformation der Poly-Prolin-Helix Typ II stabilisieren. Z.B. baut sich eine wichtige Bindung zwischen Isoleuzin 96 in der RT-Schleife der SH3 Domäne und einer hydrophoben Tasche aus Leuzin 91, Phenylalanin 94 und Tryptophan 117 bestehend auf Nef aus.

Das  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum der Nef-SH3 Interaktion ist hier nun ein wichtiger Bestandteil, um zwischen den SH3 und CD4 bedingten Verschiebungen unterscheiden zu können.

In einem zweiten Experiment wurde das  $^{15}\text{N}$ -markierte Nef (45-210) nun mit einem nicht-markierten Inhibitor A1-CD4 (ohne GST-tag) titriert. Hierfür erfolgte die Titration der 0.4 mM Probe in den Schritten 1 : 0.25, 1 : 0.5, 1 : 0.75 und 1 : 1. Abb. 3.29 zeigt drei Titrationspunkte und das Grundspektrum in der Auftragung des  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrums. Wie zu erwarten, induziert die Zugabe des Inhibitors die Verschiebung und Intensitätsänderung der Resonanzsignale, die im Vergleich mit Abb. 3.28 auf die Nef-SH3 Interaktion schließen lassen. Neben diesen Verschiebungen zeichnen sich jedoch auch Änderungen bei Resonanzsignalen ab, die nicht durch die SH3 Domäne induziert werden. Hier nimmt vor allem die Intensität vieler Signale ab, was auf eine Austauschverbreiterung hinweist.

Besonders auffällig ist die Veränderung des Resonanzsignals der Seitenkette von Tryptophan 61. Das Grundspektrum in blau veranschaulicht zwei Zustände des Tryptophans, eine Tief- und eine Hochfeldpopulation (siehe roter und blauer Pfeil). Dies entspricht den beiden möglichen Zuständen dieser Aminosäure. In ungebundener Form steht das Tryptophan 61 mit einer hydrophoben Tasche auf der Kerndomäne von Nef im Austausch [91]. Das hat zur Folge, daß zwei Signalpopulationen entstehen, die den Zustand von Tryptophan 61 außerhalb der Tasche und innerhalb der Tasche repräsentieren [92]. Durch die CD4 Domäne des Inhibitors wird nun das Tryptophan aus dieser Tasche verdrängt. Evident wird dies durch die Änderung der Signalintensität der Tief- und Hochfeldpopulation der Tryptophan 61 Seitenkette. Ausgehend von einem Verhältnis Tief- zu Hochfeldpopulation von 60 : 40 induziert die Zugabe des Inhibitors die Verschiebung des Verhältnis zu ca. 80 : 20.



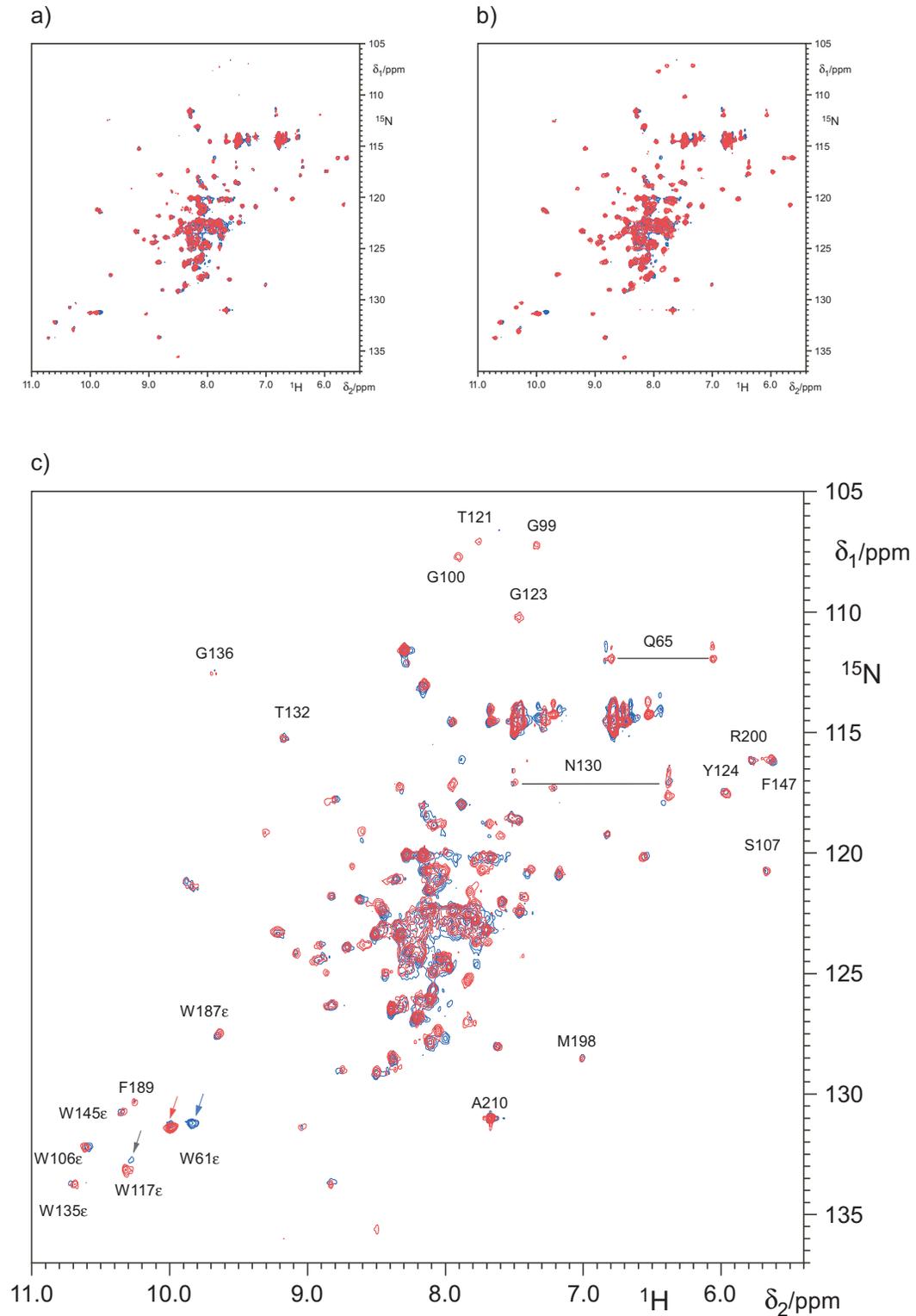
**Abbildung 3.29:** a)  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von 0.4 mM Nef (45-210) und 0.1 mM A1-CD4. b)  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von 0.4 mM Nef (45-210) und 0.3 mM A1-CD4. c)  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von 0.4 mM Nef (45-210) und 0.4 mM A1-CD4. 250  $\mu\text{l}$  einer 0.4 mM Lsg.  $^{15}\text{N}$ -markiertes Nef (45-210) wurden im 5 mM Tris/HCl Puffer pH 8.0 und 8%  $\text{D}_2\text{O}$  mit A1-CD4 titriert. Das Grundspektrum von Nef (45-210) ist jeweils in blau hinter dem Spektrum des Titrationsschrittes aufgetragen. Neben der Verschiebung von Resten, die der Bindung zwischen SH3 und Nef zugerechnet werden, verschieben sich auch Reste auf Nef (45-210), die von der CD4 Bindung betroffen sind.

Abb. 3.29 zeigt, daß die Intensität der Hochfeldpopulation deutlich abnimmt. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz für die Bindung der CD4 Domäne im Nef-Inhibitor Komplex und unterstreicht die Bedeutung des Tryptophan 61 für die Bindung des CD4 Proteins.

Interessanterweise ergibt die Titration von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Nef mit dem Inhibitor in der ursprünglichen Reihenfolge CD4-A1, wie sie schon in Kapitel 3.2.3 erprobt wurde, ein Spektrum, welches auf ein aggregiertes Protein schließen läßt. Bei schrittweiser Titration verschwinden ca. 70% der Peaks und nur die Signale aus dem „random coil“ Bereich bleiben erhalten. Wahrscheinlich aggregiert die nichtgebundene CD4 Domäne und verbindet Nef zu größeren Oligomeren, die im NMR-Experiment außerhalb des Auflösungsbereichs liegen.

Da die Auflösung der HSQC-Spektren hier keine Identifikation von anderen Resten aus der hydrophoben Tasche und deren Beteiligung an der CD4 Interaktion zuläßt, wurde der Versuch unternommen, die Auflösung des Spektrums zu verbessern. Wie beobachtet werden konnte, verbessern Detergenzien die Löslichkeitseigenschaften des Nef Proteins. In einem weiteren NMR-Experiment wurde  $^{15}\text{N}$ -markiertes Nef mit dem Detergenz CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]propanesulfonate) titriert. Dieses Detergenz eignet sich vor allem durch die Möglichkeit, es in höheren Konzentrationen einsetzen zu können, ohne daß es Mizellen bildet (CMC 8-10 mM).

Abb. 3.30 zeigt das  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Nef(45-210) in Gegenwart von CHAPS. Die Zugabe von CHAPS verbessert die Löslichkeit des Nef Proteins, was zudem eine höhere Auflösung des NMR-Spektrums verursacht. Im Vergleich zu dem bisher aufgenommenen Grundspektrum (in blau) nimmt die Intensität von vielen Resonanzsignalen zu und erlaubt somit die Beobachtung weiterer Aminosäuren von Nef in der NMR-Spektroskopie. Zusätzlich zu der Verbesserung der Auflösung verursacht CHAPS die Verschiebung von Resonanzsignalen. Hiervon betroffen sind insbesondere die Resonanzsignale der Aminosäuren Tryptophan 61 und Tryptophan 117. Ähnlich wie zuvor für die Bindung des Inhibitors A1-CD4 beobachtet, verschiebt die Zugabe von CHAPS das Verhältnis der Hochfeld- und Tieffeldpopulation von Tryptophan 61. Zusammen mit der Verschiebung des Resonanzsignals von Tryptophan 117 deutet dies darauf hin, daß CHAPS schon in äquimolaren Konzentrationen mit der hydrophoben Tasche von Nef in Wechselwirkung tritt.



**Abbildung 3.30:** a)  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von 0.4 mM Nef (45-210) und 0.1 mM CHAPS. b)  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von 0.4 mM Nef (45-210) und 0.4 mM CHAPS. c)  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von 0.4 mM Nef (45-210) und 1.0 mM CHAPS. 250  $\mu\text{l}$  einer 0.4 mM Lsg.  $^{15}\text{N}$ -markiertes Nef (45-210) wurden im 5 mM Tris/HCl Puffer pH 8.0 und 8%  $\text{D}_2\text{O}$  mit dem Detergenz CHAPS titriert. Das Grundspektrum von Nef (45-210) ist jeweils in blau hinter dem Spektrum des Titrationsschrittes aufgetragen. Die Zugabe von CHAPS verbessert die Löslichkeitseigenschaften des Nef Proteins und dadurch die Auflösung des NMR-Spektrums. Zudem induziert es die Verschiebung der Resonanzfrequenzen des Tryptophan 61 und von Resten innerhalb der hydrophoben Tasche (Tryptophan 117).

## 3.6 Charakterisierung des myristoylierten Nef<sub>SF2</sub>

Die Myristoylierung des Nef Proteins ist eine wichtige co-translationale Modifikation des Proteins. Nahezu alle Funktionen des Nef Proteins erfordern dessen Myristoylierung, obwohl nur annähernd 60% des gesamten Nef Proteins an der Membran vorliegen [147, 64, 96].

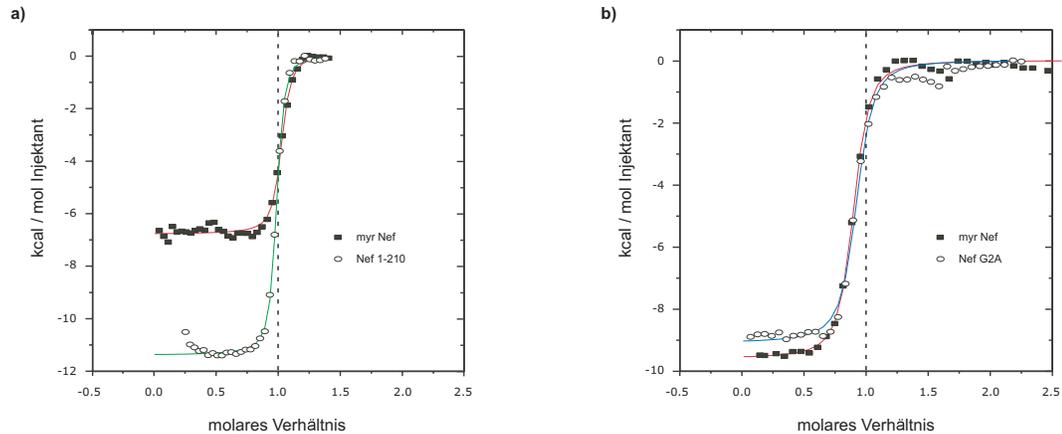
Die Myristoylierung wird durch das hochkonservierte N-terminale Myristoylierungsmotiv MGxxxS(K/R) induziert. Durch die N-Myristoyltransferase (NMT) wird die kurze unverzweigte C14-Fettsäure nach Abspaltung des N-terminalen Methionins amidisch an die Aminogruppe des Glycins gebunden. Die Myristoylierung stellt unter den Lipidierungen die schwächste Membranverankerung dar, die jedoch durch die Beteiligung anderer geladener und hydrophober Aminosäuren im N-Terminus ergänzt wird [80].

Durch die Co-Expression von Nef und NMT war es nun möglich, myristoyliertes Nef (myrNef) zu produzieren und zu untersuchen (siehe Breuer et al. (2006) [34]) .

### 3.6.1 Kalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen myristoyliertem Nef<sub>SF2</sub> und nicht-myristoyliertem Nef<sub>SF2</sub> und zellulären Bindungspartnern

Zunächst wurde hierfür myristoyliertes Nef (myrNef) und nicht-myristoyliertes Nef (Nef(G2A)) durch Co-Expression mit der N-Myristoyltransferase, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, exprimiert und isoliert. Die Myristoylierung wurde durch MALDI-TOF-MS und ESI-MS bestätigt. Das myrNef unterschied sich von Nef(G2A) und anderen Nef Mutanten trotz der hydrophoben Lipidierung nicht in seiner Löslichkeit. Hier konnten die gleichen Bedingungen (Puffer, pH Wert, Salzgehalt usw.) gewählt werden wie für das nicht-myristoylierte Protein.

In der ITC wurde zunächst der Einfluß der Myristoylierung auf die Bindung von zellulären Bindungspartnern wie SH3 und CD4 in Form des Inhibitors untersucht.



**Abbildung 3.31: Kalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen Inhibitor A1-CD4 und SH3 Domäne und myrNef.** a) ITC-Experiment der Bindung des Inhibitors A1-CD4 an myrNef und Nef(G2A). Eine 40  $\mu$ M myrNef-Lsg. oder Nef(1-210)-Lsg. (statt Nef(G2A)) wurde mit einer zehnfach höher konzentrierten Liganden-Lösung im ITC bei 25°C in 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl und 0.5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol titriert. b) ITC-Experiment der Bindung der SH3(wt) Domäne an myrNef und Nef(G2A). Eine 40  $\mu$ M myrNef-Lsg. oder Nef(G2A)-Lsg. wurde mit einer zehnfach höher konzentrierten Liganden-Lösung im ITC bei 25°C in 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl und 0.5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol titriert. Das myrNef und das Nef(G2A) unterscheiden sich nicht in der Affinität zur SH3 Domäne. Die Affinität zum Inhibitor A1-CD4 wird durch die Myristoylierung beeinflusst.

**Tabelle 3.9: Tabellarische Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter der Interaktion zwischen myrNef und nicht-myrNef mit dem Inhibitor A1-CD4.** Alle im ITC-Experiment bestimmten kalorimetrischen Daten wurden, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, ausgewertet.

	$K_d$ (nM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n
Nef(1-210)	26	-10.011	-11.400	-0.00482	-1.3888	1.09
myrNef	52	-9.919	-6.789	0.0105	3.1305	1.01

**Tabelle 3.10: Tabellarische Zusammenfassung des thermodynamischen Parameter der Interaktion zwischen myrNef und Nef(G2A) mit der SH3(wt) Domäne.** Alle im ITC-Experiment bestimmten kalorimetrischen Daten wurden, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, ausgewertet.

	$K_d$ (nM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n
Nef(G2A)	188	-9.004	-9.089	-0.00028	-0.0847	0.9
myrNef	150	-9.312	-9.589	-0.00093	-0.2761	0.87

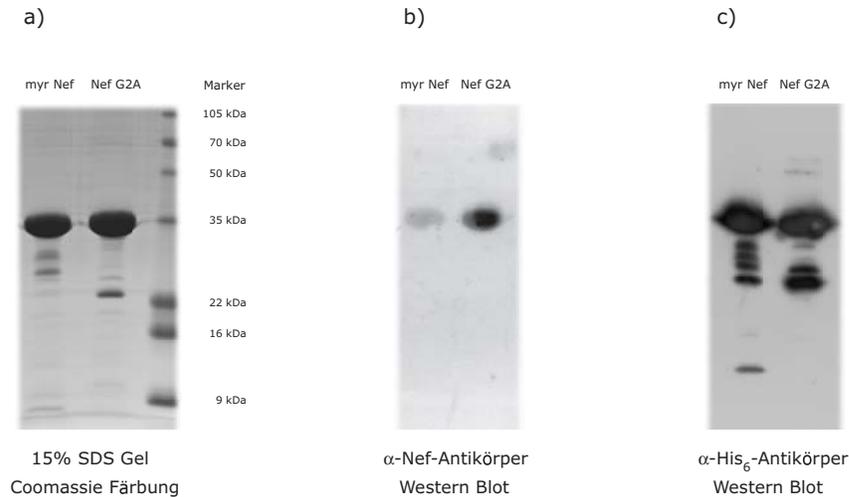
Die Daten der ITC-Experimente zeigen, daß sich die Myristoylierung nicht auf die Bindung zwischen der SH3(wt) Domäne und Nef auswirkt. Die bestimmten kalorimetrischen Daten unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Anders ist es bei der Bindung zwischen Inhibitor A1-CD4 und Nef. Hier wirkt sich die Myristoylierung abschwächend auf die Affinität aus.

Auch die Zusammensetzung der freien Energie der Bindung  $\Delta G$  unterscheidet sich vom myrNef zum Nef(G2A). Während die Entropieänderung bei dem Nef(G2A) eher ungünstig ist, also mit einer Abnahme der Freiheitsgrade einhergeht, ist sie bei dem myrNef positiv und trägt wesentlich zum Wert des  $\Delta G$ s bei. Der beobachtete Effekt ist jedoch nicht besonders signifikant, daher sind weitere Schlußfolgerungen nur schwierig zu treffen.

### 3.6.2 Die Analyse von myrNef<sub>SF2</sub> mittels Western Blot

Die Ergebnisse aus der isothermalen Titrationskalorimetrie weisen auf Unterschiede zwischen myrNef und Nef(G2A) hin. Insbesondere die Bindung der CD4 Domäne im Inhibitor scheint durch die Myristoylierung beeinflußt zu werden. Aus den Daten in Kapitel 3.5.3 geht hervor, daß der N-Terminus von Nef eine Rolle für die Nef-CD4 Interaktion spielt, daher liegt die Vermutung nahe, daß die Myristoylierung Unterschiede im N-Terminus von Nef verursacht. Hier wurde nun mit Hilfe des Western Blots untersucht, ob der N-Terminus von myrNef und Nef(G2A) unterschiedlich zugänglich ist. Der verwendete Antikörper stammt aus der Arbeitsgruppe von Mark Harris an der Universität Leeds und ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen ein spezifisches Epitop auf dem N-Terminus von Nef gerichtet ist. Weitere Angaben zum Epitop liegen aus urheberrechtlichen Gründen nicht vor.

Wie in Kapitel 2.4.6 beschrieben, wurden 8  $\mu\text{g}$  des myrNef und Nef(G2A) Proteins im SDS-Gel analysiert und im Western Blot auf die Bindung zum  $\alpha$ -Nef-Antikörper getestet. Zur Kontrolle wurde ein zweiter Western Blot mit einem gegen den C-terminalen His-tag des Nef Proteins gerichteten Antikörper durchgeführt.



**Abbildung 3.32: Vergleich von myrNef und Nef(G2A) im Western Blot.** a) Darstellung von myrNef und Nef(G2A) im 15% SDS Gel. b) Nachweis von myrNef und Nef(G2A) durch einen gegen den N-Terminus von Nef gerichteten Antikörper im Western Blot. c) Nachweis von myrNef und Nef(G2A) durch einen gegen den C-terminalen His-tag von Nef gerichteten Antikörper im Western Blot. Im SDS-Gel wurden jeweils 8  $\mu$ g des myrNef und Nef(G2A) Proteins aufgetragen und im Western Blot durch monoklonale  $\alpha$ -Nef-Antikörper oder  $\alpha$ -His-Antikörper nachgewiesen. MyrNef wird im Gegensatz zu Nef(G2A) durch den  $\alpha$ -Nef-Antikörper nicht oder nur schwach detektiert, während bei dem Nachweis mit  $\alpha$ -His-Antikörpern keine Unterschiede auftreten.

Abb. 3.32a zeigt zunächst, daß sich das Laufverhalten des myrNefs nicht von dem des Nef(G2A) im 15%-igem Polyacrylamidgel unterscheidet. Beide Banden befinden sich nach dem Marker auf einer Höhe der 35 kDa Marke. Die Untersuchung mit dem  $\alpha$ -Nef-Antikörper hingegen weist auf ein unterschiedliches Bindungsverhalten hin. Das Nef(G2A) wird wesentlich besser durch den Antikörper gebunden und führt dadurch zu einem stärkeren Signal im Western Blot als das myrNef. Daraus ergibt sich, daß das N-terminale Epitop auf dem myrNef schlechter zugänglich ist als auf dem Nef(G2A). Nicht betroffen von der Myristoylierung ist hingegen der C-terminale Bereich von Nef. Der  $\alpha$ -His-tag-Antikörper bindet beide Proteinformen gleich gut (siehe Abb. 3.32c).

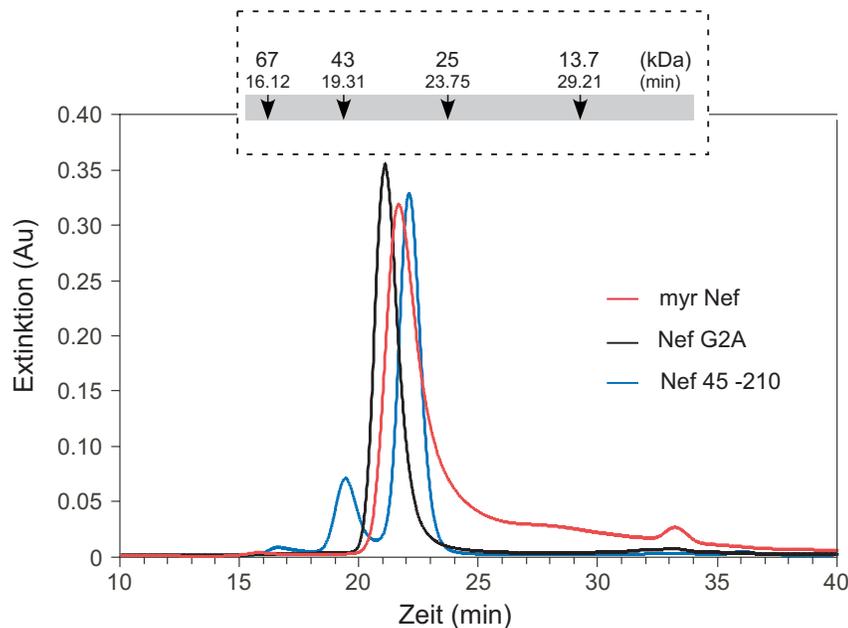
Die Empfindlichkeit gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Proteasen ist hingegen unterschiedlich. Der  $\alpha$ -His-tag-Antikörper detektiert bei der myristoylierten Nef Form wesentlich mehr Banden zwischen 20 und 35 kDa, als bei der nicht-myristoylierten Nef.

### 3.6.3 Die Analyse von myrNef<sub>SF2</sub> mittels analytischer Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation

Durch die vorausgegangenen Untersuchungen ist anzunehmen, daß sich myrNef und Nef(G2A) strukturell unterscheiden und unterschiedliche Bindungsflächen haben. Nach einer Veröffentlichung von Arold et al. (2001) wird ein Modell vorgeschlagen, in dem die Myristinsäure mit der hydrophoben Tasche auf der Kern-Domäne von Nef in Wechselwirkung tritt, die auch als CD4 Bindungsstelle dient [16]. Diese

Konformation würde bedeuten, daß der lange flexible N-Terminus sich zurückfaltet und die gesamte Ausdehnung des Proteins sich verringert.

Hier wurde nun myrNef und Nef(G2A) mit Hilfe der analytischen Gelfiltration untersucht. Auf einer Superdex S75 (10/30) Säule wurde die Retentionszeit von myrNef mit Nef(G2A) und einer verkürzten Nef-Variante, Nef (45-210), detektiert und verglichen. Dieses Experiment wurde unter verschiedenen Pufferbedingungen und Temperaturen mehrmals durchgeführt. Anhand eines Protein-Standards (Amersham Biosciences) konnte die globuläre Größe der Proteine bestimmt werden.



**Abbildung 3.33: Die analytische Gelfiltration von von myrNef und Nef(G2A).** 90  $\mu$ l einer 1 mg/ml Lsg. myrNef, Nef(G2A) oder Nef (45-210) wurden auf einer Superdex S75(10/30) mit einer Laufgeschwindigkeit von 0.5 ml/min photometrisch ( $OD_{280nm}$ ) in 20 mM  $KP_i$  Puffer pH 7.6, 50 mM NaCl untersucht. Die Bestimmung der globulären Größe erfolgte, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, anhand eines Protein-Standards (Amersham Biosciences). MyrNef eluiert bei einer globulären Größe von 33.3 kDa, Nef(G2A) bei 35.7 kDa. Die verkürzte Nef-Variante liegt bei 31.6 kDa.

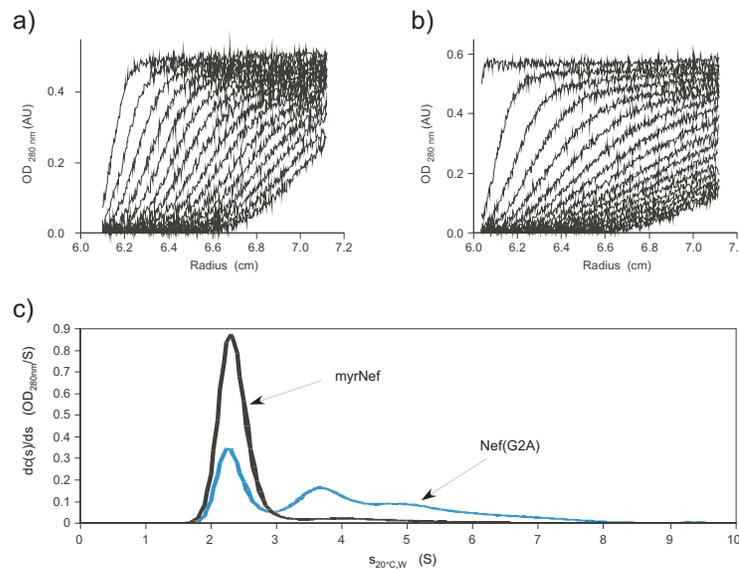
Abb. 3.33 zeigt die Daten der analytischen Gelfiltration von myrNef, Nef(G2A) und Nef (45-210). MyrNef eluiert bei einer Retentionszeit von 21.64 min, was einer Größe von 33.3 kDa entspricht. Es ist damit ca. 2.5 kDa kleiner als das Nef(G2A), welches nach 21.07 min eluiert. Die berechnete Größe liegt bei 35.7 kDa. Eine Nef-Variante, der ein großer Teil des N-Terminus fehlt, Nef (45-210), eluiert hingegen noch später bei 22.07 min und entspricht damit einer Größe von 31.6 kDa. Die Differenz der durch die analytische Gelfiltration bestimmten Größen von Nef(G2A) und Nef (45-210) korreliert mit dem theoretischen Größenunterschied von 4.7 kDa (Nef 1-45 = 4.7 kDa). Die Daten der analytischen Gelfiltration zeigen, daß sich myrNef und Nef(G2A) in ihrer Größe unterscheiden. Zudem konnte gezeigt werden, daß sich eine Deletion des N-Terminus auf die Größe des Nef Proteins auswirkt. Daher ist anzunehmen, daß die Myristoylierung zu einer Konformationsänderung

von Nef führt, die vor allem den N-Terminus von Nef betrifft.

Neben den bestimmten Größenunterschied zwischen myrNef und Nef(G2A) geben die Daten zudem Auskunft über das Monomer/Oligomer-Verhalten der Proteine.

Die Daten der analytischen Gelfiltration zeigen, daß beide Proteine, myrNef und Nef(G2A), in einer homogenen Monomer-Fraktion von der Säule eluieren. Im Gegensatz dazu werden für die verkürzte Nef-Variante, Nef(45-210), neben der Monomer-Fraktion eine weitere Fraktion (ca. 19.5 min) detektiert, die einer größeren Masse entspricht, die auf Dimere oder Trimere hindeutet.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Urbanke an der medizinischen Hochschule Hannover wurden das myrNef und Nef(G2A), in der analytischen Ultrazentrifugation untersucht. Hier bestätigt sich, daß myrNef überwiegend Monomer und nur ca. 8% in einem oligomeren Zustand vorkommen. Für das Nef(G2A) hingegen konnten drei Spezies bestimmt werden, welche wahrscheinlich monomeren, dimeren und trimeren Strukturen entsprechen. Zusammengenommen zeigt sich, daß die Myristoylierung von Nef dessen monomeren Zustand begünstigt, während die nicht-myristoylierte Nef-Form zu Oligomeren tendiert.



**Abbildung 3.34: Die analytische Ultrazentrifugation von myrNef und Nef(G2A).** a) Sedimentationskurve von myrNef . b) Sedimentationskurve von (G2A). c) Auftragung der differentiellen Sedimentationskoeffizienten-Verteilung. 9  $\mu$ M Nef(G2A) oder myrNef wurden in der analytischen Ultrazentrifuge bei 5000 rpm , 20°C in 20 mM Tris/HCl pH 8.0 sedimentiert. Photometrisch erfolgte alle 11 Minuten eine Detektion der optischen Dichte bei 280nm. Die Auswertung wurde mit dem Program SEDFIT durchgeführt. Das myrNef existiert nur in einer monomeren Form bei 2.3 S, während Nef(G2A) sich in Monomere (2.3 S), Dimere (3.7 S) und Trimere (5.1 S) unterteilt.

## Kapitel 4

# Diskussion

### 4.1 Die Entwicklung eines Inhibitors gegen Nef in einem medizinischen Kontext

Die bisherigen Bemühungen zur Entwicklung eines Inhibitors gegen Nef konzentrierten sich überwiegend auf Ansätze der Entwicklung von chemischen Komponenten oder siRNAs ohne die Berücksichtigung der besonderen funktionellen Eigenschaften des Nef Proteins [153, 134, 17, 154]. Der Ansatz eines „Drugdesigns“ im herkömmlichen Sinne mit der gerichteten Entwicklung einer Inhibitorstruktur wurde bis jetzt noch nicht beschrieben. Ein enzymatisches aktives Zentrum, das sich im klassischen Sinne als Ziel einer Inhibitorentwicklung anbieten würde, existiert bei Nef nicht. Ein Hindernis auf dem Weg zu einem Inhibitor stellt mit Sicherheit die Tatsache dar, daß Nef ein sehr flexibles Protein ist, dessen Funktionen bis heute immer noch nicht vollständig charakterisiert sind und die Anzahl an möglichen Bindungspartnern und Funktionen stetig steigt. Nef partizipiert an einer Vielzahl von zellulären Prozessen und beeinflußt fast unüberschaubar gleichzeitig Signaltransduktion, Proteintransport und den viralen Replikationszyklus mit Hilfe seiner Motive.

Der hier entwickelte Ansatz konzentriert sich auf die Inhibition weniger hoch-konservierter funktionaler Bereiche auf Nef. Hier wurde nur mit den Methoden der modernen Biophysik, Biochemie und molekularen Biologie ein Inhibitor entwickelt, der das Nef Protein mit einer hohen Affinität bindet und dessen Funktionen hemmt. Durch zwei Nef-bindende Domänen wurde ein Fusionsprotein generiert, dessen Domänen-Kombination *in vivo* nicht existiert. Zunächst wurden drei unterschiedliche Inhibitor-Klassen generiert und getestet. Letztendlich zeigte jedoch die Domänen-Kombination der Inhibitor-Klasse 3 das größte Potential für einen Nef-Inhibitor. Der Inhibitor der Klasse 3 zeigte eine hohe Affinität zu Nef, wie sie bisher für keinen anderen Bindungspartner von Nef bestimmt werden konnte. Hierdurch ergab sich die Möglichkeit, daß durch die hohe Affinität eventuell auch eine hohe Spezifität für Nef entsteht. In eukaryotischen Zellen zeigten sich keine Anzeichen von Toxizität oder extremen phänotypischen Veränderungen der Zellen. Schließlich konnte die Wirksamkeit des Inhibitors durch mehrere *in vivo* Experimente veranschaulicht werden.

Zunächst war es möglich die Nef-vermittelte Reduktion der Oberflächendichte von CD4 und CCR5 zu inhibieren. Damit wurde erreicht, daß eine wichtige Funktion von Nef gestört wird. Innerhalb des Replikationszyklus von HIV spielt die Kontrolle der Expression und des Transports von CD4 eine wichtige Rolle. Durch mehrere Proteine wird diese Kontrolle ausgeübt. Neben Nef interagieren z.B. auch das akzessorische Protein Vpu oder das Hüllprotein gp160 mit intrazellulärem CD4 und verhindern dessen Expression an der Zelloberfläche [30, 29]. Dadurch wird neben der Superinfektion durch weitere Viren vor allem der Zusammenbau des Virus an der Membran und das Abknospen („Budding“) der Viren erleichtert [30, 42, 121].

Die Vielfalt der viralen Mechanismen zur Kontrolle der CD4 Expression bestätigt dessen Bedeutung für das Virus. Die inhibitorische Wirkung des hier entwickelten Inhibitors auf die Nef-vermittelte Expressionskontrolle könnte demnach die HIV Replikation maßgeblich stören.

Desweiteren konnte gezeigt werden, daß auch die Reduktion der Nef-vermittelten MHC I Oberflächenexpression durch den Inhibitor gehemmt wird. MHC I spielt eine wichtige Rolle bei der Präsentation von viralem Antigen und induziert die zelluläre Immunantwort [196]. Die Nef-vermittelte Kontrolle der MHC I Oberflächenexpression dient also vor allem dem Schutz vor dem Immunsystem [202, 26, 110, 171]. Durch den Inhibitor könnte möglicherweise HIV Antigen mittels MHC I präsentiert und cytotoxische T-Zellen aktiviert werden.

In einem Infektiositäts-Assay konnte schließlich der direkte Effekt des Inhibitors auf den Replikationszyklus von HIV demonstriert werden. Nef steigert die Infektiosität von Viruspartikeln [183, 41]. Durch die Gegenwart des Inhibitors konnte diese Funktion signifikant gehemmt werden.

Zusammenfassend konnte hier ein hoch-affines Fusionsprotein generiert werden, das wesentliche Funktion von Nef erfolgreich inhibiert. Mit einer Größe von 100 Aminosäuren ist der Inhibitor bisher jedoch noch außerhalb der Größenordnung anderer Peptid-Inhibitoren. Hiermit ergibt sich zudem die Frage, wie eine spätere Applikation aussehen könnte. Die Aufnahme des Inhibitormoleküls in Zellen wäre durch seine Größe bedingt schwierig. Einem kleineren Peptid ist es leichter möglich die Zellmembran zu passieren, daher stellt die Reduktion der Inhibitorgröße den ersten Schritt in Richtung dieser Problemlösung dar. Andere Möglichkeiten einer Applikation wäre die Nutzung der Liposomentechnik [117] oder das Anhängen von CPPs, „Cell Penetration Peptides“ [215], kleine positiv geladene, amphipathische Peptide z.B. abgeleitet von dem HIV-Tat Protein oder dem *Drosophila Antennapedia* Protein, die die Zellmembranpassage ermöglichen.

Würde sich die Inhibitorgröße nicht weiter limitieren lassen, so wäre die Gentherapie ebenfalls eine Option für ein größeres Protein. Der heutige Stand der Technik zeigt, daß es prinzipiell möglich ist Menschen damit kurativ zu behandeln.

In speziellen Fall einer Therapie gegen HIV bietet sich insbesondere die Nutzung des lentiviralen Vektorsystems, eines HIV abgeleiteten Vektors, an. Die Therapie mit einem lentiviralen Vektor birgt in sich das Potential eines „site specific drug delivery“ Mechanismus, da man sie so konzipieren könnte, daß sie nur bestimmte

„Targetzellen“ penetrieren [143, 216, 61, 145]. Zudem ist es ein besonderes Merkmal dieser Vektoren, daß sie die DNA in das Genom integrieren und daß sie auch nicht-teilende Zellen (dies im Gegensatz zu retroviral abgeleiteten Vektoren) penetrieren. Die Genehmigung eines Gentherapie-Versuchs mit einem lentiviralen Vektor erhielt erstmals die Universität von Pennsylvania in Zusammenarbeit mit der Firma, VIRxSYS (Gaithersburg, Maryland, USA). Sie konstruierten den HIV-basierten Vektor VRX496 mit einem *env*-Gen von HIV und therapierten damit Patienten auf Basis eines siRNA Mechanismus [136]. Die Behandlung zeigte bislang eine gute Verträglichkeit und positive Auswirkungen auf den Verlauf der HI-Virämie.

**Ausblick:** In der Fortentwicklung des Inhibitors müßte vor allem die Spezifität des Inhibitors für Nef sichergestellt werden. Durch Immunopräzipitation wäre es möglich andere zelluläre Bindungspartner des Inhibitors zu identifizieren. Insbesondere das weitverbreitete PxxP-Motiv als Target des Inhibitors birgt das Risiko von unspezifischen Interaktionen. Durch Mutationsstudien, wie es schon für die SH3 Domäne durchgeführt wurde, könnte die Spezifität für Nef optimiert werden [97]. Auch die Bestimmung der Struktur des Nef-Inhibitor Komplexes könnte hier wichtig sein. Desweiteren wäre eine umfassendere Untersuchung der durch den Inhibitor gehemmten Funktionen von Nef wünschenswert. Insbesondere die Untersuchung im Kontext eines Immunsystems z.B. mit SIV Nef oder im SCID Mausmodell wäre interessant [102]. Hier würde die MHCI Expression auf den HIV-infizierten Zellen im Fokus der Untersuchung stehen. Auch müßte gezeigt werden, daß die inhibitorische Wirkung sich nicht nur auf die Allele SF2 beschränkt, sondern sich ein möglichst breites Anwendungsspektrum für diverse HIV Allelen ergibt.

## 4.2 Die Entwicklung eines Inhibitors gegen Nef im Kontext der Grundlagenforschung

### 4.2.1 Die biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nef Protein und der SH3 Domäne bzw. Inhibitorklasse 1

Die SH3 Domäne wurde hier als Grundbaustein der drei Inhibitorklassen konzipiert und zunächst die Interaktion dieser Domäne mit Nef<sub>SF2</sub> erprobt. Die SH3 Domänen konnten für die *in vitro* Applikation als lösliches, stabiles Protein generiert werden. In Anlehnung an die Veröffentlichung von Hiipakka et al. (1999) wurden zwei Mutanten der RT Schleife generiert und untersucht [97]. Im Vergleich mit der SH3(wt) Domäne wurde durch die Mutationen in der RT Schleife die Affinität zu Nef<sub>SF2</sub> erhöht. Die Mutante SH3(B6) zeigte die höchste Affinität und konnte eine Steigerung um den Faktor 30 induzieren. Die Mutante SH3(A1) steigerte die Affinität um den Faktor 8. Im Gegensatz zu dem in der Veröffentlichung eingesetzten kompetitiven 96-Well-Platten-Bindungsassay konnte hier mit der isothermalen Titrationskalorimetrie die Interaktion zwischen Nef und den SH3 Mutanten untersucht werden [97]. Die ermittelten Dissoziationskonstanten sind etwas schwächer als die in der Veröffentlichung von Hiipakka et al. (1999), jedoch wurden hier auch keine Löslichkeitsprobleme beobachtet und zudem eine andere Allele von Nef verwendet. Die kalorimetrischen Parameter sind mit denen von Arold et al. (1998) vergleichbar. Hier wurde die Interaktion zwischen Nef<sub>LAI</sub>( $\Delta 1 - 57$ ) und Hck-SH3(wt) untersucht und ebenfalls eine Dissoziationskonstante von 1.5  $\mu\text{M}$  ermittelt [15]. Interessanterweise wird bei der Interaktion zwischen unverkürztem Nef und der SH3(wt) Domäne ebenfalls eine erhöhte Affinität festgestellt, obwohl bisher keine Beteiligung von Aminosäuren im N-Terminus von Nef an der Bindung zu der SH3 Domäne beobachtet werden konnte. Hier wird vermutet, daß das unverkürzte Nef eine geordnetere Struktur annimmt als das N-terminal verkürzte Nef. Durch die Bindung der SH3(wt) Domäne kommt es dann bei der verkürzten Nef Variante zu einem höheren Entropieverlust durch Einschränkung der Freiheitsgrade des N-Terminus als bei unverkürztem Nef. Dies könnte ein Ursache für die unterschiedlichen  $K_d$ -Werte sein. Durch die Mutation des PxxP-Motivs zu AxxA in Nef konnte gezeigt werden, daß die Bindung der SH3 Domäne komplett aufgehoben werden kann. Hier wird also vermutet, daß andere Aminosäuren im N-Terminus von Nef keine wesentliche Rolle bei der Nef-SH3 Interaktion spielen. Auch die Interaktion zwischen dem Phenylalanin 94 in Nef und der SH3 Domäne, wie sie von Lee et al. (1996) beobachtet wurde, reicht nicht aus, um eine Bindung zwischen Nef und SH3 Domäne aufzubauen [125].

Die Ergebnisse zeigen die Eignung der SH3 Domäne als „Leadcompound“ für die Entwicklung eines Inhibitors. Hier wurde zunächst nur die SH3(A1) Domäne wei-

terverwendet. Prinzipiell stellt die SH3(B6) Domäne durch die höhere Affinität die für Nef spezifischere SH3 Domäne dar und könnte den inhibitorischen Effekt auf die Nef Funktion im Bereich der Signaltransduktion verbessern. Bisher wurde jedoch noch nicht untersucht, ob die Mutationen nur die Affinität zu Nef verbessern oder ob auch andere Interaktionspartner der SH3 Domäne stärker gebunden werden.

#### 4.2.2 Die biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nef Protein und der Inhibitorklasse 2

Für die Entwicklung der zweiten Inhibitorklasse wurde ein Bindungspartner des Dileuzin-Motivs in der C-terminalen flexiblen Schleife von Nef gesucht. Hierfür wurde die Interaktion zwischen dem  $\beta$ 1-Adaptin und  $\beta$ 2-Adaptin und Nef untersucht. Eine erfolgreiche Entwicklung dieser Inhibitorklasse gelang nicht. Obwohl das Fragment des  $\beta$ 2-Adaptins  $\beta$ 2(279-510) in *E.coli* exprimiert und isoliert werden konnte, war das Expressionsprodukt der Fusion aus diesem Fragment und der SH3(A1) Domäne instabil. Auch in der eukaryotischen Zellkultur konnten die Inhibitoren der Inhibitorklasse 2 nur schwierig exprimiert und untersucht werden. In beiden Versuchsreihen schien das Fusionsprotein zu aggregieren. Warum die Kombination aus beiden Domänen zu einem eher unlöslichen Expressionsprodukt führte, konnte nicht geklärt werden.

Trotzdem konnten parallel zur Entwicklung der Inhibitorklasse 2 aktuelle Fragestellungen in bezug auf die Nef-Adaptorprotein Interaktion erörtert werden. Neben AP2 werden vor allem die strukturell verwandten Proteine AP1 und AP3 als Interaktionspartner von Nef diskutiert [105, 107]. Die Daten wurden bisher auf der Basis von Hefe-Zwei-Hybrid-Assays oder Beobachtungen in Zellkultur mit Deletionsmutanten ermittelt. Durch die hier durchgeführten *in vitro* Experimente wird indiziert, daß Nef die  $\beta$ -Untereinheit von AP1 und AP2 bindet. Die  $\beta$ -Untereinheit kommt auf allen vier Adaptorproteinen vor und damit deutet sich an, daß Nef potentiell in der Lage ist, alle vier Adaptorproteine zu binden.

Die Rolle der Adaptorproteine im Endocytoseweg ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht völlig verstanden. Während AP2 direkt an der Plasmamembran mit dem Rezeptor interagiert und die Ausbildung von Clathrin-Coated Pits induziert, ist AP3 eher bei der Vesikelbildung der Endosomen beteiligt [127]. Für AP4 wird eine Beteiligung bei der lysosomalen Prozessierung der Proteine angenommen [2]. AP1 übernimmt nach neuesten Veröffentlichungen nicht nur eine Rolle beim Vesikeltransport vom TGN zum Endosomen sondern auch beim Rücktransport vom Endosomen zum TGN [67, 141]. Nef reguliert über die Bindung zum Adaptorprotein die Internalisierung von Oberflächenrezeptoren. Über eine Interaktion mit allen vier Adaptorproteinen über eine Untereinheit würde es die Sortierung der internalisierten Proteine an mehreren Stellen auf dem Endocytoseweg simultan beeinflussen. Dadurch könnte

der Recyclingweg eines einmal internalisierten Proteins unterbunden und die lysosomale Degradation induziert werden.

Eine entscheidende Rolle bei dieser Interaktion spielt das Dileuzin-Motiv auf Nef. Das Dileuzin-Motiv ist neben dem Tyrosin-basierten Motiv ( $Yxx\phi$ ) ein zweites wichtiges Proteintransport- oder Sorting-Motiv, welches an verschiedenen Stellen innerhalb des Proteintransports eine wichtige Rolle spielt [126, 94]. Es kommt in verschiedenen Varianten auf einigen Rezeptoren wie dem Mannose-46-Phosphat Rezeptor (ERxxxLL), dem Mannose-6-Phosphat Rezeptor (DxxLL), der invarianten Kette des MHCII (DDxxxLI) oder CD3- $\gamma$  (SDxxxLL) vor. Statt des zweiten Leuzins wird das Dileuzin-Motiv auch öfters durch eine hydrophobe Aminosäure wie ein Isoleuzin abweichend von der Bezeichnung variiert [58]. Zudem ist eine saure Aminosäure 4 bis 5 Aminosäuren proximal des Leuzins wichtig für die Funktionalität des Motives [99]. Eine von Coleman et al. (2006) durchgeführte Studie charakterisierte dieses Motiv auf Nef durch Punktmutationen und zeigte die Bedeutung für die Funktion von Nef [43].

Wo dieses Dileuzin-Motiv auf dem Adaptorprotein bindet, ist jedoch bis heute umstritten. Rodinov & Bakke (1998) und Bremnes et al. (1998) vermuten durch Westernblot-Assays und Phagendisplay-Assays eine Bindung an die kleine  $\mu$ -Untereinheit der Adaptorproteine [170, 32]. Diese Untereinheit bindet ebenfalls das  $Yxx\phi$ -Motiv.

Hier wurde erstmalig *in vitro* im ITC-Experiment und Hefe-Zwei-Hybrid-System-Assay gezeigt, daß das Dileuzin-Motiv von Nef auf der  $\beta$ -Untereinheit bindet. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen von Rapoport et al. (1998) und Jin et al. (2005) [167, 107].

Interessanterweise unterscheiden sich hier die Nef Proteine von HIV-2 und SIV von denen des HIV-1. SIV und HIV-2 Nef verfügen über ein zusätzliches  $Yxx\phi$ -Motiv im N-terminalen Anker und regulieren hierüber die Internalisierung von CD4. Für diese beiden Allelen erscheint die Interaktion zwischen der  $\mu$ -Untereinheit und Nef eindeutig [160].

**Ausblick:** Collins et al. (2002) waren als erste in der Lage den heterotetrameren Komplex aus allen vier Untereinheiten in *E.coli* zu produzieren. Ihnen gelang es, die Kristallstruktur von AP2 zu lösen und wichtige Erkenntnisse über die Untereinheiten zu gewinnen. Durch die Struktur wurde die Bindung des  $Yxx\phi$  Motivs auf  $\mu 2$  veranschaulicht und die dadurch induzierte Konformationsänderungen zur Bindung von Membranen vorgeschlagen [46, 155, 151]. Die hier ermittelten Daten deuten eine Bindung zwischen Dileuzin-Motiv und der  $\beta$ -Untereinheit an. Ausgehend von den bereits durchgeführten Experimenten würde eine Untersuchung der Interaktion zwischen dem gesamten AP2 Komplex und Nef im ITC oder mit anderen biophysikalischen Methoden Sinn machen.

Begonnen wurde bereits mit der Generierung des AP2 Komplexes im pET Duet System. Hier wurden die Gene aller 4 Untereinheiten in die beiden Expressionsvektoren pET-Duet und pRSF-Duet kloniert und mit der Co-Expression in *E.coli* begonnen. Die strukturelle Untersuchung eines AP2-Nef Komplexes mit Hilfe der Kristallographie würde Aufschluß über den Bindungsmechanismus des Dileuzin-Motivs geben, was nicht nur im Interesse der Nef-bezogenen Wissenschaft stünde, sondern generell zum weiteren Verständnis des Proteintransports beitragen könnte. Die Daten der bereits gelösten Struktur von AP2 wären dabei hilfreich.

Zudem wäre es mit dem myrNef möglich, die Bindung an AP2 an künstlichen Membranen zu studieren. Es wurde für AP2 gezeigt, daß es an bestimmte Lipidkompositionen bindet. Insbesondere die  $\alpha$ -Untereinheit und die  $\mu$ -Untereinheit sind dabei beteiligt [76, 172]. Höning et al. (2005) beobachteten, daß die Bindung an das Yxx $\phi$  Motiv oder Dileuzin-Motiv abhängig von der gleichzeitigen Bindung von PtdIns 4.5P<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4.5 Biphosphat) ist [98].

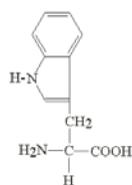
### 4.2.3 Die biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nef Protein und der Inhibitor Klasse 3

Für die Inhibitor Klasse 3 wurde die SH3 Domäne mit der cytoplasmatischen CD4 Domäne fusioniert. Diese Inhibitor Klasse zeigte in der hier durchgeführten Studie die besten Ergebnisse zur Inhibition von Nef<sub>SF2</sub>. Als GST Fusionsprotein konnten die Inhibitoren der Inhibitor Klasse 3 als stabiles, lösliches Protein in *E.coli* exprimiert werden. Die für den Nef-CD4 Komplex beschriebenen Löslichkeitsprobleme wurden hier nicht beobachtet. Allem Anschein nach wirkt sich die Fusion mit den stabilen Proteinen positiv auf die Löslichkeit des Komplexes aus. In der isothermalen Titrationskalorimetrie konnte gezeigt werden, daß beide Domänen, SH3 Domäne und CD4 Domäne, parallel an das Nef Protein binden. Durch die Kombination beider Domänen wurde ein Bindungspartner für Nef geschaffen, der die bisher höchste gemessene Affinität aller bekannter Nef Bindungspartner hat. Prinzipiell wäre es mit diesem Inhibitorprotein möglich, andere, weniger affine Bindungspartner zu verdrängen.

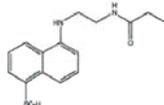
Die in der isothermalen Titrationskalorimetrie bestimmten  $K_d$ -Werte wurden für den Inhibitor CD4-SQS-A1 exemplarisch bestätigt. Hierfür wurde der Inhibitor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und die Affinität zu Nef in der Gleichgewichts-Fluoreszenztitration oder mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie untersucht. Zwischen den Ergebnissen der ITC und den Ergebnissen von Gleichgewichts-Fluoreszenztitration und Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie liegt ein Unterschied von Faktor 2 bis 3 vor (siehe Tabelle 3.5). Dieser geringe Unterschied der  $K_d$ -Werte ist nicht unbedingt ungewöhnlich und liegt innerhalb der Fehlergrenzen [112]. In der SPR wird wie in der ITC ein GST-Fusionsprotein verwendet. Jedoch wird dieses auf der Oberfläche immobilisiert, während in der

Gleichgewichts-Fluoreszenztitration ein Protein mit einem His-tag verwendet wird, was zusätzlich noch eine chemische Modifikation in Form des Fluoreszenzlabels aufweist. Diese Abweichungen könnten schon Änderungen um den Faktor 2 zwischen den Werten der einzelnen Methoden hervorrufen. Trotzdem ist die Divergenz zwischen den Werten der ITC und Gleichgewichts-Fluoreszenztitration und SPR nur geringfügig, sodaß die im ITC bestimmten Werte als bestätigt gelten. Zudem ist anzunehmen, daß die Affinität der Inhibitoren generell etwas höher ist, da eine Dissoziationskonstante von ca. 20 nM sicherlich am unteren Limit des für die isothermale Titrationskalorimetrie empfohlenen (verlässlichen) Meßbereiches befindet.

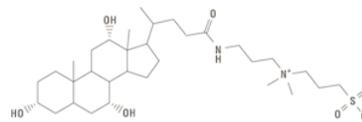
Ein Vergleich aller Inhibitoren der Inhibitor-Klasse 3 untereinander gelang nur mit der isothermalen Titrationskalorimetrie. Für die Gleichgewichts-Fluoreszenztitration wurde versucht das Nef Protein an verschiedenen Positionen nahe der Bindungsstelle von SH3 und CD4 Domäne mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Obwohl Nef über acht Tryptophane verfügt, war die Nutzung der intrinsischen Fluoreszenz nicht möglich, da hier die Zugabe des Inhibitors keine Änderung des Fluoreszenzsignals zeigte. Das Nef Protein konnte selektiv mit dem Umgebungs-sensitiven Farbstoff 1,5-IAEDans markiert werden. Die Titration mit einem Inhibitor der Inhibitor-Klasse 3 induzierte jedoch keine Fluoreszenzänderung, die die Durchführung eines Gleichgewichts-Fluoreszenztitration Experimentes ermöglichte. Ursache hierfür ist wahrscheinlich, daß die Bindung des Inhibitors die chemische Umgebung des Fluorophors nicht ändert. Dies könnte zum einen dadurch begründet werden, daß die entsprechende Position des Labels nicht nah genug an der Bindungsstelle von SH3 und CD4 Domäne ist, oder daß das Fluoreszenzlabel die Bindung des Inhibitors nicht erlaubt. Für letzteres wurde vermutet, daß der Farbstoff möglicherweise in die hydrophobe Tasche auf der Kerndomäne von Nef bindet. Die Ringstruktur des Farbstoffes zeigt gewisse Ähnlichkeiten zu der Struktur des Tryptophans 61 aus Nef, welches in die hydrophobe Tasche des gleichen Nef Proteins bindet.



Tryptophan



1,5-IAEDans



CHAPS

**Abbildung 4.1: Vergleich von Tryptophan, 1,5-IAEDans und CHAPS.** Alle drei Moleküle haben einen strukturell ähnlichen Bereich in Form einer aromatischen Ringstruktur.

Die Interaktion mit 1,5-IAEDans wird nur vermutet. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß andere hydrophobe Moleküle mit einer Ringstruktur, die ebenfalls ein gewisse Ähnlichkeit zu Tryptophan zeigen, in diese Tasche binden. Wie Abb. 3.30 in Kapitel 3.5.5 veranschaulicht, bindet auch das Detergenz CHAPS in die hydrophobe Tasche auf Nef.

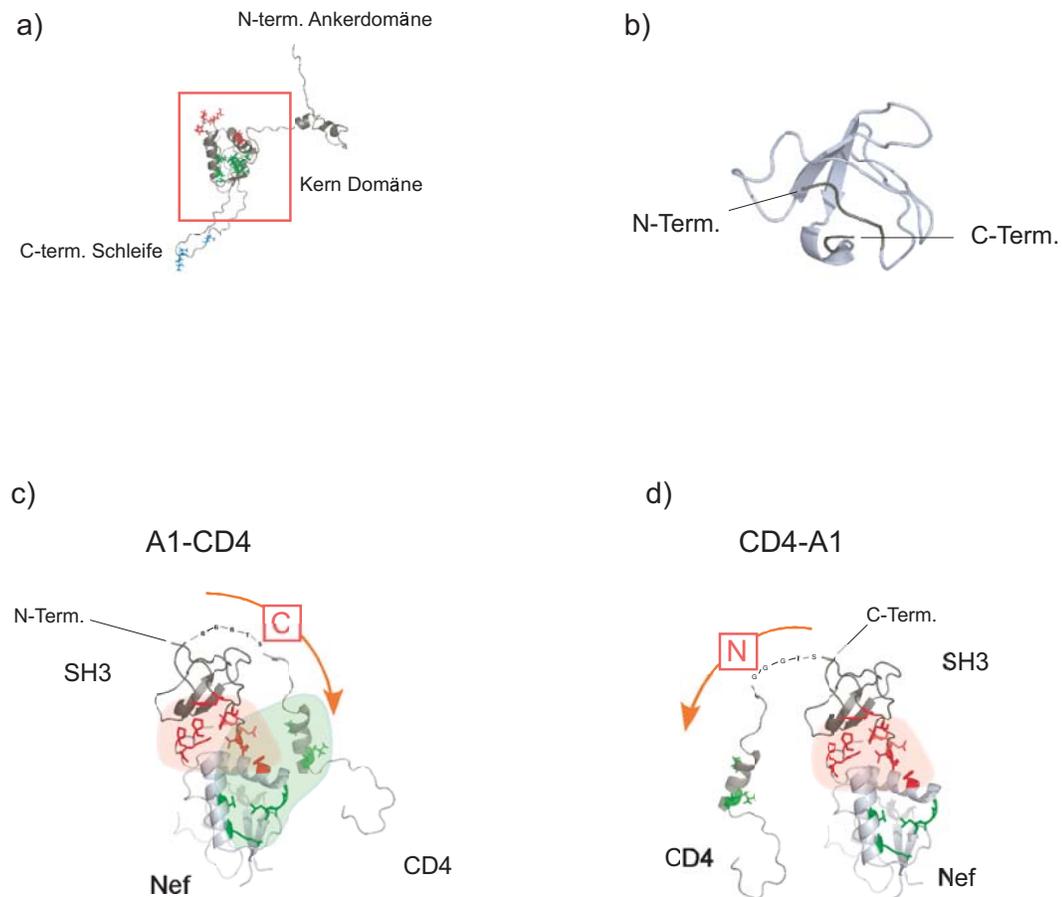
Der Versuch, alle Inhibitoren in der Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie

zu untersuchen, wurde dadurch eingeschränkt, daß für die Löslichkeit der Inhibitoren der Inhibitor-Klasse 3 Antioxidantien nötig sind. Die cytoplasmatische CD4 Domäne verfügt über mehrere Cysteine, die über Disulfidverbrückung kovalente Bindungen ausbilden können. Dadurch besteht die Möglichkeit, Aggregation auszulösen. In der Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie ist die Verwendung von Antioxidantien jedoch nur bedingt möglich, da dadurch die Disulfidbrücken des  $\alpha$ -GST-Antikörpers destabilisiert werden.

Aus den ITC-Daten geht hervor, daß die Reihenfolge einer N-terminalen SH3(A1) Domäne und einer C-terminalen CD4 Domäne zu der höchsten Affinität zwischen dem Fusionsprotein und Nef führt. Dieses deutet darauf hin, daß nur in dieser Anordnung beide Domänen gleichzeitig an das Nef Protein binden können. Ähnliches zeigen die Daten der NMR-Spektroskopie. Hier wurde  $^{15}\text{N}$ -markiertes Nef im Komplex mit dem Inhibitor CD4-A1 oder A1-CD4 untersucht. Nur der Inhibitor A1-CD4 induziert eine Verschiebung von Resonanzsignalen, die auf eine Bindung der CD4 Domäne an Nef hinweisen. Der Inhibitor CD4-A1 hingegen konnte keine chemischen Verschiebungen im Bereich der CD4 Bindungsstelle induzieren. Vielmehr zeigte sich hier die Tendenz zur Aggregation.

Nach Betrachtung der Strukturdaten (Daten nach Lee et al. (1996) [125]) wurde in Abb. 4.2 ein mögliches Bindungsmodell zwischen Nef und dem Inhibitor erstellt. Abb. 4.2 b zeigt den N- und C-Terminus der SH3 Domäne. Die beiden Enden weisen jeweils in entgegengesetzte Richtungen. Wird die CD4 Domäne N-terminal vor die SH3 Domäne gesetzt (Abb. 4.2 d), so befindet sich durch den kurzen Linker limitiert und die Vorgabe der N-terminalen Richtung (siehe Pfeil N) die CD4 Domäne auf der der CD4 Bindungsstelle abgewandten Seite von Nef. Die Ausbildung einer optimalen Bindungsoberfläche zwischen Nef und CD4 (siehe grün markierter Bereich) könnte hier behindert bzw. verhindert werden.

Wird die CD4 Domäne C-terminal an die SH3 Domäne angehängt so weist der C-Terminus (siehe Pfeil C) der SH3 Domäne bereits in die Richtung der CD4 Bindungsstelle von Nef und erlaubt so eine Bindung (Abb. 4.2 c). Unklar ist wie flexibel N- und C-Terminus der SH3 sind, sodaß nicht sicher ist wieweit die Richtung der beiden Termini eine Rolle spielt. Dennoch sind sie außerhalb der festen  $\beta$ -Faß-Struktur der SH3 nur wenige Aminosäuren lang und könnten demnach relativ unflexibel sein.



**Abbildung 4.2: Strukturelle Modelle des Nef-Inhibitor Komplexes.** a) Übersicht der Struktur von Nef mit dem in c) und d) vergrößerten Ausschnitt. b) Der N- und C-Terminus der SH3 Domäne. c) Der Nef-A1-CD4 Komplex. d) Nef-CD4-A1-Komplex. Die Reihenfolge, in der das CD4 entweder vor oder hinter die SH3 Domäne gehängt wird, ändert die Situation an Nef. N-Terminus und C-Terminus der SH3 Domäne weisen in gegensätzliche Richtungen (siehe roter Pfeil). In einer modellhaften Vorstellung erlaubt nur die Konformation des Nef-A1-CD4 Komplexes die optimale Nef-CD4-Interaktion. (Grundlage der Abbildung ist das Modell der Nef<sub>NL4-3</sub> Struktur nach Geyer et al. (2001) und die Komplexstruktur nach Lee et al. (1996) [81, 125]).

Der Inhibitor A1-CD4 wurde schließlich *in vivo* untersucht. Hier stellte sich die Frage, inwiefern die beiden Domänen im Inhibitor ihre Aufgabe erfüllen und die Bindung von zellulären Proteinen an Nef verhindern. Durch die CD4 und SH3 Domäne sollten das PxxP-Motiv und die putative CD4 Bindungsstelle auf Nef blockiert werden. Alle Interaktionen mit diesen Motiven oder Motiven in diesem Bereich sollten durch die beiden Domänen verhindert werden. In eukaryotischen Zellen konnte gezeigt werden, daß durch den Inhibitor A1-CD4 die Nef-vermittelte Reduktion der Oberflächendichte von CD4, CCR5 und MHCI inhibiert wird. Dieses deutet darauf hin, daß beide Domänen im Inhibitor die Proteintransportfunktion von Nef stören. Für die Reduktion der MHCI und CCR5 Oberflächenexpression ist das PxxP-Motiv verantwortlich [142, 26]. Die Reduktion der Oberflächendichte von CD4 ist hingegen von dem Dileuzin-Motiv in der C-terminalen Schleife und einer putativen CD4 Bin-

dungsstelle in der Kerndomäne von Nef abhängig [88, 92, 48, 33]. Es werden durch den Inhibitor also unterschiedliche Proteintransportwege von Nef gehemmt.

Über das PxxP-Motiv interagiert Nef zudem mit wichtigen Proteinen der zellulären Signaltransduktion [66, 139, 116]. Durch die Blockierung des PxxP-Motivs sollte es möglich sein, die Interaktion von Nef mit diesen Proteinen zu unterbinden. *In vivo* wurde der Versuch unternommen im Kinase-Assay zu zeigen, daß Pak Kinasen in eukaryotischen Zellen durch Nef in Gegenwart des Inhibitors nicht mehr aktiviert werden. Die vollständige Inhibierung dieser Signaltransduktionsfunktion von Nef konnte bisher nicht beobachtet werden. Dies kann bedeuten, daß die SH3 Domäne des Inhibitors das PxxP-Motiv nicht effektiv blockiert und andere Proteine über ihre SH3 Domäne mit Nef interagieren können, oder daß das Inhibieren der Nef-SH3 Interaktion alleine nicht ausreicht, um die Nef-vermittelte Signaltransduktion zu unterbinden. Eine genauere Charakterisierung der Interaktion zwischen den Domänen des Inhibitors und Nef z.B. durch Bestimmung der Assoziations- ( $k_{on}$ ) und Dissoziationsraten ( $k_{off}$ ) der einzelnen Domänen könnte hier weitere Rückschlüsse erlauben.

In Kapitel 3.4.2 wurde versucht mit einem Ubiquitylierungsmotiv den Nef-Inhibitor Komplex zum Proteasomen zu dirigieren. Im Vergleich mit dem Inhibitor ohne dieses Motiv konnte kein wesentlicher Einfluß auf dessen Wirksamkeit festgestellt werden. Es wurde zusätzlich versucht, die Lokalisation des Komplexes mit dem Proteasomen in der Zelle zu beobachten, was auf den Abbau des Nef-Inhibitor Komplexes hindeuten würde. Bisher konnten in dieser Hinsicht jedoch noch keine eindeutigen Aussagen getroffen werden.

Zusammenfassend konnte mit der Studie der Inhibitorklasse 3 gezeigt werden, daß es möglich ist, durch das Blockieren von hoch-konservierten Motiven die hierüber vermittelten Funktionen eines Proteins zu stören. Durch die Kombination zweier Domänen konnte ein Fusionsprotein generiert werden, das mit einer höheren Affinität an Nef bindet als die beiden Domänen einzeln. Die Blockierung der Motive induzierte eine effektive Störung von mehreren Nef Funktionen *in vivo*. Dies konnte insbesondere für die Proteintransportfunktion von Nef gezeigt werden.

**Ausblick:** Mit der Studie der Inhibitorklasse 3 öffnen sich diverse Wege der Weiterentwicklung und Verbesserung des Inhibitors. Zusätzlich bietet dieses Molekül den Anreiz für Studien zur Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen des Nef Proteins. Zunächst könnte durch die Mutante der SH3 Domäne SH3(B6) die Affinität des Inhibitors für Nef weiter erhöht werden. Diese SH3 Domäne hatte von allen drei untersuchten SH3 Domänen die höchste Affinität zu Nef<sub>SF2</sub> (siehe Kapitel 3.2.1). Generell stellt die Erhöhung der Affinität einen Ansatzpunkt für weiterführende Arbeiten dar. Durch eine höhere Affinität könnte die Spezifität und Wirksamkeit des Inhibitors optimiert werden. Die Mutationen der RT-Schleife der SH3 Domänen

veranschaulichen das Potential von Mutationsstudien, die die Bestimmung der Nef-Bindungsstellen des Inhibitors betreffen. Durch zufällige Mutationen kann der Versuch unternommen werden, die Affinität anderer Domänen wie der CD4 Domäne zu erhöhen. Hilfreich in diesem Zusammenhang wäre jedoch vor allem die Bestimmung der Nef-Inhibitor Komplexstruktur, um darauf basierend gezielte Veränderungen an der Struktur des Inhibitors vorzunehmen. In Kapitel 3.5.5 wurde bereits begonnen den Komplex aus Inhibitor A1-CD4 und Nef mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Durch eine vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebungen von Nef wäre es möglich, die Bindungsstellen des Inhibitors genau zu identifizieren. Hier stellt die Komplexgröße von ca. 39 kDa einen kritischen Faktor dar. Die Lösung von Strukturen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie beschränkt sich bisher auf Proteine, die nicht viel größer als 30 kDa sind [131]. Es konnte gezeigt werden, daß mit Nef(45-210) erste gute Ergebnisse erzielt wurden. Die N-terminale Verkürzung des Nef Proteins wäre demnach eine Möglichkeit das Problem zu lösen. Zusätzlich konnte festgestellt werden, daß das Detergenz CHAPS die Auflösung von Nef in der NMR-Spektroskopie verbessert. Dies stellt ebenfalls einen Ansatzpunkt für folgende Arbeiten dar.

Parallel zu diesen Experimenten wurde begonnen, den Komplex aus Inhibitorklasse 3 und Nef zu kristallisieren. Hierfür wurde das Gen des Inhibitors und das des Nef Proteins in *E.coli* Zellen co-transfiziert und gemeinsam exprimiert. Über den Affinitäts-tag des Nef Proteins konnte der Komplex isoliert werden und wurde mit Hilfe von kristallographischen Methoden versucht zu kristallisieren. Diese Versuche waren bisher ohne Erfolg und dauern derzeit noch an.

Viele Strukturdaten stellen den Ausgangspunkt für die Entwicklung von Inhibitoren dar und selbst für das Nef Protein wurde bereits ein Inhibitor untersucht, in dem die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem N-Terminus von Nef und dem Bienengift Mellitin der Ausgangspunkt der Studie war [17]. Auch in den kürzlich erschienenen Studien von Ternois et al. (2005) und Sticht et al. (2005) konnte die Lösung des Komplexes aus Peptid-Inhibitor und HIV-1 Capsid Protein wesentlich zum Verständnis des Bindungsmechanismus beitragen [193, 185]. Die Strukturdaten bieten also die Möglichkeit wichtige Informationen über die Bindungseigenschaften des Inhibitors zu erhalten. Daraus resultierend ist die Anpassung des Inhibitors an die Bindungsstellen in Nef möglich, was dann die Affinität des Inhibitors zu Nef erhöhen könnte und dessen Wirksamkeit verbessert. Auch ließe sich hierdurch die Größe des Inhibitors auf die wesentlichen Aminosäuren begrenzen, was, wie bereits erwähnt, die medizinische Applikation vereinfachen könnte.

Die Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten der einzelnen Domänen des Inhibitors könnte zusätzliche Informationen über den Bindungsmechanismus ergeben. Hier könnte sich herausstellen, wie sich die Domänen am Nef Protein verhalten. Z.B. könnte die Frage geklärt werden, ob beide Domänen gleichzeitig binden oder ob zunächst die eine Domäne bindet und anschließend die zweite folgt. Hier wurde bereits begonnen Inhibitoren der Inhibitorklasse 3 zu entwickeln, die jeweils an einer der Domänen eine Fluorophor besitzen.

Bisher wurden hier neben der SH3 Domäne nur zwei weitere Domänen erprobt. Der Ansatz, das Dileuzin-Motiv in der C-terminalen Schleife von Nef mit dem  $\beta$ -Adaptin der Inhibitor-Klasse 2 zu blockieren, gelang nicht. Die VHS Domäne (VPS-27, Hrs und STAM) der GGA Proteine (Golgi-lokalisierter  $\gamma$ -Adaptin homologer ARF Bindungsdomäne) bindet an ein sogenanntes „acidic-cluster dileuzin-motif“ [59]. Möglicherweise könnte diese 18 kDa große Domäne gegen das  $\beta$ -Adaptin in der Inhibitor-Klasse 2 ausgetauscht werden und das Dileuzin-Motiv von Nef binden. Prinzipiell stehen auch andere Domänen zur Verfügung, die das Dileuzin-Motiv in Nef binden könnten. Hierzu zählt auch die regulatorische Untereinheit H der vakuolären Membran-ATPase [82, 85]. Zudem wäre es möglich Antikörper gegen ein Dileuzin-Motiv zu entwickeln und nur die Epitop bindenden Bereiche der Fab Fragmente zu verwenden [211]. Anstelle der SH3 Domäne könnte auch die Prolin-bindende WW Domäne eingesetzt werden [209].

Durch die *in vivo* Daten konnte die Wirksamkeit des Inhibitors veranschaulicht werden. Eine Ausweitung der Versuche könnte eine genauere Lokalisation des Nef-Inhibitor Komplexes umfassen. Eventuell wäre es möglich, weitere Aussagen über den Inhibitionsmechanismus zu treffen. Z.B. wäre es interessant zu beobachten, wo der Inhibitor das Nef Protein bindet, und wo Nef nicht durch den Inhibitor erreicht werden kann. In diesem Zusammenhang könnte auch der Einfluß von anderen Membranankern getestet werden, womit möglicherweise auch die inhibitorische Wirkung des Inhibitors auf die Signaltransduktionsfunktion von Nef verbessert wird. Die Signaltransduktionsfunktion von Nef ist von dessen Assoziation mit Membranen abhängig [139, 116]. Eine Veränderung des Membranankers durch z.B. GPI Linker könnte die Wirkung des Inhibitors verbessern [95].

Zusätzlich würden sich hier *in vitro* Experimente anbieten, in denen die Bindung des Inhibitors an myrNef an künstlichen kleinen Vesikeln untersucht würde. Durch verschiedene Lipidkompositionen könnten unterschiedliche Membrantypen simuliert werden und mit Hilfe von Methoden wie der Stopped-Flow Technik die Bindungskinetik zwischen Inhibitor und myrNef beobachtet werden.

#### 4.2.4 Die biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nef Protein und der cytoplasmatischen CD4 Domäne

Die Charakterisierung der CD4-Nef Interaktion ist trotz intensiver Bemühungen bisher nur teilweise gelungen [4, 4, 161, 92]. In dieser Arbeit konnte nun erstmalig die Interaktion zwischen Nef und der CD4-Domäne in voller Länge beobachtet werden. Als Technik wurde die isothermale Titrationskalorimetrie und NMR-Spektroskopie benutzt.

Die Untersuchung der Nef-CD4 Interaktion wurde bisher durch die Tatsache erschwert, daß in Lösung der Komplex aus Nef und CD4 präzipitiert. Wie bereits

erwähnt, verbesserte die Fusion mit der SH3 Domäne und dem GST-tag die Löslichkeitseigenschaften des Nef-CD4 Komplexes erheblich. Für die Anwendung im ITC-Experiment konnte eine Konzentration von bis zu 0.5 mM eingestellt werden, ohne daß Präzipitate auftraten. Durch Deletion des SH3 Bindungsmotives PxxP auf Nef wurde dann eine Messung der CD4-Nef Interaktion möglich. Im Gegensatz zu den Daten von Grzesiek et al. (1996) ( $K_d = 0.5 - 1$  mM) findet hier eine Bindung mit einem  $K_d$ -Wert im unteren mikromolaren Bereich statt [92]. Die Dissoziationskonstante von 1.2  $\mu$ M entspricht einer eher mittelstarken Bindung, die jedoch physiologisch realistisch ist. Eine  $K_d$  von 1 mM wäre hingegen zu schwach, um eine funktional wichtige Bindung zu beschreiben.

Eine Studie von Preusser et al. (2001) zeigte vergleichbare Ergebnisse in einem Gleichgewichts-Fluoreszenztitrations Experiment mit einem CD4 Peptid [161]. Hier wurde trotz der Löslichkeitsprobleme eine Dissoziationskonstante von 0.87  $\mu$ M ermittelt.

Das Dileuzin-Motiv auf CD4 spielt eine entscheidende Rolle für die Nef-vermittelte Reduzierung der Oberflächendichte von CD4 [3]. Z.T. erscheint die genaue Funktion des Motivs in bezug auf die Nef-CD4 Interaktion jedoch nicht ganz eindeutig. Bentham et al. (2003) sehen in dem Dileuzin-Motiv auf CD4 ein zusätzliches Internalisierungssignal im Nef-CD4 Komplex, welches zusätzlich zum Dileuzin-Motiv auf Nef Adaptorprotein 2 Komplexe bindet [25]. Hier soll durch das Dileuzin-Motiv von CD4 also die Rekrutierung von Adaptorproteinen unterstützt und die Internalisierung erleichtert werden. Gegensätzlich konnten Grzesiek et al. (1996) und Preusser et al. (2001) im NMR-Spektrum einen direkten Einfluß des Dileuzin-Motivs von CD4 auf die Bindung an Nef sehen.

Die in dieser Arbeit in Kapitel 3.5 ermittelten Daten unterstützen letzteres Modell. Die Mutation der Aminosäuren Leuzin 438 und 439 in der CD4 Domäne des Inhibitors A1-CD4-LLAA zeigte in der isothermalen Titrationskalorimetrie einen signifikanten Effekt auf die Affinität zu Nef(AxxA). Im Gegensatz zum Inhibitor mit der Wildtyp CD4 Domäne konnte keine Bindung festgestellt werden (siehe Abb. 3.25).

Diese Daten unterstützen die Vorstellung, daß Nef die cytoplasmatische Domäne von CD4 bindet und durch sein eigenes Dileuzin-Motiv Proteine der Endocytosemaschinerie rekrutiert (siehe auch Abb. 4.3).

Neben dem Dileuzin-Motiv wurde untersucht, ob die Bindungsstelle der Tyrosinkinase Lck auf CD4 eine Rolle für die Interaktion zwischen Nef und CD4 spielt. Die Cysteine an Position 445 und 447 binden normalerweise über einen intermolekularen Zinkfinger an die Tyrosinkinase [114]. Durch die Untersuchung des Inhibitors A1-CD4-SQS in Kapitel 3.5.1 konnte *in vitro* keine Relevanz der Aminosäuren für die Affinität zwischen CD4 und Nef festgestellt werden. Allerdings wurde nicht überprüft, ob die Zugabe von Zink dazu führt, daß sich ein intermolekularer Zinkfinger ausbildet. Salghetti et al. (1995) konnten *in vivo* ebenfalls keine Auswirkungen einer Mutation der Reste CQC/AQA auf die Internalisierung von CD4 beobachten [175]. Wenn eine Interaktion über ein gebundenes Zink Atom stattfindet, dann ist es sehr wahrscheinlich, daß sie keine große Bedeutung hat.

Der Inhibitor A1-CD4-sh enthält eine C-terminal verkürzte Form der CD4 Domäne. In der isothermalen Titrationskalorimetrie konnte festgestellt werden, daß der C-Terminus ab Aminosäure 444 nur unwesentlich an der Bindung zu Nef beteiligt ist. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Mutationsstudien [161, 3, 10, 173, 175]. Zudem wurde in Studien von Willbold et al. (1996) und Wray et al. (1996) gezeigt, daß die größtenteils ungefaltete cytoplasmatische CD4 Domäne von Aminosäure 428 bis zu Aminosäure 442 eine kleine  $\alpha$ -Helix bildet [205, 201]. Die Fähigkeit von Nef CD4 zu binden und zu internalisieren ist von der Integrität dieser Helix abhängig [162, 87]. Möglicherweise läßt sich die Interaktionsfläche zwischen Nef und CD4 im wesentlichen auf diese Helix reduzieren.

Preusser et al. (2001) deuten in ihrer Studie an, daß der N-Terminus von Nef eventuell zur Affinität zu CD4 beiträgt [161]. Im Gegensatz zu der Studie von Grzesiek et al. (1996) wurde dort mit unverkürztem Nef gemessen und eine wesentlich höhere Affinität bestimmt [92]. Hier wurden nun N-terminale Verkürzungen von Nef auf ihre Affinität zu CD4 hin getestet und es konnte gezeigt werden, daß der N-Terminus eine Rolle für die Nef-CD4 Interaktion spielt. Die Verkürzung des N-Terminus verringert die Affinität zwischen Nef und Inhibitor. Diese Daten stimmen mit der Beobachtung von Casatelli et al. (2003) überein, daß Mutationen im N-Terminus wie z.B. L41Q die Nef-vermittelte CD4-Internalisierung *in vivo* reduzieren [36].

In Kapitel 3.5.5 wurde schließlich die Bindung des Inhibitors an Nef mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die CD4 Domäne in eine hydrophobe Tasche der Kerndomäne von Nef bindet. Die Bindung an diesen Bereich wurde bereits von Grzesiek et al. (1996) beschrieben [92]. Die Autoren vermuteten, daß Tryptophan 61 in diese Tasche bindet und eventuell durch CD4 verdrängt wird. Dies konnte hier bestätigt werden. Tryptophan 61 existiert hier in zwei Zuständen, die jeweils einem gebundenem und einem freien Zustand entsprechen. Dies deutet darauf hin, daß sich das Tryptophan 61 mit der hydrophoben Tasche in einem dynamischen Austausch befindet. Durch die langsame Titration mit dem Inhibitor konnte ein Zustand erreicht werden, in dem das Tryptophan vollständig aus der Tasche verdrängt wird. Eine Aussage darüber zu treffen inwiefern durch die unverkürzte CD4 Domäne weitere Resonanzsignale verschoben werden, die nicht von Grzesiek et al. (1996) beschrieben werden konnten, ist noch nicht möglich, da hierfür die benötigten NMR-Daten einer  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten Nef<sub>SF2</sub> Probe noch nicht vorliegen. Zudem muß hierfür die Auflösung des Spektrums weiter optimiert werden.

Die Bedeutung des Tryptophans 61 konnte zusätzlich durch ein ITC-Experiment veranschaulicht werden. Hier zeigte die Mutation der Aminosäuren CAWL/AAAA, daß die Bindung zwischen CD4 und Nef vollständig unterbunden wird. Die Integrität des Nef Proteins wurde allerdings nicht überprüft, weswegen nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Mutation des Tryptophans 61 zu Alanin auch strukturelle Auswirkungen haben könnte. Leuzin 62 zählt ebenfalls zur CD4 Bindungsstelle, während das Cysteins 59 eher eine untergeordnete Rolle bei der CD4 Bindung spielt. Aiken et al. (1996) konnten durch die Mutation C59A beobachten, daß die CD4 Internalisierung durch Nef um lediglich 28% reduziert wird [4].

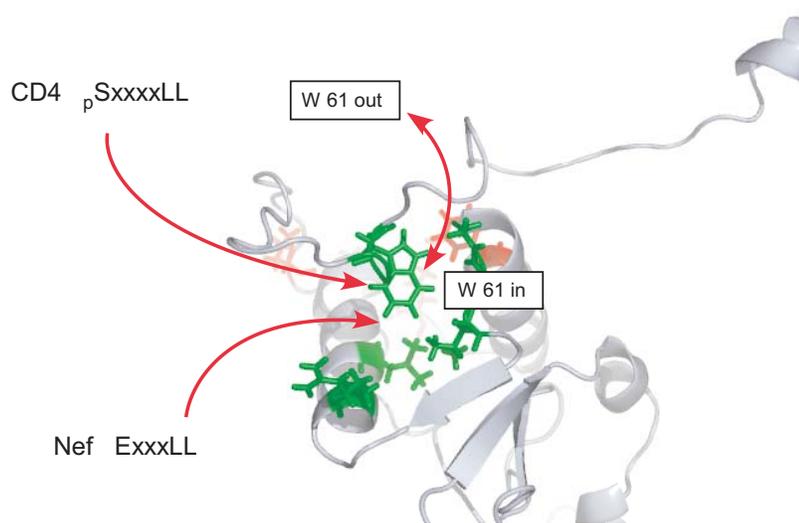
**Ausblick:** Bisher konnten nicht alle Aminosäuren, die an der Bindung zwischen Nef und CD4 beteiligt sind, identifiziert werden. Die Daten aus Kapitel 3.5.3 und von Preusser et al. (2001) deuten auf eine Beteiligung des N-Terminus von Nef hin, der bisher nicht berücksichtigt wurde. Durch eine Fortentwicklung der bisherigen Experimente mit unverkürztem Nef könnte es möglich sein, diese Interaktion zu charakterisieren. Auch der minimale Effekt der erhöhten Affinität durch die unverkürzte CD4 Domäne könnte hier charakterisiert werden.

Durch eine Isotopen-Markierung des Inhibitors wäre es wiederum möglich, die strukturellen Veränderungen der CD4 Domäne zu verfolgen. Hier könnte sich z.B. die Rolle der  $\alpha$ -Helix (Aminosäure 428-442) genauer charakterisieren lassen oder die Bedeutung des Dileuzin-Motivs manifestieren [205, 201].

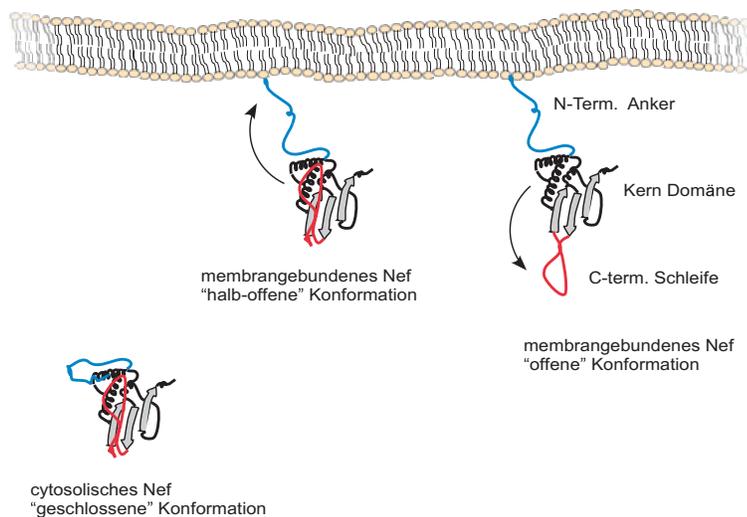
Neben dem Dileuzin-Motiv der CD4 Domäne könnte durch die aus der NMR-Spektroskopie gewonnenen Erkenntnisse auch weiter Versuche zur Untersuchung des Dileuzin-Motivs von Nef durchgeführt werden. Nach einem von Arold et al. (2001) vorgeschlagenen Modell befindet sich das Dileuzin-Motiv von Nef überwiegend in der Struktur der Kerndomäne auf Nef verborgen (siehe Abb. 4.3 c halb-offene Konformation). Darunter stellt man sich eine Art Zurückfallen der C-terminalen flexiblen Schleife vor, wobei das Dileuzin-Motiv ExxxLL in die Tasche bindet, wo auch das Dileuzin-Motiv von CD4 SxxxxLL bindet (siehe Abb. 4.3a und b).

Nach Bindung an CD4 wird das Dileuzin-Motiv von Nef durch CD4 verdrängt und durch die flexible Schleife im Cytoplasma präsentiert, wo es durch AP2 gebunden werden kann (siehe Abb. 4.3c offene Konformation) [16]. Die beiden Motive unterscheiden sich vor allem durch das Serin des CD4 Motivs, welches phosphoryliert werden kann. Da jedoch die CD4-Internalisierung phosphorylierungs-unabhängig ist, kann spekuliert werden, daß beide einen ähnlichen Bereich auf Nef binden [77].

a)



b)



**Abbildung 4.3: Modell der Bindung zwischen CD4 und Nef. a) Ausschnitt aus der Struktur der Kerndomäne von Nef.** Tryptophan 61 tritt mit der hydrophoben Tasche der Kerndomäne in Wechselwirkung, die auch durch das Dileuzin-Motiv von CD4 gebunden wird. Zudem wird vermutet, daß das eigene Dileuzin-Motiv von Nef ebenfalls in diese Bindungstasche binden kann. **b) Das Modell der dynamischen Nef Konformationen nach Arold et al. (2001) [16].** Nef existiert in einer geschlossenen, cytosolischen Konformation, in der der N-term. Anker und die flexible C-term. Schleife zurück auf die Kerndomäne von Nef falten. An der Membran nimmt Nef eine halb-offene Konformation an, in der es überwiegend Signaltransduktionsfunktionen ausübt. Durch Ausklappen der flexiblen Schleife geht Nef in eine offene Konformation über und wirkt durch sein Dileuzin-Motiv auf den Proteintransport ein.

Durch die Titration des  $^{15}\text{N}$ -markierten Nef Proteins mit dem Inhibitor konnte gezeigt werden, daß sich die Intensität der Resonanzsignale des Tryptophans 61 signifikant verschieben. Die Bedeutung des Dileuzin-Motivs für die Bindung des Nef Proteins wurde bereits erläutert. Hier wäre es zunächst interessant zu sehen, wie sich die beiden Resonanzsignale des Tryptophans 61 verändern, wenn das Dileuzin-Motiv in der flexiblen Schleife von Nef mutiert wird. Zusätzlich könnte untersucht werden, ob ein Nef Protein mit der Mutation des Dileuzin-Motivs ein Peptid mit dem Dileuzin-Motiv von Nef bindet. Es stellt sich die Frage, ob die beiden Dileuzin-Motive die gleichen Aminosäuren in der hydrophoben Tasche binden. Wenn sich eine Bindung nachweisen ließe, so würde dieses das Modell von Arold et al. (2001) unterstützen.

In einem zusätzlichen ITC Experiment könnte versucht werden zu zeigen, daß dieses Dileuzin-Motiv-Peptid durch ein Peptid mit dem Dileuzin-Motiv der CD4 Domäne verdrängt werden kann.

Das CD4 Protein ist über eine transmembrane Helix in der Membran verankert. In Zusammenhang mit der Untersuchung des myristoylierten Nef Proteins würde es sich anbieten die Interaktion zwischen CD4 und myrNef an der Membran zu untersuchen. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, daß sich ein Fragment aus der cytoplasmatische Domäne und der transmembranen Helix von CD4 mit Hilfe von N-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) lösen läßt.

#### 4.2.5 Die biochemische Untersuchung des myristoylierten Nef Proteins

Die N-terminale Myristoylierung ist eine wichtige posttranslationale Veränderung des Proteins, die dessen Assoziation mit Membranen ermöglicht [96, 81].

In einigen Studien deutete sich bereits an, daß sich die Konformation von myristoyliertem Nef (myrNef) und nicht-myristoyliertem Nef (Nef(G2A)) unterscheidet. Durch Circular dichroismus ermittelte Daten finden Dennis et al. (2005) mehr helikale Bereiche im myristoyliertem Nef als im nicht-myristoyliertem Nef [55]. Die im NMR-Experiment (DOSY) bestimmten Wasser zugängliche Fläche von Nef entspricht nicht der theoretischen Fläche, wenn N-Terminus und die C-terminale flexible Schleife vollkommen frei zugänglich sind [14, 16]. Hier wurde nun myrNef und Nef(G2A) mit Hilfe der analytischen Gelfiltration untersucht. Es konnte beobachtet werden, daß myrNef in der analytischen Gelfiltration kleiner erscheint als Nef(G2A). Im Vergleich mit einer Nef Variante, Nef(45-210), der ein großer Teil des N-Terminus fehlt, ist myrNef allerdings immer noch größer. Die Myristoylierung beeinflusst anscheinend die Größe des Proteins und es kann in Anlehnung an das Modell von Arold et al. (2001) spekuliert werden, daß der N-Terminus der Ankerdomäne auf die Nef Kerndomäne zurückfaltet (siehe Abb. 4.3 c geschlossene Konformation). Die Funktion dieser Myristoylierungs-abhängigen Konformation ist spekulativ. Für die kleine GTPase Arf1 konnte gezeigt werden, daß die Myristoylierung ebenfalls Einfluß auf

die Konformation des lipidierten Proteins hat. Man spricht im Falle von Arf1 von einem „Myristoylation switch“, was bedeutet, daß durch den Nukleotidaustausch oder die Bindung von Kalzium das Protein aktiviert wird und die Myristinsäure, die sonst innerhalb der Struktur verborgen liegt, ausklappt und zugänglich wird [8, 140, 12]. Ein ähnlicher Schaltermechanismus wurde für Nef bisher nicht identifiziert. Hier konnte nur gezeigt werden, daß die Myristoylierung die Zugänglichkeit des N-Terminus von Nef beeinflusst. Im Western Blot wurde beobachtet, daß myrNef wesentlich schlechter durch einen Antikörper nachgewiesen werden kann, der gegen den N-Terminus von Nef gerichtet ist. Das ITC Experiment der Interaktion zwischen dem Inhibitor und myrNef zeigt, daß myrNef etwas schlechter an die CD4 Domäne des Inhibitors bindet. Hier kann spekuliert werden, ob es Funktions-abhängige Konformationen gibt, die die Bindung von entsprechenden Proteinen jeweils erlaubt. Nach dem Modell von Arold et al. (2000) entspricht die halb-offene Konformation einer Signaling-Konformation und die offene Konformation einer Trafficking- oder Porteintransport-Konformation (siehe Abb. 4.3).

Das Nef Protein tendiert zur Oligomerisierung. In einer Studie von Arold et al. (2000) wurden mit einem nicht-myristoyliertem Nef<sub>LAI</sub>( $\Delta$ 1-57, $\Delta$ 206) die Konzentrations-abhängige Ausbildung von Dimeren und Trimeren beobachtet [14]. In einer kürzlich erschienenen Studie von Dennis et al. (2005) werden sogar für ein myrNef (Nef<sub>BH10</sub>) große Oligomere aus 16 Nef-Molekülen bestehend beschrieben [55]. Die Daten der analytischen Gelfiltration lassen solche oligomeren Strukturen für das myrNef und Nef(G2A) nicht erkennen. Beide Proteine, myrNef und Nef(G2A), eluieren in einer homogenen Monomer-Fraktion von der Säule. Die verkürzte Nef-Variante, Nef(45-210), zeigt jedoch ähnlich wie in der Veröffentlichung [14], daß neben der Monomer-Fraktion eine weitere Fraktion (ca. 19.5 min) eluiert, die einer größeren Masse entspricht, die auf Dimere oder Trimere hindeutet. In einer weiteren Untersuchung in der analytischen Ultrazentrifugation wird der monomere Zustand des myrNef bestätigt. Lediglich 8% liegen als Oligomer vor. Für das nicht-myristoylierte Nef hingegen können wie für Nef(45-210) drei Populationen identifiziert werden, die Monomeren, Dimeren und Trimeren entsprechen. Zusammenfassend zeigt sich, daß die Myristoylierung die monomere Form begünstigt, während das nicht-myristoylierte Nef zu Oligomeren tendiert. Die funktionale Relevanz dieser Oligomerisierung ist bisher nicht ganz verstanden. Eventuell kann hier ein Artefakt vermutet werden. Viele Proteine kommen in ihrer aktiven Form als Dimere vor. Hierunter befinden sich auch Bindungspartner von Nef wie z.B. CD4 oder auch TZR  $\zeta$  [206, 78]. Es kann spekuliert werden, daß durch die Dimerisierung von Nef Nef-assoziierte Proteine in räumliche Nähe gebracht werden und dadurch deren Aktivierung erfolgt (z.B. Kinasen und T-Zellrezeptorkomplex) [14].

**Ausblick:** Die hier ermittelten Daten deuten auf eine Konformation des Nef Proteins hin, die von dessen Bindung an die Membran abhängig ist. Die Bestimmung der Struktur von myrNef mit Hilfe der NMR-Spektroskopie könnte hier wichtige Informationen liefern und die Bedeutung der Myristoylierung für die Nef Funktion aufklären. Es wurde bereits begonnen <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C-markiertes Nef zu generieren und die Strukturlösung in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Grze-

---

siek an der Universität Basel mit Höchstfeld NMR-Geräten durchzuführen. Hierbei stellt vor allem die Strukturlösung in Gegenwart von Lipiden eine Herausforderung dar. Zusätzlich könnte die Interaktion zwischen dem myristoyliertem N-Terminus von Nef und der Nef Kerndomäne in der isothermalen Titrationskalorimetrie untersucht werden. Die Myristinsäure läßt sich nur mit Hilfe von BSA (siehe 2.2) in Lösung bringen. In einer Studie von Geyer et al. (1999) war es jedoch möglich, einen myristoylierten N-Terminus von Nef zu generieren, der löslich war [83]. Eventuell ist es möglich, eine Bindungskonstante zwischen dem myristoylierten N-Terminus und Nef(G2A) oder Nef(45-210) mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie zu bestimmen.

## Kapitel 5

# Anhang

### 5.1 Grundlagen der Auswertung von Gleichgewichts-Fluoreszenztitration, isothermalen Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie und analytischer Gelfiltration

#### 5.1.1 Ermittlung der Dissoziationskonstanten aus Gleichgewichts-Fluoreszenztitrationen

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wird eine Gleichgewichts-Fluoreszenztitration durchgeführt. Dabei variiert man die Ligandenkonzentration und mißt die Fluoreszenz des Fluorophor-markierten Proteins. Wie in Kapitel 2.5.3 dargestellt kann man die Dissoziationskonstante aus der Reaktion der Fluorophorfluoreszenz auf die Ligandenkonzentrationsänderung ermitteln.

Die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) kann durch Angleichen der mittels Fluoreszenztitration erhaltenen Bindungskurve an folgende quadratische Gleichung ermittelt werden:

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [P]_0 \cdot [L]_0}}{[L]_0} \quad (5.1)$$

$F$	=	Fluoreszenzintensität
$F_0$	=	Grundfluoreszenz des vorgelegten Liganden
$F_{max}$	=	maximale Fluoreszenzintensität bei Sättigung
$[P]_0$	=	Gesamtkonzentration des Proteins (M)
$[L]_0$	=	Gesamtkonzentration des fluoreszierenden Liganden (M)

Gleichung 5.9 leitet sich wie folgt her:

Die Gleichgewichtsreaktion der Bindung eines Liganden L an ein Protein P beschreibt:



Die Dissoziationskonstante  $K_d$  ist der Quotient der dissoziierten und dem assoziierten Protein (P)/Liganden (L)-Komplex:

$$K_d = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} \quad (5.3)$$

Nach der Massenerhaltung gilt:

$$[L]_0 = [L] + [PL] \quad \text{und} \quad [P]_0 = [P] + [PL] \quad (5.4)$$

$[P]_0, [L]_0$  = Gesamtkonzentration an Protein bzw. Ligand  
 $[P], [L]$  = Konzentration an freiem Protein bzw. Ligand  
 $[PL]$  = Konzentration des Protein-Ligand-Komplex

Aus Massenwirkungsgesetz Gleichung 5.3 und Massenerhaltung Gleichung 5.4 ergibt sich folgende Beziehung:

$$K_d = \frac{([P] - [PL]) \cdot ([L] - [PL])}{[PL]} \quad (5.5)$$

Auflösen der Gleichung nach  $[PL]$  ergibt zwei Lösungen:

$$[PL] = \frac{[P]_0 + [L]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [P]_0 \cdot [L]_0} \quad (5.6)$$

Physikalisch sinnvoll ist hierbei jedoch nur die Lösung mit dem negativen Vorzeichen vor dem Wurzelterm. Bei der Fluoreszenztitration ist die Messgröße die Änderung der Fluoreszenzemission des fluoreszierenden Liganden. Die Änderung ist proportional zum Bindungsgrad, der durch das Verhältnis von  $[PL]$  zu  $[L]_0$  gegeben ist.

Die Proportionalitätskonstante ist dabei die maximale Fluoreszenzänderung  $\Delta F_{max}$ , die unter Sättigungsbedingungen zu beobachten ist.

$$\Delta F = \Delta F_{max} \cdot \frac{[PL]}{[L]_0} \quad (5.7)$$

$\Delta F$  = partielle Fluoreszenzänderung des Titrationsschritts  
 $\Delta F_{max}$  = maximale Fluoreszenzänderung bei Sättigung

Die gemessene Gesamtfluoreszenz  $F$  in jedem Titrationsschritt setzt sich zusammen aus der Grundfluoreszenz  $F_0$  des freien fluoreszierenden Liganden und der Fluoreszenzzunahme  $\Delta F$  durch die Zugabe des Proteins. Zusammen mit Gleichung 5.7 ergibt sich:

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \cdot \frac{[PL]}{[L]_0} \quad (5.8)$$

Somit ergibt sich für die Gesamtfluoreszenz durch Einsetzen von Gleichung 5.6 der bereits oben erwähnte Zusammenhang zur Bestimmung von  $K_d$ :

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \cdot \frac{\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [P]_0 \cdot [L]_0}}{[L]_0} \quad (5.9)$$

$F$  = Fluoreszenzintensität  
 $F_0$  = Grundfluoreszenz des vorgelegten Liganden  
 $F_{max}$  = maximale Fluoreszenzintensität bei Sättigung  
 $[P]_0$  = Gesamtkonzentration des Proteins (M)  
 $[L]_0$  = Gesamtkonzentration des fluoreszierenden Liganden (M)

### 5.1.2 Ermittlung der Dissoziationskonstanten aus der isothermalen Titrationskalorimetrie

Wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben ist die Grundlage der Datenanalyse der isothermalen Titrationskalorimetrie die Auftragung der Wärmeänderung gegen das Molare Verhältnis Ligand in der Spritze zu Protein in der Zelle.

Die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) kann durch Angleichen der mittels ITC erhaltenen Bindungskurve an folgende Gleichung ermittelt werden:

$$Q = \frac{n \cdot [P]_0 \cdot \Delta H^0 \cdot V^0}{2} \cdot \left( 1 + \frac{[L]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot K_a \cdot [P]_0} - \sqrt{\left( 1 + \frac{[L]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot K_a \cdot [P]_0} \right)^2 - \frac{4 \cdot [L]_0}{n \cdot [P]_0}} \right) \quad (5.10)$$

Q	=	Wärmemenge (J)
n	=	Anzahl der Bindungsstellen des Proteins
[P] <sub>0</sub>	=	Gesamtkonzentration des vorgelegten Reaktionspartners (M)
[L] <sub>0</sub>	=	Gesamtkonzentration des zugegebenen Reaktionspartners (M)
ΔH <sup>0</sup>	=	molare Bindungsenthalpie ( $J \cdot mol^{-1}$ )
V <sup>0</sup>	=	Volumen der Messzelle (l)
K <sub>a</sub>	=	Assoziationskonstante ( $M^{-1}$ )

Die Werte für  $\Delta H^0$ , n und  $K_a$  werden iterativ an die Daten der kalorimetrischen Messung angepaßt.

Anschließend berechnet man die Dissoziationskonstante  $K_d$ ,  $\Delta G$  und  $\Delta S$  wie im Folgenden beschrieben:

Ausgangspunkt ist die Gleichgewichtsreaktion der Bindung eines Liganden L an ein Protein P, die sich durch eine Dissoziationskonstante  $K_d$  oder eine Assoziationskonstante  $K_a$  beschreiben läßt:

Die Assoziationskonstante ergibt sich aus dem Zusammenhang:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]} = \frac{[PL]}{([P]_0 - [PL]) \cdot [L]} \quad (5.11)$$

Die Dissoziationskonstante  $K_d$  ist der Kehrwert der Assoziationskonstanten  $K_a$ :

$$K_d = \frac{1}{K_a} \quad (5.12)$$

Eine wichtige Gleichung der Thermodynamik ist die Gibbs-Funktion, die die Zusammensetzung der freien Bindungsenthalpie  $\Delta G$  aus den beiden energetischen Komponenten Enthalpie  $\Delta H$  und Entropie  $\Delta S$  beschreibt:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5.13)$$

Bei den Größen  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  und  $\Delta S$  handelt es sich immer um Standardgrößen unter Gleichgewichtsbedingungen, gekennzeichnet durch den Index 0 ( $\Delta G^0$ ,  $\Delta H^0$  und  $\Delta S^0$ ). Der besseren Übersicht wegen werden aber die Indizes im folgenden weggelassen.

Unter thermodynamischen Gesichtspunkten läßt sich eine Beziehung zwischen  $K_d$  oder  $K_a$  und der Freien Enthalpie wie folgt aufstellen:

$$\Delta G = -RT\ln K_a = RT\ln K_d \quad (5.14)$$

$\Delta G$	=	freie Enthalpie ( $\text{J mol}^{-1}$ )
$K_a$	=	Assoziationskonstante ( $\text{M}^{-1}$ )
$K_d$	=	Dissoziationskonstante ( $\text{M}$ )
$T$	=	absolute Temperatur ( $\text{K}$ )
$R$	=	Gaskonstante ( $8.315 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

Für ein „Single Site Binding Model“, also der Annahme, daß das Protein in der Zelle nur einen Typ von Ligandenbinungsplatz mit der gleichen Affinität besitzt, läßt sich der Bindungsgrad  $\Theta$  in Zusammenhang mit der Assoziationskonstante bringen:

Für den Bindungsgrad  $\Theta$  gilt:

$$\Theta = \frac{[PL]}{[P_0]} \quad (5.15)$$

Die Auflösung dieser Gleichung nach  $[PL]$  und Einsetzen in Gleichung 5.11 ergibt schließlich:

$$K_a = \frac{\Theta}{(1 - \Theta) \cdot [L]} \quad (5.16)$$

Für den Liganden L kann eine Massenbilanz unter Berücksichtigung der Zahl der aktiven Ligandenbindungsstellen n des Proteins aufgestellt werden:

$$[L]_0 = [L] + n \cdot [PL] = [L] + n \cdot \Theta \cdot [P]_0 \quad (5.17)$$

Auflösung der Gleichung 5.16 und 5.17 nach [L] und Gleichsetzen führt zu einer quadratischen Gleichung in  $\Theta$  :

$$0 = \Theta^2 - \Theta \left( 1 + \frac{[L]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot [P]_0 \cdot K_a} \right) \quad (5.18)$$

Die bei der Bindung gemessene Wärme Q ist proportional zur Stoffmenge des Makromoleküls ( $[P]_0 \cdot V$ ) in der Meßzelle, wobei die Proportionalitätsfaktoren die molare Bindungsenthalpie  $\Delta H_0$  der Bindungsgrad  $\Theta$  und die Anzahl der Ligandenbindungsstellen n sind:

$$Q = n \cdot \Theta \cdot \Delta H_0 \cdot [P]_0 \cdot V \quad (5.19)$$

Durch Auflösen der quadratischen Gleichung 5.18 nach dem Bindungsgrad  $\Theta$  und Einsetzen in Gleichung 5.19 ergibt sich letztendlich Gleichung 5.20:

$$Q = \frac{n \cdot [P]_0 \cdot \Delta H^0 \cdot V^0}{2} \cdot \left( 1 + \frac{[L]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot K_a \cdot [P]_0} - \sqrt{\left( 1 + \frac{[L]_0}{n \cdot [P]_0} + \frac{1}{n \cdot K_a \cdot [P]_0} \right)^2 - \frac{4 \cdot [L]_0}{n \cdot [P]_0}} \right) \quad (5.20)$$

- Q = Wärmemenge (J)
- n = Anzahl der Bindungsstellen des Proteins
- $[P]_0$  = Gesamtkonzentration des vorgelegten Reaktionspartners (M)
- $[L]_0$  = Gesamtkonzentration des zugegebenen Reaktionspartners (M)
- $\Delta H^0$  = molare Bindungsenthalpie ( $J \cdot mol^{-1}$ )
- $V^0$  = Volumen der Messzelle (l)
- $K_a$  = Assoziationskonstante ( $M^{-1}$ )

### 5.1.3 Ermittlung der Dissoziationskonstanten aus der Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie

Es wird angenommen, daß die Assoziationskinetik der Interaktion zwischen Ligand und Protein einer Kinetik pseudo-erster-Ordnung entspricht und zudem eine 1:1 Bindung vorliegt. Demnach läßt sich mit folgender Glweichung die  $K_d$  berechnen.

Die Rate der Komplexbildung aus Protein und Ligand setzt sich aus der Assoziationsrate und Dissoziationsrate zusammen.

$$k_{obs} = \frac{\Delta[PL]}{\Delta t} = k_{on} * [L] + k_{off} \quad (5.21)$$

- $k_{on}$  = Assoziationsrate ( $M^{-1}s^{-1}$ )
- $k_{off}$  = Dissoziationsrate ( $s^{-1}$ )
- $k_{obs}$  = die beobachtete Assoziationsrate
- $[L]$  = Ligandenkonzentration

Gemäß dem Massenwirkungsgesetz entspricht die Dissoziationskonstante der Ratio aus Dissoziationsrate und Assoziationsrate.

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (5.22)$$

- $k_{on}$  = Assoziationsrate ( $M^{-1}s^{-1}$ )
- $k_{off}$  = Dissoziationsrate ( $s^{-1}$ )
- $K_d$  = Dissoziationskonstante (M)

Die Assoziation des Ligand-Protein-Komplexes folgt einer Funktion der Zeit. Die hier beobachteten Kinetiken der Nef-Inhibitor-Bindung zeigen einen einfach-exponentiellen Zusammenhang.

$$R(t) = R_{eq}[1 - \exp^{-k_{obs}(t)}] \quad (5.23)$$

$R(t)$  = biosensor Response zum Zeitpunkt  $t$

$R_{eq}$  = biosensor Response zum Zeitpunkt der Sättigung (maximale Response)

$k_{obs}$  verhält sich linear zur Liganden-Konzentration [L].

Bei der Ausgleichgeraden entspricht  $k_{on}$  der Steigung und  $k_{off}$  dem y-Achsenabschnitt.

Es empfiehlt sich  $k_{off}$  durch ein separates Dissoziationsexperiment zu bestimmen, da die Genauigkeit bei der Bestimmung über den y-Achsenabschnitt nicht optimal ist.

#### 5.1.4 Ermittlung der Molekularmasse aus der analytischen Gelfiltration

Die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit einem Protein-Standard bietet die Möglichkeit die Masse eines Proteins zu bestimmen.

Hierfür wird das Elutionsvolumen der Proteine des Standards aufgenommen und durch folgende Gleichung der jeweilige  $K_{AV}$ -Wert ermittelt:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0} \quad (5.24)$$

$V_e$  = Elutionsvolumen  
 $V_0$  = Ausschlußvolumen  
 $V_T$  = Totalvolumen

Die Auftragung der  $K_{AV}$ -Werte gegen den Logarithmus der Molekularmasse zeigt einen linearen Zusammenhang. Aus der Geradengleichung der Ausgleichgeraden kann nun die Molekularmasse eines Proteins unbekannter Größe nach Bestimmung des Elutionsvolumens berechnet werden.

## 5.2 Zusätzliche Ergebnis-Tabellen

### 5.2.1 Die Molekularmassen der verwendeten Proteine

**Tabelle 5.1:** Die kalkulierten Molekularmassen (MW) der verwendeten Proteine. Alle Molekularmassen wurden mit Hilfe des Servers ExPASy ProtParam tool (<http://us.expasy.org/>) berechnet.

Protein	MW (kDa) mit tag	MW (kDa) ohne tag	MW (kDa) im MALDI-TOF-MS bestimmt
Nef(1-210)	27.094 (His)	24.126	26.983 (mit tag)
Nef(28-210)	24.094(His)	21.126	24.232 (mit tag)
Nef(45-210)	22.102 (His)	19.134	21.940 (mit tag)
Nef(59-210)	20.995 (His)	18.027	20.931 (mit tag)
Nef(C71)	27.124 (His)	24.156	27.142 (mit tag)
Nef(C85)	27.084 (His)	24.116	-
Nef(50)	27.094 (His)	24.126	26.969 (mit tag)
myrNef	25.609 (His)	-	26.641 (mit tag)
Nef(G2A)	25.575 (His)	-	25.563 (mit tag)
SH3(wt)	34.637 (GST)	7.556	7.722 (ohne tag)
SH3(A1)	34.592 (GST)	7.511	7.481 (ohne tag)
SH3(B6)	34.688	7.607	7.473 (ohne tag)
CD4-A1	39.372(GST)	11.968	39.203 (mit tag)
CD4-SQS-A1	15.032(His)	12.064	15.037 (mit tag)
CD4-SQS-A1	39.152 (GST)	12.064	-
CD4-LLAA-A1	39.099 (GST)	11.695	-
CD4-12G-A1	39.613 (GST)	12.209	39.641 (mit tag)
CD4-sh-A1	37.742 (GST)	10.338	37.950 (mit tag)
A1-CD4	39.372(GST)	11.968	39.303 (mit tag)
A1-CD4-SQS	15.032(His)	12.064	-
A1-CD4-sh	37.742 (GST)	10.338	37.802 (mit tag)
A1-CD4-LLAA	39.099 (GST)	11.695	-
$\beta$ 2(279-510)	29.390 (His)	26.422	29.240 (mit tag)

## 5.2.2 Übersicht der mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie ermittelten Daten

**Tabelle 5.2:** Übersicht der mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie bestimmten thermodynamischen Parameter der in dieser Arbeit beschriebenen Interaktionen.

Interaktion	$K_d$ (nM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n
Nef(45-210) & SH3*(wt)	1500	-7.931	-4.503	0.0115	3.428	0.97
Nef(45-210) & SH3*(A1)	180	-9.169	-8.161	0.0035	1.008	0.99
Nef(45-210) & SH3*(B6)	47	-9.924	-7.985	0.0067	1.939	0.95
$\beta 2(279-510)$ & Nef Peptid	2900	-7.338	-1.028	0.0219	6.310	0.69
Nef(1-210) & SH3(wt)	244	-8.706	-4.240	0.0155	4.466	1.08
Nef(1-210) & SH3(A1)	140	-9.035	-8.897	0.0005	0.138	1.07
Nef(1-210) & CD4-A1	84	-9.327	-8.506	0.0028	0.821	1.09
Nef(1-210) & A1-CD4	26	-10.011	-11.400	-0.0048	-1.388	0.97
Nef(1-210) & CD4-12G-A1	62	-9.508	-8.223	0.0044	1.285	1.06
Nef(1-210) & CD4-SQS-A1	87	-9.304	-8.8636	0.00232	0.668	1.12
Nef(1-210) & A1-CD4-SQS	27	-9.978	-11.500	-0.0053	-1.521	1.03
Nef(1-210) & A1-CD4-sh	41	-9.737	-7.035	0.0094	2.702	0.98
Nef(1-210) & A1-CD4-LLAA	96	-9.253	-6.910	0.0082	2.348	1.1
Nef(AxxA) & A1-CD4	1200	-8.091	-4.096	0.0134	3.995	0.85
Nef(28-210) & A1-CD4-sh	50	-9.612	-12.220	-0.0091	-2.607	1.00
Nef(45-210) & A1-CD4-sh	96	-9.272	-16.130	-0.0238	-6.857	1.06
Nef(59-210) & A1-CD4-sh	148	-9.099	-13.810	-0.0151	-4.472	0.98
myrNef & A1-CD4	52	-9.919	-6.789	0.0105	3.1305	1.01
Nef(G2A) & SH3(wt)	188	-9.004	-9.089	-0.0003	-0.0847	0.9
myrNef & SH3(wt)	150	-9.312	-9.589	-0.0009	-0.2761	0.87

### 5.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)-diethylammonio)-1-propansulfonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
RNA	Ribonukleinsäure
g	Gramm
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
ITC	isothermale Titrationskalorimetrie
kcal	Kilokalorie
kDa	Kilodalton
Lsg.	Lösung
min	Minute
myrNef	myristoyliertes Nef
MW	Molekulargewicht
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphatpuffer
nM	nanomolar
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ppm	parts per million
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
SH3	Src Homology-3
SPR	Surface Plasmon Resonanz Spektroskopie
SDS	Sodiumdodecylsulfat
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TGN	Trans Golgi Netzwerk
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

# Literaturverzeichnis

- [1] A Adachi, H E Gendelman, S Koenig, T Folks, R Willey, A Rabson, and M A Martin. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol*, 59(2):284–291, Aug 1986.
- [2] R C Aguilar, M Boehm, I Gorshkova, R J Crouch, K Tomita, T Saito, H Ohno, and J S Bonifacino. Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J Biol Chem*, 276(16):13145–13152, Apr 2001.
- [3] C Aiken, J Konner, N R Landau, M E Lenburg, and D Trono. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*, 76(5):853–864, Mar 1994.
- [4] C Aiken, L Krause, Y-L Chen, and D Trono. Mutational Analysis of HIV-1 Nef: Identification of Two Mutants That Are Temperature-Sensitive for CD4 Downregulation. *Virology*, 217:293–300, 1996.
- [5] C Aiken and D Trono. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J Virol*, 69(8):5048–5056, Aug 1995.
- [6] G M Aldrovandi and J A Zack. Replication and pathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 accessory gene mutants in SCID-hu mice. *J Virol*, 70(3):1505–1511, Mar 1996.
- [7] J S Allan, J E Coligan, T H Lee, M F McLane, P J Kanki, J E Groopman, and M Essex. A new HTLV-III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. *Science*, 230(4727):810–813, Nov 1985.
- [8] J B Ames, R Ishima, T Tanaka, J I Gordon, L Stryer, and M Ikura. Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature*, 389(6647):198–202, Sep 1997.
- [9] J L Anderson and T J Hope. HIV accessory proteins and surviving the host cell. *Curr HIV/AIDS Rep*, 1(1):47–53, Apr 2004.
- [10] S J Anderson, M Lenburg, N R Landau, and J V Garcia. The cytoplasmic domain of CD4 is sufficient for its down-regulation from the cell surface by human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol*, 68(5):3092–3101, May 1994.

- [11] M A Andrade, C Petosa, S I O'Donoghue, C W Muller, and P Bork. Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J Mol Biol*, 309(1):1–18, May 2001.
- [12] B Antonny, S Beraud-Dufour, P Chardin, and M Chabre. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*, 36(15):4675–4684, Apr 1997.
- [13] S Arold, P Franken, M P Strub, F Hoh, S Benichou, R Benarous, and C Dumas. The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signaling. *Structure*, 5(10):1361–1372, Oct 1997.
- [14] S Arold, F Hoh, S Domergue, C Birck, M A Delsuc, M Jullien, and C Dumas. Characterization and molecular basis of the oligomeric structure of HIV-1 nef protein. *Protein Sci*, 9(6):1137–1148, Jun 2000.
- [15] S Arold, R O'Brien, P Franken, M P Strub, F Hoh, C Dumas, and J E Ladbury. RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef. *Biochemistry*, 37(42):14683–14691, Oct 1998.
- [16] S T Arold and A S Baur. Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends Biochem Sci*, 26(6):356–363, Jun 2001.
- [17] A A Azad. Novel Drugs and Vaccines Based on the Structure and Function of HIV Pathogenic Proteins Including Nef. *Ann N Y Acad Sci*, 1056:279–292, Nov 2005.
- [18] F Barre-Sinoussi, J C Chermann, F Rey, M T Nugeyre, S Chamaret, J Gruest, C Dauguet, C Axler-Blin, F Vezinet-Brun, C Rouzioux, W Rozenbaum, and L Montagnier. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Rev Invest Clin*, 56(2):126–129, Mar 2004. Biography.
- [19] A S Baur, G Sass, B Laffert, D Willbold, C Cheng-Mayer, and B M Peterlin. The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. *Immunity*, 6(3):283–291, Mar 1997.
- [20] A S Baur, E T Sawai, P Dazin, W J Fantl, C Cheng-Mayer, and B M Peterlin. HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity*, 1(5):373–384, Aug 1994.
- [21] S Benichou, M Bomsel, M Bodeus, H Durand, M Doute, F Letourneur, J Camonis, and R Benarous. Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J Biol Chem*, 269(48):30073–30076, Dec 1994.

- [22] S Benichou, L X Liu, L Erdtmann, L Selig, and R Benarous. Use of the two-hybrid system to identify cellular partners of the HIV1 Nef protein. *Res Virol*, 148(1):71–73, Jan 1997.
- [23] S Benn, R Rutledge, T Folks, J Gold, L Baker, J McCormick, P Feorino, P Piot, T Quinn, and M Martin. Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science*, 230(4728):949–951, Nov 1985.
- [24] R E Benson, A Sanfridson, J S Ottinger, C Doyle, and B R Cullen. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp Med*, 177(6):1561–1566, Jun 1993.
- [25] M Bentham, S Mazaleyrat, and M Harris. The di-leucine motif in the cytoplasmic tail of CD4 is not required for binding to human immunodeficiency virus type 1 Nef, but is critical for CD4 down-modulation. *J Gen Virol*, 84(Pt 10):2705–2713, Oct 2003.
- [26] A D Blagoveshchenskaya, L Thomas, S F Feliciangeli, C H Hung, and G Thomas. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell*, 111(6):853–866, Dec 2002.
- [27] M Bodeus, A Marie-Cardine, C Bougeret, F Ramos-Morales, and R Benarous. In vitro binding and phosphorylation of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein by serine/threonine protein kinase. *J Gen Virol*, 76 ( Pt 6):1337–1344, Jun 1995.
- [28] S Bour, R Geleziunas, and M A Wainberg. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev*, 59(1):63–93, Mar 1995.
- [29] S Bour, C Perrin, and K Strebel. Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *J Biol Chem*, 274(47):33800–33806, Nov 1999.
- [30] S Bour and K Strebel. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect*, 5(11):1029–1039, Sep 2003.
- [31] MM Bradford. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 73:248–254, 1976.
- [32] T Bremnes, V Lauvrak, B Lindqvist, and O Bakke. A region from the medium chain adaptor subunit ( $\mu$ ) recognizes leucine- and tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem*, 273(15):8638–8645, Apr 1998.
- [33] P A Bresnahan, W Yonemoto, S Ferrell, D Williams-Herman, R Geleziunas, and W C Greene. A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr Biol*, 8(22):1235–1238, Nov 1998.

- [34] S Breuer, H Gerlach, B Kolaric, C Urbanke, N Opitz, and M Geyer. Biochemical indication for myristoylation-dependent conformational changes in HIV-1 Nef. *Biochemistry*, 45(7):2339–2349, Feb 2006.
- [35] P Carter, H Bedouelle, and G Winter. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res*, 13(12):4431–4443, Jun 1985.
- [36] N Casartelli, G Di Matteo, C Argentini, C Cancrini, S Bernardi, G Castelli, G Scarlatti, A Plebani, P Rossi, and M Doria. Structural defects and variations in the HIV-1 nef gene from rapid, slow and non-progressor children. *AIDS*, 17(9):1291–1301, Jun 2003.
- [37] JH Chan, G A Freeman, J H Tidwell, K R Romines, L T Schaller, J R Cowan, S S Gonzales, G S Lowell, C W 3rd Andrews, D J Reynolds, M St Clair, RJ Hazen, R G Ferris, K L Creech, G B Roberts, S A Short, K Weaver, G W Koszalka, and L R Boone. Novel benzophenones as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-1. *J Med Chem*, 47(5):1175–1182, Feb 2004.
- [38] A Chaudhry, S R Das, A Hussain, S Mayor, A George, V Bal, S Jameel, and S Rath. The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J Immunol*, 175(7):4566–4574, Oct 2005.
- [39] N Chen, C McCarthy, H Drakesmith, D Li, V Cerundolo, A J McMichael, G R Screaton, and X Xu. HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef. *Eur J Immunol*, 36(2):278–286, Feb 2006.
- [40] Y L Chen, D Trono, and D Camaur. The proteolytic cleavage of human immunodeficiency virus type 1 Nef does not correlate with its ability to stimulate virion infectivity. *J Virol*, 72(4):3178–3184, Apr 1998.
- [41] M Y Chowes, C A Spina, T J Kwoh, N J Fitch, D D Richman, and J C Guatelli. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol*, 68(5):2906–2914, May 1994.
- [42] E A Cohen, R A Subramanian, and H G Gottlinger. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 214:219–235, 1996.
- [43] S H Coleman, R Madrid, N Van Damme, R S Mitchell, J Bouchet, C Servant, S Pillai, S Benichou, and J C Guatelli. Modulation of cellular protein trafficking by human immunodeficiency virus type 1 Nef: role of the acidic residue in the ExxxLL motif. *J Virol*, 80(4):1837–1849, Feb 2006.
- [44] S H Coleman, N Van Damme, J R Day, C M Noviello, D Hitchin, R Madrid, S Benichou, and J C Guatelli. Leucine-specific, functional interactions between human immunodeficiency virus type 1 Nef and adaptor protein complexes. *J Virol*, 79(4):2066–2078, Feb 2005.
- [45] Y Collette, H Dutartre, A Benziane, R Benarous, M Harris, and D Olive. Physical and functional interaction of Nef with Lck. HIV-1 Nef-induced T-cell signaling defects. *J Biol Chem*, 271(11):6333–6341, Mar 1996.

- [46] B M Collins, A J McCoy, H M Kent, P R Evans, and D J Owen. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell*, 109(4):523–535, May 2002.
- [47] L J Costa, Y Zheng, J Sabotic, J Mak, O T Fackler, and B M Peterlin. Nef binds p6\* in GagPol during replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 78(10):5311–5323, May 2004.
- [48] H M Craig, M W Pandori, and J C Guatelli. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(19):11229–11234, Sep 1998.
- [49] H M Craig, T R Reddy, N L Riggs, P P Dao, and J C Guatelli. Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. *Virology*, 271(1):9–17, May 2000.
- [50] P Crespo, K E Schuebel, A A Ostrom, J S Gutkind, and X R Bustelo. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature*, 385(6612):169–172, Jan 1997.
- [51] B R Cullen. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell*, 93(5):685–692, May 1998.
- [52] A T Das, T R Brummelkamp, E M Westerhout, M Vink, M Madiredjo, R Bernards, and B Berkhout. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol*, 78(5):2601–2605, Mar 2004.
- [53] S R Das and S Jameel. Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res*, 121(4):315–332, Apr 2005.
- [54] N J Deacon, A Tsykin, A Solomon, K Smith, M Ludford-Menting, D J Hooker, D A McPhee, A L Greenway, A Ellett, C Chatfield, V A Lawson, S Crowe, A Maerz, S Sonza, J Learmont, J S Sullivan, A Cunningham, D Dwyer, D Downton, and J Mills. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science*, 270(5238):988–991, Nov 1995.
- [55] C A Dennis, A Baron, J G Grossmann, S Mazaleyrat, M Harris, and J Jaeger. Co-translational myristoylation alters the quaternary structure of HIV-1 Nef in solution. *Proteins*, 60(4):658–669, Sep 2005.
- [56] C A Derdeyn, J M Decker, J N Sfakianos, Z Zhang, W A O’Brien, L Ratner, G M Shaw, and E Hunter. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp120 interactions with the coreceptor. *J Virol*, 75(18):8605–8614, Sep 2001.
- [57] U Dianzani, T Bensi, A Savarino, S Sametti, M Indelicato, R Mesturini, and A Chicchetti. Role of FAS in HIV infection. *Curr HIV Res*, 1(4):405–417, Oct 2003.

- [58] J Dietrich, J Kastrup, B L Nielsen, N Odum, and Geisler C. Regulation and function of the CD3 gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol*, 138:271–281, 1997.
- [59] B Doray, K Bruns, P Ghosh, and S A Kornfeld. Autoinhibition of the ligand-binding site of GGA1/3 VHS domains by an internal acidic cluster-dileucine motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12):8072–8077, Jun 2002.
- [60] H Drakesmith, N Chen, H Ledermann, G Screaton, A Townsend, and X Xu. HIV-1 Nef down-regulates the hemochromatosis protein HFE, manipulating cellular iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(31):11017–11022, Aug 2005.
- [61] T Dull, R Zufferey, M Kelly, R J Mandel, M Nguyen, D Trono, and L Naldini. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 72(11):8463–8471, Nov 1998.
- [62] J D Dunitz. Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem Biol*, 2(11):709–712, Nov 1995.
- [63] M Emerman. How TRIM5alpha defends against retroviral invasions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Mar 2006. JOURNAL ARTICLE.
- [64] O T Fackler, N Kienzle, E Kremmer, A Boese, B Schramm, T Klimkait, C Kucherer, and N Mueller-Lantzsch. Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization. *Eur J Biochem*, 247(3):843–851, Aug 1997.
- [65] O T Fackler, X Lu, J A Frost, M Geyer, B Jiang, W Luo, A Abo, A S Alberts, and B M Peterlin. p21-activated kinase 1 plays a critical role in cellular activation by Nef. *Mol Cell Biol*, 20(7):2619–2627, Apr 2000.
- [66] O T Fackler, W Luo, M Geyer, A S Alberts, and B M Peterlin. Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Mol Cell*, 3(6):729–739, Jun 1999.
- [67] T Falguieres, F Mallard, C Baron, D Hanau, C Lingwood, B Goud, J Salamero, and L Johannes. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell*, 12(8):2453–2468, Aug 2001.
- [68] D Fenard, W Yonemoto, C de Noronha, M Cavois, S A Williams, and W C Greene. Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement. *J Immunol*, 175(9):6050–6057, Nov 2005.
- [69] D Fenard, W Yonemoto, C de Noronha, M Cavois, S A Williams, and W C Greene. Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement. *J Immunol*, 175(9):6050–6057, Nov 2005.

- [70] HF Fisher and N Singh. Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods Enzymol*, 259:194–221, 1995.
- [71] J Fortin, C Barat, Y Beausejour, B Barbeau, and M J Tremblay. Hyper-responsiveness to stimulation of human immunodeficiency virus-infected CD4+ T cells requires Nef and Tat virus gene products and results from higher NFAT, NF-kappaB, and AP-1 induction. *J Biol Chem*, 279(38):39520–39531, Sep 2004.
- [72] E O Freed, D J Myers, and R Risser. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12):4650–4654, Jun 1990.
- [73] J Freund, R Kellner, J Konvalinka, V Wolber, H G Kräusslich, and H R Kalbitzer. A possible regulation of negative factor (Nef) activity of human immunodeficiency virus type 1 by the viral protease. *Eur. J. Biochem*, 223:589–593, 1994.
- [74] T Friedberg, U Milbert, P Bentley, T M Guenther, and F Oesch. Purification and characterization of a new cytosolic glutathione S-transferase (glutathione S-transferase X) from rat liver. *Biochem J*, 215(3):617–625, Dec 1983.
- [75] Y Fujii, K Otake, Y Fujita, N Yamamoto, Y Nagai, M Tashiro, and A Adachi. Clustered localization of oligomeric Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 on the cell surface. *FEBS Lett*, 395(2-3):257–261, Oct 1996.
- [76] I Gaidarov, Q Chen, J R Falck, K K Reddy, and J H Keen. A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. Implications for the endocytic pathway. *J Biol Chem*, 271(34):20922–20929, Aug 1996.
- [77] J V Garcia and A D Miller. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature*, 350(6318):508–511, Apr 1991.
- [78] K C Garcia, L Teyton, and I A Wilson. Structural basis of T-Cell recognition. *Annu Rev Immunol*, 17:369–397, 1999.
- [79] R Geleziunas, W Xu, K Takeda, H Ichijo, and W C Greene. HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature*, 410(6830):834–838, Apr 2001.
- [80] H Gerlach. *Fluoreszenzstudien zur Analyse der Membranbindungsmotive des myristoylierten HIV-1 Nef Proteins*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, Fachbereich Biochemie, 2004.
- [81] M Geyer, O T Fackler, and B M Peterlin. Structure–function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep*, 2(7):580–585, Jul 2001.
- [82] M Geyer, O T Fackler, and B M Peterlin. Subunit H of the V-ATPase involved in endocytosis shows homology to beta-adaptins. *Mol Biol Cell*, 13(6):2045–2056, Jun 2002.

- [83] M Geyer, C E Munte, J Schorr, R Kellner, and H R Kalbitzer. Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *J Mol Biol*, 289(1):123–138, May 1999.
- [84] M Geyer and B M Peterlin. Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS Lett*, 496(2-3):91–95, May 2001.
- [85] M Geyer, H Yu, R Mandic, T Linnemann, Y Zheng, O T Fackler, and B M Peterlin. Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery. *J Biol Chem*, 277(32):28521–28529, Aug 2002.
- [86] M A Goldsmith, M T Warmerdam, R E Atchison, M D Miller, and W C Greene. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol*, 69(7):4112–4121, Jul 1995.
- [87] S Gratton, X J Yao, S Venkatesan, E A Cohen, and R P Sekaly. Molecular analysis of the cytoplasmic domain of CD4: overlapping but noncompetitive requirement for lck association and down-regulation by Nef. *J Immunol*, 157(8):3305–3311, Oct 1996.
- [88] M Greenberg, L DeTulleo, I Rapoport, J Skowronski, and T Kirchhausen. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr Biol*, 8(22):1239–1242, Nov 1998.
- [89] M E Greenberg, S Bronson, M Lock, M Neumann, G N Pavlakis, and J Skowronski. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J*, 16(23):6964–6976, Dec 1997.
- [90] W C Greene and B M Peterlin. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med*, 8(7):673–680, Jul 2002.
- [91] S Grzesiek, A Bax, J S Hu, J Kaufman, I Palmer, S J Stahl, N Tjandra, and P T Wingfield. Refined solution structure and backbone dynamics of HIV-1 Nef. *Protein Sci*, 6(6):1248–1263, Jun 1997.
- [92] S Grzesiek, S J Stahl, P T Wingfield, and A Bax. The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry*, 35(32):10256–10261, Aug 1996.
- [93] B Guy, M P Kieny, Y Riviere, C Le Peuch, K Dott, M Girard, L Montagnier, and J P Lecocq. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature*, 330(6145):266–269, Nov 1987.
- [94] C R Haft, R D Klausner, and S I Taylor. Involvement of dileucine motifs in the internalization and degradation of the insulin receptor. *J Biol Chem*, 269(42):26286–26294, Oct 1994.

- [95] T Harder and K Simons. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*, 9(4):534–542, Aug 1997.
- [96] M Harris. The role of myristoylation in the interactions between human immunodeficiency virus type I Nef and cellular proteins. *Biochem Soc Trans*, 23(3):557–561, Aug 1995.
- [97] M Hiipakka, K Poikonen, and K Saksela. SH3 domains with high affinity and engineered ligand specificities targeted to HIV-1 Nef. *J Mol Biol*, 293(5):1097–1106, Nov 1999.
- [98] S Höning, D Ricotta, M Krauss, K Späte, B Spolaore, A Motley, M Robinson, C Robinson, V Haucke, and D J Owen. Phosphatidylinositol-(4,5)-Biphosphate Regulates Sorting Signal Recognition by the Clathrin-Associated Adaptor Complex AP2. *Mol Cell*, 18(4):519–531, May 2005.
- [99] S Höning, I Sandoval, and K von Figura. A di-leucine based motif in the cytoplasmic tail of limp-II and tyrosinase selective binding of AP3. *EMBO J*, 17:1304–1314, 1998.
- [100] K Hrecka, T Swigut, M Schindler, F Kirchhoff, and J Skowronski. Nef proteins from diverse groups of primate lentiviruses downmodulate CXCR4 to inhibit migration to the chemokine stromal derived factor 1. *J Virol*, 79(16):10650–10659, Aug 2005.
- [101] Invitrogen. *Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. Invitrogen Corporation, Karlsruhe, 2005.
- [102] B D Jamieson, G M Aldrovandi, V Planelles, J B Jowett, L Gao, L M Bloch, I S Chen, and J A Zack. Requirement of human immunodeficiency virus type 1 nef for in vivo replication and pathogenicity. *J Virol*, 68(6):3478–3485, Jun 1994.
- [103] A Janardhan, T Swigut, B Hill, M P Myers, and J Skowronski. HIV-1 Nef binds the DOCK2-ELMO1 complex to activate rac and inhibit lymphocyte chemotaxis. *PLoS Biol*, 2(1):E6, Jan 2004.
- [104] K Janvier, H Craig, S Le Gall, R Benarous, J Guatelli, O Schwartz, and S Benichou. Nef-induced CD4 downregulation: a diacidic sequence in human immunodeficiency virus type 1 Nef does not function as a protein sorting motif through direct binding to beta-COP. *J Virol*, 75(8):3971–3976, Apr 2001.
- [105] K Janvier, Y Kato, M Boehm, J R Rose, J A Martina, B Kim, S Venkatesan, and J S Bonifacino. Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J Cell Biol*, 163(6):1281–1290, Dec 2003.
- [106] I Jelesarov and H R Bosshard. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit*, 12(1):3–18, Jan 1999.

- [107] Y Jin, C Y Cai, X Zhang, H Zhang, J A Hirst, and S J Burakoff. HIV Nef-mediated CD4 down-regulation is adaptor protein complex 2 dependent. *J Immunol*, 175(5):3157–3164, Sep 2005.
- [108] Y Jin, X Zhang, J G Boursiquot, and S J Burakoff. CD4 phosphorylation partially reverses Nef down-regulation of CD4. *J Immunol*, 173(9):5495–5500, Nov 2004.
- [109] J Kaminchik, R Margalit, S Yaish, H Drummer, B Amit, N Sarver, M Gorecki, and A Planet. Cellular distribution of HIV-1 type Nef protein: identification of domains in Nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 10:1003–1010, 1994.
- [110] M R Kasper, J F Roeth, M Williams, T M Filzen, R I Fleis, and K L Collins. HIV-1 Nef disrupts antigen presentation early in the secretory pathway. *J Biol Chem*, 280(13):12840–12848, Apr 2005.
- [111] H W 3rd Kestler, D J Ringler, K Mori, D L Panicali, P K Sehgal, M D Daniel, and R C Desrosiers. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*, 65(4):651–662, May 1991.
- [112] C Kiel. *Untersuchung von Ras/Effektor-Komplexen mit gezielt veränderten elektrostatischen Eigenschaften*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Fachbereich Biochemie, 2003.
- [113] J M Kilby, S Hopkins, T M Venetta, B DiMassimo, G A Cloud, J Y Lee, L Alldredge, E Hunter, D Lambert, D Bolognesi, T Matthews, M R Johnson, M A Nowak, G M Shaw, and M S Saag. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med*, 4(11):1302–1307, Nov 1998. Clinical Trial.
- [114] P W Kim, Z J Sun, S C Blacklow, G Wagner, and M J Eck. A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science*, 301(5640):1725–1728, Sep 2003.
- [115] F Kirchhoff, T C Greenough, D B Brettler, J L Sullivan, and R C Desrosiers. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med*, 332(4):228–232, Jan 1995. Case Reports.
- [116] E Krautkramer, S I Giese, J E Gasteier, W Muranyi, and O T Fackler. Human immunodeficiency virus type 1 Nef activates p21-activated kinase via recruitment into lipid rafts. *J Virol*, 78(8):4085–4097, Apr 2004.
- [117] N A Kshirsagar, S K Pandya, B G Kirodian, and S Sanath. Liposomal drug delivery system from laboratory to clinic. *J Postgrad Med*, 51 Suppl:S5–S15, Oct 2005.
- [118] UK Laemmli. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.

- [119] J P Lalezari, E DeJesus, D W Northfelt, G Richmond, P Wolfe, R Haubrich, D Henry, W Powderly, S Becker, M Thompson, F Valentine, D Wright, M Carlson, S Riddler, F F Haas, R DeMasi, P R Sista, M Salgo, and J Delehanty. A controlled Phase II trial assessing three doses of enfuvirtide (T-20) in combination with abacavir, amprenavir, ritonavir and efavirenz in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-naive HIV-infected adults. *Antivir Ther*, 8(4):279–287, Aug 2003. Clinical Trial.
- [120] J Lama. The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. *Curr HIV Res*, 1(2):167–184, Apr 2003.
- [121] R A Lamb and L H Pinto. Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B virus have ion channel activities in the viral life cycles? *Virology*, 229(1):1–11, Mar 1997.
- [122] V Laumann. *Synthese der zytoplasmatischen Domäne von CD4 zur Analyse der Interaktion mit HIV-1 Nef*. Diplomarbeit, Universität Dortmund, Fachbereich Chemie, 2004.
- [123] J Lebowitz, M S Lewis, and P Schuck. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci.*, 11:2067–2079, 2002.
- [124] C H Lee, B Leung, M A Lemmon, J Zheng, D Cowburn, J Kuriyan, and K Saksela. A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J*, 14(20):5006–5015, Oct 1995.
- [125] C H Lee, K Saksela, U A Mirza, B T Chait, and J Kuriyan. Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell*, 85(6):931–942, Jun 1996.
- [126] F Letourneur and R D Klausner. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell*, 69:1143–1157, 1992.
- [127] D A Lewin and I Mellman. Sorting out adaptors. *Biochim Biophys Acta*, 1401(2):129–145, Feb 1998.
- [128] K A Lichtenstein, C Armon, A C Moorman, K C Wood, and S D Holmberg. A 7-year longitudinal analysis of IL-2 in patients treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, 18(17):2346–2348, Nov 2004. Letter.
- [129] S J Little, N L Riggs, M Y Chowes, N J Fitch, D D Richman, C A Spina, and J C Guatelli. Cell surface CD4 downregulation and resistance to superinfection induced by a defective provirus of HIV-1. *Virology*, 205(2):578–582, Dec 1994.
- [130] L X Liu, N Heveker, O T Fackler, S Arold, S Le Gall, K Janvier, B M Peterlin, C Dumas, O Schwartz, S Benichou, and R Benarous. Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions. *J Virol*, 74(11):5310–5319, Jun 2000.

- [131] F Lottspeich and H Zorbas. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, 1998.
- [132] P A Luciw, C Cheng-Mayer, and J A Levy. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(5):1434–1438, Mar 1987.
- [133] R Lumry and S Rajender. Enthalpy-entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules: a ubiquitous property of water. *Biopolymers*, 9(10):1125–1227, 1970.
- [134] T Luo, B L Fredericksen, K Hasumi, A Endo, and J V Garcia. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced CD4 cell surface downregulation is inhibited by ikarugamycin. *J Virol*, 75(5):2488–2492, Mar 2001.
- [135] T Luo and J V Garcia. The association of Nef with a cellular serine/threonine kinase and its enhancement of infectivity are viral isolate dependent. *J Virol*, 70(9):6493–6496, Sep 1996.
- [136] R R MacGregor. Clinical protocol. A phase 1 open-label clinical trial of the safety and tolerability of single escalating doses of autologous CD4 T cells transduced with VRX496 in HIV-positive subjects. *Hum Gene Ther*, 12(16):2028–2029, Nov 2001. Clinical Trial.
- [137] A Mangasarian, V Piguët, J Wang, Y Chen, and D Trono. Nef-Induced CD4 and Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) Down-Regulation Are Governed by Distinct Determinants: N-Terminal Alpha Helix and Proline Repeat of Nef Selectively Regulate MHC-I Trafficking. *J Virol*, 73(3):1964–1973, Mar 1999.
- [138] B Mangeat, P Turelli, G Caron, M Friedli, L Perrin, and D Trono. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, 424(6944):99–103, Jul 2003.
- [139] A Manninen, M Hiipakka, M Vihinen, W Lu, B J Mayer, and K Saksela. SH3-Domain binding function of HIV-1 Nef is required for association with a PAK-related kinase. *Virology*, 250(2):273–282, Oct 1998.
- [140] S McLaughlin and A Aderem. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci*, 20(7):272–276, Jul 1995.
- [141] C Meyer, D Zizioli, S Lausmann, E L Eskelinen, J Hamann, P Saftig, K von Figura, and P Schu. mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J*, 19(10):2193–2203, May 2000.
- [142] N Michel, I Allespach, S Venzke, O T Fackler, and O T Keppler. The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr Biol*, 15(8):714–723, Apr 2005.

- [143] K V Morris and J J Rossi. Anti-HIV-1 gene expressing lentiviral vectors as an adjunctive therapy for HIV-1 infection. *Curr HIV Res*, 2(2):185–191, Apr 2004.
- [144] A Musacchio, M Saraste, and M Wilmanns. High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides. *Nat Struct Biol*, 1(8):546–551, Aug 1994.
- [145] L Naldini, U Blomer, P Gally, D Ory, R Mulligan, F H Gage, I M Verma, and D Trono. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259):263–267, Apr 1996.
- [146] T M Niederman, J V Garcia, W R Hastings, S Luria, and L Ratner. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits NF-kappa B induction in human T cells. *J Virol*, 66(10):6213–6219, Oct 1992.
- [147] T M Niederman, W R Hastings, and L Ratner. Myristoylation-enhanced binding of the HIV-1 Nef protein to T cell skeletal matrix. *Virology*, 197(1):420–425, Nov 1993.
- [148] M E Noble, A Musacchio, M Saraste, S A Courtneidge, and R K Wierenga. Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin. *EMBO J*, 12(7):2617–2624, Jul 1993.
- [149] M F Nunn and J W Marsh. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a member of the p21-activated kinase family. *J Virol*, 70(9):6157–6161, Sep 1996.
- [150] G Nunnari and R J Pomerantz. IL-7 as a potential therapy for HIV-1-infected individuals. *Expert Opin Biol Ther*, 5(11):1421–1426, Nov 2005.
- [151] H Ohno, J Stewart, M C Fournier, H Bosshart, I Rhee, S Miyatake, T Saito, A Gallusser, T Kirchhausen, and J S Bonifacino. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*, 269(5232):1872–1875, Sep 1995.
- [152] E Olivetta and M Federico. HIV-1 Nef protects human-monocyte-derived macrophages from HIV-1-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 312(6):890–900, Apr 2006.
- [153] A Olszewski, K Sato, Z D Aron, F Cohen, A Harris, B R McDougall, W E Jr Robinson, L E Overman, and G A Weiss. Guanidine alkaloid analogs as inhibitors of HIV-1 Nef interactions with p53, actin, and p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(39):14079–14084, Sep 2004.
- [154] S Omoto, M Ito, Y Tsutsumi, Y Ichikawa, H Okuyama, E A Brisibe, N K Saksena, and Y R Fujii. HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology*, 1(1):44, Dec 2004.

- [155] D J Owen and P R Evans. A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science*, 282(5392):1327–1332, Nov 1998.
- [156] M W Pandori, N J Fitch, H M Craig, D D Richman, C A Spina, and J C Guatelli. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J Virol*, 70(7):4283–4290, Jul 1996.
- [157] W. S. Pear, G. P. Nolan, M. L. Scott, and D Baltimore. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18):8392–6, Jul 1993.
- [158] B Peng and M Robert-Guroff. Deletion of N-terminal myristoylation site of HIV Nef abrogates both MHC-1 and CD4 down-regulation. *Immunol Lett*, 78(3):195–200, Oct 2001.
- [159] R Perezzo, G Folkers, and L Scapozza. Thermodynamics of Protein-Ligand Interactions: History, Presence and Future Aspects. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 24(1):1–52, 2004.
- [160] V Piguet, Y Chen, A Mangasarian, M Foti, J Carpentier, and D Trono. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the  $\mu$  chain of adaptor complexes. *EMBO J*, 17(9):2472–2481, 1998.
- [161] A Preusser, L Briese, A Baur, and D Willbold. Direct In Vitro Binding of Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Protein to CD4 Cytoplasmic Domain. *J Virol*, 75(8):3960–3964, 2001.
- [162] A Preusser, L Briese, and D Willbold. Presence of a helix in human CD4 cytoplasmic domain promotes binding to HIV-1 Nef protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 292(3):734–740, Apr 2002.
- [163] K Princen, S Hatse, K Vermeire, S Aquaro, E De Clercq, L Gerlach, M Rosenkilde, Th W Schwartz, R Skerlj, G Bridger, and D Schols. Inhibition of human immunodeficiency virus replication by a dual CCR5/CXCR4 antagonist. *J Virol*, 78(23):12996–13006, Dec 2004.
- [164] W Proctor and F Yu. The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound. *Phys Rev*, 77:717, 1950.
- [165] A Pugliese, C Cantamessa, A Saini, A Piragino, L Gennero, C Martini, and D Torre. Effects of the exogenous Nef protein on HIV-1 target cells. *Cell Biochem Funct*, 17(3):183–192, Sep 1999.
- [166] X Qiao, B He, A Chiu, DM Knowles, A Chadburn, and A Cerutti. Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol*, Jan 2006. JOURNAL ARTICLE.
- [167] I Rapoport, Y C Chen, P Cupers, S E Shoelson, and T Kirchhausen. Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and

- regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J*, 17(8):2148–2155, Apr 1998.
- [168] G H Renkema, A Manninen, D A Mann, M Harris, and K Saksela. Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Curr Biol*, 9(23):1407–1410, Dec 1999.
- [169] L T Rimsky, D C Shugars, and T J Matthews. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol*, 72(2):986–993, Feb 1998.
- [170] D G Rodionov and O Bakke. Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J Biol Chem*, 273(11):6005–6008, Mar 1998.
- [171] J F Roeth, M Williams, M R Kasper, T M Filzen, and K L Collins. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *J Cell Biol*, 167(5):903–913, Dec 2004.
- [172] G Rohde, D Wenzel, and V Haucke. A phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 158(2):209–214, Jul 2002.
- [173] F Rossi, A Gallina, and G Milanesi. Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system. *Virology*, 217(1):397–403, Mar 1996.
- [174] K Saksela, G Cheng, and D Baltimore. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J*, 14(3):484–491, Feb 1995.
- [175] S Salghetti, R Mariani, and J Skowronski. Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(2):349–353, Jan 1995.
- [176] R Sanchez-Pescador, M D Power, P J Barr, K S Steimer, M M Stempien, S L Brown-Shimer, W W Gee, A Renard, A Randolph, and J A Levy. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science*, 227(4686):484–492, Feb 1985.
- [177] F Sanger, S Nicklen, and A R Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–5467, Dec 1977.
- [178] M Schindler, S Wurfl, P Benaroch, T C Greenough, R Daniels, P Easterbrook, M Brenner, J Munch, and F Kirchhoff. Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J Virol*, 77(19):10548–10556, Oct 2003.

- [179] J A Schragar and J W Marsh. HIV-1 Nef increases T cell activation in a stimulus-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14):8167–8172, Jul 1999.
- [180] P Schuck. Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26:541–566, 1997.
- [181] K Sharp. Entropy-enthalpy compensation: fact or artifact? *Protein Sci*, 10(3):661–667, Mar 2001.
- [182] N Sol-Foulon, A Moris, C Nobile, C Boccaccio, A Engering, J Abastado, J Heard, Y van Kooyk, and O Schwartz. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity*, 16(1):145–155, Jan 2002.
- [183] C A Spina, T J Kwok, M Y Chowers, J C Guatelli, and D D Richman. The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J Exp Med*, 179(1):115–123, Jan 1994.
- [184] R M Steinman, A Granelli-Piperno, M Pope, C Trumpfheller, R Ignatius, G Arrode, P Racz, and K Tenner-Racz. The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 276:1–30, 2003.
- [185] J Sticht, M Humbert, S Findlow, J Bodem, B Muller, U Dietrich, J Werner, and H-G Krausslich. A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nat Struct Mol Biol*, 12(8):671–677, Aug 2005.
- [186] V Stove, I Van de Walle, E Naessens, E Coene, C Stove, J Plum, and B Verhasselt. Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alpha. *J Virol*, 79(17):11422–11433, Sep 2005.
- [187] M Stremlau, C M Owens, M J Perron, M Kiessling, and J Autissier, Pand Sordroski. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427(6977):848–853, Feb 2004.
- [188] F W Studier and B A Moffatt. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189(1):113–130, May 1986.
- [189] P Stumptner-Cuvelette, S Morchoisne, M Dugast, S Le Gall, G Raposo, O Schwartz, and P Benaroch. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(21):12144–12149, Oct 2001.
- [190] T Swigut, M Greenberg, and J Skowronski. Cooperative interactions of simian immunodeficiency virus Nef, AP-2, and CD3-zeta mediate the selective induction of T-cell receptor-CD3 endocytosis. *J Virol*, 77(14):8116–8126, Jul 2003.

- [191] T Swigut, N Shohdy, and J Skowronski. Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J*, 20(7):1593–1604, Apr 2001.
- [192] S Swingler, B Brichacek, J Jacque, C Ulich, J Zhou, and M Stevenson. HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature*, 424(6945):213–219, Jul 2003.
- [193] F Ternois, J Sticht, S Duquerroy, H-G Krausslich, and F A Rey. The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor. *Nat Struct Mol Biol*, 12(8):678–682, Aug 2005.
- [194] E Terwilliger, J G Sodroski, C A Rosen, and W A Haseltine. 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. *J Virol*, 60(2):754–760, Nov 1986.
- [195] D Trono and J K Wang. Nef and PAK: virulence factor and cellular accomplice. *Chem Biol*, 4(1):13–15, Jan 1997.
- [196] G M van Bleek and S G Nathenson. Presentation of antigenic peptides by MHC class I molecules. *Trends Cell Biol*, 2(7):202–207, Jul 1992.
- [197] F Wang, Y Xu, J Sullivan, E Souder, E G Argyris, E A Acheampong, J Fisher, M Sierra, M M Thomson, R Najera, I Frank, J Kulkosky, R J Pomerantz, and G Nunnari. IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *J Clin Invest*, 115(1):128–137, Jan 2005.
- [198] J K Wang, E Kiyokawa, E Verdin, and D Trono. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(1):394–399, Jan 2000.
- [199] X Wei, JM Decker, H Liu, Z Zhang, R B Arani, J M Kilby, M S Saag, X Wu, G M Shaw, and J C Kappes. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(6):1896–1905, Jun 2002.
- [200] R Welker, H Kottler, H R Kalbitzer, and H G Krausslich. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology*, 219(1):228–236, May 1996.
- [201] D Willbold and P Rosch. Solution Structure of the Human CD4 (403-419) Receptor Peptide. *J Biomed Sci*, 3(6):435–441, Nov 1996. JOURNAL ARTICLE.
- [202] M Williams, J F Roeth, M R Kasper, R I Fleis, C G Przybycin, and K L Collins. Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking. *J Virol*, 76(23):12173–12184, Dec 2002.

- [203] T Wiseman, S Williston, J F Brandts, and L N Lin. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem*, 179(1):131–137, May 1989.
- [204] V Witte, B Laffert, O Rosorius, P Lischka, K Blume, G Galler, A Stilper, D Willbold, P D'Aloja, M Sixt, J Kolanus, M Ott, W Kolanus, G Schuler, and A S Baur. HIV-1 Nef mimics an integrin receptor signal that recruits the polycomb group protein Eed to the plasma membrane. *Mol Cell*, 13(2):179–190, Jan 2004.
- [205] V Wray, D Mertins, M Kiess, P Henklein, W Trowitzsch-Kienast, and U Schubert. Solution structure of the cytoplasmic domain of the human CD4 glycoprotein by CD and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy: implications for biological functions. *Biochemistry*, 37(23):8527–8538, Jun 1998.
- [206] H Wu, PD Kwong, and W A Hendrickson. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature*, 387:52–530, 1997.
- [207] X N Xu, B Laffert, G R Screaton, M Kraft, D Wolf, W Kolanus, J Mongkolsapay, A J McMichael, and A S Baur. Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J Exp Med*, 189(9):1489–1496, May 1999.
- [208] X G Yu, M Lichterfeld, M M Addo, and M Altfeld. Regulatory and accessory HIV-1 proteins: potential targets for HIV-1 vaccines? *Curr Med Chem*, 12(6):741–747, 2005.
- [209] A Zarrinpar, R P Bhattacharyya, and W A Lim. The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE*, 2003(179):RE8, Apr 2003.
- [210] G Zauli, D Gibellini, P Secchiero, H Dutartre, D Olive, S Capitani, and Y Collette. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4(+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway. *Blood*, 93(3):1000–1010, Feb 1999.
- [211] A Zeytun, A Jeromin, B A Scalettar, G S Waldo, and A R M Bradbury. Fluorobodies combine GFP fluorescence with the binding characteristics of antibodies. *Nat Biotechnol*, 21(12):1473–1479, Dec 2003. Evaluation Studies.
- [212] H Zhang, B Yang, R J Pomerantz, C Zhang, S C Arunachalam, and L Gao. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*, 424(6944):94–98, Jul 2003.
- [213] Y Zheng, A Plemenitas, C J Fielding, and B M Peterlin. Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14):8460–8465, Jul 2003.
- [214] Y H Zheng, A Plemenitas, T Linnemann, O T Fackler, and B M Peterlin. Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr Biol*, 11(11):875–879, Jun 2001.

- 
- [215] M Zorko and U Langel. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(4):529–545, Feb 2005.
- [216] R Zufferey, T Dull, R J Mandel, A Bukovsky, D Quiroz, L Naldini, and D Trono. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, 72(12):9873–9880, Dec 1998.

# Danksagung

ich danke.....

Prof. Dr. Roger S. Goody (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Abteilung Physikalische Biochemie)

Dr. Matthias Geyer (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Abteilung Physikalische Biochemie)

Prof. Dr. Martin Engelhard (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Abteilung Physikalische Biochemie)

Prof. Dr. Roland Winter (Universität, Institut für Physikalische Chemie I)

Dr. Oliver Fackler (Universitätsklinikum Heidelberg, Hygiene Institut, Abteilung für Virologie)

Simone Giese (Universitätsklinikum Heidelberg, Hygiene Institut, Abteilung für Virologie)

der ganzen Arbeitsgruppe Geyer (Andre, Antje, Bernhard, Diana, Fanny, Friderike, Holger, Karin, Karl-Heinz, Nadine, Santiago), Janina und Sabine

für die finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft

**Eidesstattliche Erklärung**

Die selbständige und eigenhändige Anfertigung versichere ich an Eides statt.

---

Datum / Unterschrift