

Molekulare Strategien zur Inhibition des HIV-1 Nef Proteins

Dissertation

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

Angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund

vorgelegt von

Dipl.-Biologe Sebastian Lülff

aus Hamm (Westf.)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2010 bis Juli 2013 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung für Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Leitung von PD Dr. Matthias Geyer angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Entdeckung von HIV-1 als AIDS verursachendes Pathogen	3
2.2	Entstehung und pandemische Verbreitung von HIV	4
2.3	Charakterisierung von Nef im 3'- offen Leserahmen von HIV	5
2.4	Die Diversität verschiedener Nef Allele	7
2.5	Die Struktur von Nef	8
2.6	Nef und seine Interaktionspartner	12
2.6.1	Der Oberflächenrezeptor CD4 (<i>cluster of differentiation antigen 4</i>).....	13
2.6.2	Die Funktionsweise der Endozytose von CD4.....	14
2.6.3	Die Nef-vermittelte Endozytose von CD4.....	15
2.6.4	SIV spezifische Nef-vermittelte Endozytose von CD3.....	16
2.6.5	Die Nef-vermittelte Endozytose von MHC-I.....	18
2.6.6	Nef als Aktivator von Serin/Threonin- und Src-Tyrosinkinasen.....	19
2.7	HIV-Inhibitoren: Nef als Zielprotein	23
2.7.1	Bereits existierende HIV-1 Inhibitoren.....	23
2.7.2	Allgemeine Funktionsweisen und Eigenschaften von Inhibitoren.....	24
2.7.3	Nef als Ziel für kleine molekulare Inhibitoren.....	24
2.7.4	Nef als Ziel für große molekulare Inhibitoren.....	25
2.7.4.1	scFv- und Einzeldomänen-Antikörper als Inhibitoren gegen Nef.....	26
2.7.4.2	Verwendung von verknüpften Proteindomänen als Nef-Inhibitoren.....	29
2.8	Zielsetzung	31
3	Material und Methoden	32
3.1	Chemikalien	32
3.1.1	Feinchemikalien.....	32
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	32
3.1.3	Molekularbiologische Kits.....	32
3.1.4	Chromatographiesäulen und -materialien.....	32
3.1.5	Größenstandards.....	33
3.2	Bakterienstämme	33
3.3	Enzyme	33
3.4	Synthetische Peptide	33
3.5	Nukleinsäuren	34
3.6	Bakterielle Nährmedien	34
3.7	Antibiotika	34
3.8	Geräte	34

3.9	Molekularbiologische Methoden	35
3.9.1	Polymerasekettenreaktion	35
3.9.2	Agarosegelelektrophorese	36
3.9.3	Restriktion von Plasmid-DNA	36
3.9.4	Isolierung von DNA-Fragmenten	37
3.9.5	Ligation	37
3.9.6	Transformation und Anzucht von Bakterien	37
3.9.7	Isolierung von Plasmiden aus Bakterien	38
3.9.8	Sequenzierung eines DNA-Fragmentes	38
3.9.9	Herstellung von Glycerindauerkulturen	38
3.9.10	Proteinüberexpression in Bakterien	38
3.9.11	Ernte und Zellaufschluss	39
3.9.12	Reinigung von rekombinant hergestellten Proteinen	39
3.10	Biochemische Methoden	40
3.10.1	Präparative Größenausschlusschromatographie / Gelfiltration	40
3.10.2	Analytische Größenausschlusschromatographie / Gelfiltration	41
3.10.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
3.10.3.1	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	41
3.10.3.2	Konzentrationsbestimmung durch die Absorption bei 280 nm	41
3.10.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.10.5	Peptidsynthese	42
3.11	Biophysikalische Methoden	43
3.11.1	Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS)	43
3.11.2	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	43
3.11.3	Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)	45
3.11.4	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)	45
3.11.5	Kristallographische Strukturaufklärung von Proteinen	47
3.11.5.1	Proteinkristallisation	47
3.11.5.2	Datenaufnahme	49
3.11.5.3	Das Phasenproblem	49
3.11.5.4	Molekularer Ersatz	50
3.11.5.5	Verfeinerung eines Strukturmodells	50
3.11.5.6	Verfeinerung durch Nicht-Kristallographische Symmetrien (NCS)	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Inhibition von Nef durch die Bindung großer molekularer Inhibitoren	52
4.1.1	Biochemische Charakterisierung von sdAb19 und Komplexbildung mit Nef	52
4.1.2	Biochemische Charakterisierung eines Nef-Inhibitors mit fusionierten sdAb19-SH3-Domänen im Komplex mit Nef	57
4.1.3	Strukturelle Charakterisierung des Komplexes aus Nef und sdAb19	62
4.1.3.1	Kristallisation und Strukturlösung des Nef-sdAb19-Komplexes	62
4.1.3.2	Strukturelle Charakterisierung der V_{HH} -Domäne sdAb19	66
4.1.3.3	Charakterisierung der Bindungsfläche zwischen Nef und sdAb19	67
4.1.3.4	Untersuchung des Wassernetzwerkes in der Bindungsfläche zwischen Nef und sdAb19	72

4.1.3.5 Strukturelle Charakterisierung des Einflusses der C-terminalen flexiblen Schleife auf die Bindung von sdAb19 an Nef.....	74
4.1.4 Mutationsstudien innerhalb der Interaktionsfläche von Nef und sdAb19.....	75
4.1.4.1 Biochemische Mutationsstudien auf sdAb19 und Neffin in Hinblick auf die Nef-Bindung.....	75
4.1.4.2 Biochemische Mutationsstudien in Nef in Hinblick auf die Interaktion mit sdAb19 und Neffin.....	78
4.1.5 Untersuchung der an der Interaktion mit sdAb19 beteiligten Reste von Nef in Hinblick auf den Grad der Konservierung.....	80
4.1.6 Funktionelle Experimente mit den bindungsdefizienten Mutanten von Nef, sdAb19 und Neffin.....	82
4.1.7 Funktionelle biochemische Experimente mit Nef, CD3 ζ , sdAb19 und Neffin zur Untersuchung der Gründe der Nef-Inhibition.....	83
4.2 Biochemische Untersuchung der Nef-interagierenden Adaptorproteinkomplexe AP1 und AP2.....	88
4.2.1 Darstellung des heterotetrameren AP1-Komplexes.....	88
4.2.2 Darstellung des heterotetrameren AP2-Komplexes.....	90
4.2.3 Massenspektrometrische Untersuchungen des AP2-Komplexes.....	91
4.2.4 Biochemische Experimente zur Untersuchung der Interaktion zwischen AP1, MHC-I und Nef.....	93
4.2.5 Biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen AP2, CD4 und Nef.....	95
4.3 Screen eines kleinen molekularen Inhibitors gegen Nef.....	96
4.3.1 Arbeitsweise des iNEF Konsortiums im 7. EU-Forschungsrahmenprogramm.....	98
4.3.2 Herstellung von isopenmarkierten Nef und Titrationsreihen mittels 2D HSQC-NMR-Spektroskopie.....	99
4.3.3 ITC-Messungen mit ES000219 und HIV-1 Nef.....	103
4.3.4 NMR-Titrationsreihen mit Nef und Derivaten von ES000219.....	105
4.3.4.1 Derivate von ES000219 mit veränderter Nitro- und Sulfon-Gruppe.....	105
4.3.4.2 Derivate von ES000219 mit Veränderungen im Pyrrolidinring.....	108
4.3.4.3 Derivate von ES000219 mit Veränderungen im und vor dem Pyrrolidinring.....	110
4.3.5 ITC-Messungen mit den Derivaten ES000669, ES000675 und ES000794 und Nef.....	112
4.3.6 Kooperatives Bindungsexperiment mit Nef, CHAPS und ES000219.....	113
4.3.7 Charakterisierung der Bindungsstellen von ES000219 auf Nef.....	114
4.3.8 Co-Kristallisations- und Soakingversuche mit Nef und ES000219.....	116
4.4 Biochemische und strukturelle Charakterisierung von einer aus dem Gorilla abstammenden HIV-1 Nef Variante gorNef.....	119
4.4.1 Mutationsstudien mit gorNef zur Bildung von Komplexen mit sdAb19 und Neffin.....	119
4.4.2 Strukturelle Charakterisierung des Komplexes aus gorNef, sdAb19 und SH3 _{B6}	124
5 Diskussion.....	129
5.1 Biochemische und strukturbiologische Charakterisierung von sdAb19 und Neffin als große molekulare Inhibitoren gegen HIV-1 Nef.....	129

5.2	Untersuchung der Nef-interagierenden Adaptorproteinkomplexe AP1 und AP2.....	139
5.3	Die Suche nach einem kleinen molekularen Inhibitor von Nef.....	143
5.4	Biochemische und strukturelle Charakterisierung des HIV-1 Nef Proteins des Subtyps P.....	148
5.5	Oligomerisierungen von Nef-Molekülen.....	150
6	Anhang.....	153
7	Literaturverzeichnis.....	161

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10} m)
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (engl. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AP	Adapterproteinkomplex (engl. <i>assembly poly-peptide</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum Albumin</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus
CCV	Clathrin umhüllte Vesikel (engl. <i>clathrin-coated vesicles</i>)
CD	Zirkulardichroismus
CD3	Unterscheidungsgruppe 3 (engl. <i>cluster of differentiation 3</i>)
CD4	Unterscheidungsgruppe 4 (engl. <i>cluster of differentiation 4</i>)
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)-diethylammonio)-1-propan sulfonat
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
ΔG	Änderung der Gibb'schen freien Energie
ΔH	Änderung der Enthalpie
ΔS	Änderung der Entropie
Da	Dalton (1u, 1/12 der Masse von ^{12}C)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTE	Dithioerythritol
ε	ε-Position der Aminosäuren-Seitenkette
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EGFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
Env	Virales Hüllprotein (engl. <i>envelope glycoprotein</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifische Antigene
gorNef	Nef Protein des HIV-1 Subtypes P
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie (engl. <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
Hck	Hämatopoetische Zell-Kinase (engl. <i>hemopoietic cell kinase</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
hNMT	Humane N-Myristoyltransferase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HSQC	Heteronukleare Einquantenkohärenz (heteronuclear single quantum coherence)

HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmuster (engl. <i>immunoreceptor tyrosin based activation motif</i>)
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie (engl. <i>isothermal titration calorimetry</i>)
kcal	Kilokalorie
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAV	Lymphadenopathie-assoziiertes Virus
Lck	engl. <i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LMW	Marker für Moleküle mit kleinem Molekulargewicht (engl. <i>low molecular weight marker</i>)
LTNP	Langzeitüberlebende (engl. <i>Long-Term Non-Progressor</i>)
LTR	Lange terminale Wiederholung (engl. <i>long terminal repeat</i>)
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl. <i>multiple cloning site</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
ml	Milliliter
myrNef	Myristoyliertes Nef
MW	Molekulargewicht
n	Stöchiometrie einer Bindung
N-Terminus	Aminoterminus
NAKC	Nef-assoziiierenden Kinase Komplex C
NCS	Nicht-Kristallographische Symmetrie (engl. <i>non crystallographic symmetry</i>)
Nef	Negativer Faktor (engl. <i>negative factor</i>)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-triessigsäure (engl. <i>nickel nitrilotriacetic acid</i>)
nM	Nanomolar
NMR	Kernspinresonanz (engl. Nuclear Magnetic Resonanz)
OD _(x)	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
Orf	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
PACS	engl. <i>Phosphofurin acidic cluster sorting protein</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pak2	p21-aktivierende Kinase 2
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
PISA	engl. <i>Protein Interface, Surface and Assemblies</i>
PKC	Protein Kinase C
PMF	engl. <i>Peptid Mass Fingerprint</i>
ppm	engl. <i>parts per million</i>
Rev	engl. <i>Regulator of Virion Expression</i>
RFP	Rot fluoreszierendes Protein (engl. <i>Red Fluorescent Proteins</i>)
rms	Wurzel des quadratischen Mittelwerts (engl. <i>root mean square</i>)
rmsd	Wurzel des mittleren Abstandsquadrats (engl. <i>root mean square deviation</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolution per minute</i>)
sdAb19	Einzeldomänen-Antikörper 19 (<i>single domain antibody 19</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)

SH3	engl. <i>Src homology 3</i>
shRNA	Kleine Haarnadel RNA (engl. <i>small hairpin ribonucleic acid</i>)
SIV	Immundefizienz-Virus der Affen (engl. <i>Simian immunodeficiency viruses</i>)
SNID	SIV Nef interagierende Domänen (engl. <i>SIV Nef interaction domain</i>)
Tat	Transaktivator der Transkription
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEV	engl. <i>tobacco etch virus</i>
TGN	trans-Golgi Netzwerk
TLS	engl. <i>translation libration screw</i>
TOF	Flugzeit (engl. <i>Time of flight</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
v/v	Volumen pro Volumen
Vif	engl. <i>Viral infectivity factor</i>
Vpr	engl. <i>Viral Protein R</i>
Vpu	engl. <i>Viral Protein U</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
ZAP-70	engl. <i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt. Zur Bezeichnung von Aminosäuren wurden der Drei- und der Einbuchstabencode gemäß den Empfehlungen von IUPAC und IUB verwendet (IUPAC-IUB, 1984; IUPAC-IUB, 1993).

1 Zusammenfassung

Das retrovirale, akzessorische HIV-Protein Nef interagiert innerhalb der infizierten Wirtszelle mit verschiedenen zellulären Proteinen und verändert die Zelle so, dass eine effiziente Replikation und Verbreitung des Virus möglich wird. Das Nef Protein wird ausschließlich durch die Primaten-Retroviren HIV-1, HIV-2 und SIV exprimiert und vermittelt Interaktionen innerhalb von Signaltransduktionswegen und der Rezeptorinternalisierungs-Maschinerie ohne dabei eine eigene katalytische Funktion auszuüben. Dadurch kommt es zu deutlichen Steigerungen der viralen Replikation, der Virusinfektiosität und zur Beeinflussung des Immunsystems. Mit diesen Eigenschaften ist Nef für das Virus ein wichtiger und essenzieller Pathogenitätsfaktor.

Es gibt eine Vielzahl an postulierten Funktionen von Nef, deren genaue Mechanismen bis heute nicht gänzlich verstanden und deren intrazelluläre Interaktionspartner zum Teil unbekannt sind. In vielen veröffentlichten Mutationsstudien konnten unterschiedliche Aminosäurereste und Sequenzmotive identifiziert werden, die für Nef funktionell wichtig sind und deren Fehlen mit einer verminderten Viruspathogenität einhergeht. In Kombination mit der gestiegenen Anzahl gut aufgelöster kristallografisch erzeugter Nef-Strukturen wurden verschiedene Domänen identifiziert, die für unterschiedliche Funktionen von Nef essenziell sind und die als Ziel für kleine oder große molekulare Inhibitoren dienen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansatzpunkte gewählt, um Nef zu inhibieren und diese Inhibition biochemisch und strukturell zu charakterisieren. Zum einen wurde innerhalb eines europäischen Konsortiums ein kleines Molekül als Leitstruktur gefunden, das nach NMR-spektroskopischen Daten in eine hydrophobe Tasche von Nef bindet und damit die Bindung des CD4- und CD3-Rezeptors inhibieren sowie die Membranbindung von Nef beeinflussen könnte. Durch Titrationsreihen mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie wurden neben dieser Leitstruktur weitere Derivate überprüft, die ebenso mit Nef interagieren. Die durch isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) ermittelten Affinitäten liegen im mittleren bis hohen mikromolaren Bereich, so dass diese Leitstruktur als Ausgangsmolekül für weitere Wirkstoffentwicklungen dienen könnte.

Außerdem konnte mit sdAb19 erstmals ein Einzeldomänen-Antikörper charakterisiert werden, der in der Lage ist viele Funktionen von Nef zu inhibieren. Dieser Antikörper wurde 2011 von Arbeitsgruppen in Paris und Marseille durch Immunisierungsstudien in einem Lama generiert und inhibiert verschiedene Funktionen von Nef wie die Nef-vermittelte Endozytose von CD4 und die Erhöhung der Virusinfektiosität. Im Zuge dieser Arbeit konnte der Komplex zwischen sdAb19 und Nef *in vitro* geformt sowie für diese Interaktion eine Affinität von etwa 40 nM ermittelt werden. Außerdem ist die gleichzeitige Bindung von sdAb19 und einer modifizierten SH3-Domäne der Hck-Tyrosinkinase (SH3_{B6}) auf Nef möglich, wodurch ein trimerer Komplex mit einer 1:1:1 Stöchiometrie geformt werden konnte. Dieser Komplex wurde kristallisiert und die Komplexstruktur mit einer Auflösung von 2,1 Å gelöst. Der Einzeldomänen-Antikörper sdAb19 interagiert mit seinen variablen, Antigen-erkennenden Schleifen spezifisch mit Aminosäurereste am C-Terminus von Nef. Dadurch ist der Antikörper in der Lage die Bindung verschiedenster Interaktionspartner von Nef innerhalb von Signaltransduktionswegen und der Rezeptorinternalisierungs-Maschinerie zu verhindern. In Hinblick auf eine zukünftige Struktur- und Liganden-basierte Wirkstoffentwicklung zur Herstellung kleinerer molekularer Inhibitoren, die sich auf die Bindungsfläche zwischen sdAb19 und Nef stützt, konnten für ein Hochdurchsatz-Screening bereits mehrere sdAb19-

Mutanten generiert werden, die im Vergleich zum Wildtyp eine 25-fach bzw. 100-fach verminderte Affinität zu Nef besitzen. Basierend auf der Strategie der Protein-Stabilisierung durch die Interaktion mit sdAb19 konnte außerdem erstmals die Struktur eines Nef Proteins aus dem Gorilla abstammenden HIV-1 Subtyps P kristallografisch gelöst werden.

In Kooperation mit Prof. Serge Benichou (Institut Cochin, Paris) und Prof. Kalle Saksela (Universität Helsinki) wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ein kombinatorischer Inhibitor namens Neffin generiert, der aus den Untereinheiten sdAb19 und der modifizierten SH_{3B6}-Domäne besteht und als Fusionsprotein weit bessere inhibitorische Fähigkeiten als sdAb19 besitzt. Im Gegensatz zu sdAb19, ist Neffin auch in der Lage die Nef-vermittelte Runterregulierung von MHC-I zu inhibieren. In dieser Arbeit konnte anhand der gelösten Nef-sdAb19-SH_{3B6} Komplexstruktur und durch biochemische Experimente gezeigt werden, dass ein stöchiometrischer 2:2 Komplex zwischen Nef und Neffin ausgebildet wird, wodurch so die verstärkten inhibitorischen Fähigkeiten von Neffin erklärt werden können. Mit einer sehr hohen Affinität von bis zu 1,6 nM werden dabei zwei Nef-Moleküle im Zentrum eines sehr stabilen Komplexes von möglichen Interaktionspartnern abgeschirmt, indem sie von zwei Neffin-Molekülen umschlossen werden. Dadurch verliert HIV-1 Nef unter anderem die Fähigkeit zur vermittelten Internalisierung von MHC-I.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit gezeigt, dass Funktionen von Nef sowohl mit kleinen molekularen Molekülen als auch mit großen generierten Molekülen inhibiert werden können. Damit stehen verschiedene Strategien zur Inhibition von Nef zur Verfügung. Während die generierten kleinen Inhibitoren mit einer Masse von weniger als 400 Dalton als injizierbares Medikament infrage kommen, könnten sdAb19 und Neffin gentherapeutisch oder in einer zukünftigen Wirkstoffentwicklung eingesetzt werden.

2 Einleitung

2.1 Entdeckung von HIV-1 als AIDS verursachendes Pathogen

Es sind gerade einmal 30 Jahre vergangen, seit die ersten Fälle von AIDS (*Acquired immunodeficiency syndrome*) in den USA bekannt wurden und HIV als AIDS verursachendes Pathogen identifiziert wurde. Anfang der 80er Jahre häuften sich dort Fälle einer plötzlich auftretenden Immunschwächekrankheit. Die ersten Berichte der neuen, unbekannteren Krankheit erschienen 1981. In einer Studie wurden beispielsweise bei 26 homosexuellen Männern Kaposi-Sarkome diagnostiziert, von denen 8 innerhalb von 24 Monaten nach der Diagnose verstarben (Friedmann-Kien et al., 1981). Charakteristisch für das neue Krankheitsbild waren opportunistische Infektionen mit Viren, Myobakterien, Pilzen oder Protozoen sowie das Auftreten der sehr seltenen Kaposi-Sarkome.

1983 waren inzwischen mehr als 800 Fälle von AIDS in Nordamerika sowie über 24 in Kanada bekannt (Gilmore et al., 1983). Durch die unspezifischen Symptome bei AIDS-Patienten konnte zu diesem Zeitpunkt keine diagnostischen Ursachen angeführt werden. Doch noch im gleichen Jahr wurde der pathogene Erreger von AIDS als ein Retrovirus identifiziert und zunächst in die Familie des humanen T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV) eingeordnet (Barresinoussi et al., 1983). Erst 1986 wurde durch das *International Committee on Taxonomy of Viruses* der Name auf HIV-1 festgelegt, der die Bezeichnungen HTLVIII und Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV) ersetzte (Brown, 1986).

Bis heute wurden vier unterschiedliche Untergruppen von HIV-1 identifiziert, die mit M, N, O und P bezeichnet werden. M (*major group*) ist die erste entdeckte und heute weltweit die am häufigsten vorkommende Variante von HIV-1. Die Gruppe O (*outlier*) wurde erst 1990 gefunden und ist weit weniger weit verbreitet als M (De Leys et al., 1990; Gurtler et al., 1994). Die Gruppe N (*new*), die im Jahre 1998 identifiziert wurde, ist wiederum weniger verbreitet als O (Simon et al., 1998). Erst kürzlich kam es in zwei Fällen zur Diagnose einer weiteren HIV-Variante bei einer Kamerunerin in Paris (Plantier et al., 2009) und bei einer weiteren Person in Kamerun (Vallari et al., 2011), die der alphabetischen Reihenfolge entsprechend mit dem Kürzel P versehen wurde. Dieser Subtyp soll vom Simianen Immundefizienz-Virus (SIV) aus dem Gorilla abstammen (Abbildung 1). Es ist nicht auszuschließen, dass auch zukünftig noch weitere HIV-Varianten gefunden werden.

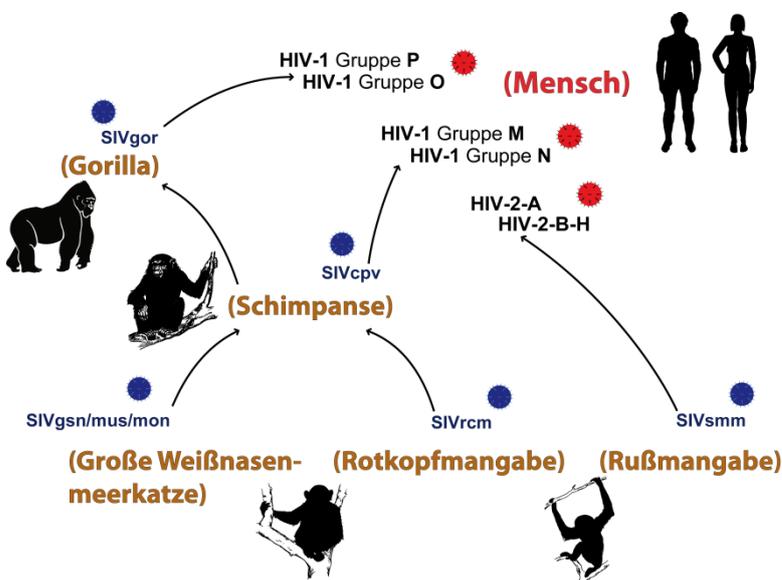


Abbildung 1: Entstehungswege der heute bekannten Gruppen von HIV-1 und HIV-2. Das Simiane Immundefizienz-Virus (SIV) aus Schimpansen (SIV_{cpz}) ist wahrscheinlich rekombinant aus den Vorgängern SIV_{rcm} , SIV_{gsn} , SIV_{mus} und SIV_{mon} entstanden. Möglicherweise ist das Virus übergesprungen, weil diese gelegentlich andere Primaten jagen. SIV_{cpz} wurde dann später auf Menschen und Gorilla übertragen wodurch die HIV-1 Gruppen M, N, O und P sowie SIV_{gor} entstanden. HIV-2 stammt währenddessen vom SIV_{smm} ab. (Abgew. aus Sauter et al., 2010; Sauter et al., 2011).

2.2 Entstehung und pandemische Verbreitung von HIV

Neben HIV-1 gibt es in Gebieten Westafrikas, mit der größten Verbreitung in Guinea-Bissau und dem Senegal, ein Virus namens HIV-2 (de Silva et al., 2008) (Abbildungen 1 und 2). Dieses Virus ist näher mit dem in Affen vorkommenden SIV verwandt als mit HIV-1, wobei aber beide ihren Ursprung im SIV haben (Chakrabarti et al., 1987; Guyader et al., 1987). SIV wurde in verschiedenen Primaten der subsaharischen Region gefunden, ohne dass sie in ihrem Wirt AIDS-ähnliche Symptome verursachten. Genetische Analysen mehrerer SIV-Stämme auf einer Insel in Westafrika zeigen, dass SIV schon weit länger als 32.000 Jahre in verschiedenen Affenarten vorkommt. Denn auf der Insel Bioko im Golf von Guinea (Abbildung 2), die seit der Eiszeit vor etwa 10.000-12.000 Jahren vom Festland getrennt ist, wurden SIV-Varianten gefunden, die sich so stark von denen vom Festland unterscheiden, dass das Virus vorher entstanden sein muss (Worobey et al., 2010).

Das bedeutet, dass über einen sehr großen Zeitraum hinweg zwischen SIV und seinem Wirt eine Anpassung stattfinden konnte was für HIV im Menschen zeitlich noch nicht möglich war. Denn während eine HIV-Infektion beim Menschen zu AIDS führt, wurde früh nach der Entdeckung von SIV festgestellt, dass dieses Virus in vielen Affen endemisch co-existiert ohne einen tödlichen Krankheitsverlauf zu verursachen (Cichutek and Norley, 1993). Die Übertragung des HIV-2 Subtyp A Vorläufers auf den Menschen wird auf das Jahr 1940 \pm 16 Jahre geschätzt, etwa ein Jahrzehnt nach der Übertragung von HIV-1 (Abbildung 2) (Korber et al., 2000; Lemey et al., 2003; Salemi et al., 2001). Hierbei erfolgte die Übertragung von HIV-1 vom Schimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*) und HIV-2 durch den Rußmangabean (*Cercocebus atys*) auf den Menschen (Chen et al., 1997; Gao et al., 1999). Das älteste nachgewiesene HI-Virus stammt aus der Gruppe M und wurde nachträglich in der Blutprobe eines Mannes aus dem Kongo von 1959 gefunden (Nahmias et al., 1986; Zhu et al., 1998).

Durch Gensequenzanalysen von Proben der ältesten bekannten AIDS Patienten auf Haiti, scheint der Subtyp B von HIV-1 um das Jahr 1966 (1962-1970) von Afrika nach Haiti gekommen zu sein und hat sich dann nach ein paar Jahren in weitere Länder wie der USA und dann über die ganze Welt ausgebreitet. (Gilbert et al., 2007). Zeitgleich breitete sich HIV-1 in ganz Afrika aus, bis auf etwa 24 Millionen infizierte Menschen im Jahr 2011 (Abbildung 2). Heute leben weltweit etwa 34 Millionen Menschen mit dem HI-Virus, wobei es jährlich 2,5 Millionen Neuinfektionen gibt und jedes Jahr etwa 1,7 Millionen Menschen an AIDS sterben.

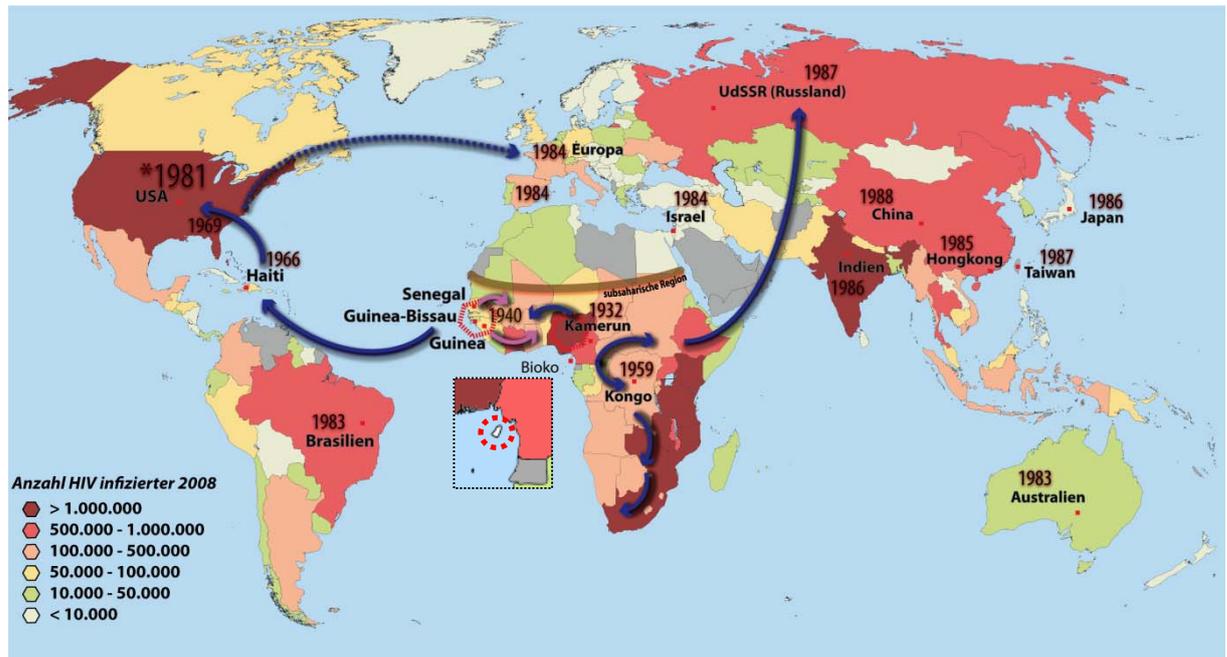


Abbildung 2: Schema des zeitlichen Verlaufs der Pandemie von HIV. Es wird angenommen, dass HIV-1 (blaue Pfeile) und HIV-2 (violette Pfeile) durch mehrere Artengrenzen übergreifenden Übertragungen des SIV in Westafrika und Kamerun (rote Hexagone) entstanden ist (Wertheim and Worobey, 2009). Der Zeitpunkt wird dabei für HIV-1 auf 1932 und HIV-2 auf 1940 geschätzt (Lemey et al., 2003; Salemi et al., 2001). Die erste nachgewiesene HIV-1 Infektion geht auf das Jahr 1959 im Kongo zurück. Von dort aus verbreitete sich das Virus in Afrika und kam um 1966 durch eine infizierte Person nach Haiti und anschließend gegen 1969 in die USA (Gilbert et al., 2007). Dort wurde erst 1981 und damit 12 Jahre später erstmals AIDS diagnostiziert (*1981). Im weiteren Verlauf verbreitete sich HIV-1 immer schneller mit ersten Infizierten und Toten 1983 in Brasilien (Amato Neto et al., 1983) und Australien (Gold et al., 1994). Darauf folgten 1984 die ersten Fälle in Europa (Sevilla (Spanien)) (Auhuber et al., 1984; Gazengel et al., 1984; Noguerol et al., 1984) und in Israel (Marilus et al., 1984) sowie die ersten entdeckten Infektionen in Asien wie 1985 in Hongkong (Chan and Ng, 1985), 1986 in Indien (Simoes et al., 1987) und Japan (Toki et al., 1986), 1987 in Taiwan (Lin et al., 1987) und Russland und 1988 in China. Gerade die Erstinfektionen der letzten beiden Länder sind symptomatisch für die Geschwindigkeit der HIV-Verbreitung. In Russland hat ein Mann, der sich im Ostafrika infiziert hat, 5 von 22 männliche Sexualpartner infiziert, die daraufhin 3 weitere Frauen direkt und 5 andere durch Bluttransfusionen infizierten (Pokrovskii et al., 1987). In China erfolgt letzteres durch importierte HIV-verunreinigte Blutprodukte (Zheng, 1988). Deshalb ist vor allem die Globalisierung der Grund für die schnelle Verbreitung der Pandemie. Dargestellt ist die länderspezifische Anzahl infizierter Menschen im Jahre 2008.

2.3 Charakterisierung von Nef im 3'-offen Leserahmen von HIV

Kurz nach der Entdeckung von HIV-1 als Erreger von AIDS haben verschiedene Forschungsgruppen das Virus aus dem Blut von Infizierten isoliert sowie das Virus im Labor in Zellkultur hergestellt (Popovic et al., 1984). Neben den bereits bei anderen Retroviren bekannten Genen für *gag*, *pol* und *env* (Allan et al., 1985a; Robey et al., 1985), hat man früh Gene für mindestens drei weitere Proteine gefunden: die Genprodukte des 23 kDa *sor* (Kan et al., 1986; Lee et al., 1986; Sodroski et al., 1986), des 14 kDa *tatIII* (Goh et al., 1986) und des 3' *orf*-Leserahmens (Allan et al., 1985b) (Abbildung 3). Früh war klar, dass das Genprodukt von *tatIII* (heute *tat*) wichtig für das virale Wachstum und die Erhöhung der Transkriptionsrate ist (Arya and Gallo, 1986; Dayton et al., 1986; Fisher et al., 1986; Sodroski et al., 1985) und das von *sor* (heute *Vif* = *viral infectivity factor*) die Infektiosität der Viren erhöht (Strebel et al., 1987).

Bei der ersten Charakterisierung des Genprodukts von 3' *orf* wurde ein Protein mit 206 Aminosäuren und einer Masse von 27 kDa erhalten, das N-terminal myristoyliert ist und möglicherweise durch die Protein Kinase C (PKC) am N-Terminus phosphoryliert wird. Nach rekombinanter Expression und Reinigung konnte es in den ersten Versuchen GTP binden und zeigte GTPase- und Autophosphorylierungs-Aktivitäten sowie die Runterregulierung von CD4 in CD4-Zelllinien. Desweiteren wurde 3'*orf* auch in HIV-2 und SIV gefunden (Guy et al., 1987). Auch wenn die GTPase Aktivität nach heutigem Stand nicht zutrifft und die Phosphorylierung nicht bewiesen ist, wurden doch viele Funktionen dieses Proteins bereits früh beschrieben.

Darauffolgend wurde 3'*orf* in Nef (*negative factor*) umbenannt, weil es scheinbar als negativer Regulator fungierte. Denn in Zellkultur wurde die Replikation von HIV-1 mit Nef im Vergleich zu ohne Nef um den Faktor 30-50 reduziert, so dass davon ausgegangen wurde, dass Nef als Repressor die Transkription an den LTR (*long terminal repeats*) inhibiert (Ahmad and Venkatesan, 1988; Niederman et al., 1989). Dass letzteres nicht zutrifft und Nef kein transkriptionaler Repressor ist, wurde in Studien in den darauf folgenden Jahren gezeigt. Nef ist weder ein transkriptionaler Inhibitor noch ein negativer viraler Faktor (Hammes et al., 1989) und hat keinen direkten Einfluss auf die LTR-Aktivität (Bachelier et al., 1990). Später konnte auch gezeigt werden, dass Nef keine Guaninnukleotide direkt bindet, kein GTP hydrolysiert und auch keine Autophosphorylierung aufweist (Backer et al., 1991). Vielmehr wurde erkannt, dass anstatt der Funktion als negativer Regulator, Nef ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von AIDS ist.

Anfang der 90er Jahre wurde beobachtet, dass einige Menschen nach einer HIV-Infektion keine AIDS ähnliche Symptome entwickelten (Langzeitüberlebende oder *Long-Term Non-Progressor (LTNP)*). Während diese für mehr als 10 Jahre ohne Behandlung asymptomatisch blieben (Sampalis et al., 1993), entwickelten andere in sehr kurzer Zeit nach der HIV Infektion AIDS und starben nach nur 7 Monaten (Walsh and Calabrese, 1992). Nachdem in Experimenten mit Rhesus Affen herausgefunden wurde, dass Affen die mit SIV_{mac239}-Mutanten mit einem deletierten Nef Protein infiziert wurden keine AIDS Symptome entwickelten (Kestler et al., 1991), wurden ähnliche Beobachtungen in zwei anderen Studien kurze Zeit später auch bei HIV infizierten Menschen gemacht. Hierbei wurde bei den untersuchten HIV-positiven Personen, die kein AIDS entwickelten, ebenfalls Deletionen im *nef*-Gen festgestellt (Deacon et al., 1995; Kirchhoff et al., 1995), so dass die Ausbildung von AIDS von der Anwesenheit eines funktionellen Nef Proteins abhängig war.

In einem anderen Fall wurde in 10 LTNPs 12 bis 15 Jahre nach der HIV Infektion gezeigt, dass die meisten *nef*-Sequenzen (91,1%) einen vollständigen und intakten offenen Leserahmen enthielten. Daher sind die Deletionen und Veränderungen in der Sequenz von Nef wahrscheinlich nicht die Hauptklärung für den asymptomatischen Krankheitsverlauf von LTNP nach einer HIV-Infektion, trägt aber dazu bei (Huang et al., 1995). Nef ist scheinbar nicht essenziell für die Entwicklung von AIDS, beschleunigt diese aber sehr stark und hat somit als Pathogenitätsfaktor eine ausschlaggebende Rolle in der effizienten Virusreplikation und Pathogenese.

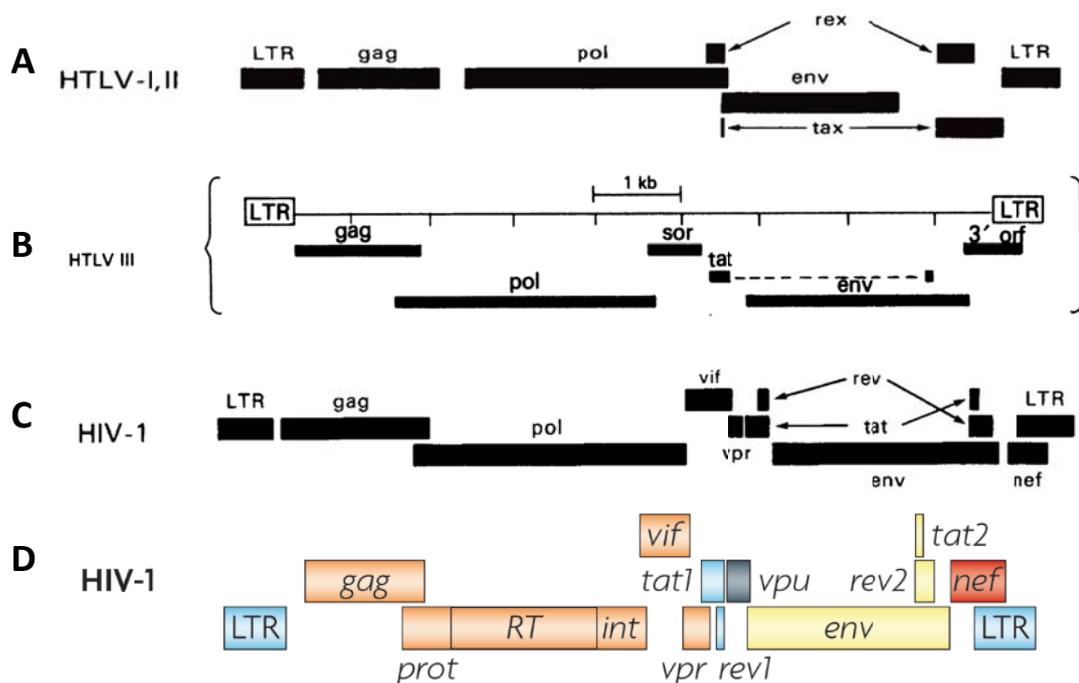


Abbildung 3: Originale Genkarten des Genoms von HIV-1 von Arya, S. K. and R. C. Gallo von 1986 und Gallo, R., F. Wongstaal, et al. von 1988 sowie Kirchhoff, F. von 2009. Mitte der 80er Jahre wurde das AIDS-auslösende Virus, aufgrund der Ähnlichkeiten zu HTLV I und II (A), als HTLV III klassifiziert (B) (Barresinoussi et al., 1983). Es konnten die typischen Strukturprotein-kodierenden Sequenzen *gag* und *env* sowie der Enzyme *pol* und die LTR-Elemente identifiziert werden. Hinzu kamen weitere Gene für *sor* (heute *vif* = *viral infectivity factor*) und *tat* (*Trans-Activator of Transcription*). Einem zu der Zeit unbekanntem Protein in einem offenen Leserahmen am 3' Ende konnte erst keine Funktion zugeordnet werden und wurde zunächst 3' orf (B), aber später dann Nef (*Negative Factor*) genannt (C und D) (Ahmad and Venkatesan, 1988; Arya and Gallo, 1986; Brown, 1986). Nach Identifizierung von HIV-1 kamen noch die Proteine *vif* (*Viral infectivity factor*), *vpr* (*Viral Protein R*) und *rev* (*Regulator of Virion Expression*) hinzu (Cohen et al., 1990a; Cohen et al., 1990b; Feinberg et al., 1986). Kurze Zeit später wurde mit *vpu* (*Viral Protein U*) das letzte Protein identifiziert, dass am 3' Ende mit *env* überlappt (D) (Gallo et al., 1988; Kirchhoff, 2009; Matsuda et al., 1988; Strebel et al., 1988).

2.4 Die Diversität verschiedener Nef Allele

Da es sich bei Nef um ein retrovirales Protein handelt, sind die existierenden Nef Proteine nicht zwingend identisch, sondern es gibt viele verschiedene Allele, die nach den HIV Isolaten benannt sind aus denen sie stammen. Denn die Mutationsrate von HIV ist etwa eine Million Mal höher als die einer eukaryotischen DNA-Replikation. Der Grund dafür ist die hohe Fehlerrate von durchschnittlich 10^{-4} bis 10^{-3} pro Base durch die Reversen Transkriptase beim Umschreiben des viralen RNA Genoms in doppelsträndige DNA, im Vergleich zu 10^{-10} bis 10^{-9} durch die zelluläre DNA Polymerase (Nowak, 1990). Da eine infizierte Zelle in seiner verbleibenden durchschnittlichen Lebensspanne von 2,2 Tagen täglich etwa $10,3 \times 10^9$ neue Viren produziert (Perelson et al., 1996), entstehen durch die hohen Mutationsraten sehr schnell verschiedene HIV- und damit Nef-Varianten, so dass es seit Beginn der Epidemie Anfang der 90er Jahre verschiedene HIV-1 und Nef Isolate gibt.

In wissenschaftlichen Laboren wird heute hauptsächlich mit sechs Nef Allelen gearbeitet. Zum einen mit dem im Labor funktionalen NL4-3 Allel (Nef_{NL4-3}) (Srivastava et al., 1991) sowie mit Nef_{LAV-1} (abgel. v. Lymphadenopathie-assoziiertes Virus) und Nef_{LAI} (Chang et al., 1993b; Folks et al., 1985). Ein weiteres Allel ist Nef_{BH10}, was im originalen HIV-1 Isolat

in der Nef-Sequenz ein Stop-Codon enthält, was zu einem 122 Aminosäure großen verkürzten Peptid führt (Ratner et al., 1985). Dieses Stop-Codon wurde im Nef_{BH10} Allel künstlich entfernt (Kaminchik et al., 1990). Das Nef_{NA7} Protein hingegen ist ein natürlich vorkommendes Nef Allel (Mariani and Skowronski, 1993), genauso wie Nef_{SF2}, das aus einem HIV-1 Isolat von 1984 aus San Francisco stammt, welches zu der Zeit noch ARV hieß (AIDS-associated retroviruses) (Levy et al., 1984; Sanchezpescador et al., 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde, wenn nicht ausdrücklich anders beschrieben, mit dem HIV-1 Nef_{SF2} Allel gearbeitet.

2.5 Die Struktur von Nef

Das Nef Protein hat eine Masse von 27-35 kDa und besteht im Prinzip aus vier Regionen: einem flexiblen N-Terminus (1-59), einer anschließenden Region (60-82) mit dem hochkonservierten PxxP-Motiv (73-82), einer kompakten Kerndomäne (83-210, Δ 152-184) sowie einer C-terminalen flexiblen Schleife (152-184) (Abbildung 5 und 6). Die Aminosäuren-Nummerierung bezieht sich hierbei auf die HIV-1 Nef_{SF2} Allele, die u.a. durch Studien unseres Labors bisher am besten charakterisiert ist. Dabei macht die Kerndomäne, obwohl sie etwa die Hälfte aller Aminosäuren enthält, bei der Oberflächenexposition nur etwa ein Drittel der Gesamtoberfläche des Proteins aus. Dies ist durch die vielen ungefalteten und flexiblen Bereiche wie z.B. der Ankerdomäne und der C-terminalen flexiblen Schleife zu erklären, was in einem repräsentativen Modell für eine Gesamtoberfläche von etwa 17600 Å² sorgt (Geyer and Peterlin, 2001).

Nef besteht im Zentrum aus antiparallelen β -Strängen, die von mehreren α -Helices umgeben sind (Abbildung 5 und 6) (Horenkamp et al., 2011). Wie jedes myristoylierte Protein beginnt auch Nef mit der Konsensussequenz MGxxx(S/T), wobei das initiale Methionin während der Translation entfernt und die Myristinsäure in Form von Myristin-CoA co-translational von der N-Myristoyl Transferase (NMT) mit dem Glycin via Amidbindung kovalent verknüpft wird. Diese Proteinmodifikation mittels einer Fettgruppe von nur 14 Kohlenstoffen ist die kürzest mögliche und ist zudem nicht reversibel (Curtain et al., 1998; Resh, 1999; Rudnick et al., 1993). Wie wichtig die Myristoylierung für die Funktion von Nef ist zeigt sich darin, dass das Motiv in verschiedenen Nef Allelen hoch konserviert ist (in O'Neill, Kuo et al. 2006: G₂ in 1635 von 1643 und S/T₆ in 1631 von 1643 Allelen) und dass die Mutationen des Glycins zu einem Alanin viele Funktionen von Nef inhibiert (Geyer et al., 2001; O'Neill et al., 2006). Zudem befinden sich viele positiv geladene Arginine und Lysine und aromatische Tryptophane und Tyrosine im N-Terminus, die die Bindung an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Plasmamembran unterstützen (Killian and von Heijne, 2000; Wimley and White, 1996). Durch die Mutation des für die kovalente Bindung der Myristinsäure essenziellen Glycins zu Alanin (G2A) wird die Membranbindung von Nef unterbunden (Abbildung 4).

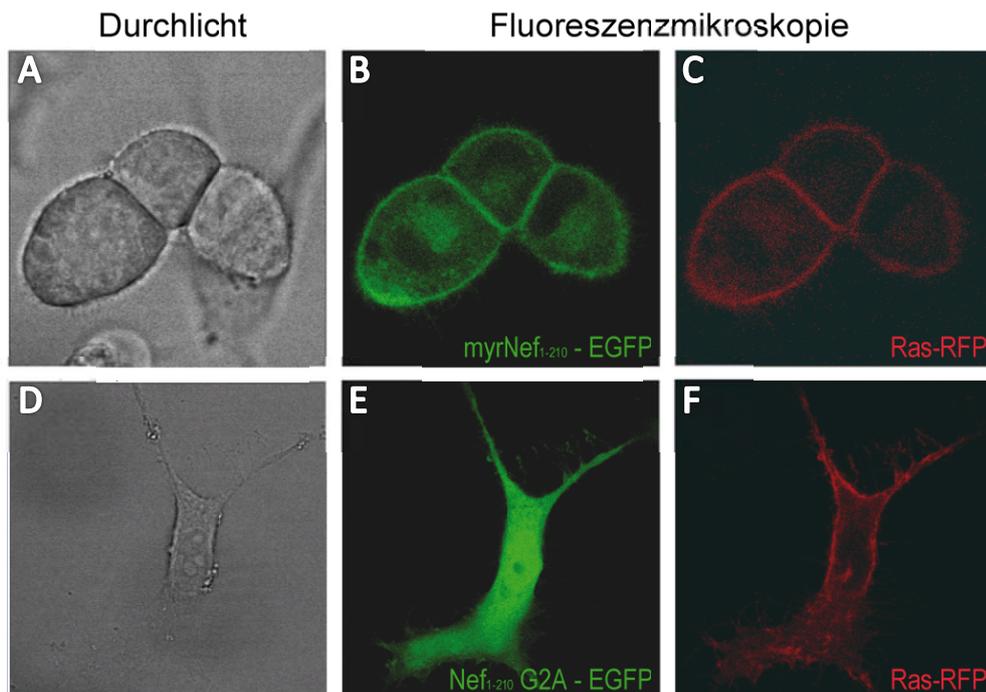


Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen mit exprimierten myristoyliertem Nef und der Myristylierungs-defizienten Nef G2A-Mutante. Es wurde myrNef₁₋₂₁₀ und Nef₁₋₂₁₀ (G2A) mit C-terminalem EGFP-Fusionsprotein mittels Transfektion zusammen mit Ras-RFP in HeLa-Zellen exprimiert. Mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen (**A und D**) sind die HeLa-Zellen im Ganzen und durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen im Wellenlängenbereich von Ras-RFP (**C und F**) deren Membransysteme zu Erkennen. Durch Aufnahmen im Wellenlängenbereich von GFP (**B und E**), kann die Lokalisation der Nef-EGFP Fusionsproteine ermittelt werden. Während myrNef₁₋₂₁₀-EGFP an der Plasmamembran und am TGN lokalisiert ist (**B**), befindet sich das Myristylierungs-defiziente Nef₁₋₂₁₀ (G2A)-EGFP überall im Zytoplasma der Zelle (**E**). Die Aufnahmen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Franziska Tesche am MPI Dortmund durchgeführt.

Im weiteren Verlauf des N-Terminus von Nef folgt ein Cluster basischer Aminosäuren (R17-R22), der sich zu einer amphipatischen α -Helix (α_1) faltet, die ebenso die Membranbindung unterstützt (Abbildung 5 und 6). Außerdem ist diese Helix in die Interaktion mit dem Nef-assoziiierenden Kinase Komplex (NAKC) involviert, mit Beteiligung der Src-Tyrosinkinase Lck (siehe dazu Abschnitt 2.6.6) (Baur et al., 1997). Zudem ist das Methionin 20, zusammen mit weiteren Resten im N-Terminus wichtig für die Rekrutierung von MHC-I (HLA-A2) und AP1 zur Internalisierung von MHC-I (Mangasarian et al., 1999; Williams et al., 2005; Wonderlich et al., 2007). MHC-I und die μ 1-Untereinheit von AP1 interagieren dabei koordinativ mit mehreren Bereichen des N-Terminus und der Kerndomäne von Nef (siehe dazu Abschnitt 2.6.5) (Jia et al., 2012).

Auf die N-terminale Helix α_1 folgt die α_2 -Helix (R35-G41) und die α_3 -Helix (W61-V70; pdb:3REA), die wiederum am letzteren Ende der N-terminalen Ankerdomäne in ein sauren Cluster von vier Glutamaten (E66-E69) mündet (Breuer et al., 2011; Gerlach et al., 2010; Geyer et al., 1999; Piguet et al., 1999). Dieses Cluster soll an der Interaktion mit PACS-1 und PACS-2 (*Phosphofurin acidic cluster sorting protein*) beteiligt sein, was wiederum Einfluss auf die Regulation des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (MHC-I) haben könnte (Dikeakos et al., 2012; Piguet et al., 2000). Die N-terminale Ankerdomäne soll außerdem mit dem Tumorsuppressor Protein p53 sowie mit Aktin interagieren (Fackler et al., 1997; Greenway et al., 2002).

Auf das saure Cluster folgt die für die Bindung an SH3-Domänen wichtige links-gängige PP-II-Helix (P73-P82) mit drei hochkonservierten PxxP-Motiven (siehe dazu Abschnitt 2.6.6). Beide sind verbunden durch eine gleichermaßen konservierte VGF Region (V70-F72), die aus den Aminosäuren Valin, Glycin und Phenylalanin besteht. Sie bildet zusammen mit dem sauren Cluster und dem PxxP-Motiv eine große amphipatische Oberfläche (Meuwissen et al., 2012).

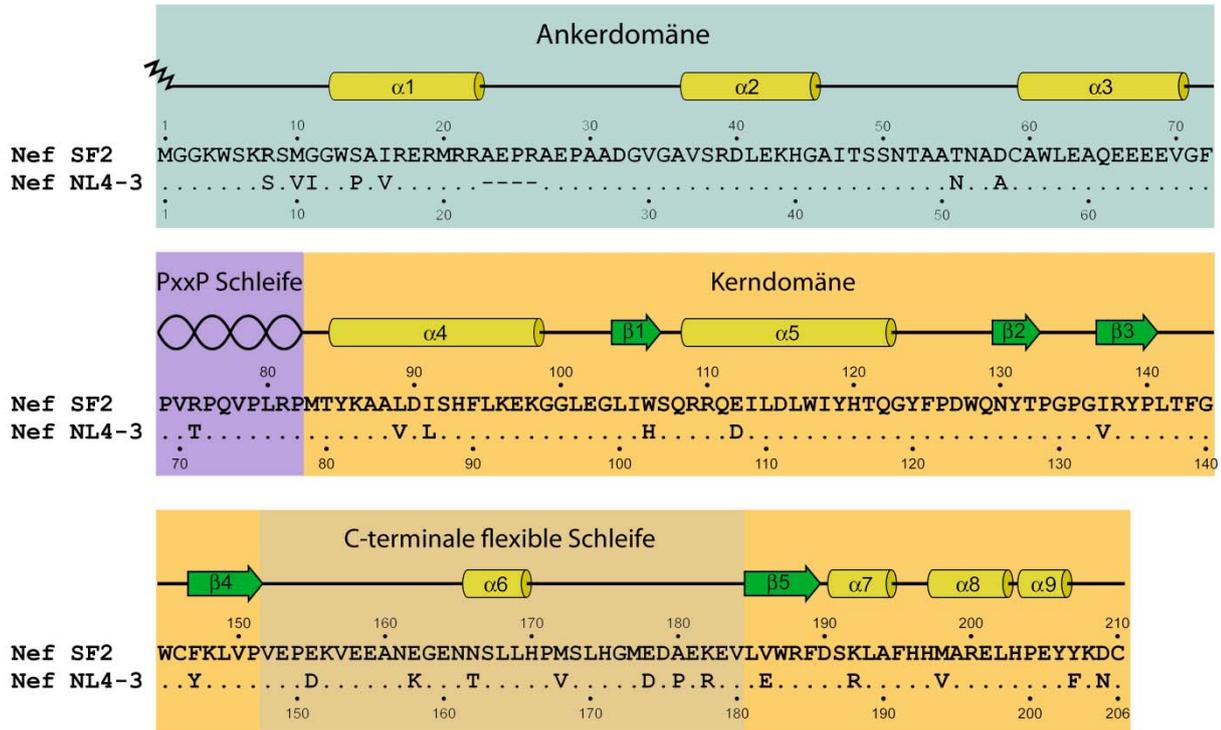


Abbildung 5: Sequenzielle Überlagerung von Nef_{SF2} und Nef_{NL4-3} mit Darstellung der Sekundärstrukturelemente. Es ist die Überlagerung der Aminosäuresequenzen der weltweit am meisten verwendeten Nef Allelen SF2 und NL4-3 mit ihren konservierten Sekundärstruktur-Elementen nach den pdb-Einträgen 1QA5 (Geyer et al., 1999), 3REA (Breuer et al., 2011) und 3RBB (Horenkamp et al., 2011) von Nef_{SF2} dargestellt. Die Regionen mit der Ankerdomäne (1-82) mit flexiblen N-terminus (1-59) und anschließender PxxP-Schleife (73-82), sowie der Kerndomäne (83-210, Δ 152-184) und die C-terminale flexible Schleife (152-184) sind zur Verdeutlichung farblich hinterlegt. Die α -Helices sind als gelbe Säulen und die β -Stränge als grüne Pfeile dargestellt.

An die Ankerdomäne und der PxxP-Schleife schließt sich die Kerndomäne von Nef an, die aus den α -Helices 4 und 5 und den β -Strängen 1-5 aufgebaut ist (Abbildung 5 und 6). Die α_4 -Helix (Y85-K98) schließt direkt an die PxxP-Helix an und liegt um etwa 45° verdreht antiparallel der α_5 -Helix (Q108-Q122) gegenüber, verbunden durch eine 9 Aminosäuren lange Schleife (G99-S107) mit kurzem β_1 -Strang. Die Helices α_4 und α_5 , zusammen mit der sie verbindenden Schleife, bilden eine große und stark konservierte hydrophobe Tasche (Horenkamp et al., 2011). Diese Tasche wird durch die Reste der Aminosäuren Phenylalanin 94 und Tryptophan 117 in eine proximale RT-Schleifen-Erkennungsdomäne und in eine distale Sortierungsmotiv-Erkennungsdomäne unterteilt, indem diese beiden Aminosäuren durch ihre aromatischen Reste eine Barriere bilden (Lülf et al., 2011).

In die proximale hydrophobe Tasche binden Reste von Aminosäuren der RT-Schleife von SH3-Domänen (W92_{HckA1} und F93_{HckB6}), während in den distalen Bereich CD4 mit

dessen Sortierungsmotiv bindet (siehe dazu Abschnitt 2.6.3), genauso wie CD3 bei SIV Nef (siehe dazu Abschnitt 2.6.4) (Breuer et al., 2011; Grzesiek et al., 1996b; Horenkamp et al., 2011; Kim et al., 2010). Zwei konservierte Arginine in der α_5 -Helix (R109 und R110) scheinen außerdem eine Funktion bei der Aktivierung der p21-aktivierenden Kinase 2 (Pak2) zu haben (Abbildung 6) (Sawai et al., 1995).

Nach der Helix α_5 folgt eine 25 Aminosäuren umfassende Schleife (G123-F147), in der sich ein unvollkommenes β -Faltblatt aus den β_2 - und β_3 -Strängen befindet. Am Anfang der Schleife sind die drei konservierten Aminosäuren Phenylalanin 125, Prolin 126 und Aspartat 127 an Dimerisierungsprozessen von Nef und damit an der Bindung an die Thioesterase beteiligt (Cohen et al., 2000; Liu et al., 2000). Zusätzlich zu diesen Resten, sollen auch sechs weitere Reste der Helix α_5 für die konzentrationsabhängige Oligomerisierung von Nef verantwortlich sein (Nef_{NL4-3}: R105, D108, I109, L112, Y115, H116) (Arold et al., 2000).

Anschließend verläuft die Peptidkette aus der Kerndomäne heraus in die C-terminale flexible Schleife, in dem sich das Dileucinmotiv E₁₆₄xxxLL in einer kleinen 3_{10} -Helix α_6 (N₁₆₆SLL) befindet (Abbildung 5 und 6). Dieser etwa 33 Aminosäuren große C-terminale flexible Schleife bildet ein außergewöhnliches symmetrisches Sequenzmotiv VExExxEEEx8LLx8EDxExEV, dessen beiden Enden zu einem antiparallelen β -Faltblatt aus β_4 und β_5 in der Kerndomäne konvergieren (Horenkamp et al., 2011). Die gegenseitige Abstoßung der negativen Reste begünstigt die Bildung und Flexibilität der Schleife und unterstützt die Exposition des Dileucinmotivs an der negativ geladenen Plasmamembran, was für die Interaktion mit AP2 essenziell ist.

Nach der flexiblen Schleife befinden sich mit den Helices α_7 (S191-A194), α_8 (M198-L202), und α_9 (P204-Y206) noch kleinere Sekundärelemente (Horenkamp et al., 2011). Interessant ist im C-Terminus das konservierte und stark auf der Oberfläche exponierte Phenylalanin 195. Es gilt als Schlüsselrest für die Interaktion mit aktiven Pak2 und dem GTP-Austauschfaktor (*Guanosine triphosphate Exchange Factor*) Vav1, denn allein durch dessen Mutation, beispielsweise zu einem Leucin, ist Nef zu keiner Pak2 Assoziation mehr fähig. (Agopian et al., 2006; Agopian et al., 2007; Rauch et al., 2008). Nef_{NL4-3} F191Y (komplementär zu F195 in Nef_{SF2}) hingegen ist noch in der Lage Pak2 zu aktivieren. Das Phenylalanin liegt an der Oberfläche von Nef und sein Benzolring frei in Lösung und damit gut zugänglich für Interaktionspartner (Abbildung 6) (O'Neill et al., 2006).

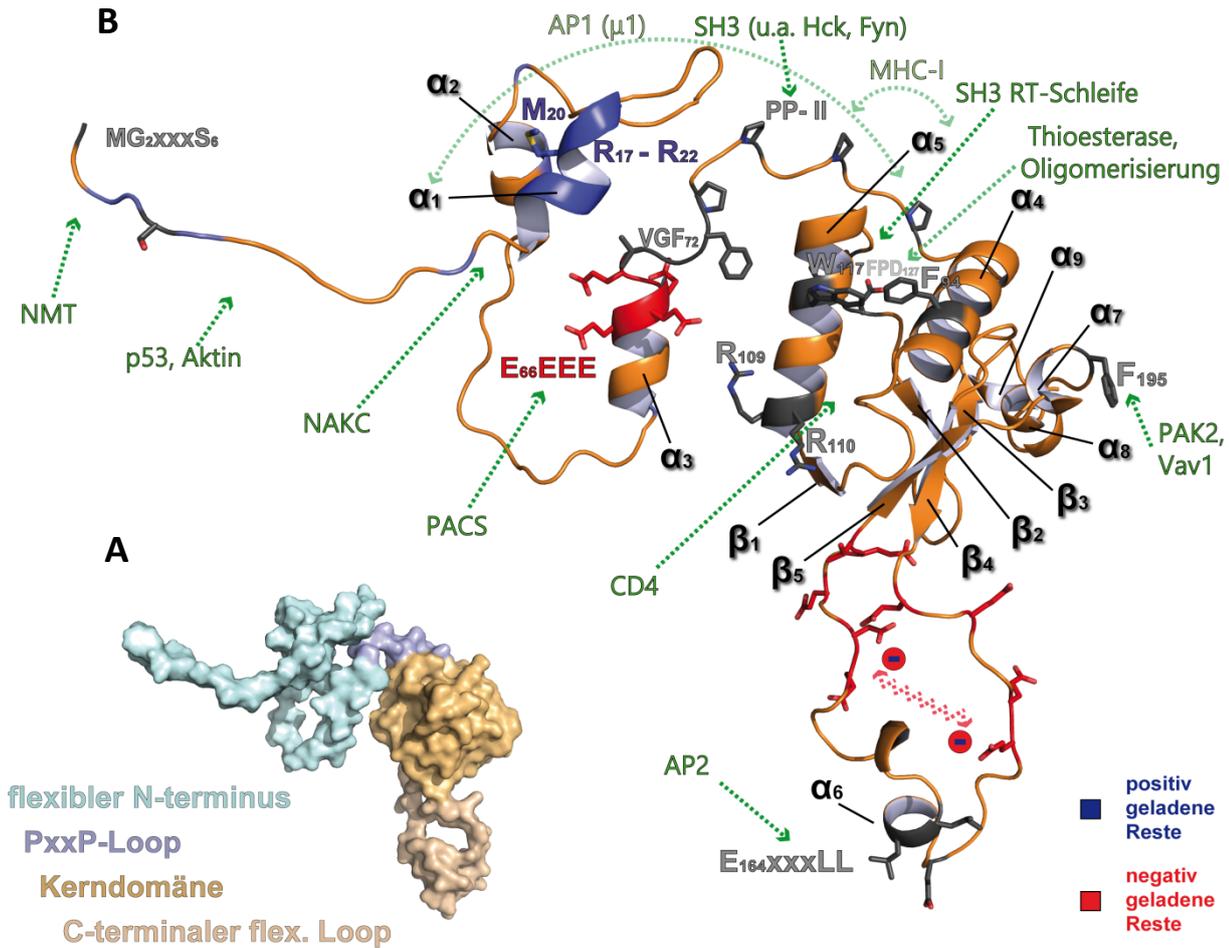


Abbildung 6: Überblick über die Struktur und Bindungsinteraktionen von Nef. (A) Oberflächendarstellung von Nef₁₋₂₁₀ unter Verwendung des N-Terminus 1-57 der Struktur 1QA5 (Geyer et al., 1999), der Reste 57-72 der Struktur 3REA (Breuer et al., 2011) und der Reste 72-208 der Struktur 3RBB (Horenkamp et al., 2011), farblich angelehnt an Abbildung 5. Das Protein lässt sich in die vier Bereiche der flexiblen Ankerdomäne mit flexiblen N-Terminus, der PxxP-Helix, der Kerndomäne und der C-terminalen flexiblen Schleife unterteilen. (B) Darstellung der Tertiärstruktur von Nef_{SF2} im Schleifenmodell (schwarz), der mit Nef interagierenden Proteine (grün) und deren postulierte Motive auf Nef (grau). Positiv geladene Aminosäurereste sind blau und negativ geladene rot dargestellt. Die gegenseitige Abstoßung der negativen Reste in der C-terminalen flexiblen Schleife ist schematisch dargestellt.

2.6 Nef und seine Interaktionspartner

Anhand des in Abbildung 6 dargestellten Modells einer Volllängen-Struktur von Nef ist zu erkennen, dass es viele beschriebene Motive besitzt mit ebenso vielen Interaktionspartnern, durch die Nef verschiedene zelluläre Vorgänge beeinflussen kann. Im Folgenden wird aber nur auf einige dieser Interaktionspartner von Nef wie CD4, CD3, MHC-I, und der SH3-Domäne der Tyrosinkinase Hck sowie deren zellulären Wechselwirkungen mit Nef detaillierter eingegangen. Denn diese spielen in dieser Arbeit eine Rolle als Ziele für die hier entwickelten und charakterisierten Nef-Inhibitoren.

2.6.1 Der Oberflächenrezeptor CD4 (*cluster of differentiation antigen 4*)

Das membranständige Glykoprotein CD4 (früher T4/Leu3a/91D6 (Bernard and Bousnell, 1984)) ist ein Oberflächenrezeptor, der sich auf T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen befindet (Bierer et al., 1989). Die Funktion ist die Verstärkung der durch MHC-II-Moleküle Antigen-vermittelten Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) von T-Zellen (Anderson et al., 1987; Emrich et al., 1987; Owens et al., 1987). Der CD4-Rezeptor fungiert hierbei als Corezeptor des TCR und erhöht die Aktivität der CD4 assoziierten Src-Tyrosinkinase Lck, was zur Phosphorylierung der zeta Untereinheit (CD3 ζ) des TCR führt (Barber et al., 1989; Bowers et al., 1997; Veillette et al., 1988; Veillette et al., 1989). Daraufhin bindet die zytosolische Tyrosinkinase ZAP-70 an CD3 ζ , die daraufhin aktiviert wird und das Signal intrazellulär weiterleitet (Abbildung 7) (Chan et al., 1991; Chan et al., 1992).

Das bedeutet, dass CD4 eine wichtige Rolle in der Antigen-vermittelten Aktivierung der T-Zelle einnimmt. Außerdem ist CD4 der Hauptrezeptor von HIV zur Bindung und Infizierung seiner Wirtszelle, in dem es mit seinem Glykoprotein 120 (gp120) an CD4 sowie an den Corezeptoren CXCR4 (früher LESTR) und CCR5 (früher auch CC-CKR5) bindet (Bleul et al., 1996; Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996; McClure et al., 1987; McDougal et al., 1986; Sattentau and Weiss, 1988).

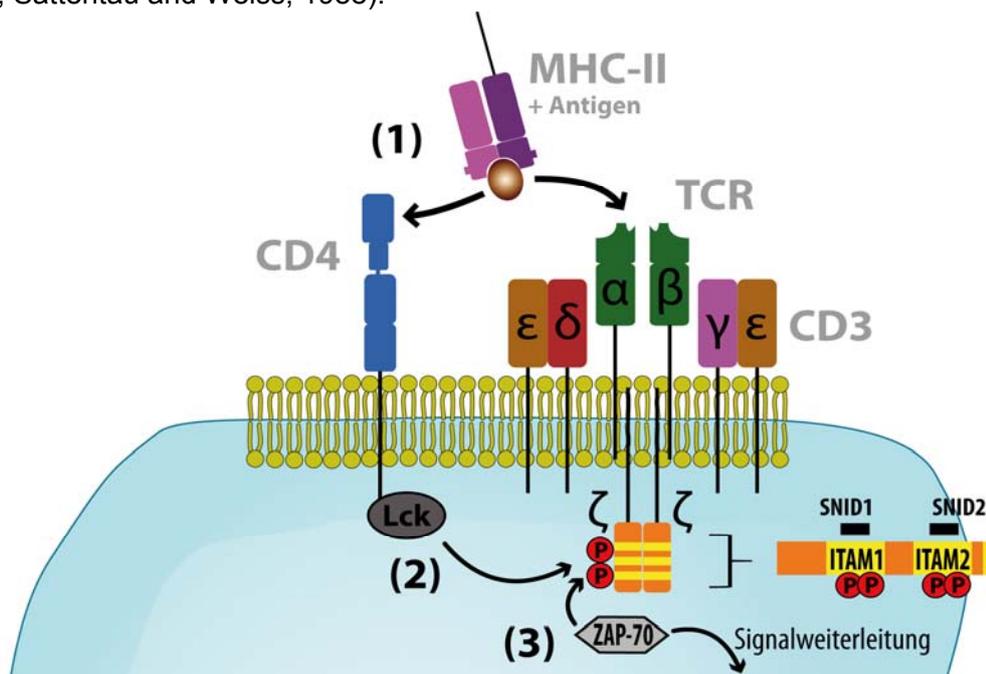


Abbildung 7: Schema der Funktion von CD4 bei der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors. (1) Die Erkennung und Bindung eines an einem MHC-II-Rezeptor gebundenen Antigens erfolgt durch die α - und β -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors sowie durch den Corezeptor CD4. (2) Es folgt die Aktivierung der Tyrosinkinase Lck, die Tyrosine innerhalb der CD3 ζ Untereinheit des TCR phosphoryliert. (3) Daraufhin bindet eine weitere Tyrosinkinase ZAP-70, die so aktiviert wird und zusammen mit Lck das Signal in die Zelle weiterleitet (Love and Hayes, 2010).

2.6.2 Die Funktionsweise der Endozytose von CD4

In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass CD4-Moleküle ständig einen Prozess der Endozytose und des Recyclings durchlaufen. Etwa 1,5-2% der CD4-Rezeptoren auf der Oberfläche werden pro Minute internalisiert, wobei das *steady state*-Level zwischen Endozytose und Recycling nach 30-60 min erreicht wird (Marsh et al., 1990).

Damit CD4 internalisiert werden kann, muss es zunächst von Lck dissoziieren, denn Lck inhibiert die Endozytose von CD4 indem der Eintritt in umhüllte Vesikel (*coated vesicles*) verhindert wird (Pelchen-Matthews et al., 1992). Diese umhüllten Vesikel sind kurz vor der Rezeptor-vermittelten Endozytose Plasmamembran-assoziiert (Goldstein et al., 1985). Sie bestehen hauptsächlich aus dem Proteinkomplex Clathrin, dass mit seinen schweren und leichten Ketten Triskelions bildet und damit abgeschnürte Membranvesikel wie einen Käfig umschließen (Crowther et al., 1976; Kirchhausen and Harrison, 1981; Pearse, 1975; Unanue et al., 1981; Ungewickell and Branton, 1981).

Außerdem beinhalten diese der Plasmamembran entsprungenen Vesikel den Adaptorproteinkomplex 2 (AP2). Dieser ist zusammen mit Cathrin die wichtigste Komponente der Vesikelhüllen. Bei der Entstehung der Vesikel generieren Clathrin und AP2 scharf gekrümmte Hüllen, wobei die Bindung von AP2 an membrangebundene Proteine die Membran deformieren, bevor Dynamin und Auxilin das Vesikel letztendlich abschnüren (Ehrlich et al., 2004; Lee et al., 2006; Massol et al., 2006). Wichtig für die Endozytose von CD4 durch Clathrin und AP2 sind zum einen ein Paar von Leucinen in seiner zytoplasmatischen Domäne sowie die Phosphorylierung eines benachbarten Serin (Shin et al., 1990; Shin et al., 1991). Solche zwei direkt benachbarte Leucine werden auch als Dileucinmotiv bezeichnet und spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Proteinsortierungs-Prozessen (Bonifacino and Traub, 2003). Für die Endozytose von CD4 sind das Dileucinmotiv und die Serin-Phosphorylierung essenziell, weil nur so die Bindung an AP2 möglich ist (Pitcher et al., 1999).

AP2 ist ein heterotetramerer Proteinkomplex, der aus den zwei großen Untereinheiten α und $\beta 2$ (beide ≈ 100 kDa), einer mittleren $\mu 2$ (≈ 50 kDa) und der kleinen $\sigma 2$ (≈ 20 kDa) besteht, die zusammen den Kern-Komplex bilden (Abbildung 8). Die C-terminalen Domänen der α und $\beta 2$ -Untereinheit bilden globuläre Anhängsel (*appendages* oder *ears*), die mittels flexibler Verbindungsdomänen (*hinges*), von bis zu 6 nm Länge, mit der Kerndomäne verknüpft sind (Collins et al., 2002; Hirst and Robinson, 1998; Keen, 1990; Kirchhausen, 1993).

Zur Endozytose von CD4 interagiert AP2 mittels eines Clathrin-Box Motivs in der $\beta 2$ -*hinge* Region (ter Haar et al., 2000) und den *appendage*-Regionen mit Clathrin (Owen et al., 2000), bindet mit der α -Untereinheit an die Plasmamembran (Chang et al., 1993a; Gaidarov and Keen, 1999) und mit Bereichen der α und $\sigma 2$ -Untereinheiten die Konsensussequenz [DE]XXXL[LI] von CD4 (Abbildung 8) (Doray et al., 2007). Diese Bindung konnte in der Struktur von AP2 mit einem bindenden CD4-Peptids (RM(phosphoS)QIKRLLSE) 2008 gelöst werden. In der Struktur bindet das Peptid an die α -Untereinheit nahe der Bindestelle für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) sowie mit dem Dileucin in eine hydrophobe Tasche der $\sigma 2$ -Untereinheit (Kelly et al., 2008). AP2 ist dadurch mit den α - und β -Untereinheiten zur Membran hin orientiert, wodurch die Bindung an die Membran, an CD4 und an beteiligte Proteine der Internalisierungsmaschinerie ermöglicht wird (Abbildung 8). Daraufhin wird ein kleiner Teil der CD4-Moleküle internalisiert, in frühe Endosomen transportiert und recycelt zur Zelloberfläche zurückgebracht (Oldridge and Marsh, 1998).

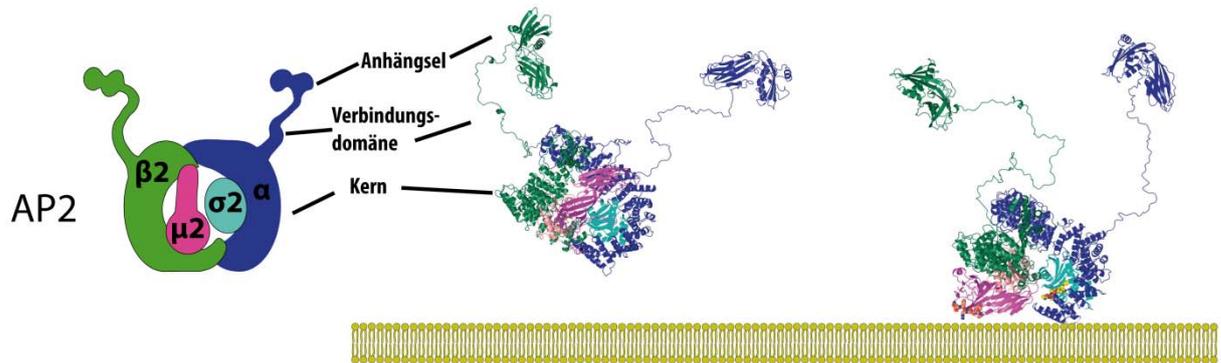


Abbildung 8: Schematischer Aufbau von AP2 und dessen Membranassoziation. Im Zytoplasma hat AP2 (α , $\beta 2$, $\mu 2$, $\sigma 2$) eine geschlossene Konformation, so dass die Cargo Bindestellen nicht erreichbar sind. (links, PDB ID: 2VGL, 1B9K, 1E42). Nach der Bindung an die Membran mittels vier PtdIns(4,5) P_2 Bindestellen auf α , $\beta 2$ und $\mu 2$ kommt es durch Konformationsänderungen und der Phosphorylierung von Threonin 156 der $\mu 2$ -Untereinheit zur Öffnung der beiden Cargo-Sortierungsmotiv-Bindestellen für ein Dileucinmotiv (gelb) und ein Tyrosinmotiv (orange) (rechts, PDB ID: 2XA7, 1B9K, 1E42) (Jackson et al., 2010). (Abbildung verändert aus Heldwein et al., 2004; Jackson et al., 2010)

2.6.3 Die Nef-vermittelte Endozytose von CD4

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass CD4 phosphoryliert und runterreguliert wird wenn T-Zellen mit Phorbol Ester (PMA) behandelt werden (Shin et al., 1990). Dies führt fast sofort zu einer vollständigen Internalisierung aller CD4-Moleküle von der Zelloberfläche, wobei sie in Lysosomen transportiert und dann degradiert werden. Hierbei kommt es außerdem zur Aktivierung von PKC. Die Neusynthese von CD4 wird durch PMA hingegen nicht gestört (Petersen et al., 1992).

Eine ähnliche Runterregulierung aller CD4-Moleküle wurde zuvor schon durch das Nef Protein beobachtet (Garcia and Miller, 1991; Geleziunas et al., 1991; Guy et al., 1987). Aber im Gegensatz zur Internalisierung durch PMA, ist die Nef-induzierte Runterregulierung von CD4 nicht abhängig von der Phosphorylierung von CD4 und somit auch von PKC unabhängig, so dass dies durch einen anderen Mechanismus funktionieren muss (Jin et al., 2004).

In T-Zell Linien ist die Oberflächenexpression von CD4 antiproportional zur Nef Expression, wobei Nef nicht das *steady-state*-Level der CD4 RNA oder von CD4 selbst verändert (Garcia and Miller, 1991; Inoue et al., 1993). Für diese Nef-induzierte Runterregulierung wird ebenfalls das Dileucinmotiv in der zytoplasmatischen Domäne von CD4 benötigt (Aiken et al., 1994). Die CD4-Moleküle werden in T-Zellen in Anwesenheit von Nef zur Plasmamembran transportiert und anschließend schnell internalisiert und lysosomal degradiert (Rhee and Marsh, 1994).

Die direkte Interaktion zwischen CD4 und Nef konnte in einer Studie mittels Hefe 2-Hybridsystem gezeigt werden (Rossi et al., 1996). Auch in einer anderen Studie war die Coexpression von Nef und CD4, aber auch die Myristylierung von Nef unerlässlich für die Interaktion und die Endozytose von CD4 (Greenway et al., 1995; Harris and Neil, 1994). In späteren Untersuchungen *in situ* wurde mittels Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer in intakten humanen Zellen die Interaktion zwischen Nef und CD4 bewiesen, doch wird das Dileucinmotiv von CD4, was zwar für die CD4-Runterregulierung essenziell ist, für die Nef/CD4-Komplexbildung nicht benötigt (Cluet et al., 2005). Schon zuvor wurde ebenso

gezeigt, dass Nef mit einem Vollängen CD4(LL-AA)-Konstrukt sowohl *in vivo* in Insektenzellen, als auch *in vitro* interagiert (Bentham et al., 2003).

Konsens bei allen Studien ist, dass Nef direkt mit CD4 interagiert, wobei der genaue Mechanismus aber bis heute unbekannt ist. In der einzigen Studie aus der strukturelle Daten des Nef-CD4-Komplexes hervorgegangen sind, wurde ein 13 Aminosäuren langes CD4-Peptid (MSQIKRLLSEKKT) verwendet, das in die distale hydrophobe Tasche von Nef bindet. Mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) konnte eine Affinität zwischen Nef und CD4 von etwa 1 mM bestimmt werden (Grzesiek et al., 1996b).

Das Nef Protein selbst besitzt wie CD4 ein Dileucinmotiv (E/DXXXLΦ) in einer exponierten C-terminalen flexiblen Schleife (siehe Abbildung 6), die in der Endozytose von CD4 eine wichtige Rolle spielt (Craig et al., 1998; Grzesiek et al., 1996a; Lee et al., 1996). Es gibt hierbei für Nef zwei Möglichkeiten die Dileucinmotiv Bindestelle sowie das eigene Dileucinmotiv der C-terminalen flexiblen Schleife in der Endozytose von CD4 einzusetzen. Zum einen könnte Nef an die zytoplasmatische Domäne von CD4 binden, wodurch die grundsätzlich schwache Endozytose durch AP2 durch eine starke ersetzt und der CD4-Nef-Komplex internalisiert wird. Zum anderen könnte Nef die direkte Interaktion zwischen CD4 und Proteinen der endozytotischen Maschinerie vermitteln, indem AP2 rekrutiert wird, und die Endozytose so verstärken, (Craig et al., 1998; Greenberg et al., 1997; Lock et al., 1999). Denn wie bereits erwähnt, haben Adaptorproteinkomplexe wie AP2 auf ihren α und $\sigma 2$ -Untereinheiten eine Bindestelle für Dileucinmotive (Doray et al., 2007). Die direkte Interaktion zwischen Nef, CD4 und AP2 in einem trimeren Komplex konnte mittels Hefe 3-Hybridsystem gezeigt werden (Chaudhuri et al., 2007).

Es gibt dabei viele Gründe, weshalb es für HIV wichtig ist mittels Nef CD4 zu internalisieren und abzubauen. So konnte beobachtet werden, dass T-Zellen die Nef exprimieren, resistent gegenüber HIV-1 Infektionen sind. Deshalb könnte die Internalisierung dazu dienen, eine Superinfektion mehrerer HI-Viren derselben Zelle zu verhindern (Benson et al., 1993; Michel et al., 2005). Außerdem gehört CD4 zu den Rezeptoren, die sehr stark auf der Oberfläche der T-Zelle exprimiert sind, so dass deren Endozytose die Virusreplikation verbessert, weil es die Virusfreisetzung erleichtert (Cullen, 1994; Ross et al., 1999). Zudem ist CD4 wichtig für die Entwicklung und der Funktion des Immunsystems und für die antivirale Immunantwort, die durch die verstärkte Endozytose von CD4 nicht mehr möglich ist (Bowers et al., 1997; Weiss and Littman, 1994). Damit könnte die Inhibition der Nef-vermittelten Endozytose von CD4 den viralen Replikationszyklus stören.

2.6.4 SIV spezifische Nef-vermittelte Endozytose von CD3

Der T-Zell-Rezeptor besteht neben dem heterodimeren α - und β -Komplex aus zwei weiteren heterodimeren Komponenten des CD3-Rezeptors ϵ/δ und γ/δ sowie aus einem CD3 ζ Homodimer (Abbildung 9) (Call and Wucherpfennig, 2005). Während die α - und β -Untereinheiten für die Antigenerkennung zuständig sind, haben die Untereinheiten von CD3 die Aufgabe das Signal in die Zelle zu transduzieren. Nach erfolgter Phosphorylierung der ITAM-Motive (*immunoreceptor tyrosin based activation motif*) von CD3 ζ durch Lck, bindet ZAP-70 an die CD3 ζ -Untereinheit wodurch die Signale ins Zellinnere weitergeleitet werden (Wucherpfennig et al., 2010). Die Phosphorylierungsstellen in den ITAMs besitzen die Konsensussequenz YxxI/Lx6-8YxxI/L (mit ⁷²YNELx7YDVL₈₆, ¹¹¹YNELx8YSEI₁₂₆,

¹⁴²YQGLx7YDAL₁₅₆), wodurch Lck bei 3 ITAMS sechs Tyrosine phosphorylieren muss (Abbildung 9) (Kersh et al., 1998; Reth, 1989).

Zur Internalisierung der CD3 ζ -Untereinheit des TCR wurden innerhalb seiner zytoplasmatischen Domäne zwei SIV Nef interagierende Domänen (SNIDs) entdeckt, die für die Nef-vermittelte Endozytose essenziell sind (Schaefer et al., 2000). SNID 1 befindet sich innerhalb von ITAM 1 und SNID 2 von ITAM 2 (Abbildung 9). Durch Studien und letztendlich mittels der gelösten Komplexstruktur von SIV Nef und einem CD3 ζ SNID 1-Peptids konnte gezeigt werden, dass CD3 ζ in die distale hydrophobe Tasche von Nef bindet (Kim et al., 2010; Schaefer et al., 2002; Swigut et al., 2003). Hierbei bindet die Sequenz YNEL von SNID 1 (vorderes Tyrosinmotiv von ITAM 1) in die Tasche, wobei die gleiche Sequenz auch im ITAM 2 (SNID 2) vorhanden ist und wahrscheinlich in gleicher Weise mit Nef interagiert. Wie anschließend der Nef-CD3 ζ -Komplex internalisiert wird, ist weitgehend ungeklärt, wobei diese aber nicht AP2/Clathrin-vermittelt erfolgen soll (Swigut et al., 2003).

Möglicherweise bewirkt die Internalisierung von CD3 durch SIV Nef, dass die T-Zelle und das Immunsystem nicht so stark aktiviert wird wie dies bei einer HIV Infektion beim Menschen geschieht, weil HIV-1 Nef mit CD3 ζ nicht interagiert. Dadurch vermehrt sich das HI-Virus in seinem Wirt nicht so stark, so dass es möglicherweise zu einem Gleichgewicht zwischen Virusvermehrung und der Anzahl an nicht infizierter T-Zellen kommt (Schindler et al., 2006).

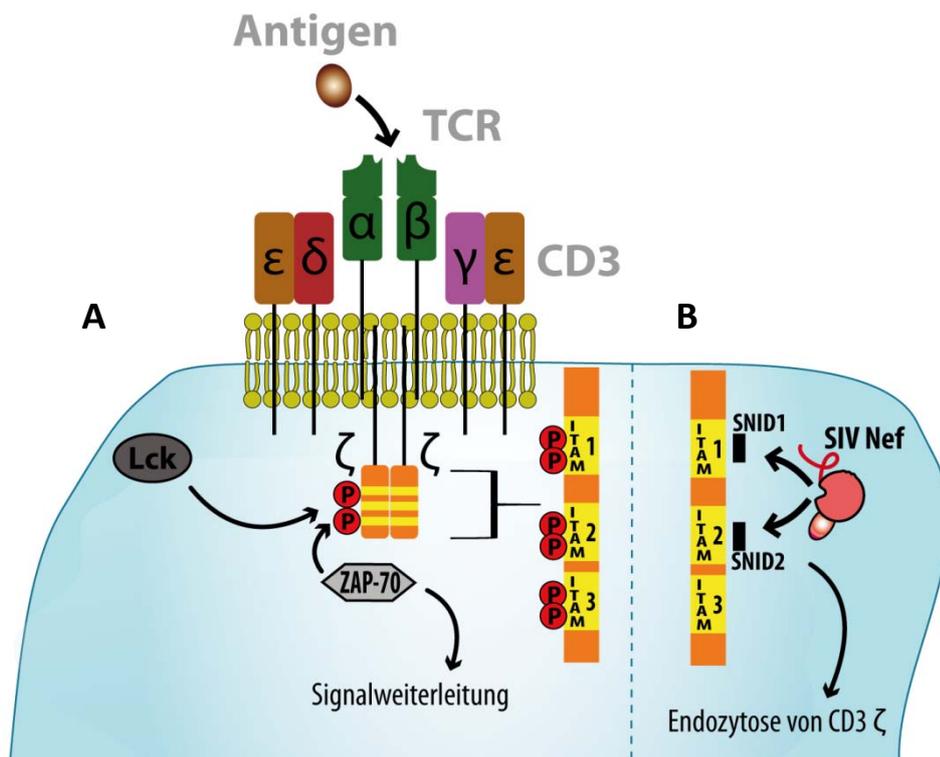


Abbildung 9: Schema der Funktion von CD3 bei der Aktivierung des TCR und der Nef-vermittelten Endozytose von CD3. (A) Bei der Aktivierung des T-Zell Rezeptors durch die Bindung eines Antigens an die α - und β -Untereinheiten und für die Signalweiterleitung, wird die CD3 ζ -Untereinheit durch Lck phosphoryliert, bevor ZAP-70 die Signale ins Zellinnere weiterleitet. CD3 ζ besitzt drei ITAM-Motive mit jeweils zwei Phosphorylierungsstellen. **(B)** Innerhalb von ITAM 1 und 2 wiederum befinden sich die SIV Nef interagierende Domänen SNID 1 und 2, mit denen SIV Nef mittels hydrophober Tasche interagiert und damit die CD3 ζ -Untereinheit internalisieren kann.

2.6.5 Die Nef-vermittelte Endozytose von MHC-I

Es wird neben CD4 auch der Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC-I), bzw. das humane Leukozytenantigen (HLA), in HIV-1 infizierten Zellen runterreguliert. Dies ist für HIV sehr wichtig, weil ihre Wirtszellen dann weniger anfällig für die Lyse durch zytotoxische T-Zellen (CTL) sind (Kerkau et al., 1989; Scheppeler et al., 1989). Die Endozytose von MHC-I spielt daher eine wichtige Rolle für die Pathogenese des Virus und des Wirtes.

Diese Endozytose von MHC-I wird, wie die von CD4, durch Nef verursacht (Schwartz et al., 1996). Hierbei wird ein Komplex aus Nef, AP1 und der zytoplasmatischen Domäne von MHC-I gebildet (Noviello et al., 2007). AP1 ist nicht wie AP2 an der Plasmamembran lokalisiert, sondern im *Trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), denn AP1 bindet an das für die Membran des TGN spezifische Phosphatidylinositol 4-Phosphat (PI4P) (Wang et al., 2003). Da die zytoplasmatischen Domänen von MHC-I im Endoplasmatisches Retikulum noch nicht phosphoryliert sind und Nef bevorzugt unphosphoryliertes MHC-I bindet, interagiert Nef mit frühen Vorstufen von MHC-I bereits am TGN (Harding and Geuze, 1993). Nef beeinflusst dabei den Transport von MHC-I am TGN indem es AP1, das zytoplasmatische Domänen von Proteinen am TGN bindet, zum MHC-I umleitet und in Clathrin umhüllte Vesikel (CCVs) zum endolysomalen Abbau bringt. Durch den Knockout von AP1 konnte bewiesen werden, dass der Abbau von MHC-I durch Nef in verschiedenen Zelllinien nicht mehr stattfindet. Außerdem lassen sich Nef und MHC-I mit AP1 co-präzipitieren (Roeth, 2004). Der Mechanismus mit dem Nef mit MHC-I und AP1 interagiert ist anders als der von CD4, weil MHC-I kein Dileucinmotiv besitzt. Stattdessen hat es ein Tyrosin Bindemotiv, das die Interaktion mit Adapterproteinkomplexen ermöglicht (Ohno et al., 1995; Robinson, 1994).

AP1 gehört wie AP2 zur Familie der heterotetrameren Endozytosekomplexe, ist daher auch sehr ähnlich aufgebaut, besteht aber aus den Untereinheiten γ , $\beta 1$, $\mu 1$ und $\sigma 1$ (Abbildung 10). Die $\mu 1$ -Untereinheit bindet, wie auch die $\mu 2$ -Untereinheit von AP2, Tyrosin Bindungsmotive von Cargoproteinen (Heldwein et al., 2004; Le Gall et al., 1998; Marks et al., 1997; Ohno et al., 1995).

In der Klasse der MHC-I-Rezeptoren beim Menschen gibt es unter anderem die Typen HLA-A, -B, -C und -E. Während HLA-A und -B ein sogenanntes kryptisches Tyrosin Bindemotiv (YSQA) enthalten, hat HLA-C (CSQA) keines und -E (YSKA) ein mutiertes Motiv. Nef ist in der Lage HLA-A und HLA-B zu internalisieren, aber HLA-C und HLA-E nicht. Das ist insofern wichtig für HIV, als dass zwar die Endozytose der HLA-Rezeptoren die Zelle vor der Lyse durch CTL schützt, andererseits aber eine vollständige Internalisierung aller HLA die Zerstörung durch natürliche Killerzellen (NK) zur Folge haben würde. Somit scheint es ein evolutionärer Kompromiss zu sein HLA-A und -B runterzuregulieren und HLA-C und -E nicht (Cohen et al., 1999; Le Gall et al., 1998).

In Anwesenheit von Nef akkumuliert HLA-A und -B in der perinuklearen Region in CCVs. Ohne Nef als Mediator kann AP1 die HLA-A- und HLA-B-Ketten nur sehr schwach binden, da sie kein vollständiges Tyrosin Bindemotiv YxxL/I besitzen, sondern eben nur ein kryptisches bzw. nichtkanonisches. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass ein Alanin anstatt eines Leucins innerhalb des Tyrosinmotivs an Position +3 relativ zum Tyrosin die Interaktion mit der μ -Untereinheit des AP-Komplexes beeinträchtigen (Boll et al., 1996; Ohno et al., 1996). Das heißt, während Nef für die Endozytose von CD4 ein schon funktionierendes System benutzt, vermittelt es zwischen AP1 und MHC-I eine natürlich nicht vorkommende Interaktion. Nef kompensiert im Prinzip das Alanin im Tyrosin Bindemotiv und

kann im Komplex mit AP1 das MHC-I so zu Lysosomen transportieren (Wonderlich et al., 2007).

In der normalen Funktion als Cargo-bindender Clathrin-Adapter Proteinkomplex muss die μ 1-Untereinheit zunächst phosphoryliert werden, was eine Konformationsänderung zur Folge hat. An der Membran des TGN bindend kann ein Cargo-Rezeptor mit seinem Tyrosinmotiv mit der μ 1-Untereinheit interagieren, woraufhin der endosomale Transport mittels CCVs erfolgt (Ghosh and Kornfeld, 2003). Nef hingegen bindet an MHC-I und AP1 Phosphorylierung-unabhängig (Abbildung 10).

Die kürzlich gelöste Komplexstruktur der C-terminalen Domäne der μ 1-Untereinheit von AP1 und einem Fusionsprotein aus der zytosolischen Domäne von MHC-I (MHC-I-CD) und Nef zeigt, dass MHC-I-CD nur zusammen mit Nef an AP1 binden kann und dass die μ 1-Untereinheit direkt beteiligt ist (Noviello et al., 2007; Singh et al., 2009). Hierbei bindet MHC-I-CD in eine schmale Furche zwischen Nef und μ 1 mittels einer tertiären kooperativen Interaktion, wobei es von der Cargo-Erkennungsstelle von μ 1 umgeben wird. Eine Erklärung weswegen Nef AP1 und nicht AP2 für die Endozytose von MHC-I verwendet, ist das Fehlen eines basischen Bereichs von μ 1 bei μ 2, sowie eines Tyrosins, das mit Prolin 72 des PxxP-Motivs von Nef interagiert. Mit Blick auf einen möglichen Nef-Inhibitor, könnte die schmale Furche in die MHC-I bindet ein Ziel für ein kleines Molekül darstellen. Durch die mögliche Inhibition der Internalisierung von MHC-I, könnte die infizierte Zelle von CTL erkannt und zerstört werden (Jia et al., 2012).

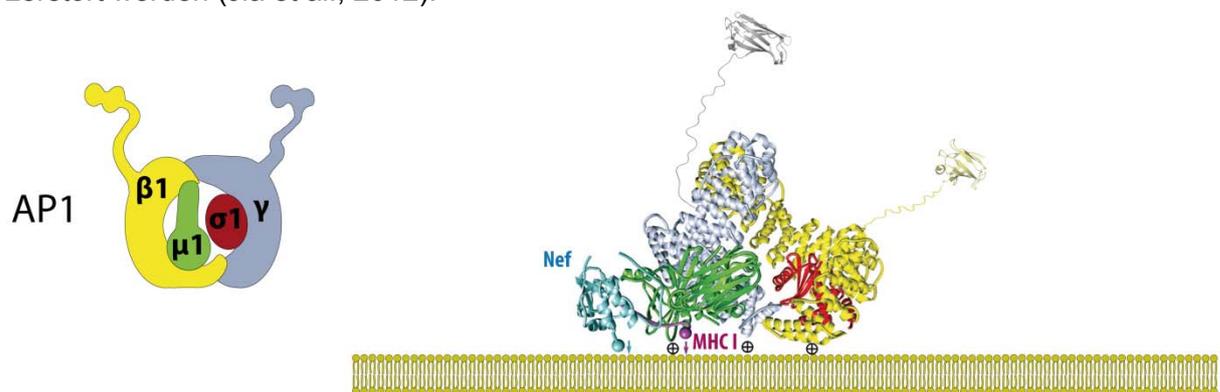


Abbildung 10: Schematischer Aufbau von AP1 und dessen Membranassoziation mit Nef. Der trimere Komplex aus Adapterprotein, Cargo und Nef wurde durch die Kristallisation eines Nef-MHC-I-CD Fusionskonstrukts mit der C-terminalen Domäne der μ 1-Untereinheit von AP1 gelöst. In der Abbildung wurden die Untereinheiten γ , β 1, und σ 1 *in silico* mittels der Koordinaten der Kernstruktur von AP2 aus Jackson, Kelly et al. 2010 ergänzt (Jia et al., 2012). Bei Nef-MHC-I-CD- μ 1 handelt es sich um einen trimären kooperativen Komplex. Hierbei wird durch die Assoziation von Nef und AP1 eine schmale Furche gebildet, in die MHC-I bindet und in Clathrin umhüllte Vesikel transportiert und internalisiert wird (Abbildungen verändert, Jia et al., 2012).

2.6.6 Nef als Aktivator von Serin/Threonin- und Src-Tyrosinkinasen

Neben der Funktion als Mediator für die Endozytose von Rezeptoren, hat Nef auch Einfluss auf Signaltransduktionswege in der Wirtszelle von HIV. Nef interagiert dabei unter anderem mit intrazellulären Serin/Threonin-Kinasen und mit Src Tyrosinkinasen (Saksela et al., 1995; Sawai et al., 1994).

Als Serin/Threonin-Kinase wurde eine Nef-assoziiierende Kinase (NAK) identifiziert, bei der es sich um die p21-aktivierende Kinase 2 (Pak2) handelt, wobei an der Interaktion noch weitere Proteine beteiligt sein müssen (Arora et al., 2000; Nunn and Marsh, 1996;

Renkema et al., 1999; Sawai et al., 1994). Möglicherweise bildet Nef einen Nef-assoziiierenden Kinase Complex (NAKC), der dann zur Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen und der daraus resultierenden Steigerung der Virusinfektiosität und der Transkriptionsrate führt (Wiskerchen and Cheng-Mayer, 1996; Wolf et al., 2008). Neben den Proteinen Nef und Pak2 sind am NAKC-Komplex noch die Proteine Eed, hnRNPk, PKC δ und Lck beteiligt. Während der Bildung des Komplexes interagiert Eed mit Integrin, Paxillin und TACE, was zur Aktivierung von Erk1/2 führt, sowie zur Phosphorylierung von Paxillin durch Lck und Pak2, und zur Phosphorylierung von TACE (*Tumor necrosis factor (TNF)-converting enzyme*) durch Erk1/2. Daraufhin ist TACE aktiviert, bindet Paxillin und beide werden gemeinsam mit Nef mittels extrazellulärer Vesikel sekretiert. Dies ist der Grund weswegen in einigen *in vivo* Studien Nef enthaltene Vesikel beobachtet werden konnten, die zu benachbarten T-Zellen transportiert werden. Möglicherweise aktiviert dann das transportierte aktive TACE Vorstufen von TNF- α in anderen T-Zellen. (Lee et al., 2013; Moss et al., 2001; Muratori et al., 2009). Hierdurch würden dann benachbarte T-Zellen aktiviert und stünden als weitere Wirtszellen für HIV zur Verfügung.

Zu den Src Tyrosinkinase zählen im Menschen 11 Mitglieder (Manning et al., 2002). Von ihnen werden Src, Yes, Lyn und Fyn in sehr vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, wobei Blk, Fgr, Hck und Lck hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen vorkommen (Bolen and Brugge, 1997; Thomas and Brugge, 1997). Src Tyrosinkinase haben viele wichtige Funktionen in verschiedenen zellulären Signalwegen (Bolen, 1993). Sie besitzen N-terminal vor der katalytischen Domäne eine SH3- und SH2-Domäne, die für spezifische Protein-Protein Interaktionen und damit für die Weiterleitung von Signalen von der Zelloberfläche zum Nukleus wichtig sind. Während SH2-Domänen Phosphotyrosin enthaltende Proteine bindet, interagiert die SH3-Domäne mit Prolin-reiche PxxP-Domänen von Proteinen (Abbildung 11) (Mayer and Baltimore, 1993; Pawson and Schlessingert, 1993; Superti-Furga, 1995). Hierbei handelt es sich um eine links-gängige Polyprolin-Typ II (PPII) helikale Konformation mit der typischen PxxP-Sequenz, wo x für jede beliebige Aminosäure steht (Ren et al., 1993; Yu et al., 1994).

Src Kinase haben zwei wichtige Phosphorylierungsstellen, wobei die Phosphorylierung von Tyr416 stimulierend und die von Tyr527 inhibitorisch wirkt. Im inaktiven Zustand bindet die SH2-Domäne an Phosphotyrosin 527 im C-Terminus, sowie der Linker zwischen SH2- und Kinase-Domäne mit einer Art PxxP-Motiv mit drei Prolinen an die SH3-Domäne (Brown and Cooper, 1996; Cohen et al., 1995). Durch die Dephosphorylierung von Tyr527 kommt es zu Konformationsänderungen, so dass ein Interaktionspartner mit PxxP-Helix und Phosphotyrosin an die SH3-Domäne der Src-Kinase bindet und damit die aktivierte Konformation stabilisiert. Tyr416 wird außerdem phosphoryliert und die Kinase damit aktiviert (Roskoski, 2004; Sun et al., 1998).

Diesen Mechanismus nutzt Nef aus, indem es mit seinem eigenen PxxP-Motiv an die SH3-Domäne der Tyrosinkinase bindet und sie damit aktiviert (Moarefi et al., 1997). Nef ist in der Lage mit den Src Kinase Hck und Lyn, schwach mit Fyn, aber nicht mit Lck direkt zu interagieren, was einer sehr spezialisierten PxxP-SH3 Interaktion entspricht (Lee et al., 1995; Lee et al., 1996; Saksela et al., 1995). Während die Hck Tyrosinkinase mit einer Affinität von 250 nM mit Nef interagiert, bindet die der sehr homologen Fyn-Kinase mit etwa 20 μ M. Der Unterschied ist in einer variablen Region innerhalb der RT-Schleife begründet, die sich in der Nähe der Reste befindet die an der Bindung an das PxxP-Motiv beteiligt ist. Dabei reicht die Mutation R96I aus um eine ähnliche Affinität wie die von Hck zu erreichen (...⁹⁴EA**R**TED⁹⁹... zu ...⁹⁴EA**I**TED⁹⁹...) (Lee et al., 1995; Lee et al., 1996). Mit dieser variablen Region aus

sechs Aminosäuren (Hexapeptid) bindet die RT-Schleife der SH3-Domäne in eine hydrophobe Tasche, die von zwei α -Helices gebildet wird (Abbildung 11) (Grzesiek et al., 1996a; Hiipakka et al., 1999; Lee et al., 1996).

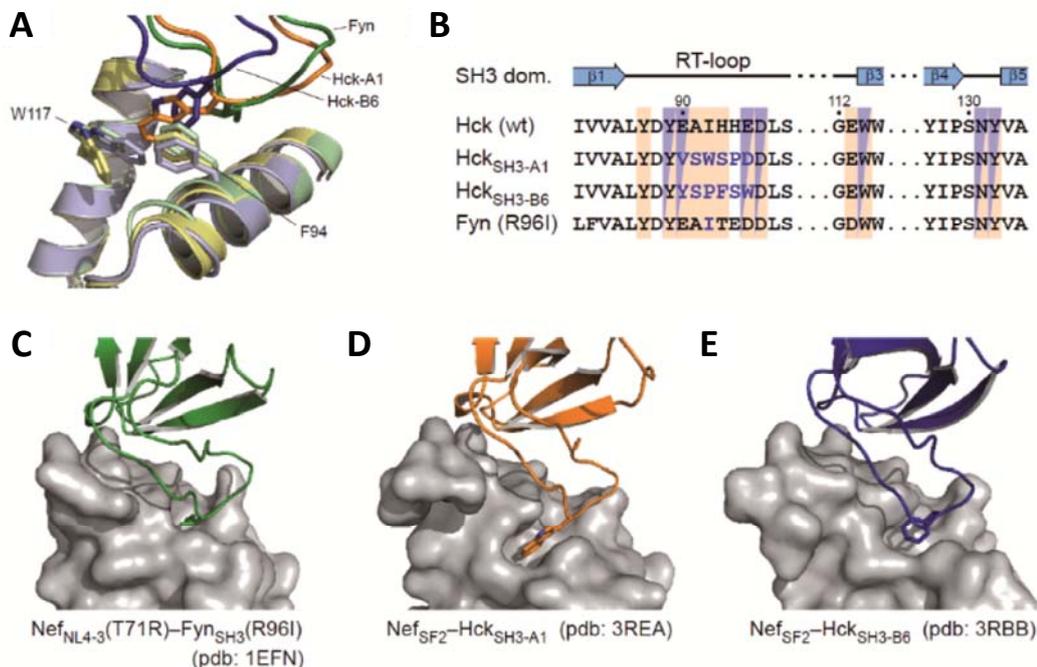


Abbildung 11: Vergleich verschiedener SH3-Domänen und ihre Bindungsspezifitäten für Nef. (A) Überlagerung verschiedener Komplexstrukturen von Nef mit SH3-Domänen von Hck oder Fyn. Die RT-Schleife der SH3-Domänen bindet jeweils mit einem zentral gelegenen hydrophoben Rest in die charakteristische RT-Schleifen Erkennungsdomäne. Die SH3-Domäne des Komplexes aus Nef_{NL4-3} und Fyn_{SH3}(R96l) ist grün, aus Nef_{SF2} und Hck_{SH3-A1} orange und aus Nef_{SF2} und Hck_{SH3-B6} blau dargestellt, während Nef grau angefärbt ist. (B) Sequenzvergleich der SH3-Domänen von Hck und Fyn. Die Reste, die in der Struktur des Nef_{SF2}-Hck_{SH3-B6}-Komplexes (Horenkamp et al., 2011) direkt an der Interaktion beteiligt sind, sind orange hinterlegt sowie die die intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden durch blaue Dreiecke gekennzeichnet. (C) Oberflächendarstellung von Nef_{NL4-3}(T71R) und die als Schleifendiagramm dargestellten Fyn_{SH3}(R96l)-Domäne im Komplex (Lee et al., 1996). (D) Struktur des Komplexes aus Nef_{SF2} mit Hck_{SH3-A1} (Breuer et al., 2011) sowie (E) mit Hck_{SH3-B6} (Horenkamp et al., 2011). Die verschiedenen Orientierungen der aromatischen Ringe von W92 in SH3_{A1} und F93 in SH3_{B6} verdeutlichen die Bandbreite von Konformationen verschiedener Bindungen unterschiedlicher RT-Schleifen sowie deren Spezifität für die Bindetasche der RT-Schleife von Nef.

Durch die Aktivierung dieser Src Tyrosinkinase durch HIV-1 Nef werden im weiteren Verlauf des Signalweges STAT1, 2 und 3 sowie ERK aktiviert, wodurch es zur Erhöhung der Transkriptionsrate, sowie zur Induzierung der Zellproliferation und -differenzierung kommt (Briggs et al., 2001; Hiyoshi et al., 2008; Mangino et al., 2011). Möglicherweise ist die Aktivierung dieser Signalwege auch der Grund für die Nef-vermittelte Erhöhung der Interleukin-6 (IL-6) und TNF- α Produktion, die für HIV-1 wichtig ist. Durch das Ausschütten von TNF- α und IL-6 werden weitere T-Zellen aktiviert, wodurch diese dann als weitere Wirtszelle bereitstehen und damit bereits latent infizierte Zellen aktivieren können (Abbildung 12) (Quaranta et al., 2011). In der folgenden Abbildung 12 sind die in Abschnitte 2.6.1 bis 2.6.6 beschriebenen zellulären Veränderungen durch Nef schematisch gezeigt, die sich in die Nef-vermittelte Endozytose von Rezeptoren und in den Eingriff in Signaltransduktionswege zusammenfassen lassen.

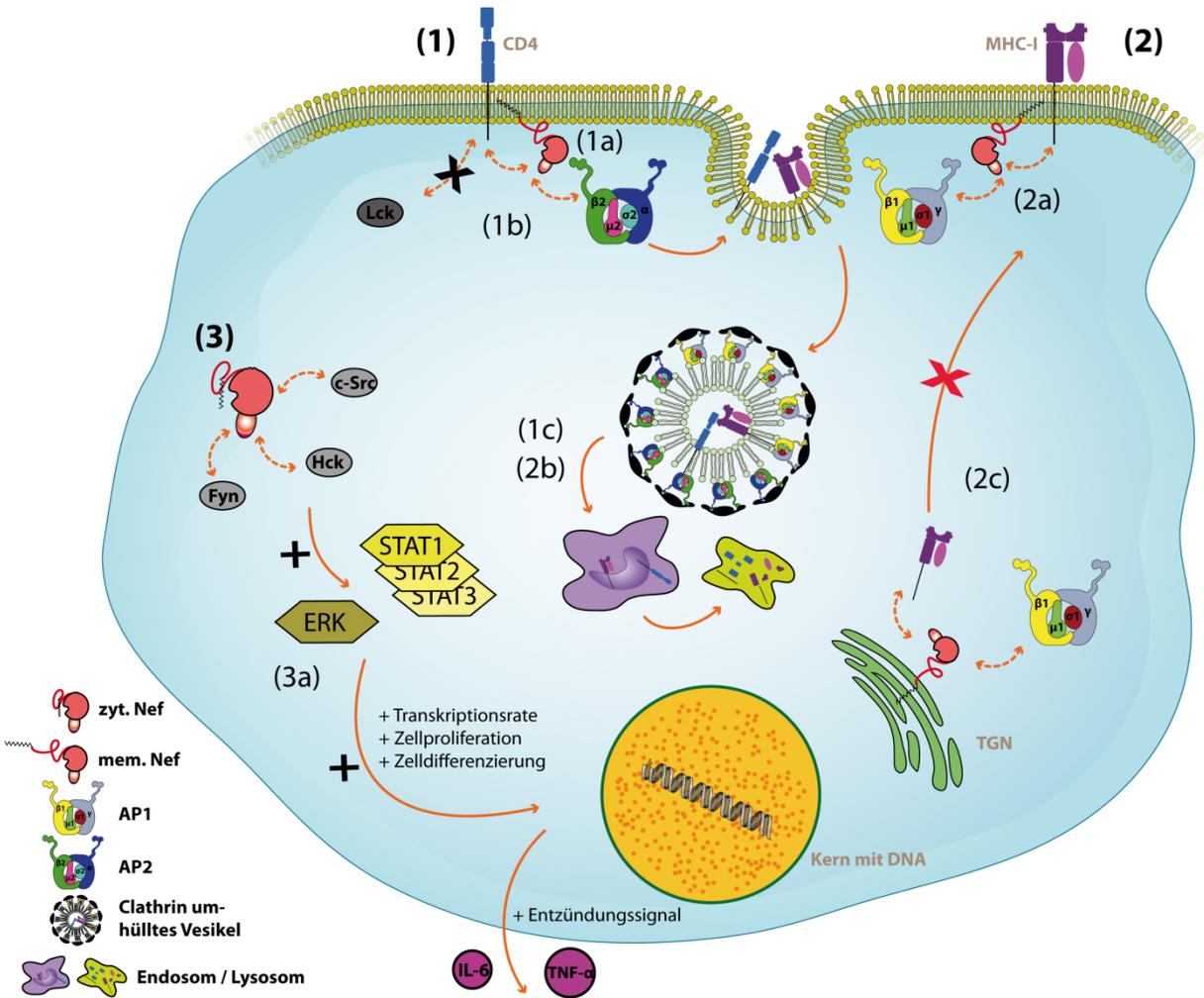


Abbildung 12: Schema der Funktionen von HIV-Nef. Die Funktionen von Nef können im Prinzip in zwei Hauptkategorien eingeteilt werden: In die Nef-vermittelte Endozytose von Rezeptoren **(1 und 2)** und in den Eingriff in Signaltransduktionswege **(3)**. **(1 und 2)** HIV-1 Nef induziert die Internalisierung verschiedener Rezeptoren von der Oberfläche der T-Zelle wie CD4 und MHC-I. **(1b)** Im Fall von CD4 bindet Nef mittels Myristinanker an die Plasmamembran, rekrutiert AP2 und unterbindet die internalisierungshemmende Interaktion zwischen CD4 und Lck. Die Endozytose von MHC-I findet durch einen anderen Mechanismus als bei CD4 statt, bei dem AP1 rekrutiert wird. **(1c und 2b)** Durch die Nef-vermittelte Bindung zwischen Rezeptor und Adaptorprotein, das wiederum an Clathrin bindet, kommt es zur Bildung von Clathrin umhüllte Vesikeln. Dadurch folgen die Endozytose von CD4 und MHC-I, dessen Transport in Endosomen und der anschließende lysosomale Abbau. **(2c)** Im Fall von MHC-I ist Nef auch in der Lage schon am TGN mit AP1 und frühen Formen von MHC-I zu interagieren, was die Inhibition des Transports von MHC-I zur Plasmamembran zur Folge hat. **(3a)** Für den Eingriff in Signaltransduktionswege der Wirtszelle interagiert Nef unter anderem mit den Tyrosinkinase Hck, Fyn und c-Src, wodurch diese aktiviert werden. In den folgenden Signalwegen werden verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert, die zum einen die Transkriptionsrate erhöhen, was zu Zellproliferations- und -differenzierungsreaktionen führt. Außerdem werden durch Nef vermehrt Cytokine wie Interleukin-6 und TNF- α gebildet. Das hat zur Folge, dass bereits latent-infizierte und weitere nicht infizierte T-Zellen aktiviert werden, die anschließend als weitere Wirtszellen für HIV bereit stehen. (zyt. Nef: zytosolisches Nef; mem. Nef: membrangebundenes Nef).

2.7 HIV-Inhibitoren: Nef als Zielprotein

Im Folgenden werden zunächst verschiedene Klassen bereits entwickelter Inhibitoren gegen HIV-1 und Nef beschrieben, um im weiteren Verlauf die im Zuge dieser Arbeit charakterisierten kleinen und großen molekularen Inhibitoren einzuführen. Wie in den Kapiteln zuvor beschrieben, ist Nef ein wichtiger Pathogenitätsfaktor, der Einfluss auf die Endozytose von CD4, CD3 und MHC-I sowie auf die Aktivierung von verschiedenen Tyrosinkinasen und damit auf essenzielle Signaltransduktionswege nimmt. Daher stellt neben den im nächsten Abschnitt beschriebenen existierenden Inhibitoren gegen verschiedene HIV-1 Proteine auch Nef ein mögliches Ziel für Inhibitoren dar, um die Virusreplikation zu inhibieren.

2.7.1 Bereits existierende HIV-1 Inhibitoren

Innerhalb des Replikationszyklus von HIV kommen prinzipiell sämtliche beteiligten Proteine als Ziel für Inhibitoren in Frage. Zum einen wäre das eine große Anzahl zellulärer Proteine, denn in einem HIV-genomweiten siRNA Screen konnten 311 Proteine identifiziert werden die wichtig für den Replikationszyklus von HIV-1 sind (Zhou et al., 2008). Andererseits sind das auch alle Proteine vom HI-Virus, wobei je nach Art des Zielproteins in beiden Fällen ein hohes Risiko von Nebenwirkungen besteht. Der Schlüssel liegt deshalb darin Proteine zu inhibieren, die essenziell für die Replikation des Virus sind, aber nicht für das Überleben und den Stoffwechsel der Zelle (Garg and Gupta, 1997).

Bei Betrachtung des Replikationszyklus kommen die Bindung an die Plasmamembran, die Membranfusion, die Virusfreisetzung, die Reverse Transkription, die Integration des Provirus oder die Proteaseaktivität (Virusreifung) als geeignete Inhibitionsstellen in Frage. Die meisten etablierten Inhibitoren richten sich gegen die Reverse Transkription mittels nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) oder nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Hemmer (NNRTI) und gegen die Protease via Proteasehemmer (PI).

Als einer der ersten Inhibitoren wurden die NRTI Anfang der 80er Jahre entwickelt und als wirksam gegen HIV getestet, zu denen auch Azidothymidin (AZT) zählt (Mitsuya and Broder, 1986; Mitsuya et al., 1985). Aufgrund schnell auftretender Resistenzen gegen einzelne Inhibitoren wegen der hohen Mutationsrate von HIV wird heutzutage die HAART (Hochaktive antiretrovirale Therapie) bei Patienten angewendet, in der üblicherweise eine Kombination aus zwei NRTI und einem NNRTI oder PI verabreicht werden (Hammer et al., 1996; Saravolatz et al., 1996).

Obwohl die Kombination sicherlich das Entstehen von HIV-Resistenzen erschwert, werden weltweit etwa in jedem zehnten HIV-Langzeiterkrankten mit HAART-Medikation mindestens eine Resistenz gegen eines der verabreichten Inhibitoren festgestellt. Daher häufen sich HIV-1 Neuinfektionen mit bereits resistenten Stämmen, so dass die initiale antiretrovirale Therapie immer häufiger fehlschlägt und auf alternative Medikamente zurückgegriffen werden muss (Hamers et al., 2013; Little et al., 2002; Manosuthi et al., 2013; Novak et al., 2005). Aus diesem Grund ist es sehr wichtig den Fokus auch auf andere Proteine zu setzen und als Zielproteine für Inhibitoren in Betracht zu ziehen.

2.7.2 Allgemeine Funktionsweisen und Eigenschaften von Inhibitoren

Im Prinzip gibt es verschiedene Gruppen von Inhibitoren, die unterschiedliche Funktionen ausüben. Zum einen kann ein Inhibitor in ein aktives Zentrum eines Proteins binden und damit beispielsweise bei einer Kinase die ATP-Bindestelle blockieren (Zhang et al., 2010). Andererseits können auch andere Proteine aktiviert werden, die beispielsweise bei Krebs fehlreguliert sind. Andere Inhibitoren hingegen stören Protein-Protein Interaktionen (PPI), indem die Bindung zwischen Interaktionspartnern verhindert wird. Hierbei muss ein Inhibitor verschiedene Bindungsenergien wie van der Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Anziehungen oder Kation- π -Wechselwirkungen unterbinden (Dougherty, 2012; Lo Conte et al., 1999).

PPI Interaktionsflächen sind dabei typischerweise mit 600 bis 1300 Å² sehr groß, so dass sich oft die Frage stellt welcher Bereich für die Bindung eines Inhibitors am geeignetsten erscheint (Clackson and Wells, 1995; Valkov et al., 2012). Hierbei ist es hilfreich, dass oft nur einige wenige Aminosäuren, sogenannte "hotspots", den Hauptteil der Interaktion und somit trotz großer Interaktionsfläche einzelne Reste den Großteil der freien Bindungsenergie der Interaktion ausmachen (Clackson and Wells, 1995; Wells, 1991). Diese "hotspots" sind meist reich an Tryptophanen, Tyrosinen und Argininen und sind umgeben von energetisch weniger wichtigen Resten, die meist dazu dienen die Reste im Zentrum vom Lösungsmittel zu schützen. Möglicherweise sind dabei 600 Å² die Mindestgröße einer Interaktionsfläche, um einen hotspot wasserdicht abzuschirmen. Das Abschirmen vom Lösungsmittel wird bei kleinen Molekülen dadurch erreicht, dass es in eine tiefe Tasche auf der Proteinoberfläche bindet. Besonders wichtig sind hydrophobe Interaktionen in PPIs, so dass die Abschirmung den Angriff von Wasser und damit eine Dissoziation des Komplexes verhindert wird (Bogan and Thorn, 1998; Tsai et al., 1997).

Ein weiteres Problem ist, dass Proteine dynamische Moleküle sind und man wenig über ihre Adaptivität weiß. Denn zur Untersuchung von Proteinoberflächen stehen meistens nur Kristallstrukturen zur Verfügung und damit nur ein Schnappschuss einer gerade eingenommenen Proteinkonformation (Thanos et al., 2003). In ersten Versuchen von sequenzbasierten Vorhersagen von "hotspots" auf Proteinoberflächen, konnte am Beispiel von Nef computerbasiert einige vorhergesagt werden, die gut mit experimentellen Ergebnissen übereinstimmten (Sarmady et al., 2011).

2.7.3 Nef als Ziel für kleine molekulare Inhibitoren

Bisher gibt es keine Inhibitoren gegen Nef, deren Einsatz über die Grundlagenforschung hinausgeht. In Hinblick auf kleine molekulare Inhibitoren mit Nef als Zielprotein, gibt es erst seit kurzem ein paar erste Ansätze. Zum einen wurde ein Guanidin Alkaloid analoger Inhibitor mittels Phagen-Display gefunden, der die Interaktion mit p53, Aktin, and Lck inhibiert. Diese synthetischen Analoga von Batzellidin und Crambescidin inhibieren die Nef-Liganden Interaktion mit IC₅₀-Werten in einem niedrigen mikromolaren Bereich. Zwar sind diese initialen Substanzen *in vitro* effektiv, doch *in vivo* in Zellassays zu toxisch, so dass sie nur als Leitstruktur für eine Weiterentwicklung dienen können (Olszewski et al., 2004).

In einer anderen Studie konnten mit einer chemischen Substanz mehrere Nef-vermittelte Funktionen inhibiert werden. Das Diphenylfuroopyrimidin 2c ist ein Derivat der Leitstruktur UCS15A, das PxxP-abhängige Bindung von Sam68 mit Src Kinasen verhindert (Oneyama et al., 2003). Zum einen wurde gezeigt, dass 2c in Co-Immunpräzipitationsstudien

die Interaktion und damit die Aktivierung der Src Kinase Hck inhibiert, zum anderen konnte die direkte Interaktion von 2c und Nef mittels NMR-Spektroskopie gezeigt werden, was womöglich zu Konformationänderungen der PxxP-Helix von Nef führt. Außerdem konnte mit 2c teilweise die Runterregulierung von MHC-I (HLA-A2) inhibiert werden, wobei 2c aber keinen Einfluss auf die Endozytose von CD4 hat (Dikeakos et al., 2010).

In einer weiteren Studie wurde in Replikationsversuchen mit 2c ein inhibitorischer Effekt auf die Nef-vermittelte HIV-1 Infektiosität beobachtet, ohne dass es zu toxischen oder zytopathischen Effekten kam. Zudem bestätigten kompetitive *pull-down*-Versuche, dass 2c mit der Hck Bindung an Nef kompetiert (Chutiwitoonchai et al., 2011).

Eine andere chemische Substanz namens DLC27 (*D1-like compound 27*) ist ein Derivat der Leitstruktur D1, das die Nef-Hck_{SH3}-Interaktion um bis zu 75% inhibieren kann. Außerdem wurde die Bindung direkt durch NMR-Experimente gezeigt. D1 wurde zunächst mittels virtuellen Screening gefunden und anschließend durch Hochdurchsatzmethoden zu mehreren Derivaten wie DLC27 weiterentwickelt. Auch andere Derivate zeigten antivirale Aktivität, so dass die Stoffgruppe als Inhibitor weiter untersucht werden könnte (Betzi et al., 2007). Es gibt demnach schon Leitstrukturen, die zur Weiterentwicklung geeignet wären, die unter anderem die MHC-Regulation und die Hck-Aktivierung inhibieren, aber Substanzen zur Inhibition der für HIV essenziellen CD4-Runterregulierung gibt es bisher keine.

Die niedermolekulare chemische Verbindungen D1 diene als Leitstruktur zur Entwicklung von ES000219, das in dieser Arbeit in Bindungsstudien mit Nef eingesetzt wird.

2.7.4 Nef als Ziel für große molekulare Inhibitoren

Anders als kleine molekulare Inhibitoren, ist der Einsatz von größeren Inhibitoren gegen Nef schon allein aufgrund ihrer Masse schwieriger. Denn umso größer, geladener und polarer diese Moleküle sind, desto geringer ist ihre Fähigkeit Zellmembranen zu überwinden. Da die Inhibition von Nef intrazellulär gewährleistet sein muss, könnten hierbei gentherapeutische Methoden zum Einsatz kommen. Hierbei gibt es zum einen die Möglichkeit mittels retroviraler Vektoren Protein-kodierende Gene in die infizierte Zelle zu bringen oder die Expression bestimmter HIV-Gene durch *anti-sense*-Ansätze zu inhibieren (Morgan et al., 1994). Das Letzteres gegen Nef funktioniert konnten Studien zeigen, in der shRNA gegen die U3 überlappende Region von HIV-1 *nef* mittels eines lentiviralen Vektors exprimiert wurde, der teilende und nichtteilende Zellen transduziert. Diese RNA-Interferenz (RNAi) verhindert die Expression von Nef und unterdrückt damit die HIV-1 Replikation in Makrophagen sowie die Nef-vermittelte Chemokinproduktion. Ein Nebeneffekt durch den Einsatz von *nef* shRNA ist die Inhibition der reversen Transkription, weil die U3 Region hierbei eine wichtige Rolle spielt (Yamamoto et al., 2006).

Im Falle proteinbasierender lentiviraler anti-HIV Gentherapie gibt es die Möglichkeit der Expression transdominanter Proteine (TNPs), Einzelketten Antikörpern (Intrabodies), toxischer Proteine, Domänen viraler Interaktionspartner oder Einzeldomänen-Antikörpern (Nanobodies oder sdAb) zur Inhibition des Replikationszykluses.

TNPs sind Genprodukte regulatorischer oder struktureller Proteine mit dominant negativer Mutationen, so dass deren Funktion gegenüber dem Wildtyp Protein inhibiert ist (Herskowitz, 1987).

Einzelketten Antikörper oder auch scFv (*single chain variable fragment*) bestehen aus den variablen Regionen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) eines monoklonalen Antikörper, die durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind und können intrazellulär exprimiert ebenfalls virale Proteine inhibieren (Bird et al., 1988; Duan et al., 1994; Marasco et al., 1993). Im Falle toxischer Proteine, werden Gene, die unter Kontrolle HIV regulatorischer Elemente wie Tat für zytotoxische Genprodukte kodieren, in die Zelle eingebracht, so dass die Zelle früh nach der Virusinfektion stirbt (Harrison et al., 1992). Bei der intrazellulären Expression von Domänen viraler Interaktionspartnern, kompetiert das Genprodukt mit dem natürlichen Partner um die Bindestellen des viralen Proteins, so dass dessen Funktion gestört wird (Morgan et al., 1990). Als Einzeldomänen-Antikörper wird die variable Antigen-erkennende Domäne eines Schwere-Ketten-Antikörper genannt, der ähnlich wie scFv intrazellulär eingesetzt werden kann.

In dieser Arbeit wird ein Einzeldomänen-Antikörper biochemisch und strukturell untersucht, der u.a. die Nef-vermittelte Endozytose von CD4 und die Erhöhung der Virusinfektiosität inhibieren kann. Das Prinzip und der Ursprung von scFv- und Einzeldomänen-Antikörpern wird im Folgenden näher erläutert.

2.7.4.1 scFv- und Einzeldomänen-Antikörper als Inhibitoren gegen Nef

Antikörper bestehen typischerweise aus vier Polypeptidketten, die sich aus zwei leichten (MW: 22-23 kDa) und zwei schweren Ketten (MW: 50-55 kDa) zusammensetzen, die mittels inter- und intramolekularen Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Abbildung 13) (Porter, 1973). In der dreidimensionalen Struktur besteht jede Kette aus mehreren β -Faltblättern, die in einer typischen β -Fass Form mit jeweils drei hypervariablen Regionen am Ende der schweren und leichten Kette angeordnet sind (Schiffer et al., 1973). Diese Antigen-erkennenden variablen Regionen befinden sich am N-Terminus beider Ketten und werden durch die Interaktion der variablen leichten (V_L) und variablen schweren Kette (V_H) geformt. Die jeweiligen drei Antigenbindungsstellen werden auch *complementarity determining regions* (CDRs) 1, 2 und 3 genannt. Das Fc-Fragment bildet die Basis eines IgG-Antikörpers, das zweimal aus den identischen schweren Domänen C_{H3} und C_{H2} gebildet werden. Darauf folgt N-terminal eine *hinge*-Region, mit der C_{H2} und C_{H1} miteinander verknüpft sind. C_{H1} zusammen mit V_H binden über Disulfidbrücken an die leichten Domänen C_L und V_L , die alle zusammen die Fab-Domäne bildet (Abbildung 14) (Davies and Metzger, 1983; Harris et al., 1992).

Aufgrund der unvorteilhaften Größe, den biochemischen Eigenschaften und dem daraus resultierenden Problem diese nicht in einfachen bakteriellen Expressionssystemen herstellen zu können, entwickelte sich die Idee Einzelketten Antigen-bindende Proteine (scFv) zu nutzen. Diese werden aus den einzelnen Polypeptidketten der V_L - und V_H -Sequenzen synthetisiert, wobei der Carboxyl-Terminus von V_L mittels eines generierten Peptids mit dem Amino-Terminus der V_H verbunden wird (Abbildung 13). Beide Ketten werden somit in äquimolaren Konzentrationen exprimiert und dessen Assoziation und Faltung durch die kovalenten Bindungen zwischen V_L und V_H begünstigt. Strukturell sind die einzelnen variablen Domänen, trotz ihrer variablen Bereiche, sehr charakteristisch in sehr eng gepackte β -Faltblättern gefaltet (Bird et al., 1988; De Preval and Fougereau, 1976; Huston et al., 1988).

Dank dieser scFv, auch Intrabodies genannt, und der zellulären Interaktion mit Proteinen, konnten nicht nur viele Funktionen neuentdeckter Proteine entschlüsselt werden (Auf der Maur et al., 2001; Auf der Maur et al., 2004; Auf der Maur et al., 2002), sondern es ergaben sich auch neue Möglichkeiten in der gentherapeutischen Anwendung. Letzteres wurde unter anderem für so gut wie alle viralen Proteine von HIV durchgeführt, darunter mit strukturellen Proteinen (Matrix, Nukleokapsid, Hülle), mit Enzymen (Integrase, Reverse Transkriptase) und regulatorischen Proteinen (Tat, Rev, Nef) (Duan et al., 1994; Rondon and Marasco, 1997).

Auch wenn gezeigt wurde, dass scFv-Antikörper zur Inhibition gut einsetzbar sind, kommt es aufgrund des reduzierenden intrazellulären Milieus oft zu Faltungsproblemen, geringen Löslichkeiten und einer starken Tendenz zur Aggregation, was mit einer ineffizienten zytoplasmatischen Expression einhergeht (Cattaneo and Biocca, 1999). Intrazellulär exprimierte scFv können die intramolekularen Disulfidbrücken zwischen ihren Domänen nicht ausbilden (Biocca et al., 1995), was zwar einigen Antikörpern funktionell nichts ausmacht (Proba et al., 1998), wodurch es aber trotzdem unvorhersehbar wird ob geplante scFv funktionsfähig sind oder nicht.

Eine Alternative bieten die sogenannten Einzeldomänen-Antikörper (sdAbs). Studien an Blut von Kamelen (*Camelus dromedarius*) haben Ende der 80er Jahre überraschend gezeigt, dass sich in ihrem Blut neben den gewöhnlichen IgG-Antikörpern auch sogenannte Schwere-Ketten-Antikörper befinden (Ungur-Waron et al., 1987). Bis jetzt wurden diese in verschiedenen Arten der Familie der Camelidae (Lama, Dromeda und Kamele), aber auch im atlantischen Ammenhai gefunden (Greenberg et al., 1995; Roux et al., 1998).

Diesen Antikörpern fehlen die C_H1 Ketten und alle leichte Ketten, so dass sie ausschließlich aus den schweren Ketten C_H3 , C_H2 und V_H bestehen und somit anstatt eines Molekulargewichts von etwa 160 kDa nur eines von etwa 95 kDa besitzen (Abbildung 13). Die Antigenerkennung findet nicht mehr zusammen durch die hypervariablen Regionen von V_H und V_L statt, sondern durch V_H alleine, wobei zur Unterscheidung diese V_H -Domäne V_{HH} oder V_{HH} genannt wird (Hamers-Casterman et al., 1993; Ungur-Waron et al., 1987). Aufgrund der veränderten Antigenerkennung haben die CDRs der V_{HH} charakteristische Besonderheiten, so dass im Gegensatz der humanen CDRs die CDR1 der V_{HH} variabler sind als CDR2 (Vu et al., 1997). Außerdem ist bei einigen V_{HH} -Domänen CDR3 sehr viel länger und wird deshalb durch eine zusätzliche Disulfidbrücke stabilisiert (Muyldermans et al., 1994). Ansonsten sind sich V_H der IgG und V_{HH} der Schwere-Ketten-Antikörper sehr ähnlich. Sie besitzen beide die typische β -Fass Form bzw. Immunglobulin-Faltung im Kern und die drei CDRs, so dass sie eine Sequenzhomologie von mehr als 80% aufweisen (Muyldermans et al., 2001).

Durch die Eigenschaften der V_{HH} -Domänen ist es möglich Antigen-bindende Proteine herzustellen, die im Gegensatz zu scFv nur aus einer einzigen Domäne bestehen. Diese lassen sich leichter in Bakterien herstellen und weisen eine hohe Antigen-Affinität im nanomolaren Bereich und eine hohe Stabilität auf. Prinzipiell ist es biotechnologisch möglich, Sequenzen von V_H -Domänen gewöhnlicher IgG-Antikörper zu amplifizieren und somit künstliche Einzeldomänen-Antikörper nach Vorbild der Schwere-Ketten-Antikörper der Kamele herzustellen (Arbabi Ghahroudi et al., 1997). Doch wird die natürliche Antigenerkennung kombinatorisch aus V_H und V_L vermittelt, so dass V_H allein eine verringerte Antigen Affinität aufweist. Außerdem wird eine große, hydrophobe Bindungsfläche, die sonst intramolekular mit V_L interagiert, frei zugänglich für die wässrige Umgebung, wodurch dessen Handhabung erschwert wird (Davies and Riechmann, 1995;

Ward et al., 1989). Es gibt Beispiele in denen dieses "kamelisieren" der V_H -Domäne zu einer V_{HH} -Domäne funktioniert hat. In einem Fall wurden die biochemischen Eigenschaften der Oberfläche der V_H -Domäne eines scFv so verändert, dass es weiterhin an das Protein Vif aus HIV binden und dieses inhibieren kann und trotzdem löslich und stabil war (Silva et al., 2004). Dies ist aber im Ganzen sehr zeitaufwendig, sowie das Erhalten eines stabilen Antigen-bindenden sdAb nicht voraussagbar.

Alternativ besteht die Möglichkeit zur Produktion spezifischer Schwere-Ketten-Antikörper direkt Dromedare zu immunisieren und diese zu isolieren, anstatt den Umweg über die Immunisierung von Hasen zu gehen. Zur Antigen-spezifischen Selektion der Antikörper kann die Phagen-Display-Methode eingesetzt werden. Hierbei wird ein Repertoire von Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von filamentösen Bakteriophagen exprimiert, wobei jede einzelne ein anderes Fragment enthält. Daraufhin folgt die Selektion durch die Bindung der Phagen an ein immobilisiertes Antigen (Winter et al., 1994). Mit dieser Technologie wurden Antigen-spezifische V_{HH} bzw Einzeldomänen-Antikörper von Schwere-Ketten-Antikörpern direkt aus Dromedare selektiert und isoliert. Diese Methode hat den Vorteil, dass das Immunsystem des Dromedas direkt hochaffine Binder gegen das Antigen herstellt, die anschließend nicht weiter optimiert werden müssen. Um ein vollständiges Phagen Repertoire zu Erhalten muss außerdem nur ein kleines für die V_{HH} -Domäne kodierendes Gen kloniert und dabei nur ein einzelnes Paar Primer verwendet werden (Muyldermans and Lauwereys, 1999).

Genau diese Methode wurde von den Arbeitsgruppen von Dr. Serge Benichou (Institut Cochin, Paris) und von Dr. Daniel Baty (Inserm U624, Marseille) durchgeführt, um einen Nef spezifischen Einzeldomänen-Antikörper zu erhalten. Hierfür wurde ein Lama innerhalb von drei Wochen 4x mit rekombinant exprimiertem Nef_{NL4-3} (AS: 57-205) immunisiert, 15 Tage danach Blutproben entnommen und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert. Mittels der Phagen-Display-Methode und dem ELISA mit immobilisiertem Nef, konnte eine V_{HH} -Domäne namens sdAb19 mit einer hohen Affinität zu Nef isoliert werden (Bouchet et al., 2011).

Der Einzeldomänen-Antikörper sdAb19 lässt sich *in vivo* mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie zusammen mit Nef co-lokalisieren und inhibiert dieses in vielerlei Hinsicht. Zum einen verhindert sdAb19 die Nef-vermittelte Endozytose von CD4 mehrerer Nef Allele, zum anderen die Nef-Pak2 Assoziation und damit die Pak2 Aktivität der Reorganisation des Zytoskeletts sowie die Nef-vermittelte Erhöhung der Virusinfektiosität und -replikation. Interessanterweise inhibiert sdAb19 nicht die MHC-I-Runterregulierung durch Nef, so dass dies wiederum ein Hinweis auf einen anderen Mechanismus ist als der der Nef-vermittelte Endozytose von CD4. (Bouchet et al., 2011).

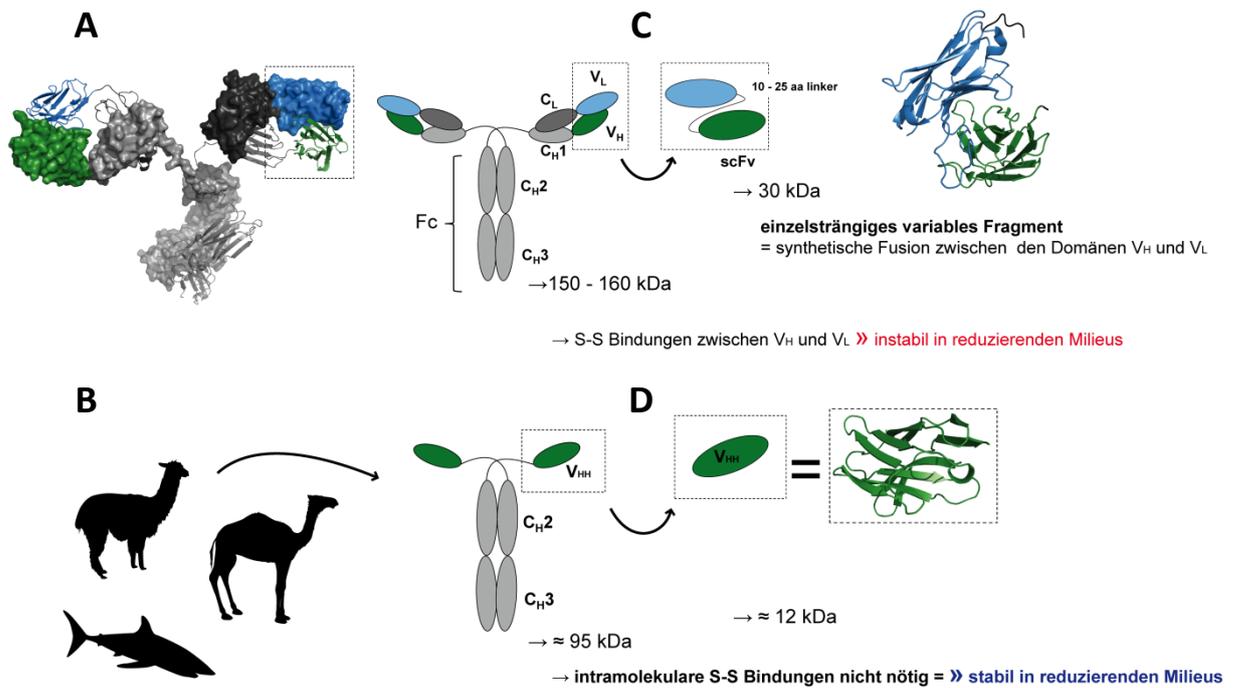


Abbildung 13: Schema zur Synthese von IgG-Antikörper-abgeleiteten scFv, sowie von Schwere-Ketten-Antikörper-abgeleiteten Einzeldomänen-Antikörper (V_{HH}). (A) Während monoklonale Antikörper aus zwei identischen schweren (C_H3, C_H2, C_H1 und V_H) und leichten Ketten (C_L und V_L) bestehen, haben (B) Schwere-Ketten-Antikörper aus u.a. Kamelen, Lamas und Ammenhaien ausschließlich schwere Ketten, wobei ihnen außerdem die C_H1-Domäne fehlt (Clark and Walsh, 2009). (C) Die molekularbiologisch hergestellten scFv bestehen aus den Antigen-erkennenden variablen Domänen V_H und V_L, die mittels kurzem flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Dadurch sind diese Moleküle zwar kleiner (30 kDa) als der Antikörper von dem sie abstammen (150-160 kDa), benötigt aber weiterhin intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Domänen, wodurch sie in zellulären, reduzierenden Milieus instabil sind. (D) Die Einzeldomänen-Antikörper (V_{HH}) sind mit 12 kDa deutlich kleiner und benötigen keine intramolekularen Disulfidbrücken, da sie ausschließlich aus der Antigen-erkennenden V_{HH}-Domäne bestehen (Clark and Walsh, 2009; Harris et al., 1997).

2.7.4.2 Verwendung von verknüpften Proteindomänen als Nef-Inhibitoren

Im Gegensatz zur Verwendung kompletter Proteine für die Inhibition von Nef, besteht auch die Möglichkeit bekannte Domänen von Liganden zu verwenden um Nef entsprechend zu inhibieren. Zu den am besten untersuchtesten Bindungsmotiven auf Nef gehört die RT-Schleifen-Erkennungsdomäne, in der die RT-Schleife von SH3-Domänen bindet (Lee et al., 1995). Um SH3-Domänen zu generieren die eine höhere Affinität zu Nef aufweisen, wurden willkürlich verschiedenste Derivate des Hexapeptids (RRT-SH3) mittels Phagen-Display selektiert. Hierbei wurden 15 Hck SH3-Derivate gefunden die besser an Nef binden und sogar drei, RRT.A1 (VSWSPD), RRT.B6 (YSPFSW) und RRT.C1 (TSPFPW), die eine zwischen 31 und 37-fach höhere Affinität im Vergleich zum Hck Wildtyp aufwiesen (Hiipakka et al., 2001; Hiipakka et al., 1999). Diese veränderte Hck RT-Schleife wäre ein Ansatzpunkt zur Herstellung von Inhibitoren, indem sie die Bindung von Nef an dem Hck Wildtyp unterbinden und somit die Aktivierung von Pak2 und die Induzierung der Produktion des Transkriptionsfaktors NFAT verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass die meisten endogenen Proteine, die an den Hck Wildtyp binden, wegen ihrer hohen Spezifität zum Hexapeptid in der RT-Schleife nicht oder nur noch sehr schwach mit den RRT-SH3-Domänen interagieren (Hiipakka et al., 2001).

Daraus resultierte die Idee des sogenannten *“wrapping Nef“*, in dem weitere Nef-Bindungsdomänen und dessen bekannte Liganden identifiziert werden um diese kombinatorisch zu verknüpfen und Nef zu inhibieren. Es gibt dabei die Möglichkeit der Inhibition der SH3-Domänen Interaktion (PxxP-Motiv und RT-Schleifen Erkennungsdomäne), verschiedener Protein Transportprozesse (Dileucinmotiv), der CD4-Bindung (CD4 Sortierungsmotiv-Erkennungsdomäne) und die für Nef essenzielle Membranbindung (Myristylierungsmotiv). Für die Bindung an das PxxP-Motiv wurden SH3-Domänen, für das Dileucinmotiv β 2-Adaptin von AP2 bzw. die VHS-Domäne und für die Sortierungsmotiv-Bindetasche die Erkennungssequenz von CD4 verwendet. In verschiedenen Kombinationen wurden diese Domänen mit flexiblen Linkern verknüpft und zur Membranlokalisation myristoyliert oder prenyliert (Breuer et al., 2011).

Durch diese Methode lassen sich zum einen mehrere Funktionen von Nef gleichzeitig inhibieren, was Resistenzbildungen erschwert sowie die Affinität und Spezifität zum Zielprotein durch die Kombination erhöht. Es wurden auf diese Weise drei etwa 10 kDa große Inhibitoren hergestellt, in denen eine SH3-Domäne (RRT.A1) und die zytosolische Domäne von CD4 (422-458) mit einem kurzen Linker verknüpft wurden. Diese wiesen eine erhöhte Affinität zu Nef auf und inhibierten zum einen die CD4-Runterregulierung von Nef sowie die Erhöhung der Infektiosität von Virionen (Breuer et al., 2011). Aufgrund ihres modularen Aufbaus haben diese mit einem Linker verbundenen Domänen Ähnlichkeit mit den bereits erwähnten scFv.

Diese Methode des *“wrapping Nef“* (Breuer et al., 2011) wird im Laufe dieser Arbeit benutzt, um sdAb19 und die SH3-Domäne RRT.B6 (SH3_{B6}) kombinatorisch zu verwenden. Hierzu werden sdAb19 und die SH3_{B6}-Domäne mit einem Linker verknüpft, wodurch der daraus resultierende Inhibitor namens Neffin eine weit höhere Affinität besitzt und im Vergleich zu sdAb19 verbesserte inhibitorische Eigenschaften aufweist (Bouchet et al., 2012; Jarviluoma et al., 2012).

2.8 Zielsetzung

Im Zuge dieser Arbeit diene Nef als Zielprotein für verschiedene Klassen von Inhibitoren, um Ansätze zu schaffen verschiedene Funktionen von Nef inhibieren und damit die effiziente Replikation und Verbreitung von HIV im Organismus unterbinden zu können. Denn das akzessorische HIV-Protein Nef vermittelt Interaktionen innerhalb von Signaltransduktionswegen und der Rezeptorinternalisierungs-Maschinerie, so dass es als wichtiger Pathogenitätsfaktor die virale Replikation und die Virusinfektiosität erhöht und gleichzeitig die Immunreaktion gegenüber der Wirtszelle verhindert.

Im Laufe dieser Arbeit wurde 2011 durch eine Forschungsgruppe in Paris ein Einzeldomänen-Antikörper namens sdAb19 generiert, der in der Lage ist viele Funktionen von Nef wie die Erhöhung der Virusinfektiosität und der Nef-vermittelte Endozytose von CD4 zu inhibieren. Ziel dieser Arbeit war es den Komplex zwischen sdAb19 und HIV-1 Nef biochemisch zu charakterisieren und die Komplexstruktur kristallografisch zu lösen. Denn während die inhibitorischen Fähigkeiten von sdAb19 gegen Nef *in vivo* hinreichend gezeigt wurden, fehlten biochemische und strukturelle Daten zur Charakterisierung des Nef-sdAb19-Komplexes um die Funktionsweise der Inhibition zu verstehen und einen Ansatzpunkt für eine mögliche spezifische und zielgerichtete Wirkstoffentwicklung von kleinen molekularen Inhibitoren zu erhalten.

Desweiteren wurde im Zuge dieser Arbeit in Kooperation mit Serge Benichou (Paris) und Kalle Saksela (Helsinki) ein Fusionsprotein namens Neffin hergestellt, das aus sdAb19 und einer generierten SH3-Domäne (SH3_{B6}) besteht und als Inhibitor gegenüber sdAb19 verbesserte inhibitorische Fähigkeiten besitzt. Dieser sollte ebenfalls biochemisch und strukturell charakterisiert werden, um die verbesserten inhibitorischen Eigenschaften zu erklären, wofür auch die Kristallisation des trimeren Komplexes aus HIV-1 Nef, sdAb19 und SH3_{B6} angestrebt wurde. Letzteres wurde auch mit einem aus dem Gorilla abstammenden HIV-1 Nef des Subtyps P durchgeführt und damit erstmals die Struktur dieses Nef Proteins gelöst.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit sollte im Zuge des europäischen iNEF-Konsortiums ein kleiner molekularer Inhibitor gegen Nef gefunden werden. Hierzu wurde zunächst die Oberfläche von HIV-1 Nef nach geeigneten Bindungsmotiven anhand ihrer Konservierung untersucht. Daraufhin sollten innerhalb des Konsortiums kleine molekulare Inhibitoren mit Massen zwischen 300 und 400 Dalton generiert und in Hochdurchsatz-Methoden auf ihre inhibitorischen Eigenschaften hin getestet werden. Im Zuge dieser Arbeit sollten Substanzen, die als positive Treffer identifiziert wurden, mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie in Titrationsreihen eingesetzt werden um die direkte Bindung auf HIV-1 Nef zu überprüfen. Desweiteren sollte die Verbesserung der Bindungseigenschaften durch die Herstellung von Derivaten und die Charakterisierung der Bindungsfläche angestrebt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

3.1.1 Feinchemikalien

Die in dieser Arbeit benutzten Chemikalien wurden von den folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Baker (Deventer, Niederlande), Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), GE Healthcare (Freiburg), Gerbu (Gaiberg), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Riedel de Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (München).

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Big-Dye Terminator Reaction mix	MPI, Dortmund
Bradford Assay	Biorad, München
Dialysemembranen	Roth, Karlsruhe
Kristallisationsplatten 96fach	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Corning Life Sciences, Lowell, (USA)
Kristallisationsplatten Linbro 24fach	MP Biomedicals, Solon, (USA)
Kristallisationsscreens	Qiagen, Hilden
	Hampton Research, Aliso Viejo (USA)
	Parafilm Roth, Karlsruhe
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Ligationspuffer	New England Biolabs, Ipswich (USA)
NMR Röhrchen	Wilmad-LabGlass, Buena (USA)
PCR-Puffer	Roche, Mannheim
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Restriktionspuffer	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Sequenzierungspuffer	MPI, Dortmund
Ultrafiltrationseinheiten	Millipore Amicon, Witten
Vivacell250 Ultrafiltrationseinheiten	Sartorius stedim, Aubagne (Frankreich)

3.1.3 Molekularbiologische Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

3.1.4 Chromatographiesäulen und -materialien

Säulenmaterial

GSH 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden

Säulen

Gelfiltrationssäule, 10/300 GL Superdex 75	GE Healthcare, Freiburg
Gelfiltrationssäule, 10/300 GL Superdex 200	GE Healthcare, Freiburg
Gelfiltrationssäule, HiLoad 16/60 Superdex 75	GE Healthcare, Freiburg
Gelfiltrationssäule, HiLoad 16/60 Superdex 200	GE Healthcare, Freiburg
VYDAC-C4-Säule für ESI-MS	Grace, Deerfield (USA)

3.1.5 Größenstandards

Gelchromatographiestandard	Biorad, München
LMW-Marker für SDS-PAGE	GE Healthcare, Freiburg
DNA-Größenstandard 1kb	Invitrogen, Karlsruhe

3.2 BakterienstämmeStammGenotyp

TG1	<i>E. coli</i> F' traD36 lac ^q Δ(lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ /supE Δ(hsdM-mcrB)5 (rk-mk ⁺ McrB ⁻) thi Δ(lac-proAB)
B834(DE3)	<i>E. coli</i> F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm met (DE3)
BL21(DE3) R3/Rosetta	<i>E. coli</i> B F' dcm ompT hsdS _B (r _B -m _B ⁻) gal λ(DE3) pRARE (BL21(DE3) Derivat mit zusätzlichem pRARE Plasmid, welches für in <i>E. coli</i> selten vorkommende tRNAs kodiert.)

3.3 Enzyme

T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
DNA Polymerase	Roche, Mannheim
DNase I	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Taq Expand High Fidelity	Roche, Mannheim
TEV Protease	gruppeninterne Herstellung

3.4 Synthetische Peptide

<u>Name</u>	<u>Aminosäuresequenz</u>	<u>Hersteller</u>
CD4 _{LL}	AYQQAERMSQIKRLLS	Biosynthan, Berlin
SNID2xl	AQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG	MPI, Dortmund (Sascha Gentz)
HLA-A2	SDRKGGSYSQAASSDSAQGSVDVSLTACKV	MPI, Dortmund (Sascha Gentz)
HLA-B	RKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDVSLTA	MPI, Dortmund (Sascha Gentz)

- das jeweilige Erkennungsmotiv ist rot markiert

3.5 Nukleinsäuren

Oligonukleotide

Die zur Herstellung der Plasmide verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech und Metabion in München synthetisiert und auf 10 pmol/µl in ddH₂O gelöst.

Expressionsvektoren

pET-12a	Novagen, Darmstadt
pET-23d	Novagen, Darmstadt
pET-28a	Novagen, Darmstadt
pET-30a	Novagen, Darmstadt
pET-Duet	Novagen, Darmstadt
pRSF-Duet	Novagen, Darmstadt
pGEX-4T1, TEV-site modifiziert	GE Healthcare, Freiburg
pProEx-HTa	Invitrogen, Karlsruhe

3.6 Bakterielle Nährmedien

LB-Medium	10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 5 mM NaOH
TB-Medium	12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml/l Glycerin nach Autoklavieren Zugabe von: 100 ml/l 0,72 M KH ₂ PO ₄ , 100 ml/l 0,71 M K ₂ HPO ₄

Minimalmedium zur heteronuklearen Markierung von Proteinen

Pro Liter: 0,5 g NaCl, 1,3 ml *Spurenelementlösung, 1 g Zitronensäuremonohydrat, 36 mg Eisencitrat, 4,02 g KH₂PO₄, 5,96 g K₂HPO₄, 4,1 ml **Zink-EDTA Lösung, 2 ml MgSO₄, 1 g ¹⁵NH₄Cl (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Andover, USA), 25 ml 20% Glukose-Lösung oder 2 bis 3 g ¹³C-Glukose

* Spurenelementlösung: 2,5 g/l Borsäure, 2,0 g/l CoCl₂·6 H₂O, 1,1 g/l CuCl₂·2 H₂O, 9,8 g/l MnCl₂·2 H₂O, 2,9 g/l Na₂MoO₄·2 H₂O

** Zink-EDTA Lösung: 5 mg/ml EDTA, 8,4 mg/ml Zn(Ac)₂

3.7 Antibiotika

Ampicillin	Serva, Heidelberg
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Gerbu, Gaiberg

3.8 Geräte

Agarosegelkammer, DNA-SUB-Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank, Heraeus CO ₂ Auto zero	Heraeus Instruments, Hanau
CD-Spektrometer J-815	Jasco, Gross-Umstadt
Elektroporationsgerät, Gene Pulser	Bio-Rad, München

Elektrospraymassenspektrometer	Finnigan LCQ Advantage MAX Thermo	Fisher Scientific, Corston (UK)
	Agilent 1100 Chromatographiesystem	Agilent Technologies, S.C. (USA)
Elektrophorese System		Bio-Rad, München
ESI-Massenspektrometer Agilent 1100		Hewlett Packard, Texas (USA)
HPLC-Systeme		
	Absorptionsdetektor, Waters 717plus	Waters, Milford (USA)
	Äkta [®] prime plus	GE Healthcare, Freiburg
	Autosampler und Inline Entgaser AF	Waters, Milford (USA)
Konfokales Fluoreszenz-Mikroskop		LEICA (Zeiss, Göttingen)
Kristallisationsroboter Mosquito Crystal TTP		Labtech, Royston (UK)
Microkalorimeter, iTC200		GE Healthcare, Freiburg
Microfluidizer, Modell 100S		Microfluidics Corp., Newton (USA)
Nanodrop DN-1000 UV-Spektrometer		Thermo Scientific, Wilming. (USA)
PCR Express-Gerät		Hybaid, Franklin (USA)
Photometer		Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Rock Imager		Formulatrix, Waltham (USA)
Röntgengenerator, Detektor		Marresearch, Norderstedt
Schüttelinkubator		Multitron, Bottmingen (Schweiz)
SDS Gel system, Mini protean III		Bio-Rad, München
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103H		Bandelin electronic (Berlin)
Ultraschallgerät, Branson Sonifier W-250		Branson, Danbury (USA)
Varian Inova 600 Spektrometer (NMR)		Varian Inc. (USA)
Vortexer Vortex Genie2		Bender & Hobein, Bruchsal
Waters 600 S Controller		Waters, Milford (USA)
Waters 626 Pumpe, Waters 2487		Waters, Milford (USA)
Zentrifuge Avanti TM J-20 XP		Beckman, Fullerton (USA)
Zentrifuge JS-HS centrifuge		Beckman, Fullerton (USA)

3.9 Molekularbiologische Methoden

3.9.1 Polymerasekettenreaktion

In der Molekulargenetik dient die Polymerasekettenreaktion (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) der Amplifikation von DNA mittels der zellulären DNA-Polymerase. Hierbei wird von einem DNA-Einzelstrang und einem zu dem DNA-Strang komplementären DNA-Oligonukleotid (Primer) ausgehend ein DNA-Doppelstrang synthetisiert und dieser Schritt in einer Kettenreaktion mehrfach wiederholt. Durch die Verwendung spezifischer Primer können so ausgewählte Abschnitte der DNA in mehreren Zyklen in den Zellen vermehrt und anschließend extrahiert werden. Ein Zyklus besteht dabei aus drei Schritten. Im ersten wird die zu vermehrende DNA stark erhitzt, so dass DNA-Einzelstränge erzeugt werden (Denaturierung). Im nächsten Schritt wird die Temperatur gesenkt, um die Bindung der komplementären Primer zu ermöglichen (Hybridisierung). Im letzten Schritt wird dann die Temperatur so eingestellt, dass die DNA-Polymerase mittels der im Ansatz befindlichen Nukleotide vom Primer beginnend den DNA-Doppelstrang effizient vervollständigt, der dann wiederum als DNA-Strang für den nächsten Zyklus dient. Üblicherweise wird dieser Zyklus 15-25x wiederholt, um ausreichende Mengen amplifizierter DNA zu erhalten.

PCR Ansatz		PCR-Programm		
Bestandteil	Volumen	Schritt	Temperatur	Zeit
200 ng/µl DNA-Matrize	1 µl	Denaturierung	95°C	120 s
2,5 mM dNTPs	4 µl	Denaturierung Hybridisierung Elongation	95°C	15 s
10 pmol/µl 3'Primer	1 µl		T _m	30 s
10 pmol/µl 5'Primer	1 µl		72°C	45-60 s
5000 U/ml Polymerase	0,5 µl	Finale Elongation	72°C	15-25x
10x Polymerasepuffer	5 µl			420 s
ddH ₂ O	37,5 µl			

mit T_m: 4°C x (Anzahl G+C) + 2°C x (Anzahl A+T) - 5°C

3.9.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode um DNA-Stränge nach ihrer Größe zu trennen und die Größe anhand eines DNA-Markers zu bestimmen oder nach einem Restriktionsverdau die DNA von Enzymen und Nukleotiden zu reinigen. Aufgrund des negativ geladenen Phosphatrückgrates der DNA bewegt sich diese innerhalb des Agarosegels zum positiven Pol des angelegten elektrischen Feldes. In der Gelmatrix bewegen sich größere Moleküle langsamer und kleinere Moleküle schneller, wodurch DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Gelsystemen bei konstanter Spannung von 110 Volt und je nach Größe der zu trennenden DNA in 1-1,5%-igen Agarosegelen. Die aufgetragenen Proben werden dabei mit 6-fachen Probenpuffer versetzt und zur Größenbestimmung der Fragmente zudem ein 1 kb Größenstandard aufgetragen. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid zum Laufpuffer und den Gelen konnten die DNA-Fragmente unter UV-Licht visualisiert und analysiert werden.

10x TBE		6x Probenpuffer	
108 g/l	Tris	10%	Ficoll
55 g/l	Borsäure	0,025%	Bromphenolblau
3,35 g/l	EDTA	0,025%	Xylencyanol
60 µl/l	Ethidiumbromid		
	ad 1L Wasser		in TBE-Puffer

3.9.3 Restriktion von Plasmid-DNA

Mit der Methode des Restriktionsverdaus lässt sich doppelsträngige DNA spezifisch schneiden, indem Restriktionsenzyme als Endonukleasen in meist palindromischen Sequenzen schneiden. Somit kann die DNA an bestimmten Stellen geschnitten, mit anderen Fragmenten ligiert und in mit identischen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektoren eingebracht werden. Der Restriktionsverdau wurde ebenso benutzt, um nach der Klonierung die neugenerierten Plasmide zu kontrollieren, in dem das geschnittene Produkt mittels Agarosegelelektrophorese auf seine Größe hin überprüft wurde. Es wurden die vom Hersteller New England Biolabs angegebenen Pufferbedingungen eingesetzt.

3.9.4 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten nach der Restriktion aus Agarosegelen erfolgte mittels Gelextraktionskits nach den Angaben des Herstellers Qiagen.

3.9.5 Ligation

Nach der Restriktion und Isolierung der spezifisch geschnittenen DNA-Fragmente, werden diese in ebenso geschnittene Vektoren eingebracht. Hierzu wird die DNA-Ligase T4 verwendet, die sowohl glatte als auch überhängende freie 3'-Hydroxyenden mit 5'-Phosphatenden des DNA-Fragments und des geschnittenen Vektors miteinander verknüpft.

Ligations-Ansatz

<u>Bestandteil</u>	<u>Volumen</u>
geschnittener Vektor	1 µl
restringiertes DNA-Fragment	8 µl
10-fach Ligationspuffer	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
ddH ₂ O	5 µl

3.9.6 Transformation und Anzucht von Bakterien

Die Transformation von *E. coli* erfolgte für ein Plasmid typischerweise durch die Hitzeschock-Methode und für zwei Plasmide durch Elektroporation. Die hitzekompetenten oder elektrokompenten TG1 bzw. B834(DE3) und BL21(DE3) R3/Rosetta-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde zu 50-100 µl der Bakteriensuspension entweder 1 µl Mini-Prep DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes hinzugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert.

Hitzeschock

Zur Transformation mittels Hitzeschock wird das Bakterien-DNA-Gemisch bei 42°C für 1 min erhitzt und anschließend wieder 5 min auf Eis runtergekühlt. Dann folgte die Zugabe von etwa 300 µl sterilem LB-Medium und eine etwa 60-minütige Inkubation bei 37°C. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend auf Platten mit LB-Medium und Plasmid-entsprechendem Selektionsantibiotikum gestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Elektroporation

Für das Einbringen von zwei Plasmiden in elektrokompente *E. coli*-Zellen wurden Elektroporationsküvetten auf Eis runtergekühlt und das Bakterien-DNA-Gemisch hineingegeben. Der Elektroschock erfolgte in einem GenePulser mit einem Elektrodenabstand von 2 mm bei einem Puls von 1,5 kV, 25 µF und einer Zeitkonstante von 10 s. Sofort danach wurde die Suspension mit sterilem LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und bei 37°C für etwa eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz wie bei der Hitzeschock-Transformation auf entsprechende LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.9.7 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmiden nach erfolgter Plasmidligation und Transformation in TG1-Zellen wurde das QIAquick Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

3.9.8 Sequenzierung eines DNA-Fragmentes

Zur Überprüfung der Gensequenzen und des Leserahmens aller in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide, wurden diese entsprechend sequenziert. Hierbei wurde die Kettenabbruchmethode verwendet (Sanger et al., 1977). Ein Sequenzierungs-PCR-Ansatz besteht aus der zu untersuchenden DNA, dem Sequenzierungspuffer, einem spezifischen Primer und Terminator Reaction Mix. Nach der PCR wurde die DNA gefällt und hausintern kapillarelektrophoretisch getrennt (MPI Dortmund, Biotechnologie).

<u>Sequenzierungs-PCR Ansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>		
<u>Bestandteil</u>	<u>Volumen</u>	<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
Isolierte DNA	3 µl	Strangtrennung	96°C	10 s
5' bzw. 3' Primer	1 µl	Hybridisierung	52°C (25x)	5 s
Terminator Reaction Mix	4 µl	Elongation	60°C	240 s
10x Sequenzierungspuffer	2 µl			
ddH ₂ O	auf 20 µl			

3.9.9 Herstellung von Glycerindauerkulturen

Nach erfolgreicher Proteinexpression und -aufreinigung wurde von der verwendeten Kultur eine Glycerindauerkultur angesetzt, um bei einer erneuten Proteinexpression den identischen Bakterienklon verwenden zu können. Hierzu wurden 1,2 ml der Zellkultur ($\approx OD_{600} = 0,6$) mit 800 µl einer 50%-igen Glycerin-Lösung steril vermischt. In entsprechenden 2 ml Reaktionsgefäßen mit Schraubverschluss wurden die Ansätze in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zu nächsten Expression gelagert.

3.9.10 Proteinüberexpression in Bakterien

Zur rekombinanten Expression der in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurde zunächst mit einer sterilen Pipettenspitze eine kleine Menge der entsprechenden *E. coli*-Zellen aus den Glycerindauerkulturen in 50-250 ml LB-Medium überführt und über Nacht in einem Erlenmeyerkolben als Vorkultur bei 37°C und 150 rpm im Schüttler mit entsprechendem Selektionsantibiotikum inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde 2-10 L LB-Medium für die Expression der Nef Proteine und TB-Medium für die der AP1- und AP2-Komplexe, sowie für die Inhibitoren sdAb19 und Neffin 1:100 angeimpft und in 5 L Erlenmeyerkolben bei 37°C und 120-150 rpm in einem Schüttler bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 inkubiert. Für die Expression des ¹⁵N-isotopenmarkiertem Nef₁₋₂₁₀ mit C-terminalem Histidinanker, wurde ein spezielles Minimalmedien verwendet (siehe Abschnitt 3.6). Die Kultivierung erfolgte hierbei in Gegenwart der Selektionsantibiotika Ampicillin (100 mg/ml) oder/und Kanamycin (50 mg/ml). Zur Expression von myristoyliertem Nef wurden 20 Minuten vor der Induktion bei einer OD_{600}

von etwa 0,4 pro Liter Kultur 10 ml einer Lösung aus 5 mM Myristinsäure und 600 μ M BSA mit einem pH-Wert von 9,0 zugegeben. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte dann mit 0,2 bis 0,5 mM IPTG (Isopropyl-1-Thio-D-Galactopyranosid), so dass das *lac*-Operon des Plasmids aktiviert wird. Für die Expression der AP1- und AP2-Komplexe sowie die der Inhibitoren sdAb19 und Neffin wurden hingegen zu Beginn der Expression Laktose in einer Endkonzentration von 0,2% zugegeben und die Expression dadurch langsam induziert, weil die Ausbeuten dadurch deutlich größer waren als nach der Verwendung von IPTG. Die Proteinexpression erfolgte grundsätzlich zwischen 22 und 24°C im Schüttler bei 120-150 rpm über Nacht, außer beim myristoylierten Nef, bei dem die Expressionstemperatur 26°C betrug und nur 6 Stunden inkubiert wurde.

3.9.11 Ernte und Zellaufschluss

Nach der Proteinexpression wurden die *E. coli*-Zellen bei 5000 rpm für 15 min zentrifugiert und das Sediment in entsprechendem Lyse-Puffer (je nach Reinigungsprotokoll) resuspendiert. Zur anschließenden Isolierung des exprimierten Proteins wurden die Zellen durch einen Mikrofluidizer mechanisch aufgeschlossen, in dem sie unter Hochdruck (1000 bar) durch eine enge Kammer gepresst werden. In der anschließenden 30 minütigen Zentrifugation bei 30000 g wurden die Zellreste sedimentiert und die zytosolischen Proteine im Überstand erhalten. Aus diesem werden im Folgenden die hergestellten Proteine spezifisch mittels Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt.

3.9.12 Reinigung von rekombinant hergestellten Proteinen

Die Proteine Nef₄₅₋₂₁₀, Nef_{45-210, K148E}, Nef_{45-210, M198K}, Nef_{45-210, L202K}, Nef_{45-210, Δ 158-178} und Nef₁₋₂₁₀ (G2A) des HIV-1_{SF2} Allels, sowie HIV-1 Nef_{NL4-3, 41-206}, HIV-1 Nef_{NA7, 41-206} und die TEV-Protease wurden mit N-terminaler Histidinfusion hergestellt. Die heterotetrameren Adapterproteinkomplexe AP1, AP1 μ DD und AP2 besitzen aufgrund des verwendeten pET-Duet-Systems zwei N-terminale Histidinanker. Die Proteine myrNef₁₋₂₁₀, myrNef-EGFP, sowie Neffin, Neffin18x-Linker, Neffin38x-Linker und Neffin*₃ hingegen wurden mit C-terminaler 6-facher Histidinfusion exprimiert.

Die Isolierung und Reinigung erfolgte mittels Säulen mit Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (Ni²⁺-NTA), auf die die lösliche Proteinfraction aufgetragen und anschließend mit etwa 10 Säulenvolumen Lyse-Puffer gewaschen wurde. Innerhalb des Waschschritts wurde das auf der Säule fixierte Protein mit Hochsalzpuffer gewaschen (Puffer inkl. 1M NaCl). Die Elution erfolgte durch den Elutionspuffer mit einem Gradienten von 30 bis 300 mM Imidazol. Das eluierte Protein wurde anschließend auf dessen Reinheit mittels SDS-PAGE überprüft und gegebenenfalls über Nacht bei 4°C während der Dialyse in Gelfiltrationspuffer durch Zugabe von TEV-Protease (1:100-1:20) der Histidinanker entfernt. Je nach Reinheit des Proteins, wurde es durch eine weitere Auftragung auf Ni²⁺-NTA-Säulen von ungeschnittenem Protein gesäubert oder mittels Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt.

Lyse-Puffer	Elutionspuffer	Gelfiltrationspuffer
20 mM Tris, pH 8,0 * **	20 mM Tris, pH 8,0 * **	20 mM Tris, pH 8,0 * **
100 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
30 mM Imidazol	300 mM Imidazol	

*sdAb19 = pH 9,0

**AP1, AP1 μ DD, AP2 = pH 8,7 + 10 mM TCEP

Die löslichen Proteinfractionen mit den Proteinen mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusion Nef₁₋₂₁₀, SH3_{B6}, sdAb19, sdAb19_{D60R}, sdAb19_{G102R,S103E}, sdAb19^{*3}, gorNef-6er₄₄₋₂₀₉, gorNef-6er_{44-209, Δ 156-177}, gorNef-9er₄₄₋₂₀₉, gorNef-9er_{44-209, Δ 156-177}, HzuS Nef_{18x, 45-210}, SIV Nef_{mac239, 87-235} und CD3 ζ ₇₁₋₁₃₅ wurden zur Isolierung auf Säulen mit GSH-Sepharose aufgetragen und nach dem gleichen Schema wie die Proteine mit Histidininfusion gereinigt. Als Puffer dienten die im Folgenden beschriebenen Puffer.

Lyse-Puffer	Elutionspuffer	Gelfiltrationspuffer
20 mM Tris, pH 8,0 *	20 mM Tris, pH 8,0 *	20 mM Tris, pH 8,0 *
100 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
	10 mM reduz. GSH	

*Nef₁₋₂₁₀ = + 2 mM DTE

Nach erfolgter Größenausschlusschromatographie wurden einzelne Protein-Fractionen auf dem SDS-Gel untersucht, entsprechende Fraktionen fusioniert und mit Ultrafiltrationseinheiten für spätere Experimente konzentriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.10 Biochemische Methoden

3.10.1 Präparative Größenausschlusschromatographie / Gelfiltration

Die Größenausschlusschromatographie oder auch Gelfiltration genannt ist eine Methode zur Trennung von Proteinen eines Proteingemisches nach ihrer Größe über eine poröse Säulenmatrix. Kleinere Proteine dringen in die Poren der Matrix ein und wandern dadurch langsamer als größere Proteine. Dadurch kommt es zur Separation zwischen schneller eluierenden großen Proteinen mit kurzen und langsamer laufenden kleinen Proteinen mit langen Retentionszeiten, die in Fraktionen aufgefangen werden. Nach dieser präparativen Gelfiltration werden die gesammelten Fraktionen auf einem SDS-Gel untersucht, entsprechende Fraktionen fusioniert und das isolierte Protein mit Ultrafiltrationseinheiten für spätere Experimente konzentriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Neben der präparativen Anwendung der Größenausschlusschromatographie wurde diese Methode in dieser Arbeit auch zur Reinigung von *in vitro* geformten Komplexen genutzt.

3.10.2 Analytische Größenausschlusschromatographie / Gelfiltration

Das Prinzip der Separation von Proteinen nach ihrer Molekülgröße in der analytischen Gelfiltration, entspricht dem der präparativen Gelfiltration. Für die analytische Gelfiltration wurden spezielle analytische S75 oder S200 10/30 Superdex-Säulen verwendet, mit denen Proteine in kleineren Mengen eingesetzt, sowie durch die Kombination mit einer HPLC (*high performance liquid chromatography*) automatisiert und sensitiver auf Homogenität und dem Oligomerisierungsgrades hin untersucht werden können. Bei sehr niedrigen Flussraten von 0,5 ml/min wurden 100 µl einer 1 mg/ml bzw. 1,5 mg/ml konzentrierten Proteinlösung aufgetragen und die Absorption bei 280 nm gemessen. Zur Untersuchung von Komplexformierungen werden die Interaktionspartner zunächst einzeln und anschließend zusammen aufgetragen, um die Verkürzung der Retentionszeiten bzw. die frühere Elution des Komplexes im Vergleich zu den einzelnen Proteinen zu beobachten. Da von jedem Protein 150 µg aufgetragen wurden, liegt der kleinere Interaktionspartner molar im Überschuss vor, so dass die Abnahme des Peaks mit der Menge an Protein gleichgesetzt werden kann, die die Bindung mit dem größeren Partner eingeht. Zur Abschätzung der Massen wurde zudem ein Gelfiltrationsstandard aufgetragen. Der verwendete Puffer wurde frisch hergestellt und entgast eingesetzt.

3.10.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) oder durch die Messung der UV-Absorption bei 280 nm mittels Nanodrop.

3.10.3.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinlösungen. Hierbei bindet der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 in saurer Lösung an Seitenketten der Proteine, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschoben wird. Es wurden 800 µl ddH₂O vorgelegt, mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und 1 µl der Proteinlösung zugegeben und die Absorption bei 595 nm im Vergleich zu einem Ansatz ohne zugegebenes Protein bestimmt. Anhand einer Eichgeraden, die mit bekannten Konzentrationen von BSA erstellt wurde, lässt sich durch die ermittelte Absorption die Proteinkonzentration berechnen.

3.10.3.2 Konzentrationsbestimmung durch die Absorption bei 280 nm

In der Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorption wird sich zunutze gemacht, dass aromatische Aminosäurereste eine Absorption bei 280 nm besitzen. Zur Berechnung der Konzentration ist neben der Proteinmasse auch der spezifische Extinktionskoeffizient des Proteins nötig, der mithilfe des Programms Protparam des Internetserver Expasy (<https://us.expasy.org>) ermittelt wurde. Zur automatisierten Berechnung der Proteinkonzentration wurde das Lambert-Beersche Gesetz ($A = E \cdot b \cdot c$) angewendet, mit der Absorption (A), den Extinktionskoeffizient (E), der Weglänge des Lichts (b) und der Proteinkonzentration (c).

3.10.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) wird zur Analyse von Proteinen verwendet, in dem diese denaturiert ihrer Größe nach auf einem SDS-Gel aufgetrennt werden. Als Trennmedium fungierte ein diskontinuierliches Gel aus Polyacrylamid, indem im Tris-Glycin-gepufferten System die Proteine durch SDS (Natriumdodecylsulfat) und β -Mercaptoethanol denaturiert, entfaltet vorlagen. Das SDS ist negativ geladen, bindet an die Proteine und überdeckt die Eigenladung, so dass die Proteine in einer Gelmatrix im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. In dieser Arbeit wurden 12-20%-ige SDS-Gele verwendet, die in einem Mini-Gelsystem der Firma Bio-Rad vertikal gegossen wurden. Auf dem 12-20%-igen Trenngel wurde außerdem ein 6%-iges Sammelgel gegossen und nach der Polymerisation des Acrylamids mit den Proteinproben beladen. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer gegeben und vor dem Auftragen bei 95°C etwa 5 min lang denaturiert. Durch eine angelegte Spannung von 200 Volt oder einem angelegten Strom von 40 mA wurden die durch das SDS negativ geladenen Proteine so Richtung Pluspol durch die Gelmatrix bewegt bis die Proteine auf dem Gel ausreichend getrennt waren. Anschließend wurden die SDS-Gele in einer Färbelösung mit 0,1% Coomassie Blue R 250 inkubiert und in einer Entfärbelösung aus Ethanol und Essigsäure entfärbt. Die Abschätzung der Proteingrößen erfolgte durch Verwendung eines Molekulargewichtstandards (LMW-Marker).

SDS-Laufpuffer	SDS-Sammelgelpuffer	SDS-Trenngelpuffer
25 mM Tris-HCl, pH 8,3 194 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% (m/v) SDS	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% (m/v) SDS
2 x SDS-Probenpuffer	Färbelösung	Entfärbelösung
62,5 M Tris-HCl, pH 6,8 1,6% (w/v) SDS 25% (v/v) Glycerin 0,04%(w/v) Bromphenolblau 20% (v/v) β -ME	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Coomassie Blue R 250	10% (v/v) Ethanol 5% (v/v) Essigsäure

Bestandteil	12% Trenngel	18% Trenngel	20% Trenngel	6% Sammelgel
ddH ₂ O	6,8 ml	2,8 ml	2,0 ml	2,7 ml
30% Acrylamid	8 ml	12 ml	12,8 ml	1,0 ml
Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	1,25 ml
10% SDS	200 μ l	200 μ l	200 μ l	50 μ l
10% APS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	25 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l	2,5 μ l

3.10.5 Peptidsynthese

Die in dieser Arbeit nicht käuflich erworbenen Peptide wurden von Sascha Gentz (MPI Dortmund) an einem ABI 433A Peptidsynthesizer ausgehend von einem RinkAmide Spheri Tide-Harz (0,68 mM/g) von Merck Chemicals (Darmstadt) nach Fmoc-Strategie und Standardprotokoll (Applied Biosystems, 2004, ABI 433a Peptide Synthesizer User Guide, Revision D, Vol.1) mittels automatisierter Festphasensynthese hergestellt (Kent, 1988;

Woolley and Merrifield, 1963). Nach erfolgter Synthese wurden die Peptide N-terminal mittels Essigsäureanhydrid gecappt und 3 h bei Raumtemperatur in 2,5% Wasser und 5% TIS (Triisopropylsilan) in TFA (Trifluoressigsäure) (15 ml pro 1 g Harz) vom Harz abgespalten und in eiskaltem Diethylether gefällt. Anschließend wurden die Peptide in Puffer (50% Wasser, 50% Acetonitril (+0,1% TFA)) aufgenommen und im Vakuum über Nacht gefriergetrocknet. Die Analytik und Reinigung der Peptide erfolgte an einem HPLC System (Beckman System Gold) über C18-Säulen (ProntoSil 120-5-C18 AQ, 5 μ m, analytisch: 250x4.6 mm; präparativ: 250x20 mm Bischoff Analystechnik, Leonberg) in einem linearen Gradienten von 5% Puffer A (Wasser mit 0,1% TFA) zu 65% Puffer B (Acetonitril mit 0,08% TFA) in 30 min bei einer Flussrate von 1 bzw. 10 ml/min. Die Detektion fand bei 214 nm/280 nm statt.

3.11 Biophysikalische Methoden

3.11.1 Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS)

In der Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS) wird eine Flüssigkeit mit Hilfe eines elektrostatischen Felds in sehr viele kleine geladene Tröpfchen dispergiert. Im elektrischen Feld werden dabei die ionisierten Moleküle bei Atmosphärendruck in die Gasphase transferiert. Im Fall der verwendeten Proteinproben wurden diese zunächst über eine C4-Säule entsalzt und dann an der Spitze einer Mikrokapillare ionisiert, wodurch sie sich wegen ihrer positiven Ladung in Richtung Kathode bewegen. Aufgrund der Massenunterschiede verschiedener Proteine werden sie auch unterschiedlich stark ionisiert, wodurch die Geschwindigkeit mit der sie sich zur Kathode bewegen proportional zur Größe zunimmt. Mit dieser Methode war es möglich die Flugzeit TOF (engl. *time of flight*) der ionisierten Proteinproben zur Kathode im elektrischen Feld zu messen, welche vom Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) abhängig ist, und damit das Molekulargewicht der Proteinprobe bestimmt. Die Durchführung der Methode erfolgte nach der abgeschlossenen Proteinreinigung zur Überprüfung der Proteinmasse. Zur Auswertung der ermittelten Massenspektren wurden die Computerprogramme Xcalibur und MagTran verwendet.

3.11.2 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Mittels der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) ist es möglich kleinste Wärmeänderungen innerhalb eines thermisch isolierten Systems zu messen. Dadurch lassen sich thermische Effekte untersuchen, die als Folge von chemischen und biomolekularen Reaktionen auftreten. Hierbei kann eine Reaktion dem System Energie in Form von Wärme entziehen (endotherm) oder welche freisetzen (exotherm). Um eine Wärmeänderung relativ zur Umgebungstemperatur messen zu können, besitzt das ITC-Gerät neben der Messzelle eine Referenzzelle. In der Durchführung eines ITC-Experiments wird zu einem vorgelegten Protein in der Messzelle ein Ligand durch eine Spritze, üblicherweise in einer 10-fachen Konzentration, hinzu titriert, wobei alle Proben zuvor entgast werden um Luftblasenbildung während den Messungen zu vermeiden. Mess- und Referenzzelle sind über ein elektrisches Rückkopplungssystem miteinander verbunden. Dadurch wird bei einer reaktionsabhängigen Wärmeänderung in der Messzelle eine Verringerung bzw. Erhöhung

des Heizstroms eingeleitet, um die Temperatur konstant (isotherm) zu halten. Durch diesen benötigten Heizstrom wird indirekt die Enthalpie der Reaktion ermittelt und als Spikes dargestellt. Neben den direkten Aussagen zur Thermodynamik der Reaktion, lässt sich außerdem die Kinetik der Reaktion untersuchen. Im Gegensatz zu anderen Methoden zur Bestimmung der Dissoziationskonstante, ist hierbei keine Modifizierung oder Immobilisierung eines der Reaktanten nötig und kann unabhängig von der Größe der Moleküle durchgeführt werden. Werden die Integrale der gemessenen Wärmetönung gegen das in der Messzelle vorliegende molare Verhältnis zwischen den Reaktanten aufgetragen, können die Gleichgewichtskonstante (K) und die Stöchiometrie (n) der Reaktion berechnet werden. Zudem kann aus dem Kurvenverlauf die freie Enthalpie (ΔG°), die Wärmeänderung (Enthalpie: ΔH°) und die Änderung der Entropie (ΔS°) berechnet werden. Die freie Enthalpie ergibt sich hierbei aus der Gibbs-Funktion (Formel 1):

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (\text{Formel 1})$$

Die Empfindlichkeit des verwendeten iTC200-Geräts (Microcal, GE Healthcare) lässt die Verwendung von sehr geringen Konzentrationen der eingesetzten Proteine von bis zu 2-5 μM bei einem Zellvolumen von 250 μl und einem Spritzenvolumen von 60 μl zu. Die Affinitätskonstanten (K_d) können um die 10^{-8} M herum exakt bestimmt werden, wobei das absolute Minimum bei den typischen zu beobachtenden Wärmeänderungen bei Protein-Protein Wechselwirkungen bei etwa 10^{-9} M liegt. Bei sehr schwachen Affinitäten von unter 10^{-5} M müssen hingegen deutlich höhere Proteinkonzentrationen eingesetzt werden, um auswertbare Messungen zu erzielen. Durch mehrere aufeinanderfolgende Titrations des Reaktanten aus der Spritze zu dem Protein in der Messzelle, finden solange Reaktionen in Form von Komplexbildungen statt, bis alle Bindungsstellen der vorgelegten Substanz vollständig besetzt sind und damit eine Sättigung erreicht wird. Anschließend kommt es ausschließlich zu Wärmetönungen, die durch die Verdünnung des zutitrierten Reaktanten entsteht. Dieser Verdünnungseffekt findet dabei unabhängig von der eigentlichen Reaktion statt, verursacht aber eventuell ebenfalls thermische Effekte in Form von Temperaturveränderungen. Dadurch muss für eine exakte Auswertung die Verdünnungswärme von der Wärme der eigentlichen Komplexbildung abgezogen werden, indem in Kontrollmessungen der Reaktant zum alleinigen Puffer titriert und die gemessene Enthalpie von der der Reaktion abgezogen wird. Die verursachte Verdünnungswärme in der Zelle durch den zutitrierten Puffer ist hingegen meist vernachlässigbar gering. Die entstehende Wärmeänderung durch die Reaktion wird durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Reaktanten verursacht, die durch Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräften und strukturellen Änderungen der Solvathülle entstehen. Die Veränderung der Entropie ist schwierig zu charakterisieren, da sie zum einen durch das Auflösen der Hydrathüllen ansteigt, zum anderen aber auch durch die Komplexbildung und der damit einhergehenden Reduzierung der Freiheitsgrade abnimmt. Die Messungen dieser Arbeit wurden ausschließlich bei 25°C und die Auswertung mit dem Programm ORIGIN 7.0 mit implementierter Microcal-Software durchgeführt.

3.11.3 Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Mit der Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) lassen sich die Anteile an Sekundärstrukturelementen eines Proteins bestimmen. Hierbei geben α -helicale Bereiche ein sehr viel stärkeres Signal im kurzwelligen UV-Bereich als β -Faltblatt-Elemente. Bei der Methode wird ausgenutzt, dass chirale Proteine rechts und links-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren und dies zu Überlagerungen des polarisierten Lichtes zu einer elliptischen Verschiebung führt, was als Zirkulardichroismus bezeichnet wird. Die unterschiedliche Absorption von beiden kreispolarisierten Wellenanteilen führt zu elliptischer Polarisation im austretenden Licht, die in Abhängigkeit von der Lichtwellenlänge als CD-Spektrum aufgezeichnet wird. Die α -Helices von Proteinen weisen hierbei eine negative Veränderung der Elliptizität bei 222 nm und 208 nm und eine positive bei 190 nm und 195 nm auf. Die β -Faltblätter hingegen zeigen negative Peaks bei 220 und 215 nm und einen positiven Peak bei 195 nm. Durch das Auftreten eines der beiden spezifischen CD-Spektren, kann auf ein gefaltetes Protein in der gemessenen Probe geschlossen werden. Bei der Durchführung der Messung wurden 0,5-5 μ M des entsprechenden Proteins in 5 mM KP_i-Puffer, (pH 7,5) verdünnt und in zirkular polarisiertem Licht der Wellenlängen von 260-190 nm in 1 nm-Schritten bei einer Integrationszeit von 1 sec und einer Pfadlänge von 2 mm bei einer Temperatur von 25°C gemessen. Die Kühlung des CD-Spektrometers wurde durch flüssigen Stickstoff mit einer Flussrate von 3 l/min gewährleistet. Es wurden 10 Messungen durchgeführt und die gemessene Intensitäten der Spektren gemittelt als mittlere molare Elliptizität pro Rest dargestellt ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$).

$$\Theta = \frac{l}{d \cdot c \cdot n} \quad (\text{Formel 2})$$

d: Pfadlänge (mm)

c: Konzentration des Proteins (M)

n: Anzahl der Aminosäuren des Proteins

l: Intensität des CD-Signals (mdeg).

Mit Hilfe der Formel 2 wurde die erhaltene Elliptizität in die mittlere residuale Elliptizität umgerechnet. Eine Analyse des Sekundärstrukturanteils der Proteine wurde mit dem Programm DICHROWEB durchgeführt (Whitmore and Wallace, 2004).

3.11.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die Kernspinresonanzspektroskopie kann zur Strukturaufklärung von organischen Molekülen wie Proteinen eingesetzt werden und gibt Informationen zur Proteinfaltung sowie zu dynamischen Prozessen, Konformationsänderungen oder Wechselwirkungen mit anderen Molekülen. Die Methode basiert auf Resonanz-Wechselwirkungen zwischen Radiowellen und bestimmten Atomkernen der zu untersuchenden Probe, die sich in einem sehr starken äußeren homogenen Magnetfeld befindet. Ausschlaggebend für die Anwendung dieser Methode ist, dass alle Atomkerne, außer g,g-Kerne (Kerne mit einer geraden Protonen- und Neutronenzahl), einen von null abweichenden Eigendrehimpuls bzw. Kernspin (\vec{J}) besitzen, der um seine eigene Achse rotiert. Dieser Drehimpuls verursacht ein magnetisches

Dipolmoment ($\vec{\mu}$) und kann daher an ein Magnetfeld ankoppeln. Das gyromagnetische Verhältnis (γ) bezeichnet dabei den Proportionalitätsfaktor zwischen dem Spin und dem magnetischen Moment des Kerns.

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{J} = \gamma \cdot h \sqrt{I(I+1)} \quad (\text{Formel 3})$$

I : Kernspinquantenzahl (kann halbzahlig oder ganzzahlig sein)

h : Planck-sches Wirkungsquantum

Werden Kerne mit einem Kernspin in ein Magnetfeld (B_0) eingebracht, richten sich die magnetischen Momentvektoren parallel oder antiparallel im Feld aus und es kommt zu einer Aufspaltung der Kernniveaus, wodurch sich der energetische Zustand des Kerns ändert. Durch die Verwendung eines magnetischen Wechselfeldes werden Übergänge zwischen energetischem Grundzustand und Anhebung des Kernniveaus angeregt, indem die Frequenz des Wechselfeldes der Larmorfrequenz bzw. der Resonanzbedingung entspricht. Diese Resonanzfrequenzen der Kernspins liegen bei den heute erreichten Magnetfeldstärken je nach verwendetem Isotop zwischen 200 MHz und 900 MHz. Da die Anzahl an Kernen, die auf ein höheres Energieniveau angehoben werden und daher Energie aus dem Magnetfeld absorbieren überwiegt, kann ein Signal gemessen werden. Jeder magnetisierte Kern der Proteinprobe würde im NMR-Spektrum nur ein einziges Signal ergeben. Doch erzeugen die den Kern umgebenden Elektronen ebenfalls ein Magnetfeld, dass durch die Beeinflussung von benachbarten Magnetfeldern in dessen Umgebung diesen vom angelegten äußeren Magnetfeld abschirmen. Denn durch die Bewegungen der Elektronen benachbarter Magnetfelder, wirken diese dem äußeren Magnetfeld (B_0) entgegen, wodurch eine Verringerung des Magnetfelds des betrachteten Kerns (B_N) stattfindet.

$$B_n = B_0 - \sigma B_0 = B_0(1 - \sigma) \quad (\text{Formel 4})$$

σ : Abschirmkonstante: charakterisiert die Abschirmung des Kerns durch die Elektronenhülle

Diese Änderung der Resonanzfrequenzen der betrachteten Kerne werden im NMR-Spektrum als chemische Verschiebungen registriert, die üblicherweise relativ zum Referenzsignal von Tetramethylsilan in *parts per million* (ppm) angegeben werden. Um Überlagerungen vieler verschiedener Signale aufzulösen, können bei größeren Molekülen wie Proteinen mit 2D-Experimenten und dabei insbesondere mit heteronuklearen NMR-Experimenten HSQC-Spektren (HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) aufgenommen werden. Aufgrund des weit besseren Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) werden dafür die Kerne der Isotope ^1H , ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P verwendet, die jeweils einen Kernspin $\frac{1}{2}$ besitzen. Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit der Isotope ^{13}C und ^{15}N , werden für die NMR-Messungen diese wahlweise in Proteinen angereichert (markiert). Im Falle von $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren, wie sie in dieser Arbeit aufgenommen wurden, wird aufgrund der schlechteren gyromagnetischen Verhältnisse der ^{15}N -Atome das ^1H -Proton angeregt und dann die Magnetisierung auf den ^{15}N -Kern übertragen. Daraus ergibt sich ein HSQC-Spektrum, in dem jedes auftretende Signal ein ^{15}N -Atom mit gebundenem Proton repräsentiert, so dass es aus den H^{N} -Protonen des Proteinrückrats sowie den Signalen der NH_2 -Gruppen und den aromatischen H^{N} -Protonen der Aminosäureseitenketten besteht. Die Aminogruppe vom Lysin und die Guanidiniumgruppe vom Arginin sind üblicherweise nicht zu

sehen, da sie beim physiologischen pH zu stark mit dem Wasser austauschen. Aufgrund der spezifischen Lokalisierung der Kerne innerhalb des gefalteten Proteins wird ein spezifisches HSQC-Spektrum erhalten, in dem jedem erhaltenen Signal eine Aminosäure zugeordnet werden kann, was in mehreren verschiedenen NMR Experimenten geschieht. Zur Verwendung von HSQC-Experimenten in Bindungsstudien, können dem Isotopenmarkiertem Protein Liganden zugesetzt werden, wodurch bei einer Interaktion, durch die veränderte magnetische Umgebung der an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste, Veränderungen der chemischen Verschiebungen auftreten.

3.11.5 Kristallographische Strukturaufklärung von Proteinen

3.11.5.1 Proteinkristallisation

Die Röntgenstrukturanalyse ist zusammen mit der NMR und elektronenmikroskopischen Methoden einer der wichtigsten Methode der molekularen Strukturbiologie. Anders als bei den anderen beiden Methoden, in denen das Protein in Lösung vorliegen kann, muss es für die Röntgenstrukturanalyse in kristallisierter Form eingesetzt werden, in der es in einer geordneten periodischen Gitterstruktur vorliegt. Der Vorteil der Kristallographie gegenüber der NMR besteht darin, dass es prinzipiell keine Limitierungen der Masse der eingesetzten Proteine oder Proteinkomplexe existiert. Der Nachteil hingegen ist, dass das Protein nicht nur kristallisiert werden, sondern außerdem in Form von großen, einwandfrei angeordneten Einkristallen vorliegen muss. Auch wenn die Kristallisationsbedingungen eines Proteins nicht vorhergesagt werden kann, kann der Prozess durch die Reinheit der Probe und die Uniformität des Proteins verbessert werden. Das Protein geht dabei in einer übersättigten Lösung in einen festen Phasenzustand über, wobei diese Übersättigung durch das Hinzufügen eines Präzipitanten wie Salze oder Polymere und der daraus resultierenden Verdrängung des Proteins aus der Lösung erreicht wird. Die Konzentration des Präzipitants und der Proteinkonzentration wird durch die Diffusion von Wasser aus der Proteinlösung oder durch Diffusion des Präzipitants in die Proteinlösung langsam erhöht. Dieser Prozess lässt sich zudem durch weitere Faktoren wie die Proteinkonzentration, die Temperatur, den pH-Wert oder andere Substanzen wie Alkohole oder Detergenzien beeinflussen. Die Diffusion wird durch die beiden Methoden des *hanging drop* und *sitting drop* erreicht, indem sich ein Tropfen des 1:1 Gemisches aus Proteinlösung und Präzipitationslösung mit einer Reservoirlösung aus 100%-iger Präzipitationslösung zusammen in einer geschlossenen Kammer befindet. Durch die langsame Übersättigung des Proteins, kann es zur Nukleation (Kristallisationskeimbildung) und folgend zum Kristallwachstum kommen. Dabei wird die Übersättigung verlangsamt, da durch die Kristallisation der Lösung Protein entzogen wird, so dass das System von der labilen Nukleationszone in die metastabile Zone, in dem das Kristallwachstum stattfindet, zurückkehrt (Abbildung 14). Das Kristallwachstum findet so lange statt, bis ein Gleichgewichtszustand hergestellt ist. Oftmals werden zunächst Kristalle erhalten, die beispielsweise verwachsen oder zu dünn sind, so dass durch den Zusatz von Additiven oder Detergenzien die Kristallisationsbedingung optimiert werden muss, um optimale Einkristalle zu erhalten. Selbst danach können in manchen Fällen aufgrund fehlerhafter Kristallgitteranordnungen keine ausreichend gutes Röntgenbeugungsmuster erhalten werden.

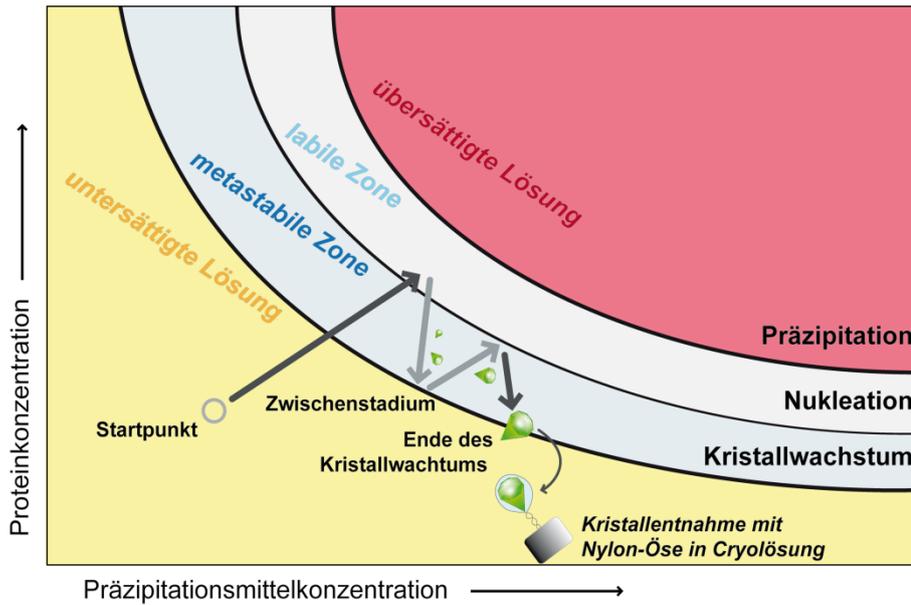


Abbildung 14: Schema eines Phasendiagramms mit beispielhaftem Kristallisationsverlauf. Im Diagramm ist gezeigt, dass sich die Proteinlösung am Startpunkt in einer untersättigten, klaren Lösung befindet. Durch die stetige Diffusion von Wasser aus dem Tropfen heraus in die Gasphase erhöht sich die Protein- und Präzipitationsmittelkonzentration. In der labilen Zone kommt es zur Nukleation bzw. Kristallkeimbildung, wodurch die Proteinkonzentration im Tropfen gesenkt wird, während die Präzipitationsmittelkonzentration weiter steigt. Im weiteren Verlauf bewegt sich der Kristall innerhalb der metastabilen Zone, was zum Kristallwachstum führt. Am Kristallisationsende kann der Kristall mit einer Nylon-Öse in Cryolösung entnommen und schockgefroren werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde zur initialen Kristallisation von Proteinen die *sitting drop*-Methode angewendet, um im Hochdurchsatz zunächst Bedingungen zu identifizieren, die für die Kristallisation des eingesetzten Proteins günstig erscheinen. Hierbei wurden kommerziell erhältliche Kristallisationsscreens verwendet, die jeweils 96 Präzipitationslösungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen enthalten. Mittels des Kristallisationsroboters Mosquito der Firma Labtech wurde dann auf einer 96er Kristallisationsplatte in einem erhöhten Well 100 nl der Proteinlösung mit 100 nl der Präzipitationslösung aus der Reservoirlösung derselben Kammer gemischt und die Platte mit transparenter Klebefolie dicht verschlossen. Neben den 96 verschiedenen Kristallisationsansätzen und dem Einsetzen von drei Tropfen mit verschiedenen initialen Proteinkonzentrationen auf derselben Platte, wurde auch die Temperatur variiert, in dem eine Platte bei 4°C und eine bei 20°C inkubierte, so dass mit zwei Platten 576 Bedingungen getestet werden konnten. Nach erfolgreicher initialer Kristallisation des Proteins, wurde die folgende manuelle Optimierung in 24-well Kristallisationsplatten durchgeführt, in der pH-Wert, Präzipitationsmittel und Proteinkonzentrationen um der initialen Bedingung herum variiert wurde. Für die folgende Datenaufnahme wurden die Kristalle mit einer Nylon-Öse in eine Cryolösung, bestehend aus der Kristallisationslösung und 15-30% Glykol/Ethylenglykol, überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Abbildung 14).

3.11.5.2 Datenaufnahme

Proteinkristalle bestehen aus einem Kristallgitter, das aus einer vielfachen Wiederholung der Einheitszelle zusammengesetzt ist, die es wiederum durch die wiederholte Translation entlang seiner Kanten ausbildet. Die Einheitszelle weist unterschiedliche Symmetrien auf, die durch die unterschiedliche Anordnung der asymmetrischen Einheit innerhalb der Zelle durch Anwendung möglicher Symmetrieeoperationen gebildet wird. Dadurch können die Gittertypen mit ihren Symmetrieeoperationen in 65 mögliche Raumgruppen unterteilt werden. Wird in Folge der Datenaufnahme ein Röntgenstrahl auf den Kristall gerichtet, durchquert der Großteil des Strahls den Kristall. Ein Bruchteil hingegen wechselwirkt mit der Elektronenhülle der Atome im Kristall, wodurch diese angeregt werden. Während diese angeregten Elektronen in den Grundzustand zurückkehren, werden die Röntgenstrahlen emittiert. Die konstruktive Interferenz mehrerer Röntgenstrahlen ergibt im Vergleich zum eingehenden Röntgenstrahl gebeugte Röntgenstrahlen, die mit einem Detektor detektiert werden.

3.11.5.3 Das Phasenproblem

Die Beugung des Röntgenstrahls entspricht einer Reflexion einer imaginären Ebenenschar mehrerer parallelen Ebenen mit einem Winkel (θ), wobei nach dem Braggschen Gesetz der maximale Beugungswinkel (θ_{\max}) dem kleinsten beobachtbaren Ebenenabstand (d_{\min}) entspricht, der als Maß der Auflösung der Kristallstruktur verwendet wird.

$$d_{\min} = \frac{\gamma}{2 \cdot \sin \theta_{\max}} \quad (\text{Formel 5})$$

γ : Wellenlänge der Röntgenstrahlen

Detektiert wird dabei die Summe der Intensitäten der gebeugten Röntgenstrahlen der einzelnen Ebenenscharen, die als Reflexe auf der Röntgenbeugungsaufnahme zu erkennen sind. Die Lage dieser Ebenenscharen und die an ihr gebeugten Röntgenstrahlen sind durch die Millerschen Indizes (h, k, l) definiert. Prinzipiell enthält ein gebeugter Röntgenstrahl durch seine Wellenlänge, seiner Amplitude und seiner Phase alle Informationen der dreidimensionalen Anordnung der Atome im Kristallgitter. Während die Wellenlänge durch die Beugung nicht verändert wird, und die Amplitude durch die relative Intensität des Reflexes auf dem Detektor ermittelt werden kann, ist die Messung der Phase nicht möglich. Aufgrund des Fehlens der Phaseninformation, ist die direkte Rekonstruktion der Elektronendichte mittels Fouriertransformation nicht möglich. Zur Berechnung der Elektronendichte ρ an einem bestimmtem Punkt (x, y, z) im Kristallgitter, sind neben der Strukturamplitude und der Intensität des gemessenen Reflexes auch die dazugehörige Phase nötig (Formel 6), die unter anderem durch molekularen Ersatz ermittelt werden kann.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum F(h, k, l) \cdot e^{i\alpha(h, k, l)} \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (\text{Formel 6})$$

$F(h, k, l)$: Strukturfaktoramplitude

h, k, l : Die gemessene Intensität des Reflexes

$\alpha(h, k, l)$: Der Phasenwinkel des dazugehörigen Reflexes

3.11.5.4 Molekularer Ersatz

In der vorliegenden Arbeit wurden die Phasen der gemessenen Reflexe über den molekularen Ersatz *in silico* berechnet, wobei neben dieser Methode noch weitere *de novo*-Methoden wie SIR/MIR (*single isomorphous replacement/multiple isomorphous replacement*) oder MAD (*Multi-wavelength anomalous diffraction*) existieren. Für den Molekularen Ersatz muss bereits eine Struktur existieren, bei der eine Sequenzidentität von mindestens 25% zum gesuchten Protein vorliegt, damit die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass sich die Phasen ebenfalls gleichen. Die Koordinaten der bekannten Struktur dienen dazu, die Strukturfaktoramplituden und die Phasen für das Modell zu berechnen. Da sich üblicherweise die Raumgruppen und die Orientierungen der Strukturen unterscheiden, wird das bekannte Strukturmodell über Translations- und Rotationsfunktionen in die neue Kristallzelle platziert und erst danach die Elektronendichte berechnet.

3.11.5.5 Verfeinerung eines Strukturmodells

Zur Prozessierung der Röntgenbeugungsdaten wurde das für akademische Zwecke frei zugängliche Softwarepaket XDS (Version von 2011 und 2012) verwendet (Kabsch, 2010). Die Reduzierung der 2-dimensionalen Daten mit XDS erfolgt mit diesem Paket in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten, in denen auch die Mosaizität, die aufgenommenen Bilder und die Raumgruppen-spezifischen Statistiken und Symmetrien überprüft werden können. Die anschließende Skalierung der Daten der Reflektionen aus XDS erfolgte mit XSCALE, wobei zusätzlich die in der Prozessierung verwendete Auflösung der Struktur begrenzt werden kann. Mit XdsConv wurden dann die prozessierten Reflektionsdaten zur Verwendung von anderen Programmen wie CCP4 oder SHELX in passende Dateiformate umgewandelt. Zur Erstellung des Strukturmodells wurde anschließend das Programm Phaser (Version 2.5.0) des CCP4i Softwarepakets verwendet (McCoy et al., 2007; Potterton et al., 2004; Winn et al., 2011).

Nach der Erstellung des ersten Strukturmodells wird in iterativen Schritten das Modell an die Elektronendichte angepasst und gegebenenfalls die Aminosäuresequenz des berechneten Modells aufgrund der Unterschiede des verwendeten Modells korrigiert. Dies wurde mit dem Programm Coot (Version 0.7) durchgeführt, das zum Bauen, Verfeinern und Analysieren von kristallografisch gelösten Strukturen eingesetzt wird (Emsley and Cowtan, 2004; Emsley et al., 2010). Außerdem enthält diese Struktur üblicherweise zunächst auch Fehler in Bindungslängen und -winkeln sowie unwahrscheinliche Torsionswinkel und Strukturgeometrien. Aus diesem Grund wird in einer folgenden Verfeinerung versucht, die Differenz zwischen den experimentell erhaltenen Strukturfaktoramplituden F_{obs} und den vom aktuellen verwendeten Modelles berechneten F_{calc} zu minimieren. Mit dem Programm Refmac (Version 5.5) des CCP4i Softwarepakets (Potterton et al., 2004) wurden dabei die Atomkoordinaten immer wieder leicht variiert und F_{calc} neu berechnet und dieses mit F_{obs} verglichen, bis die geringsten möglichen Differenzen zwischen F_{obs} und F_{calc} erreicht war. Um die Qualität der schrittweisen Verfeinerung überprüfen zu können, werden F_{obs} und F_{calc} verrechnet und die Übereinstimmung durch den kristallografischen R -faktor (R_{work}) ausgedrückt.

$$R = \frac{\sum |F_{obs}(h,k,l) - (F_{calc}(h,k,l))|}{\sum F_{obs}(h,k,l)} \quad (\text{Formel 7})$$

Theoretisch könnte bei einer identischen Übereinstimmung der R-Faktor 0 betragen, doch existieren für jedes Modell kleinste Unterschiede, so dass der tatsächliche R-Faktor bei Strukturen mit Auflösungen um die 2 Å meist zwischen 0,15 und 0,2 liegt. Bei jedem Verfeinerungsschritt werden die Phasen verbessert, was wiederum mit einer weiteren Verbesserung des Modells einhergeht. Damit besteht auch das Risiko der Überanpassung des Modells, da die möglicherweise manuell fehlerhaft veränderten Daten, das berechnete Modell nur scheinbar verbessert. Dadurch wird neben dem R-Faktor auch der R_{free} berechnet und zur Kontrolle der Verfeinerungsschritte verwendet. Dieser besteht zu 5% aus unbeeinflussten Reflexen, welche von den Verfeinerungsschritten ausgenommen werden.

3.11.5.6 Verfeinerung durch Nicht-Kristallographische Symmetrien (NCS)

Wenn innerhalb der asymmetrischen Einheit mehrere identische Proteinstrukturen existieren, kann eine Verfeinerung nach nichtkristallographischen Symmetriebeziehungen durchgeführt werden. Dies wurde mit dem Programm Phenix (Version 1.8.1) durchgeführt (Adams et al., 2010). Hierbei müssen die einzelnen Strukturen festgelegt werden, dessen Elektronendichten dann vom Computerprogramm nach nichtkristallografischen Symmetrieoperationen übereinandergelegt und gemittelt werden. Dies lässt sich mit der Annahme durchführen, dass die Moleküle innerhalb des Kristallgitters in identischer chemischer Umgebung strukturell übereinstimmen. Je mehr Moleküle dabei verwendet werden können, desto besser wird die gemittelte Elektronendichte.

4 Ergebnisse

4.1 Inhibition von Nef durch die Bindung großer molekularer Inhibitoren

4.1.1 Biochemische Charakterisierung von sdAb19 und Komplexbildung mit Nef

Um den Einzeldomänen-Antikörper sdAb19 im Komplex mit HIV-1 Nef biochemisch und strukturbioologisch charakterisieren zu können, musste zu Beginn die Klonierung von sdAb19 durchgeführt sowie dessen Expression und Reinigung etabliert werden. Das Plasmid mit dem Gen von sdAb19 wurde freundlicherweise aus den Laboren von Serge Benichou (Paris) und Kalle Saksela (Helsinki) zur Verfügung gestellt. Während das Genprodukt dieses Plasmids C-terminal ein 16-fachen flexiblen Linker mit anschließendem Hexa-Histidinanker enthielt, wurde dieses zur folgenden bakteriellen Expression so in ein pGEX-Vektor eingebracht, dass nach TEV-Digestion ausschließlich das funktionelle Protein isoliert erhalten wurde. Besonders für kristallographische Ansätze sind die zusätzlichen N-terminalen flexiblen Bereiche störend.

Die Expression von sdAb19₁₋₁₁₈ erfolgte im Bakterienstamm BL21(DE3)-R/Rosetta welcher für *E. coli* seltene tRNAs exprimiert, wodurch in 5 l Medium eine Proteinausbeute von 10,5 mg erreicht wurde (Abbildung 15). Die Reinigung erfolgte durch GSH-Affinitätschromatographie, sowie nach der proteolytischen Abspaltung des GST-Fusionsproteins durch die TEV-Protease mittels Gelfiltration bzw. Größenausschlusschromatographie. Außerdem wurde überprüft, ob sdAb19 nach bakterieller Expression und Reinigung gefaltet vorliegt. Dazu wurde es in der CD-Spektroskopie eingesetzt, um darüber hinaus auch erste strukturelle Informationen zu erhalten. Das Spektrum weist den typischen Verlauf für ein Protein auf, das hauptsächlich aus β -Faltblättern besteht (Abbildung 15).

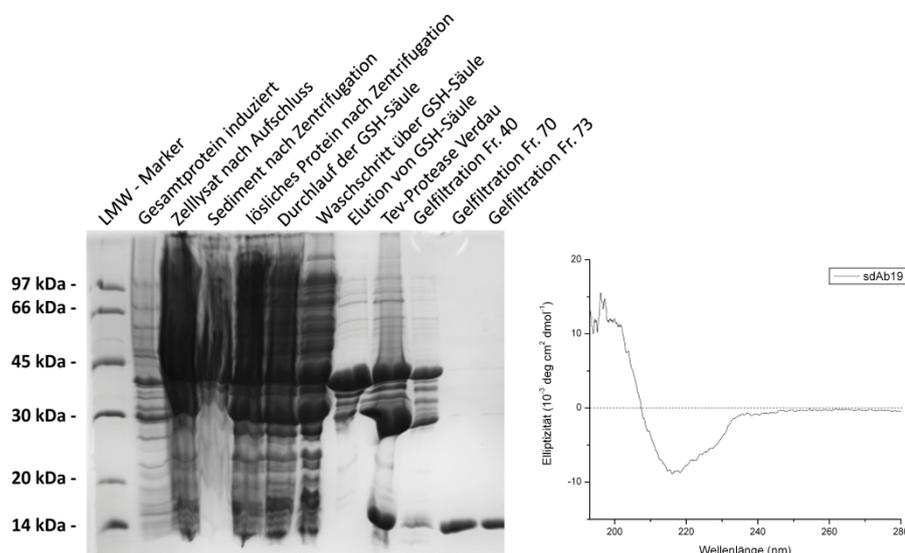


Abbildung 15: SDS-PAGE mit Proben der bakteriellen rekombinanten Expression und Reinigung des Einzeldomänen-Antikörpers sdAb19, sowie Überprüfung von dessen Faltung. Dargestellt sind die einzelnen Reinigungsschritte von sdAb19, von Proben aller Proteine der verwendeten *E. coli* und dem Zellysate nach Aufschließen der Zellen, über das Sediment und der löslichen Proteinfraction nach Zentrifugation bis zur Reinigung mittels GSH-Affinitätschromatographie und Gelfiltration nach dem TEV-Protease-Verdau. Der LMW-Marker weist auf dem 20%igen SDS-Gel für sdAb19 auf eine Masse von etwa 13 kDa hin. Die präparative Gelfiltration erfolgte mit einer 16/60 Superdex 75-Säule. Zur Überprüfung der Faltung von sdAb19 sowie zur Ermittlung seiner allgemeinen Konformation wurde ein CD-Spektrum aufgenommen, das durch einen negativen Peak um die 220 und 215 nm und einen positiven Peak bei 195 nm eine β -Faltblatt Faltung aufweist.

Nach der erfolgreichen Reinigung von sdAb19, wurde zur Untersuchung der Bindung zwischen Nef und sdAb19 und zur Ermittlung der Komplexstöchiometrie analytische Gelfiltrationen von Nef₄₅₋₂₁₀ und sdAb19 einzeln und im Komplex durchgeführt. Hierbei wurden 100 µl jedes Protein mit einer Konzentration von 1,5 mg/ml (150 µg) auf eine analytische 10/30 Superdex 75-Säule aufgetragen, so dass dadurch der jeweils kleine Bindungspartner im Überschuss vorlag. Als entgaster Puffer diente 100 mM NaCl mit 20 mM Tris-HCl, (pH 9,0). In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass Nef bei einem Retentionsvolumen von 12 ml und sdAb19 bei 14,2 ml eluiert, was im Vergleich zum Größenstandard den apparenten Massen von etwa 20 kDa bzw. 13 kDa entspricht. Der Komplex aus Nef und sdAb19 eluiert in einem einzelnen, monodispersen Peak bei einem Retentionsvolumen von 11,2 ml, was einer Masse von etwa 33 kDa entspricht. Nef und sdAb19 bilden somit einen stabilen und stöchiometrischen 1:1-Komplex aus. In einem weiteren analytischen Gelfiltrationslauf wurde untersucht, ob eine zeitgleiche synergistische Bindung von sdAb19 und der modifizierten SH3-Domäne B6 (SH3_{B6}) möglich ist. Hierzu wurde zu den 150 µg Nef₄₅₋₂₁₀ und sdAb19 auch 150 µg SH3_{B6} zugegeben. Hierbei verschiebt sich das Retentionsvolumen auf 10,6 ml, was einer Masse von etwa 44 kDa und einem stöchiometrischen 1:1:1-Komplex entspricht (Abbildung 16). Es konnte also ein stabiler Komplex aus Nef₄₅₋₂₁₀, sdAb19 und SH3_{B6} hergestellt werden, dessen apparentes Molekulargewicht sich etwas größer als der Marker bei 44 kDa einstellt.

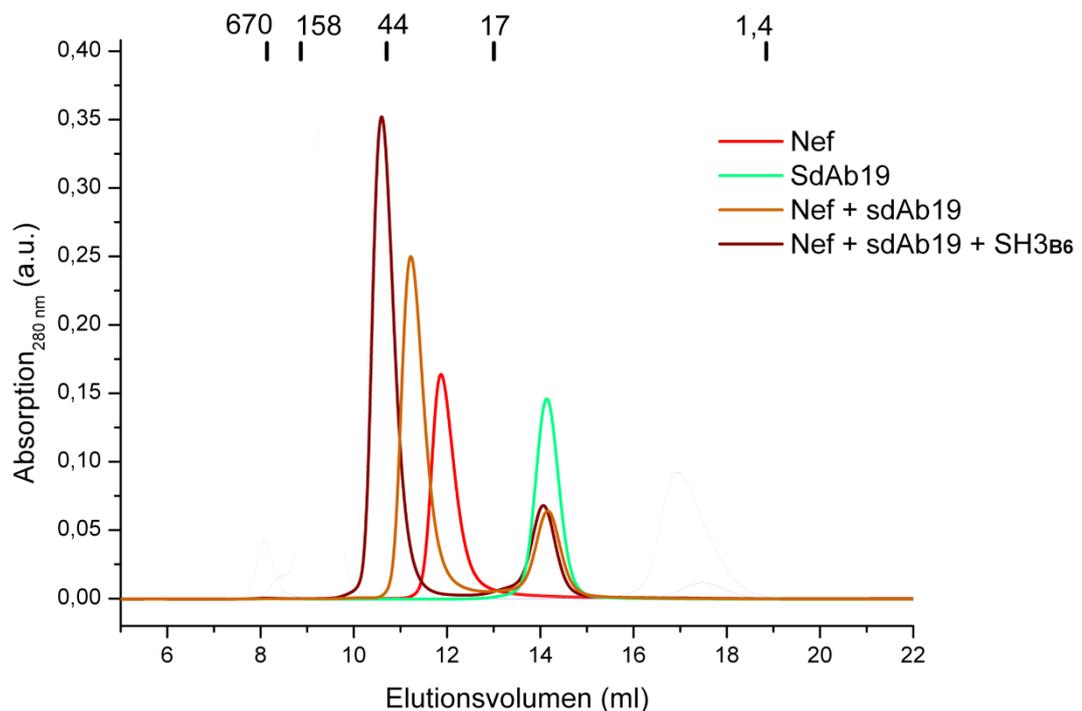
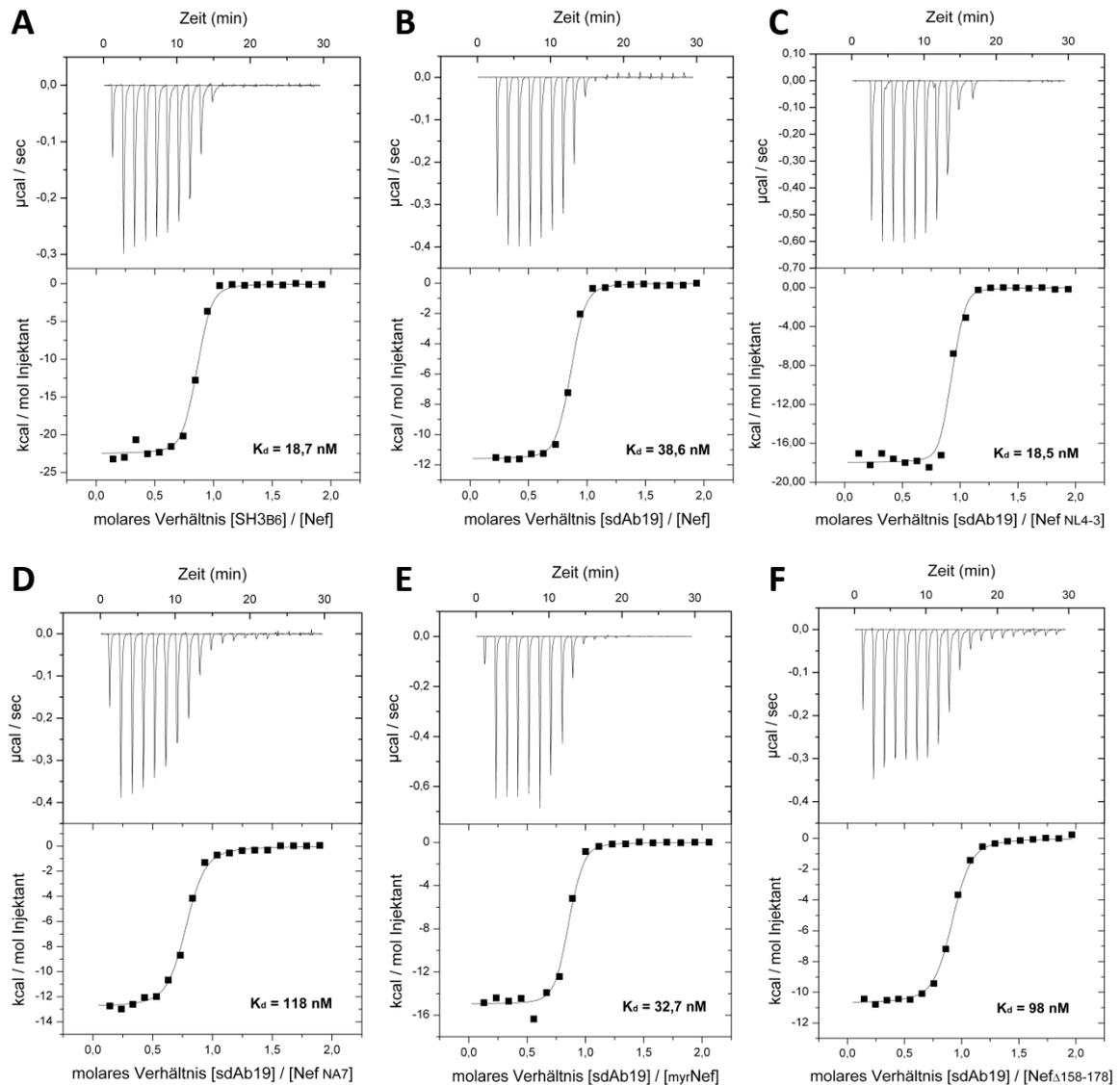


Abbildung 16: Analytische Größenausschlusschromatographie zur Untersuchung der Komplexstöchiometrie von Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19 und Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19-SH3_{B6}. Es wurden vier Einzelläufe durchgeführt von Nef₄₅₋₂₁₀ (rot) und sdAb19 (türkis) alleine und der Komplexe Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19 (hellbraun) und Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19-SH3_{B6} (dunkelbraun). Von jedem Protein wurden 100 µl einer 1,5 mg/ml konzentrierten Lösung eingesetzt, so dass die kleineren Bindungspartner im Überschuss vorlagen. Dadurch spiegelt die Verkleinerung des sdAb19-Peaks bei 14,2 ml die Proteinmenge wider, die in den Komplex mit Nef übergeht. Zur Durchführung wurde eine 10/30 Superdex 75-Säule und ein entgaster Laufpuffer aus 20 mM Tris-HCl, (pH 9) und 100 mM NaCl verwendet.

Nach der erfolgreichen Formierung des Nef-sdAb19-Komplexes erfolgten zur Bestimmung der Affinität zwischen beiden Proteinen ITC-Messungen, wofür sie im selben Puffer der analytischen Gelfiltration dialysiert wurden. In allen folgenden ITC-Experimenten des Abschnitts 4.1.1 wurde der Ligand in einer Konzentration von 200 μM in 19 Injektionen mit je 2 μl zu 20 μM des Bindungspartners titriert. Als Kontrollmessung wurde zunächst die SH3_{B6}-Domäne zu Nef₄₅₋₂₁₀ titriert und die durch die Reaktion entstehenden Wärmetönungen aufgenommen (Abbildung 17 A). Die ermittelte Affinität liegt bei 18,7 nM und damit im Bereich der bekannten Affinität zwischen Nef und SH3_{B6}. Anschließend folgte die Messung mit sdAb19 und Nef₄₅₋₂₁₀, in der eine Affinität von 38,6 nM ermittelt wurde (Abbildung 17 B). Da es sich bei diesen Messungen um das in dieser Arbeit üblicherweise verwendete HIV-1 Nef Allel SF2 handelt, aber für die Immunisierung des Lamas zur Erzeugung des Einzeldomänen-Antikörpers das HIV-1 Allel NL4-3 verwendet wurde, folgte ein weiteres ITC-Experiment mit Nef_{NL4-3} und sdAb19. Die Affinität beträgt hierbei 18,5 nM und ist damit etwas höher als bei Nef_{SF2} (Abbildung 17 C). Außerdem wurde ein weiteres HIV-1 Nef Allel namens Nef_{NA7} exprimiert, gereinigt und mittels ITC zu sdAb19 eine Bindungsaffinität von 118 nM ermittelt (Abbildung 17 D). Damit interagiert Nef_{SF2} nur etwa halb so affin mit sdAb19 als Nef_{NL4-3}, aber 4-fach stärker als das Allel NA7. Diese Experimente zeigen, dass die Affinität zwischen sdAb19 und Nef im niedrigen nanomolaren Bereich liegt und sdAb19 eine sehr hohe Bindungsspezifität für das HIV-1 Nef_{NL4-3} Protein aufweist. Die Bindungsstöchiometrie zwischen Nef und sdAb19 beträgt in allen Messungen ungefähr 1:1, so dass pro Molekül Nef nur ein Molekül sdAb19 komplexiert wird. Die Bindungsenergien setzen sich aus hohen negativen Enthalpieänderungen (exotherme Reaktion) und negativen Entropieänderungen zusammen, so dass die Reaktion exergon ist und daher spontan abläuft.

Da in der vorliegenden Arbeit aus Gründen der Proteinstabilität und höherer Expressionsausbeuten *in vitro* fast ausschließlich mit dem N-terminal verkürzten Nef₄₅₋₂₁₀ gearbeitet wurde, wurde in einer weiteren ITC-Messung auch die Affinität zwischen sdAb19 und dem myristoylierten, natürlichen Wildtyp Nef (myrNef) bestimmt um zu untersuchen, ob der Myristinanker und der N-Terminus Einfluss auf die sdAb19-Bindung hat. Zur Herstellung von myristoyliertem Nef wurde ein mit einem C-terminalen Hexa-Histidinanker versehenes Nef₁₋₂₁₀ zusammen mit der humanen N-Myristoyltransferase (hNMT) coexprimiert. Der Unterschied zur üblichen Expressionsbedingung besteht darin, dass vor Expressionsinduktion eine Myristinsäure/BSA-Lösung zugegeben wird und damit die coexprimierte NMT die Myristinsäure in Form von Myristyl-CoA an Glycin2 des N-Terminus von Nef kovalent überträgt.

Im ITC-Experiment, in dem sdAb19 zu myrNef titriert wurde, beträgt die Affinität 32,7 nM und entspricht damit in etwa der Affinität die zwischen Nef₄₅₋₂₁₀ und sdAb19 erhalten wurde und auch die Bindungsenergien sind vergleichbar (Abbildung 17 B und E). Dies zeigt, dass der Myristinanker sowie die Reste des N-terminalen Bereichs von 2-44 nicht an der Interaktion mit sdAb19 beteiligt sind. Dies war zu erwarten, da diese Reste im Nef_{NL4-3}-Konstrukt bei der ursprünglichen Immunisierung des Lamas auch fehlten. Um die C-terminale flexible Schleife ebenfalls als mögliche Bindestelle von sdAb19 zu untersuchen, wurde ein ähnliches ITC-Experiment nochmal mit einer Nef_{45-210, Δ 158-178}-Mutante durchgeführt, in dem der Großteil der C-terminalen flexible Schleife deletiert ist. Durch dessen Fehlen verringert sich die Affinität zu sdAb19 um das 2,5-fache auf etwa 98 nM (Abbildung 17 F), was darauf hindeutet, dass die Schleife möglicherweise einen kleinen Beitrag zur Interaktion mit sdAb19 leistet.



	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n (l^{-1} / l_{11})
(A) SH3 _{B6} /Nef ₄₅₋₂₁₀	18,7	-10,55	-22,51 (±0,25)	-0,040	-11,96	0,81 (±0,005)
(B) sdAb19/Nef ₄₅₋₂₁₀	38,6	-10,11	-11,62 (±0,005)	-0,005	-1,51	0,81 (±0,002)
(C) sdAb19/Nef _{NL4-3 41-206}	18,5	-10,37	-17,97 (±0,30)	-0,025	-7,42	0,88 (±0,007)
(D) sdAb19/Nef _{NA7 45-206}	118	-9,45	-12,82 (±0,12)	-0,011	-3,34	0,74 (±0,004)
(E) sdAb19/myrNef	32,7	-10,20	-14,97 (±0,22)	-0,016	-4,77	0,81 (±0,006)
(F) sdAb19/Nef _{45-210;Δflex.}	98	-9,55	-10,71 (±0,06)	-0,004	-1,16	0,87 (±0,003)

Abbildung 17: Kalorimetrische Messung der Interaktion zwischen dem Einzeldomänen-Antikörper sdAb19 und HIV-1 Nef. (A) ITC-Experiment zwischen der bindungsoptimierten SH3-Domäne B6 (SH3_{B6}) und HIV-1 Nef₄₅₋₂₁₀. (B) ITC-Titrations von sdAb19 zu Nef₄₅₋₂₁₀, (C) zu Nef_{NL4-3 41-206}, (D) zu Nef_{NA7 45-206}, (E) zu myristoyliertem Nef₁₋₂₁₀ (myrNef) und (F) zu Nef_{45-210;Δ158-178}. In jedem Experiment wurden 200 µM Ligand in 19 Injektionen mit je 2 µl zu 20 µM Nef titriert. Als Puffer diente 20 mM Tris-HCl (pH 9,0) mit 100 mM NaCl. Die Messtemperatur betrug 25°C. Alle relevanten Messwerte sind tabellarisch zusammengefasst.

Anhand drei verschiedener Nef Allele konnte gezeigt werden, dass die Bindungsspezifität zwischen sdAb19 und HIV-1 Nef_{NL4-3} recht hoch ist. Um zu überprüfen, ob sdAb19 auch mit weiterentfernt verwandten Nef Proteinen interagiert, wurden SIV Nef_{mac239} und ein aus dem Gorilla stammendes Nef namens gorNef exprimiert, gereinigt und zusammen mit sdAb19 in ITC-Messungen eingesetzt. Während HIV-1 Nef_{SF2} in einem Sequenzvergleich zu 87% mit HIV-1 Nef_{NL4-3} und zu 89% mit HIV-1 Nef_{NA7} identisch ist, ist es bei gorNef nur zu 59% und bei SIV Nef_{mac239} zu 50% (Abbildung 18).

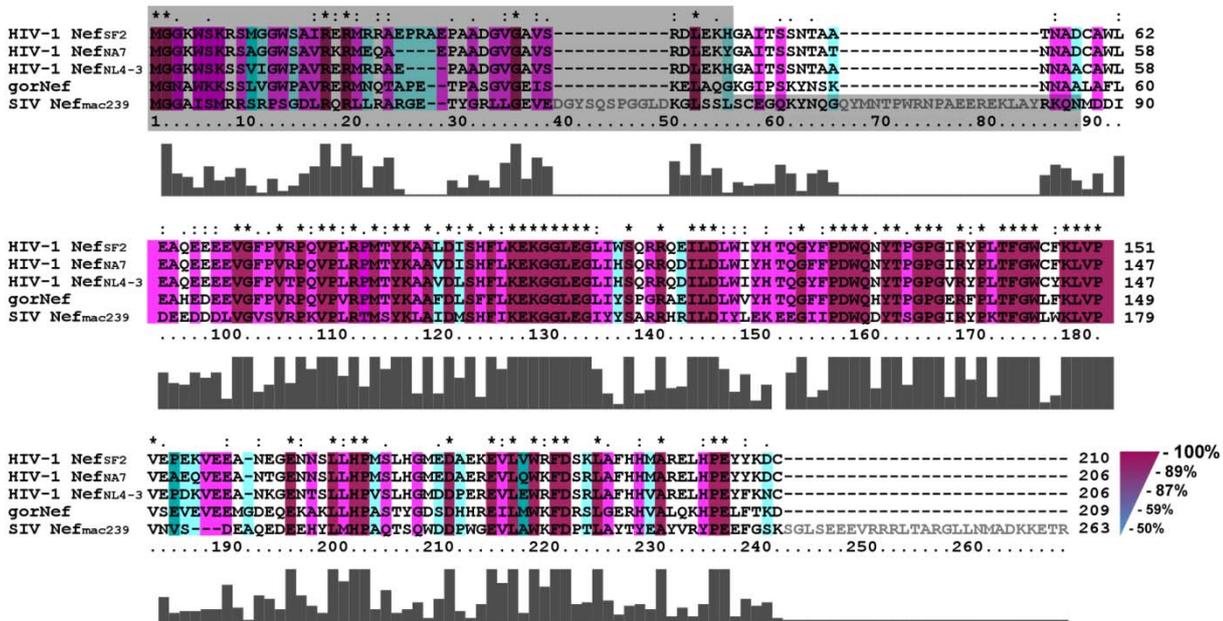


Abbildung 18: Darstellung der variablen und konservierten Bereiche von Nef anhand eines Sequenzvergleichs zwischen Nef_{SF2}, Nef_{NA7}, Nef_{NL4-3}, gorNef und SIV Nef_{mac239}. Der Grad der Konservierung der Aminosäuren ist ausgehend von der Farbe rot für sehr konserviert, über violett, weiß und hellgrün bis türkis für sehr variabel dargestellt. Im Vergleich zur Sequenz von Nef_{SF2} (100%) ist die Sequenz von Nef_{NA7} zu 89%, die von Nef_{NL4-3} zu 87%, die von gorNef zu 59% und die von SIV Nef_{mac239} zu 50% identisch. Besonders die N- und C-terminalen Bereiche beinhalten viele variable Bereiche. Grau hinterlegt sind die N-terminalen Bereiche, die in den verwendeten N-terminal verkürzten Konstrukten dieser Arbeit deletiert wurden.

ITC-Messungen, in denen sdAb19 zum einen zu SIV Nef_{mac239}, und zum anderen zu gorNef₄₄₋₂₀₉ titriert wurden zeigen, dass beide Proteine hier nicht in einem messbaren Affinitätsbereich mit sdAb19 interagieren (Abbildung 19 A und B). Damit interagiert sdAb19 nur mit Nef Proteinen aus HIV-1, wobei sich auch die Affinitäten der drei untersuchten Nef Allele zu sdAb19 leicht unterscheiden. Diese Beobachtungen korrelieren mit Ergebnissen von Experimenten, in denen die Inhibition der Nef-vermittelten CD4-Runterregulierung durch sdAb19 bei verschiedenen Nef Allelen überprüft wurde. Hierbei inhibiert sdAb19 Nef_{NL4-3} am besten, Nef_{SF2} geringfügig schlechter und Nef_{NA7} nur etwa halb so gut (Bouchet et al., 2011).

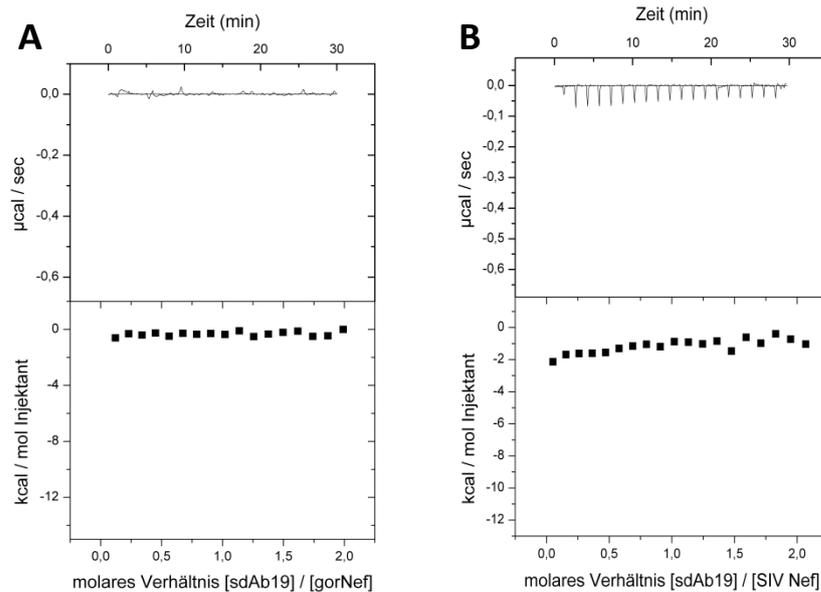


Abbildung 19: Kalorimetrische Messung zur Untersuchung der Interaktion zwischen sdAb19 und gorNef bzw. SIV Nef. (A) ITC-Messung zwischen sdAb19 und dem aus dem HIV-1 Subtyp-P stammenden gorNef und (B) zwischen sdAb19 und SIV Nef_{mac239}. In jedem Experiment wurden 200 μM Ligand in 19 Injektionen mit je 2 μl zu 20 μM Nef titriert. Als Puffer diente 20 mM Tris-HCl, (pH 9,0), mit 100 mM NaCl. Die Messtemperatur betrug 25°C.

4.1.2 Biochemische Charakterisierung eines Nef-Inhibitors mit fusionierten sdAb19-SH3-Domänen im Komplex mit Nef

Die bisherigen Untersuchungen an Nef und sdAb19 mittels analytischer Gelfiltration und ITC-Messungen zeigen, dass sdAb19 in einem stöchiometrischen 1:1 Verhältnis und einer niedrigen nanomolaren Affinität an das Nef Protein bindet. In der ersten veröffentlichten Studie von sdAb19 hat sich dieser Einzeldomänen-Antikörper als sehr potenter Inhibitor für Nef herausgestellt, wobei ein paar Funktionen wie die Internalisierung von MHC-I jedoch nicht inhibiert wurden (Bouchet et al., 2011). Aus diesem Grund wurde an der weiteren Verbesserung von sdAb19 gearbeitet.

Da die synergistische Bindung von SH3_{B6} und sdAb19 an Nef möglich ist, wurde zur Erhöhung der Affinität und der inhibitorischen Eigenschaften nach dem Prinzip des "wrapping Nef" (Breuer et al., 2011), beide Domänen mit einem kurzen flexiblen Linker aus 8 Aminosäureresten (AAAGGSGG) miteinander verknüpft. Dabei wurde der C-Terminus von sdAb19 mit dem N-Terminus der SH3_{B6}-Domäne verbunden (Abbildung 20) und der daraus resultierende Inhibitor Nefin genannt (Bouchet et al., 2012; Jarviluoma et al., 2012).

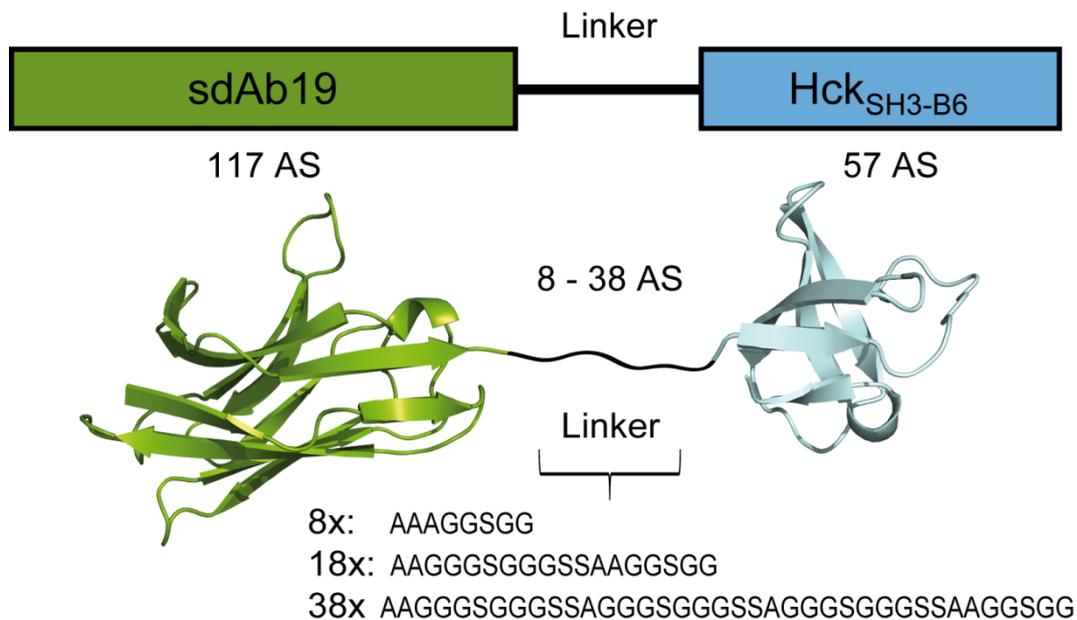


Abbildung 20: Schematischer Aufbau und strukturelles Modell des Inhibitors Neffin. Neffin besteht aus den Domänen sdAb19 (grün) und SH3_{B6} (blau), die mittels eines acht Aminosäuren umfassenden flexiblen Linker miteinander verbunden sind. In weiteren getesteten Konstrukten wurde dieser auf 18 bzw. 38 Reste verlängert (Neffin18x und Neffin38x).

Zur Expression von Neffin wurde das von unseren Kooperationspartnern Serge Benichou (Paris) und Kalle Saksela (Helsinki) freundlicherweise zur Verfügung gestellte Plasmid pET-12a-Neffin verwendet, in der zusätzlich zur Sequenz von sdAb19, des Linkers und der SH3_{B6}-Domäne, sich C-terminal ein nicht abschneidbarer 17 Reste umfassender Linker anschließt, dem dann erst der Hexa-Histidin-Anker folgt. Zwei kürzere Konstrukte von Neffin mit abschneidbaren Fusionsanker tendierten stark zur Aggregation, so dass eine effiziente Expression und Reinigung nicht erfolgen konnte. Die des längeren Konstrukts hingegen konnte im Bakterienstamm BL21(DE3)-R/Rosetta mit einer Ausbeute von 6 mg Protein aus 5 l Medium in ausreichenden Mengen durchgeführt werden (Abbildung 21). Die Reinigung wurde hierbei mittels Säulen mit Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (Ni-NTA) und anschließender Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Außerdem wurde, wie schon bei sdAb19, die Faltung von Neffin nach Expression und Reinigung mittels CD-Spektroskopie überprüft. Wie sdAb19 besteht auch Neffin mehrheitlich aus β -Faltblättern (Abbildung 21), was durch einen negativen Peak um die 220 und 215 nm und einen positiven Peak bei 195 nm im CD-Spektrum zu erkennen ist.

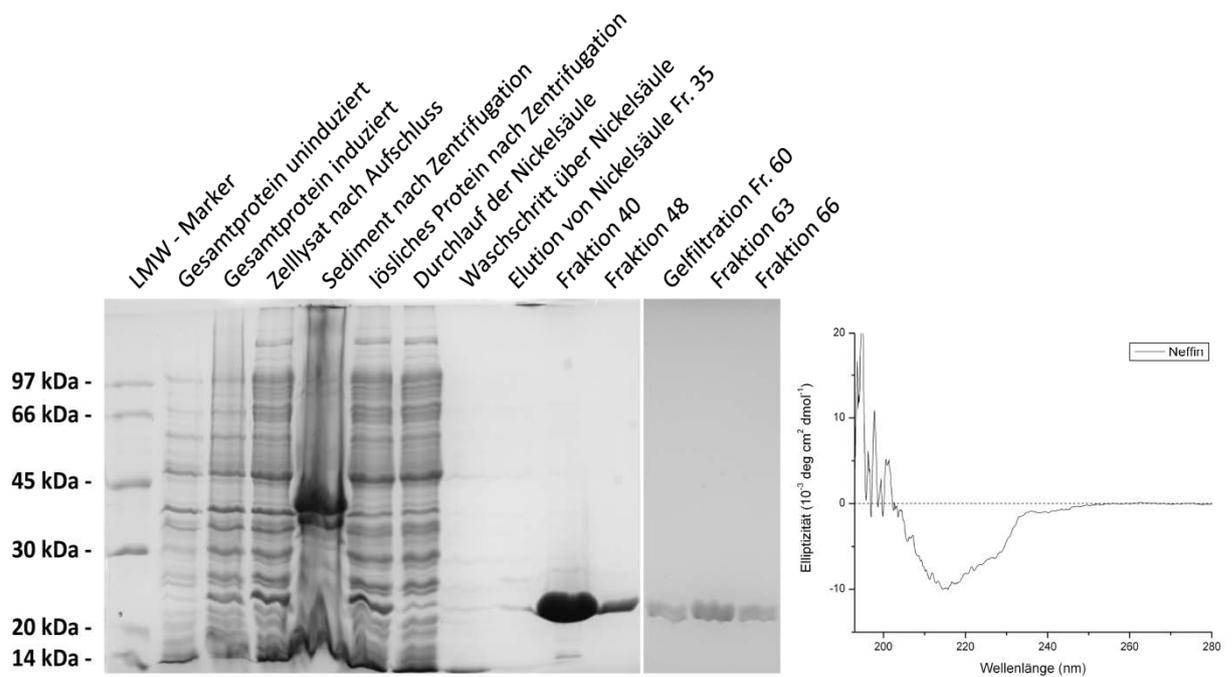


Abbildung 21: Darstellung einer SDS-PAGE mit Proben der bakteriellen rekombinanten Expression und Reinigung von Neffin. Auf dem gezeigten SDS-Gel wurden Proben der einzelnen Reinigungsschritte von Neffin und somit Proben des bakteriellen Gesamtproteins vor und nach IPTG-Induktion, dem Zellysate nach Aufschließen der Zellen, dem Sediment und der löslichen Proteinfraction nach Zentrifugation. Proben der anschließenden Reinigung mittels NTA-Ni Affinitätschromatographie und Gelfiltration sind rechts aufgetragen. Durch den Vergleich der Massen des LMW-Markers ist letztendlich auf dem 20%igen SDS-Gel eine saubere Bande bei etwa 23 kDa von Neffin zu erkennen. Die präparative Gelfiltration erfolgte mit der 16/60 Superdex 75-Säule. Zur Überprüfung der Faltung von Neffin, wurde nach der Reinigung eine CD-Spektroskopische Messung durchgeführt. Neffin besteht wie sdAb19 überwiegend aus β -Faltblättern, da auch hier das CD-Spektrum einen negativen Peak um die 220 und 215 nm und einen positiven Peak bei 195 nm und diese damit den Hauptteil der Sekundärstrukturelemente ausmachen.

Nachdem für den Nef-sdAb19-SH3_{B6}-Komplex eine 1:1:1-Stöchiometrie ermittelt werden konnte, wurde im Folgenden zur Analyse der Komplexstöchiometrie des Nef-Neffin-Komplexes ebenfalls analytische Gelfiltrationen durchgeführt (Abbildung 22). Für einen direkten Vergleich der entstehenden Komplexe wurden in dem gleichen Experiment auch die gleichen Komplexe wie in Abbildung 16 mitgeführt. Wie zuvor läuft Nef bei einer Masse von 20 kDa, sdAb19 bei 13 kDa, der Komplex aus beiden bei 33 kDa und der trimere Nef-sdAb19-SH3_{B6}-Komplex bei 44 kDa. Neffin alleine läuft trotz seiner Masse von etwa 23 kDa mit einem späten Retentionsvolumen langsamer und damit als relativ kleines Molekül über die analytische 10/30 Superdex 75-Säule. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass die SH3_{B6}-Domäne von einer präparativen und auch analytischen Gelfiltration sehr spät eluiert wird und diese auch bei Neffin auf der Retentions säule wie ein Anker wirkt (siehe dazu auch Abbildung 40). Hinzu kommt ein kleiner Peak im Ausschlussvolumen bei 8 ml, bei dem es sich um kleine Mengen von Aggregaten von Neffin handelt. Durch die Auftragung von Nef₄₅₋₂₁₀ zusammen mit Neffin kommt es interessanterweise nicht zu einem Komplex, der der apparenten Größe des trimeren Nef-sdAb19-SH3_{B6}-Komplexes entspricht, sondern zu einem einzelnen monodispersen Peak bei einem Retentionsvolumen von 9,2 ml, so dass dieser Komplex deutlich größer ist (Abbildung 22). Die apparente Masse entspricht eher einem 2:2- oder 3:3-Komplex aus mehreren Nef₄₅₋₂₁₀- und Neffin-Molekülen.

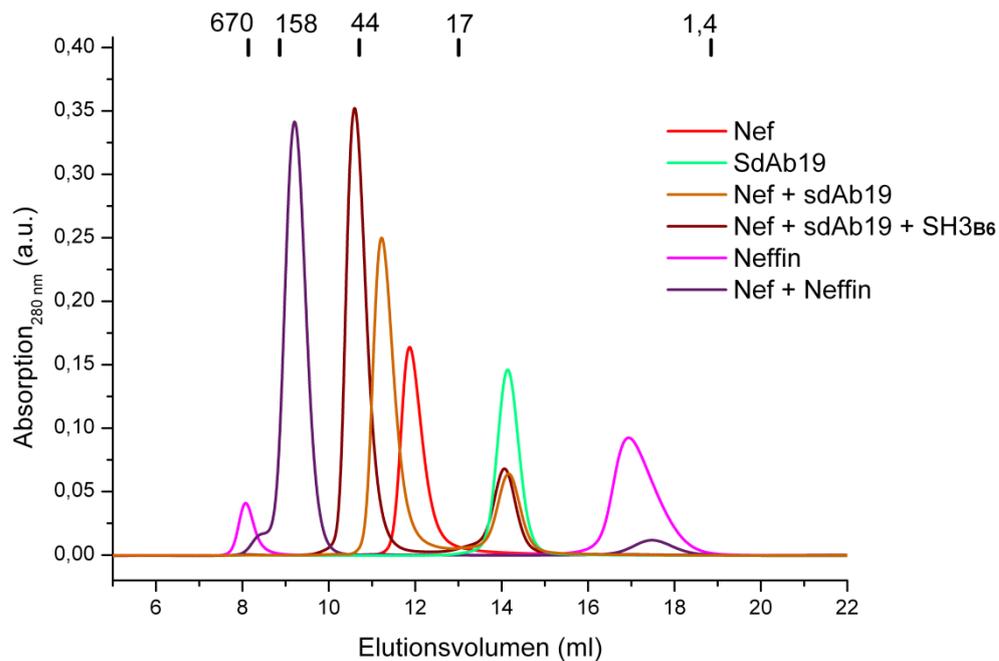


Abbildung 22: Analytische Größenausschlusschromatographie zur Untersuchung der Komplexstöchiometrie des Nef₄₅₋₂₁₀-Neffin-Komplexes. Zum Vergleich der Komplexstöchiometrien wurden im Experiment nochmals sdAb19 (türkis) und die SH3_{B6}-Domäne mit einbezogen. Es wurden somit 6 einzelne Läufe durchgeführt von Nef₄₅₋₂₁₀ (rot), sdAb19 (türkis) und Neffin (magenta) alleine und der Komplexe Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19 (hellbraun), Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19-SH3_{B6} (dunkelbraun) und Nef-Neffin (lila). Von jedem Protein wurden 100 µl einer 1,5 mg/ml konzentrierten Lösung eingesetzt, so dass die kleineren Bindungspartner im Überschuss vorlagen. Dadurch spiegelt die Verkleinerung des sdAb19-Peaks bei 14,2 ml und die des Neffin-Peaks bei 17 ml die Proteinmenge wider, die in den jeweiligen Komplex mit Nef übergeht. Zur Durchführung wurde eine 10/30 Superdex 75-Säule und ein entgaster Laufpuffer aus 20 mM Tris-HCl, (pH 9) und 100 mM NaCl verwendet.

Um zu untersuchen, ob eine Verlängerung des Linkers von Neffin zwischen sdAb19 und der SH3_{B6}-Domäne Auswirkungen auf die Komplexbildung mit Nef hat, wurde dieser wie in Abbildung 20 zu sehen auf 18 und 38 Reste verlängert und wie zuvor Neffin mit seinem 8-fachen Linker mittels analytischer Gelfiltration analysiert (Abbildung 23). Es wurden auch hier 100 µl jedes Protein in einer Konzentration von 1,5 mg/ml und damit 150 µg eingesetzt und die Proteine auf eine 10/30 Superdex 75-Säule aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass Nef und Neffin wie zuvor einen dimeren oder trimeren Komplex mit resultierendem einzelnen monodispersen Peak ausbilden. Durch die Verlängerung des 8-fachen Linkers von Neffin zu einem mit 18 bzw. 38 Resten ändert nichts an der Ausbildung des Komplexes, so dass alle drei Peaks ein etwa identisches Retentionsvolumen bei 9,2 ml besitzen. Es kommt also weder zu Oligomerisierungen mit Proteinaggregationen im Ausschlussvolumen, noch zu kleineren Komplexen aufgrund der unterschiedlichen Linkerlängen. Allein durch die unterschiedlichen Massen der verschiedenen Neffin-Konstrukte gibt es leichte Verschiebungen im Elutionsvolumen, so dass Nef-Neffin (lila) am spätesten, Nef-Neffin18x (dunkelgrün) etwas früher und Nef-Neffin38x (dunkelblau) am frühesten eluiert wird und der letztere Komplex damit am größten ist. Deutlich werden die unterschiedlichen Massen von Neffin, Neffin18x und Neffin38x durch ihr einzelnes Laufverhalten mit Neffin bei 17,5 ml (magenta), Neffin18x bei 14,5 ml (türkis) und Neffin38x bei 13,5 ml (hellblau).

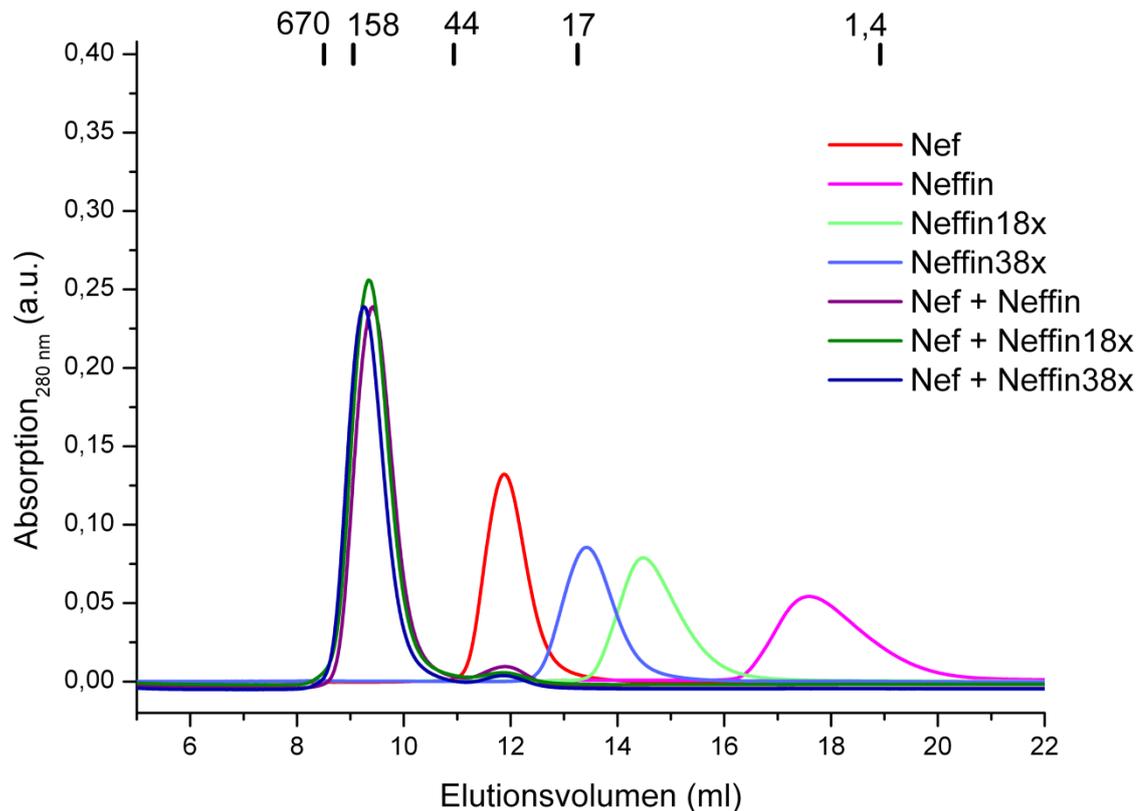
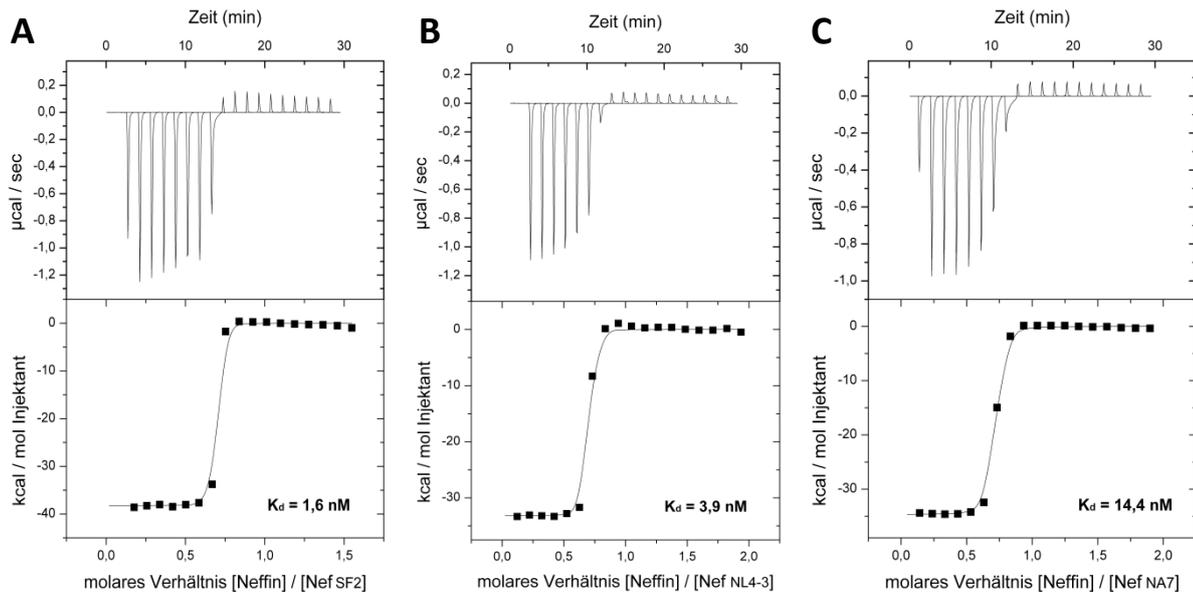


Abbildung 23: Analytische Größenausschlusschromatographie zur Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Linkerlängen zwischen sdAb19 und SH3_{B6} von Neffin auf die Komplexbildung mit Nef. Es wurden zunächst die vier einzelnen Proteine Nef₄₅₋₂₁₀ (rot), Neffin (magenta), Neffin18x (hellgrün) und Neffin38x (hellblau) alleine aufgetragen. Anschließend folgten die Komplexe aus Nef und Neffin (lila), Nef und Neffin18x (dunkelgrün) sowie Nef und Neffin38x (dunkelblau). Von jedem Protein wurden 100 µl einer 1,5 mg/ml konzentrierten Lösung eingesetzt, so dass in diesem Fall der Peak des kleineren Bindungspartners Nef bei 11,9 ml um die Menge kleiner wird, die in den Komplex mit Neffin übergeht. Zur Durchführung wurde eine 10/30 Superdex 75-Säule und ein entgaster Laufpuffer aus 20 mM Tris-HCl, (pH 8) und 100 mM NaCl verwendet.

Da es keinen Unterschied zwischen den drei getesteten Neffin-Konstrukten in der Komplexbildung mit Nef gibt, wird im folgenden weiter mit Neffin mit 8-fachen Linker gearbeitet. Die Affinität zwischen Nef und Neffin wurde dann mittels isothermaler Titrationsexperimente mit den drei verschiedenen Nef Allelen SF2, NL4-3 und NA7 ermittelt (Abbildung 24). Es wurde in jedem Experiment Neffin in der Konzentration von 200 µM in 19 Injektionen mit je 2 µl zu 20 µM Nef hinzutitriert. Die ermittelten Affinitäten liegen in einem so hohen Bereich, der es fast unmöglich macht diese mittels ITC zu bestimmen. Für Neffin zu Nef_{SF2} und Nef_{NL4-3} werden Affinitäten zwischen 1 nM und 4 nM erhalten (Abbildung 24 A und B), wobei hierbei nicht auszuschließen ist, dass die nicht noch höher und damit im pikomolaren Bereich liegen. Wie zu erwarten liegt aufgrund der etwas geringeren Affinität von Nef_{NA7} zu sdAb19 die Affinität auch zu Neffin mit 14,4 nM etwas niedriger (Abbildung 24 C). Die Bindungsstöchiometrie (n) zwischen Nef und Neffin ist kleiner als zwischen Nef und sdAb19, so dass dieser Komplex möglicherweise eine andere Stöchiometrie besitzt. Die Bindungsenergien der Reaktionen wiederum setzen sich ebenso aus sehr hohen negativen Enthalpieänderungen und negativen Entropieänderungen zusammen.



	K _d (nM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol/deg)	T ΔS (kcal/mol)	n ($\frac{L}{L}$ / $\frac{L}{L}$)
(A) Neffin/Nef _{SF2}	1,6	-12,02	-38,26 (±0,17)	-0,088	-26,23	0,66 (±0,001)
(B) Neffin/Nef _{NL4-3}	3,9	-11,49	-33,19 (±0,20)	-0,073	-21,71	0,65 (±0,002)
(C) Neffin/Nef _{NA7}	14,4	-10,72	-34,69 (±0,12)	-0,080	-23,97	0,67 (±0,001)

Abbildung 24: Charakterisierung der Bindungseigenschaften zwischen Nef und Neffin mittels isothermaler Titrationskalorimetrie. Für die kalorimetrische Messung wurden 200 µM Neffin in 19 Injektionen mit je 2 µl zu (A) 20 µM Nef_{SF2}, sowie zu (B) 20 µM Nef_{NL4-3} und zu (C) 20 µM Nef_{NA7} titriert. Es wurde ein entgaster Puffer mit 20 mM Tris-HCl, (pH 8,0) und 100 mM NaCl eingesetzt und die Messungen bei 25°C durchgeführt. Alle relevanten Messwerte sind tabellarisch zusammengefasst.

4.1.3 Strukturelle Charakterisierung des Komplexes aus Nef und sdAb19

4.1.3.1 Kristallisation und Strukturlösung des Nef-sdAb19-Komplexes

Nach der biochemischen Charakterisierung des Komplexes aus sdAb19 und Nef erfolgt im weiteren Verlauf der Arbeit die Strukturbestimmung. Hierfür wurden Komplexe aus sdAb19 und Nef₄₅₋₂₁₀ (Abbildung 25), sowie sdAb19 und Nef_{45-210,Δ158-178} (Abbildung 26) *in vitro* geformt. Zur Komplexbildung wurde das jeweilige Nef mit sdAb19 in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt und der daraus resultierende Komplex über eine präparative 16/60 Superdex 75-Gelfiltrationssäule gegeben, um diese von überschüssigen, nicht im Komplex gebundenen Proteinen zu säubern. Die Reinheit der Komplexe wurde auf SDS-Gelen überprüft (Abbildungen 25 und 26) und daraufhin konzentriert und in der Kristallisation eingesetzt.

Nach der Bildung und Reinigung der dimeren Komplexe Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19 und Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19, wurde zu einem Teil der Proben als dritter Bindungspartner eine äquimolare Menge der SH3_{B6}-Domäne zugegeben und damit die trimeren Komplexe Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19-SH3_{B6} und Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6} formiert. Diese wurden ebenfalls über eine präparative Gelfiltration gereinigt (Abbildungen 25 und 26). Der Grund für die zusätzliche kristallografische Verwendung der SH3_{B6}-Domäne ist, dass sich auf früheren

Erfahrungen basierend, die SH3-Domäne unterstützend auf den Kristallisationsprozess auswirkte indem sie stabilisierend auf Nef wirkt. Außerdem könnte die Struktur eines Trimers auch einen Hinweis auf die Formung des Komplexes aus Nef und Nefin geben.

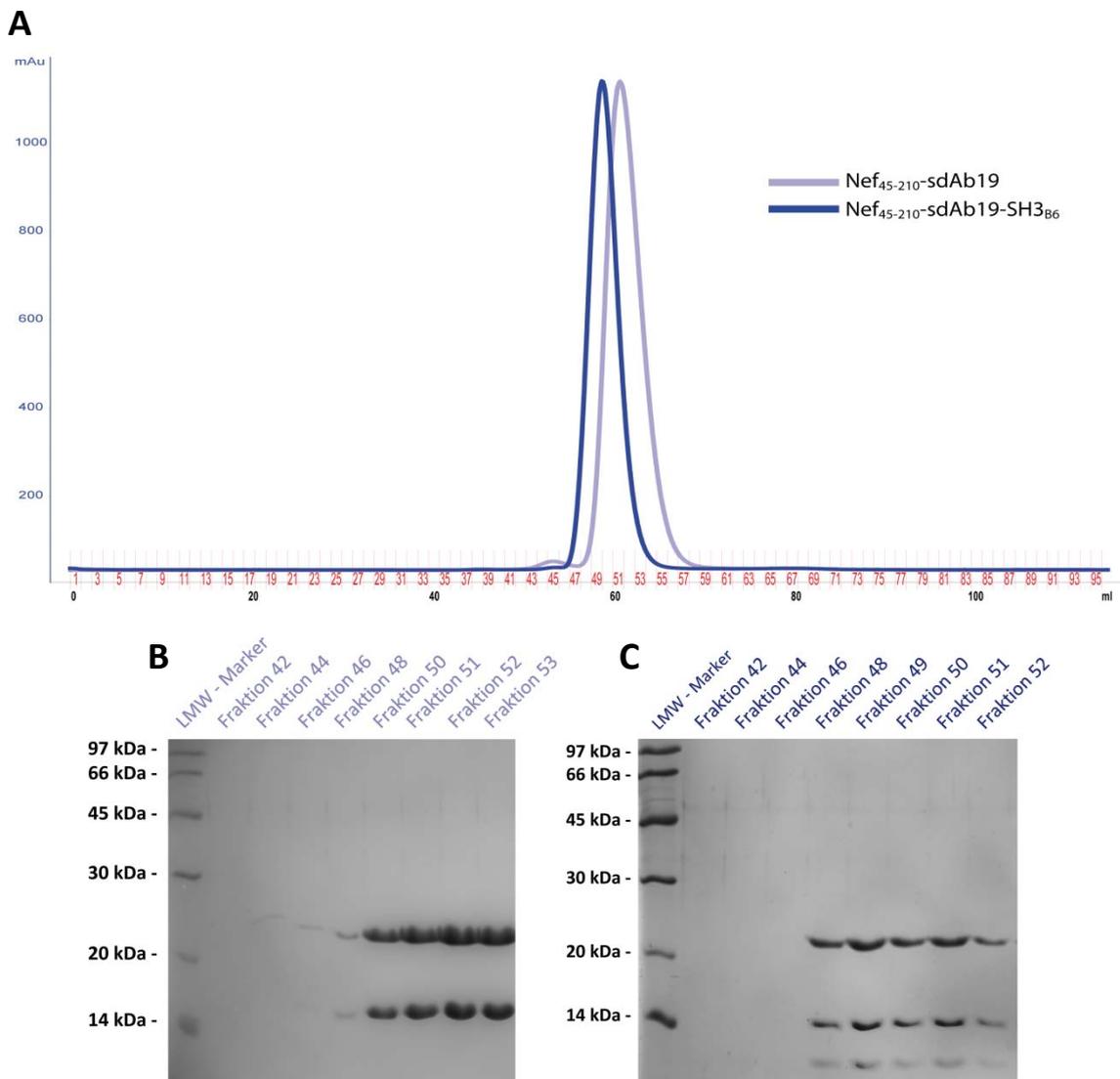


Abbildung 25: Formierung der Komplexe aus Nef₄₅₋₂₁₀ und sdAb19 ohne und mit SH3_{B6}-Domäne *in vitro*. Die Proteine Nef₄₅₋₂₁₀, sdAb19 und SH3_{B6} wurden einzeln exprimiert, gereinigt und zunächst Nef mit sdAb19 *in vitro* vermischt. **(A)** Die Reinigung des 1:1-Komplexes erfolgte über eine präparative 16/60 Superdex 75 Gelfiltrationssäule, wobei **(B)** die Reinheit des Komplexes mittels SDS-PAGE überprüft wurde (hellblau). Nach erfolgter Konzentrierung des Komplexes folgte die Zugabe der SH3_{B6}-Domäne zu einem Teil der Probe und **(A)** die Reinigung des 1:1:1-Komplex wie zuvor mittels präparativer Gelfiltration, mit **(C)** der Analyse der Reinheit über eine weitere SDS-PAGE (dunkelblau). Dargestellt sind 20%ige SDS-Gele der denaturierenden SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung.

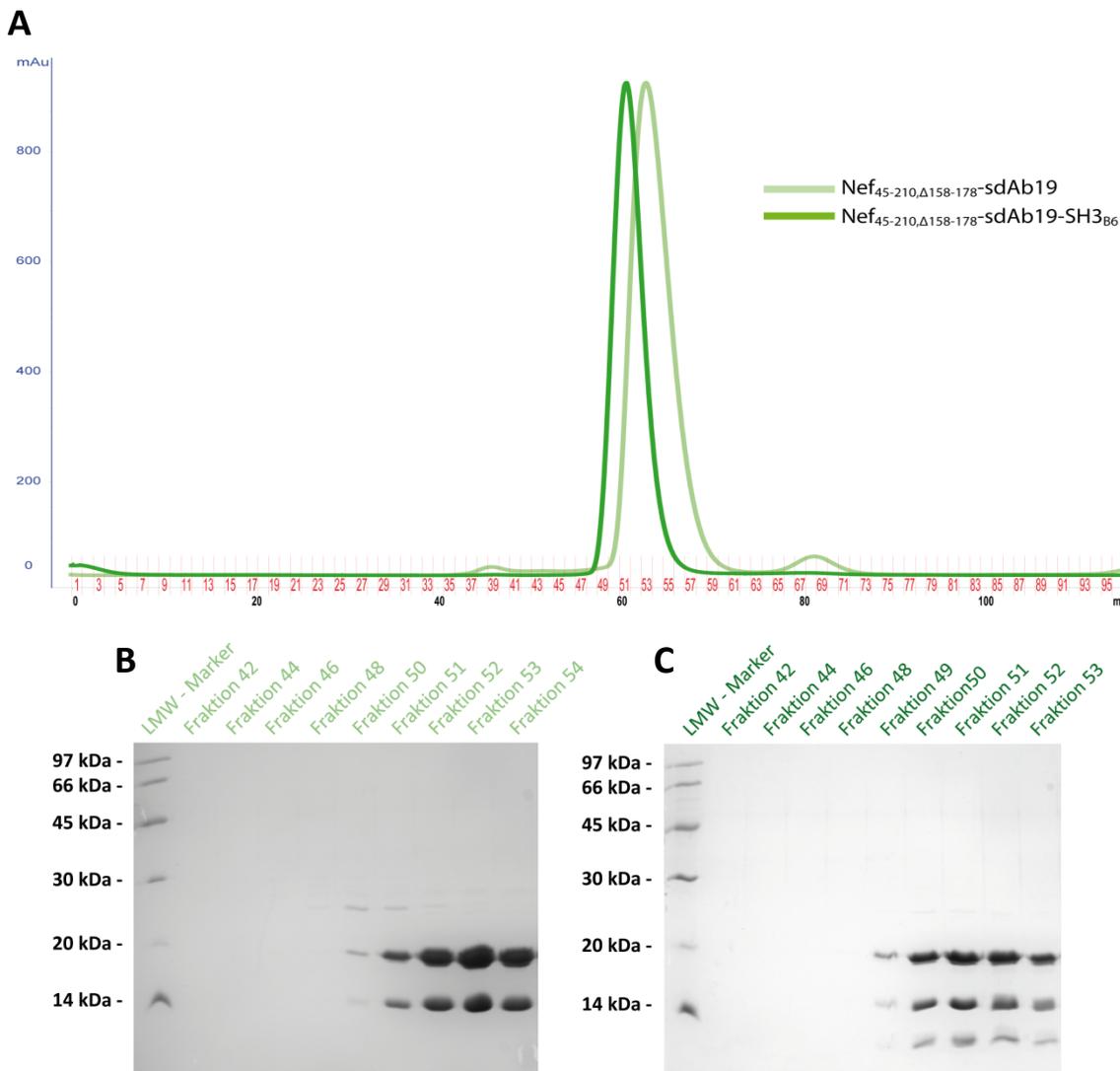


Abbildung 26: Formierung der Komplexe aus Nef_{45-210,Δ158-178} und sdAb19 ohne und mit SH3_{B6}-Domäne *in vitro*. Wie schon in Abbildung 24 beschrieben, wurden auch hier Nef_{45-210,Δ158-178}, sdAb19 und SH3_{B6} einzeln exprimiert, gereinigt und Nef mit sdAb19 *in vitro* vermischt und **(A)** der 1:1-Komplex über einer präparativen 16/60 Superdex 75 Gelfiltrationssäule gereinigt (hellgrün). **(B)** Die erhaltenen Proben wurden mittels SDS-PAGE auf dessen Reinheit überprüft und zu einem Teil der Probe zusätzlich SH3_{B6} gegeben und **(A)** dieser 1:1:1-Komplex ebenfalls auf die präparative Gelfiltrationssäule aufgetragen (dunkelgrün). **(C)** Daraus ergibt sich der 1:1:1-Komplex aus Nef, sdAb19 und SH3_{B6} wie im SDS-Gel zu erkennen. Dargestellt sind 20%ige SDS-Gele der denaturierenden SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Im SDS-Gel mit dem Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-Komplex **(B)** ist noch schwach die Bande einer GST-Verunreinigung bei etwa 26 kDa zu erkennen.

Es wurden Proteinkristalle der trimären Komplexe Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6} und Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19-SH3_{B6} erhalten und gelöst, wobei die Optimierung des Letzteren weit langwieriger und die Auflösung der Kristallstruktur nicht so gut war wie bei dem Komplex mit deletierter flexibler Schleife. Die Kristallisationsansätze des erst genannten Komplexes hingegen ergaben schnell wachsende und gut beugende Kristalle, was auf das Fehlen der C-terminalen flexiblen Schleife von Nef zurückgeführt werden kann.

Die Kristallisation des Komplexes Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6} wurde im *hanging drop* und *sitting drop*-Verfahren durchgeführt, wobei diese in sehr verschiedenen Kristallisationsbedingungen erfolgreich war. Aus der Bedingung mit 0,2 M Kaliumformat und 20% PEG 3350 wurde im *sitting drop*-Verfahren aus 10 mg/ml des Komplexes ein Kristall

erhalten und dessen Struktur im hausinternen Röntgenlabor unter Verwendung einer Röntgenbeugungsapparatur (Fa. Marresearch) bis zu einer Auflösung von 2,5 Å gelöst. Der Datensatz wurde mittels XDS prozessiert und die Struktur durch molekularen Ersatz unter Verwendung der Nef-Fyn Struktur 1EFN (Lee et al., 1996) sowie eines V_{HH} Einzeldomänen-Antikörpers mit dem pdb-Eintrag 1SJV (Spinelli et al., 2004) gelöst.

In parallelen Optimierungsplatten wurde durch die Zugabe verschiedener Salze als Kristallisationszusätze in der Bedingung 0,2 M Kaliumformat und 17,5% PEG 3350 und 0,35 M Ammoniumchlorid weit bessere Kristalle im *hanging drop*-Verfahren bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml erhalten, von denen einer bis 2,1 Å streute und am SLS-Synchrotron (Villingen, Schweiz) ein Röntgenbeugungsdatensatz aufgenommen wurde. Er hat eine primitive tetragonale Raumgruppe von $P4_1$ (76) und Dimensionen der Einheitszelle von $a = b = 73,07$ Å, $c = 71,25$ Å mit den Winkeln $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Zur Lösung der Struktur durch molekularen Ersatz wurde als Modell die zuvor gelöste und oben erwähnte Struktur von Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6} mit der Auflösung von 2,5 Å verwendet. In Tabelle 1 sind die Kristallparameter sowie die Statistiken der Datenaufnahme und der Modellverfeinerung zusammengefasst.

Tabelle 1: Kristallparameter und Statistiken der Datenaufnahme und der Modellverfeinerung der Struktur von Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6}.

Datenaufnahme und Kristall	
Röntgenquelle	SLS X10SA
Wellenlänge (Å)	0,979400
Raumgruppe	$P4_1$ (76)
Einheitszelle a, b, c, (Å) α, β, γ (°)	a=b=73,07, c=71,25 $\alpha=\beta=\gamma=90$
Auflösung (Å)	41,75-2,1
Aufgenommene Bilder	1-400
Anzahl der Reflexe	95957
Anzahl der einzigartigen Reflexe	47918
Vollständigkeit (%)	98,94
Multiplizität	2,0
Rsym (%)	7,9
$I/\sigma(I)$	17,16
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da)	2,56
Lösungsmittelgehalt (%)	52,02
Verfeinerung	
Atome (Protein, Lösungsmittel)	2459
Wasser	131
R-Faktor (%)	20,18
Rfree (%)	23,64
Rmsd vom Idealwert	
rms der Bindung	0,008
rms der Winkel	1,288
Durchschnittlicher B-Wert	2,97
Ramachandran Plot	
Favorisiert (%)	93,59
Erlaubt (%)	6,05
Verboten (%)	0,36
Fehlende Aminosäuren	35

4.1.3.2 Strukturelle Charakterisierung der V_{HH}-Domäne sdAb19

Während es von dem Komplex zwischen Nef und der SH3_{B6}-Domäne schon mehrere verschiedene Strukturen gibt und deshalb hier nicht detailliert auf die Charakteristika dieser Interaktion eingegangen wird, ist die in dieser Arbeit gelöste Struktur von sdAb19 gänzlich neu. Es ist die erste Struktur eines Antikörpers, der direkt mit einer nanomolaren Affinität an HIV-1 Nef bindet und dadurch verschiedene Funktionen von Nef inhibiert. SdAb19 weist eine sehr kompakte Struktur mit einer typischen Immunglobulin-Faltung (β -Fass Form) auf (Abbildung 27 A und B). Hierbei besteht diese aus insgesamt 12 β -Strängen, die nebeneinander mit ihren Seitenketten interagierend um den Mittelpunkt des Proteins kreisförmig angeordnet sind. Diese Anordnung der β -Stränge ist ein charakteristische Eigenschaft der Fab-Fragmente von Antikörpern (Harris et al., 1992). Dies gilt auch für die Anordnung des N- und C-Terminus, die sich an gegenüberliegenden Enden eines parallelen β -Faltstranges befinden (Abbildung 27 B). Die drei komplementierenden bestimmenden Regionen (CDR: *Complementarity Determining Region*) bilden die variablen Bereiche, mit der sdAb19 Antigene erkennt und bindet. CDR1 befindet sich zwischen den β -Strängen 3 und 4 (gelb), CDR2 von Mitte des β -Stranges 5 an bis zur Mitte des β -Stranges 6 (rot) und CDR3 vom Ende des β -Stranges 10 bis zum Ende des β -Stranges 11 (blau) (Abbildung 27 B). Das Ausmaß der Konservierung der Faltung und der Sekundärstrukturelemente wird durch eine strukturelle Überlagerung von sdAb19 mit einem anderen Einzeldomänen-Antikörper deutlich, der als Antigen Lysozym bindet (Abbildung 27 C und D, weiß) (pdb-Eintrag: 1MEL (Desmyter et al., 1996)). Die Bereiche, die sich ausschließlich voneinander unterscheiden, sind die variablen und flexiblen Bereiche der CDRs. Besonders CDR2 und CDR3 unterscheiden sich in ihrer Konformation und Länge, denn in sdAb19 ist CDR3 besonders kurz, während CDR2 hingegen länger ist als bei vielen anderen Einzeldomänen-Antikörpern (Hinz et al., 2010). Zudem besteht ein Unterschied darin, dass die Cysteine 24 und 97 bei sdAb19 keine Disulfidbrücke ausbilden und damit reduziert vorliegen (Abbildung 27 D), was aber keine Auswirkungen auf die Funktionalität des Antikörpers hat.

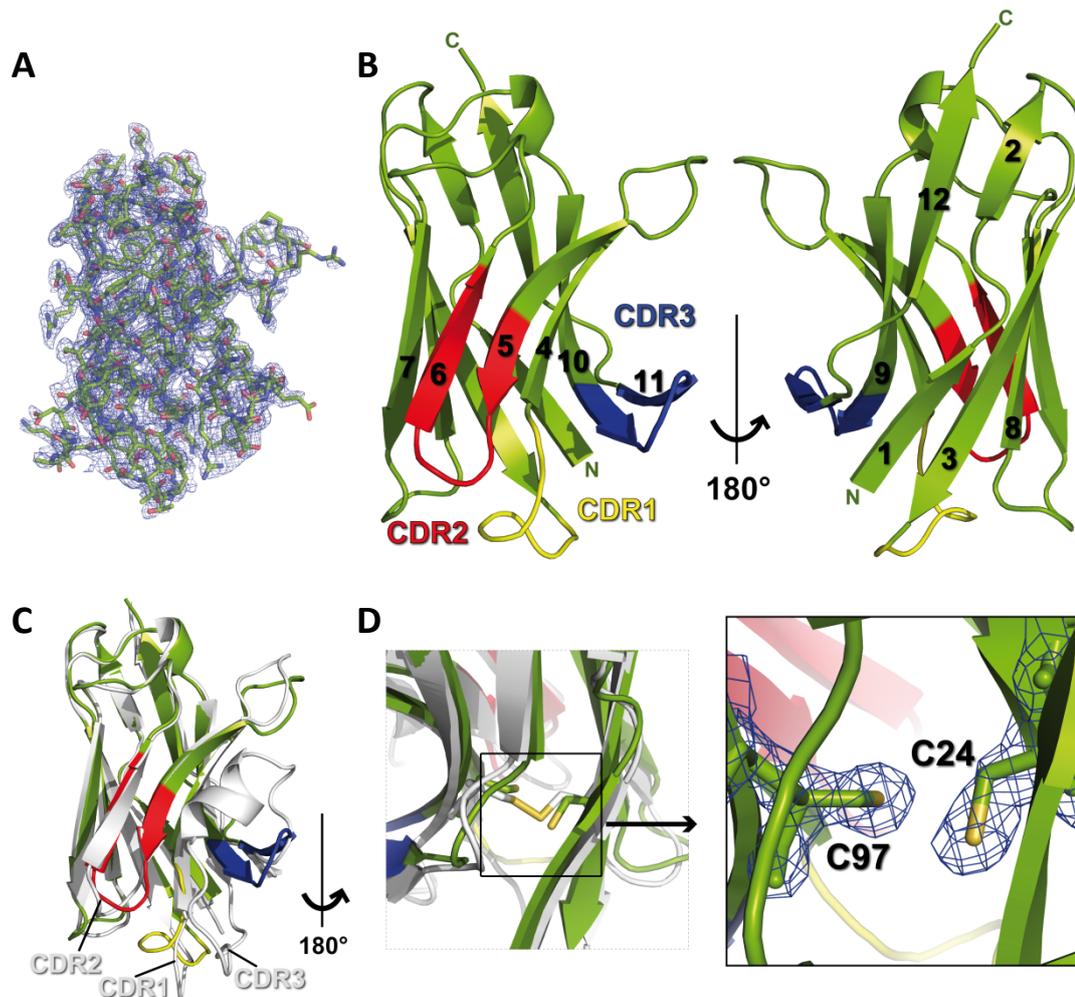


Abbildung 27: Struktur und Aufbau des Einzeldomänen-Antikörpers sdAb19. (A) Blick auf die Gesamtstruktur von sdAb19 inklusive der Elektronendichte-Karte. (B) Darstellung von sdAb19 im Schleifendiagramm mit Fokus auf CDR1 (rot), CDR2 (gelb) und CDR3 (blau) sowie auf die typische Immunglobulin-Faltung mit insgesamt 12 β -Strängen von der Seite und um 180° gedreht. Die β -Stränge sind hierbei von 1-12 durchnummeriert. (C) Strukturelle Überlagerung von sdAb19 (grün) mit der V_{HH} -Domäne des pdb-Eintrages 1MEL (weiß) (Desmyter et al., 1996). CDR1, CDR2 und CDR3 des Moleküls sind beschriftet. (D) Detailansicht der beiden intermolekularen Cysteine, die in 1MEL eine Disulfidbrücke ausbilden. In sdAb19 ist auch an der dargestellten Elektronendichte gut zu erkennen, dass Cystein 24 und 97 keine Disulfidbrücke ausbilden.

4.1.3.3 Charakterisierung der Bindungsfläche zwischen Nef und sdAb19

Als nächstes soll auf die Interaktion zwischen sdAb19 und Nef eingegangen werden. Neben einem Molekül des Einzeldomänen-Antikörpers sdAb19 befinden sich in der asymmetrischen Einheit (AU) des Kristalls ein $Nef_{45-210, \Delta 158-178}$ - und ein $SH3_{B6}$ -Molekül (Ketten A, B und C). Zusammen mit seinen Symmetrieverwandten, interagieren im Kristall jeweils ein sdAb19 mit zwei Nef-Molekülen. Zur Ermittlung der physiologisch relevanten Interaktionsfläche zwischen beiden, wurde mittels des PISA-Servers die Größe der Interaktionsflächen der Nef-sdAb19-Interaktion innerhalb und außerhalb der AU berechnet. Hierbei ist die Interaktionsfläche mit 735 \AA^2 zwischen sdAb19 und einem symmetrieverwandten Nef-Molekül deutlich größer, als die der Interaktion mit dem Nef innerhalb der asymmetrischen Einheit (442 \AA^2). Ein weiterer Hinweis für die richtige Interaktionsfläche sind die variablen CDRs, die an der Interaktion mit Nef beteiligt sein müssen, weil sie für die Antigenerkennung des Antikörpers zuständig sind

(Abbildung 28 C). Deshalb ist der Nef-sdAb19-Komplex mit der Interaktionsfläche von 735 \AA^2 der physiologisch relevante Komplex, der sich auch *in vivo* formiert (Abbildung 28 A).

Damit wurde ein Komplex erhalten, in dem zum einen die SH3_{B6}-Domäne wie erwartet durch hydrophobe und elektrostatische Interaktionen an das PxxP-Motiv von Nef sowie mit Phenylalanin 93 der RT-Schleife tief in die RT-Schleifen Bindetasche von Nef bindet (Abbildung 28 B, Vergleich Abbildung 11). Außerdem interagiert sdAb19 mit Bereichen des C-Terminus von Nef, die sich an der gegenüberliegenden Seite der SH3_{B6}-Bindungsfläche befinden. Dadurch sind der C-Terminus von sdAb19 und der N-Terminus von SH3_{B6} in Hinblick auf eine Verknüpfung, wie sie für Neffin geplant war, sehr weit voneinander entfernt. Die Auflistung der an der Nef-sdAb19 Interaktion involvierten Aminosäurereste in Tabelle 2 zeigen, dass auf Seiten von Nef im Bereich der AS 188 bis 205 viele Reste des C-Terminus beteiligt sind, wobei aber auch eine Beteiligung von Resten aus der C-terminalen flexiblen Schleife (152-184) aufgrund dessen starke Verkürzung nach der Deletion der Reste 158-178 in dieser Struktur nicht ausgeschlossen werden kann (Abbildung 28 B). Auf Seiten des sdAb19 interagieren vor allem Reste der CDR2 mit Nef, wobei aber auch CDR1 und CDR3 an der Interaktion beteiligt sind (Abbildung 28 C).

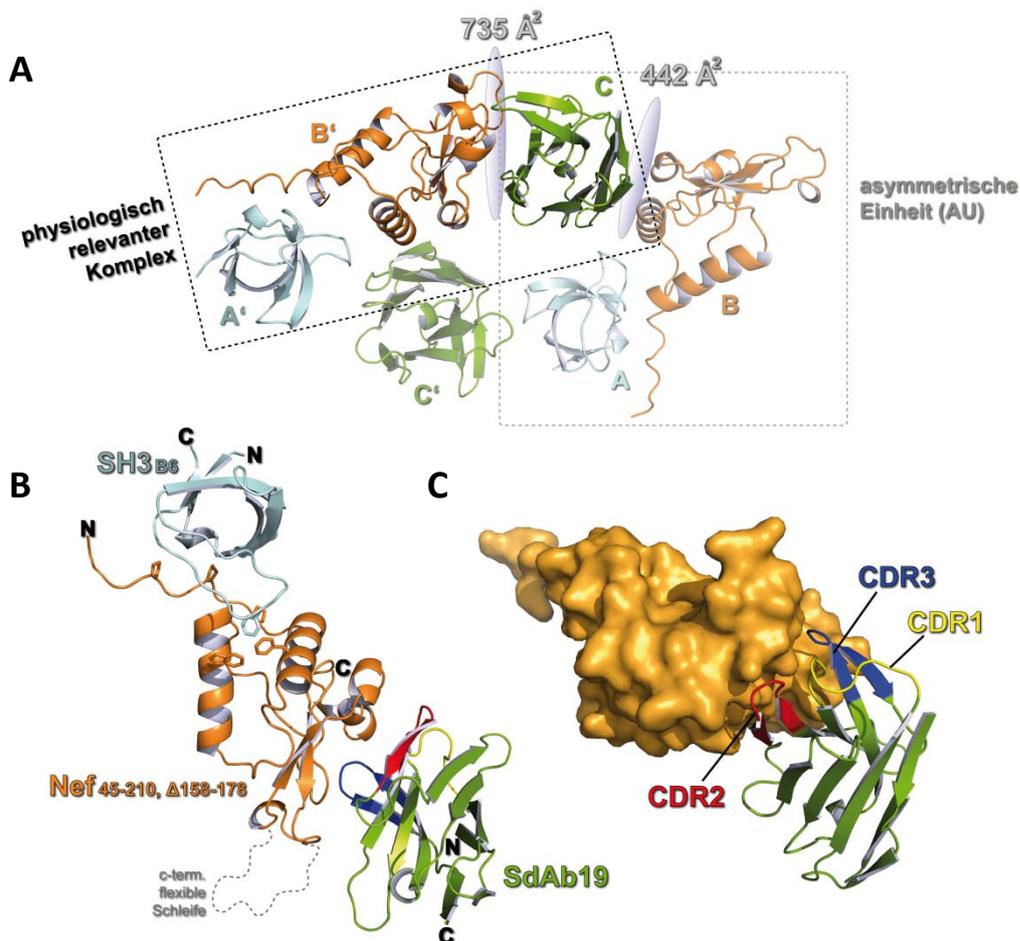


Abbildung 28: Struktur des Komplex Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6}. (A) Die asymmetrische Einheit (AU) besteht aus den drei Molekülen SH3_{B6} (Kette A: hellblau), Nef_{45-210,Δ158-178} (Kette B: orange) und sdAb19 (Kette C: grün). Im Kristall interagieren jeweils ein Nef mit zwei sdAb19-Molekülen, wobei die Interaktionsfläche mit dem Nef innerhalb der AU 442 \AA^2 und mit dem Nef-Molekül außerhalb der AU 735 \AA^2 beträgt. (B) Der physiologisch relevante Komplex besteht aus sdAb19 der Kette C und dem symmetrieverwandten Nef_{45-210,Δ158-178} der Kette B' und SH3_{B6} der Kette A'. Die fehlenden Bereiche der C-terminalen flexiblen Schleife wurden schematisch eingezeichnet und die N- und C-Termini sind beschriftet. (C) Es wird deutlich, dass hauptsächlich CDR2 (rot), aber auch CDR1 (gelb) und CDR3 (blau) mit Nef interagiert.

Zur Analyse der an der Interaktion beteiligten Reste von Nef und sdAb19 wurden zunächst mittels des PISA Servers biophysikalische Eigenschaften wie die Größen der zugänglichen und verdeckten Oberflächen und die Solvatationsenergien Δ^iG jedes Restes berechnet (Tabelle 2). Jeder einzelne Rest ist aufgrund seiner Position im Protein mit einer bestimmten Fläche dem Lösungsmittel ausgesetzt. Diese wird umso kleiner, je mehr sich der Rest in der Interaktionsfläche befindet und an der Interaktion beteiligt ist. Im Umkehrschluss lässt sich die durch die Interaktion verringerte Fläche als verdeckte Oberfläche beschreiben. Außerdem kann für jeden Rest die Abnahme der freien Energie durch Solvatation (Δ^iG) berechnet werden. Dieser wird als Differenz zwischen der Solvatationsenergie der Reste im getrennten und interagierenden Komplex in kcal/mol angegeben. Wie aus der Tabelle 2 zu entnehmen, befinden sich von Nef 25 Reste und von sdAb19 18 Reste in den Interaktionsflächen des Nef-sdAb19-Komplexes (Tabelle 2: jeweils dick gedruckt), da ihre sonst für Lösungsmittel zugänglichen Flächen durch die Interaktion verdeckt werden und sich ihre Werte für die freie Solvatationsenergie ändern. Werden in der Umgebung dieser Aminosäuren in einer Distanz zwischen 2-3,5 Å nach möglichen interagierenden Resten gesucht, sind an der Bindung von Nef (Tabelle 2: gelb umrandet) und auch von sdAb19 (Tabelle 2: grün umrandet) lediglich 7 Reste direkt beteiligt und essenziell. Auf Seiten von Nef sind das Tyrosin 139, Lysin 148, Glutamat 155, Arginin 188, Lysin 192, Glutamat 201 und Histidin 203. Diese interagieren über Wasserstoffbrückenbindungen oder ionischen Bindungen mit den 7 Resten Asparagin 35, Tryptophan 49, Serin 56, Threonin 59, Aspartat 60 und 63, sowie Serin 103 von sdAb19. Andere Reste wie Isoleucin 137, Valin 150, Histidin 196, Methionin 198 und Leucin 202 von Nef und Leucin 52, Tyrosin 58, Arginin 100 und Glycin 102 von sdAb19 bilden keine direkten Bindungen aus, liegen aber in der Interaktionsfläche und stabilisieren die Interaktion. Insbesondere bilden die hydrophoben Aminosäurereste Methionin 198_{Nef} und Leucin 202_{Nef} mit Leucin52_{sdAb19} im Zentrum einen hydrophoben Bereich, der Wassermoleküle herausdrängt (Abbildung 29).

Tabelle 2: Auflistung der interagierenden Reste zwischen Nef und sdAb19. SdAb19 (rechts) interagiert hauptsächlich mit der Schleife CDR2 (rot), aber auch mit Resten von CDR1 (gelb) und CDR3 (blau) mit C-terminalen Bereichen von Nef. Die an der Interaktion beteiligten Reste sind fett gedruckt. Für jeden Aminosäurerest wurde mit Hilfe des PISA-Servers die wasserzugängliche Gesamtoberfläche (ASA: *Accessible Surface Area*) und die durch die Interaktion verdeckte Oberfläche (BSA: *Buried Surface Area*) berechnet, die jeweils in absoluten Zahlen und prozentual angegeben sind. Außerdem ist für jeden Rest die durch die Komplexbildung resultierende Solvatationsenergie Δ^1G in kcal/mol angegeben. Bei sdAb19 sind die Bereiche der CDRs farblich passend hinterlegt.

HIV-1 Nef			
AS-Rest	Zugängliche Oberfläche (ASA) [\AA^2]	Verdeckte Oberfläche (BSA) [\AA^2]	Δ^1G [kcal/mol]
G71	124,19	0,00	0,00
....			
T132	5,41	2,23 (\approx 40%)	0,00
P133	72,72	3,51 (\approx 5%)	0,06
G134	27,36	19,20 (\approx 70%)	-0,03
P135	77,03	25,75 (\approx 30%)	0,13
G136	6,22	0,00	0,00
I137	61,80	48,85 (\approx 80%)	0,54
R138	23,32	0,00	0,00
Y139	33,97	32,74 (\approx 100%)	-0,08
....			
K148	27,90	16,71 (\approx 60%)	-0,62
L149	5,86	0,00	0,00
V150	24,76	15,57 (\approx 60%)	0,25
P151	13,65	3,93 (\approx 30%)	-0,04
V152	73,61	0,50 (\approx 1%)	0,01
E153	116,74	0,00	0,00
P154	93,03	7,87 (\approx 10%)	0,13
E155	134,17	98,60 (\approx 75%)	-0,77
K156	68,14	10,79 (\approx 15%)	0,17
V157	144,94	16,02 (\approx 10%)	0,25
....			
R188	83,35	25,69 (\approx 30%)	-0,79
F189	31,95	0,00	0,00
D190	24,39	5,27 (\approx 20%)	-0,09
S191	61,72	0,00	0,00
K192	121,51	48,97 (\approx 40%)	-0,98
L193	4,67	0,00	0,00
A194	8,61	0,00	0,00
F195	161,81	5,77 (\approx 4%)	-0,07
H196	87,69	47,52 (\approx 55%)	0,19
H197	31,82	2,04 (\approx 6%)	-0,02
M198	72,95	64,68 (\approx 90%)	1,29
A199	0,29	0,00	0,00
R200	116,13	0,00	0,00
E201	128,15	98,59 (\approx 77%)	-0,60
L202	102,92	98,74 (\approx 96%)	1,12
H203	44,82	35,66 (\approx 80%)	0,50
P204	75,61	0,00	0,00
E205	98,57	0,12 (\approx 0,5%)	0,00
....			
K208	232,73	0,00	0,00

SdAb19			
AS-Rest	Zugängliche Oberfläche (ASA) [\AA^2]	Verdeckte Oberfläche (BSA) [\AA^2]	Δ^1G [kcal/mol]
Q5	155,23	0,00	0,00
....			
G28	72,16	0,00	0,00
F29	44,15	0,00	0,00
....			
N35	42,65	34,64 (\approx 80%)	-0,34
....			
R46	198,23	54,46 (\approx 27%)	-0,29
R47	114,40	20,68 (\approx 18%)	-0,33
E48	54,56	17,12 (\approx 30%)	0,16
W49	60,51	44,23 (\approx 73%)	0,58
V50	0,00	0,00	0,00
A51	0,00	0,00	0,00
L52	28,86	28,86 (100%)	0,46
I53	7,04	0,00	0,00
T54	31,60	31,60 (100%)	-0,03
I55	75,19	12,54 (\approx 17%)	0,20
S56	67,39	6,88 (\approx 10%)	-0,06
G57	36,07	0,00	0,00
Y58	150,27	97,68 (\approx 65%)	1,42
T59	70,12	42,14 (\approx 60%)	-0,44
D60	76,07	67,37 (\approx 90%)	-0,48
Y61	53,40	10,36 (\approx 20%)	0,03
A62	14,89	0,67 (\approx 5%)	0,01
D63	133,06	55,40 (\approx 40%)	-0,51
....			
R99	45,64	0,00	0,00
R100	74,72	60,27 (\approx 80%)	-1,03
V101	79,04	0,00	0,00
G102	60,84	47,08 (\approx 78%)	0,39
S103	97,45	69,17 (\approx 70%)	-0,16
E104	130,68	0,00	0,00
....			
L107	22,44	0,00	0,00

Zur detaillierten Analyse der Wechselwirkungen der sieben direkt an der Interaktion beteiligten Reste von Nef und sdAb19 werden im Folgenden die Aminosäurereste in der Interaktionsfläche der Struktur untersucht (Abbildung 29). Entlang dieser interagieren diese über verschiedene Bindungen wie durch Wasserstoffbrückenbindungen und ionischen Wechselwirkungen. Die Seitenketten von Histidin 203, Glutamat 155 und 201, Tyrosin 139 und Lysin 192 von Nef bilden Wasserstoffbrücken mit den Resten von Serin 103, Typtophan 49, Asparagin 35, Serin 56, Aspartat 60 und Threonin 59 von sdAb19 aus (Abbildung 29 B). Unterdessen interagiert die Seitenkette des Arginin 188 von Nef mit der Seitenkette des Aspartat 63 von sdAb19 sowie Lysin 148 von Nef als zweiter interagierender Rest mit Aspartat 60 von sdAb19 durch ionische Wechselwirkungen (Abbildung 29 B).

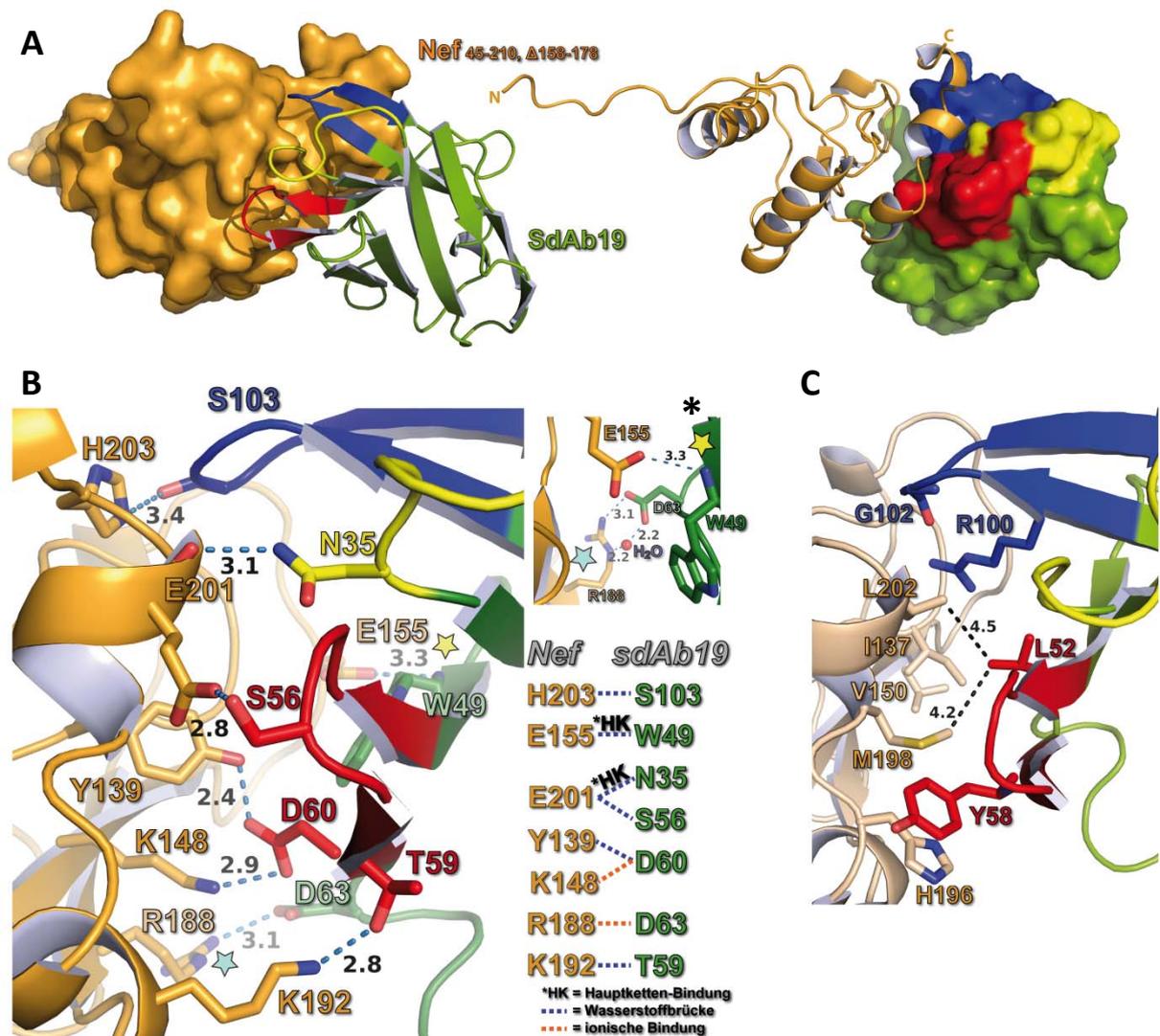


Abbildung 29: Struktur und Analyse des Bindungsinterfaces zwischen Nef und sdAb19 im Nef_{45-210, Δ158-178}-sdAb19-Komplex. (A) Überblick über die Interaktion zwischen Nef (orange) und sdAb19 (grün) als Oberflächendarstellung und im Schleifendiagramm in der CDR1 (gelb), CDR2 (rot) und CDR3 (blau) direkt beteiligt sind. (B) Darstellung der an der Interaktion direkt und (C) indirekt beteiligten Aminosäurereste von Nef und sdAb19. * Die Guanidinogruppe der Seitenkette von R188_{Nef} und die Carboxygruppe des Restes von D63_{sdAb19} interagieren zusätzlich über einen Wasser-vermittelten Kontakt mit einem Abstand zum Wasser von 2,2 Å. Die Abstände der interagierenden Reste sind in Ångström angegeben.

4.1.3.4 Untersuchung des Wassernetzwerkes in der Bindungsfläche zwischen Nef und sdAb19

Wie für jedes Protein und dessen Funktionsfähigkeit, ist auch für Nef die Ausbildung einer Hydrathülle essenziell, was neben hydrophoben Effekten mit Anlagerungen von Wassermolekülen auf der Proteinoberfläche einhergeht. Hierbei bilden sich aufgrund des Dipolcharakters des Wassers Netzwerke auf der Oberfläche aus, in denen zum einen Wassermoleküle mit polaren Gruppen auf der Proteinoberfläche interagieren sowie untereinander über van-der-Waals- und Dipol-Kräfte wechselwirken. In der Kristallografie findet die Kristallisation von zytosolischen Proteinen ebenfalls in wässrigen Lösungen statt, so dass je nach Auflösung der prozessierten Strukturen und Stärke der Fixierung des Wassers auch Elektronendichte von Wassermolekülen auf der Proteinoberfläche erhalten werden. Solche Wassermoleküle befinden sich oft auch an der Oberfläche oder in Furchen in der Nähe von "hotspots", das heißt in der Nähe einzelner Reste, die wesentlich zur Bindungsspezifität beitragen. Vergleicht man Liganden-gebundene und frei vorliegende Strukturen mit ähnlicher Auflösung, lassen sich aufgrund der Ligandenbindung neben Veränderungen der Sekundärstrukturelemente auch Veränderungen des Wassernetzwerkes und die Ausbildungen von Furchen beobachten. Wassermoleküle und Furchen, die innerhalb der Interaktionsfläche auch im Liganden-ungebundenen Zustand vorhanden sind, könnten Ziele für kleine molekulare Inhibitoren und damit für eine zielgerichtete Wirkstoffentwicklung darstellen. Denn ein kleines Molekül was auf gleicher Weise wie der Ausgangsligand an die Proteinoberfläche bindet, könnte identische inhibitorische Effekte verursachen.

Zur Untersuchung struktureller Veränderungen von Nef in der Bindungsfläche zwischen Nef und sdAb19, wurden strukturelle Überlagerungen von Nef aus der Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6}-Komplexstruktur dieser Arbeit mit den Nef-Molekülen der Strukturen Nef_{45-210,Δ158-178}-SH3_{A1} (pdb: 3REA (Breuer et al., 2011), Auflösung. 2,00 Å) und Nef₄₅₋₂₁₀-SH3_{B6} (pdb: 3RBB (Horenkamp et al., 2011), Auflösung 2,35 Å) durchgeführt. Alle drei Strukturen kristallisierten dabei in unterschiedlichen Raumgruppen. In Abbildung 30 sind die Überlagerungen von Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19 (orange-grün) mit Nef_{45-210,Δ158-178} (grau) (Abbildung 30 A und B) sowie mit Nef₄₅₋₂₁₀ (weiß) (Abbildung 30 C und D) zu erkennen. Bereits die grobe Darstellung des Wassernetzwerkes auf der Proteinoberfläche zeigt, dass sich dieses zwischen den beiden Strukturen 3REA (Abbildung 30 A) und 3RBB (Abbildung 30 C) kaum unterscheidet und eher konserviert ist. Deutlicher sind die Unterschiede in der Struktur und des Wassernetzwerkes (blaue Sphären) beim sdAb19 gebundenen Nef. Einige Wassermoleküle (rot markiert mit 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10) bilden ein Netzwerk zwischen Nef und sdAb19, fixiert durch beiderseitige Interaktionen, während andere aufgrund der Ligandenbindung verdrängt sind (gelb markiert mit 6, 7, 8, 11). Andere wiederum sind in allen drei Strukturen konserviert und an der Oberfläche fixiert (blau/grau bzw. blau/weiße Sphären). Durch die direkte Interaktion einiger Reste wie E201_{Nef} mit S56_{sdAb19}, K192_{Nef} mit T59_{sdAb19}, Y139_{Nef} und K148_{Nef} mit D60_{sdAb19} werden Reste von Nef zu sdAb19 hingezogen (orange), während andere dadurch weggeschoben werden (weiß bzw. grau transparent). Dadurch entsteht wie in Abbildung 30 in B und D zu erkennen eine neue Furche, während andere konservierte Bereiche mögliche Ansatzpunkte zur Entwicklung kleiner molekularer Inhibitoren dienen könnten.

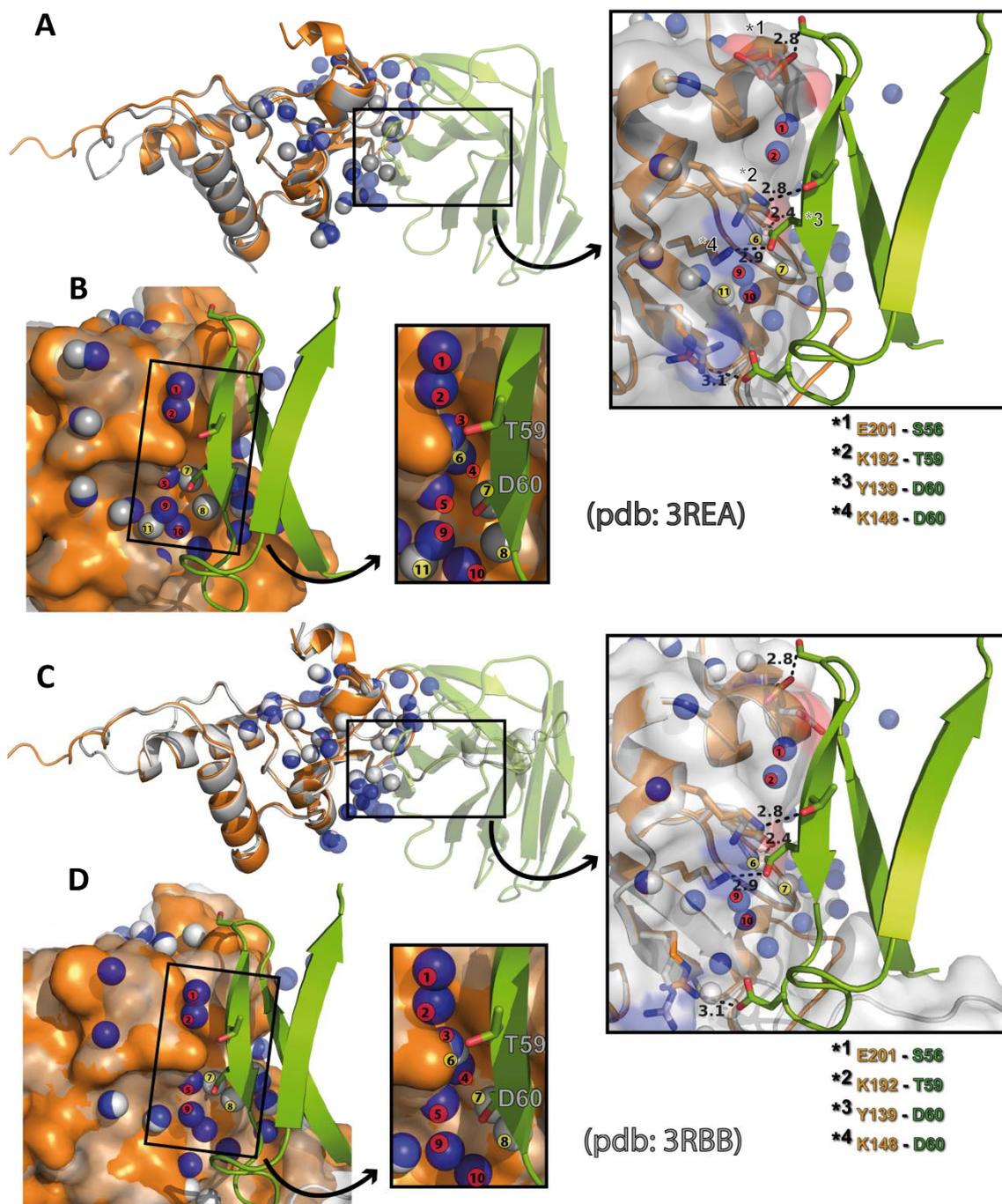


Abbildung 30: Analyse der strukturellen und biochemischen Veränderungen von Nef durch die Bindung von sdAb19 und Überlagerung mit zwei weiteren Nef-Strukturen. (A) Überblick und Detailansicht auf die Nef-sdAb19-Interaktionsfläche. Die strukturellen Veränderungen durch die Interaktion der beschriebenen Reste von Nef (orange) mit sdAb19 (grün), im Vergleich zur Nef Struktur des pdb-Eintrags 3REA (grau), sind als Schleifendiagramm und mit transparenter Oberfläche dargestellt. **(B)** Oberflächendarstellung der Überlagerung von Nef (orange) und Nef_{3REA} (grau transparent) mit Fokus auf eine durch die sdAb19 Interaktion entstehende Furche auf der Nef-Oberfläche mit interagierendem Wassernetzwerk. Die Wassermoleküle von Nef sind blau und die der 3REA-Struktur grau dargestellt. **(C)** Die identische Darstellung des gesamten Nef-sdAb19-Komplexes und der Interaktionsfläche zwischen Nef (orange) und sdAb19 (grün) wie in **(A)**, aber mit Überlagerung der Nef Struktur des pdb-Eintrags 3RBB, ebenso als Schleifendiagramm mit transparenten Oberflächen. **(D)** Die ebenfalls identische Oberflächendarstellung der Überlagerung von Nef (orange) und Nef_{3RBB} (weiß transparent) wie in **(B)** mit Fokus auf Veränderungen der Nef-Oberfläche und des Wassernetzwerkes.

4.1.3.5 Strukturelle Charakterisierung des Einflusses der C-terminalen flexiblen Schleife auf die Bindung von sdAb19 an Nef

In ITC-Messungen der Abbildung 17 wurde durch die Deletion von 21 Resten der C-terminalen flexiblen Schleife von Nef eine 2,5-fach geringere Affinität zu sdAb19 erhalten, was die Frage aufwirft ob dieses Strukturelement ebenfalls mit sdAb19 interagiert. Dazu wurde die Kristallisation des Komplexes aus Nef₄₅₋₂₁₀, sdAb19 mit und ohne die SH3_{B6}-Domäne angestrebt. Es konnten nach einigen Verbesserungsschritten mittels *hanging drop* in der Kristallisationsbedingung 0,1 M HEPES, (pH 7,5) mit 10% PEG 4000, 0,1 M Magnesiumchlorid und 0,12 M Natriumthiocyanat mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml Kristalle des Komplexes Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19-SH3_{B6} erhalten werden. Die Kristalle beugten am SLS-Synchrotron (Villingen, Schweiz) bis zu einer Auflösung von 3,2 Å. Der aufgenommene Röntgenbeugungsdatensatz ergab für den Kristall die hexagonale Raumgruppe P6₅22 (179) und Dimensionen der Einheitszelle von a = 72,050, b = 72,050 und c = 354,300 mit den Winkeln $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. Zur Lösung der Struktur durch molekularen Ersatz wurde die in dieser Arbeit zuvor gelöste Struktur Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6} verwendet. In Tabelle 9 (Anhang) sind die Kristallparameter sowie die Statistiken der Datenaufnahme und der Modellverfeinerung zusammengefasst. Die Komplexstruktur entspricht genau der bereits zuvor beschriebenen Struktur von Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6}, außer dass hier die C-terminale flexible Schleife komplett vorhanden ist. Innerhalb der gelösten Struktur ist diese Schleife aufgrund der Flexibilität nicht gut aufgelöst. Die flexible Schleife kann hierbei am N-terminalen Ende von Position 152-156 und am C-terminalen Ende von 179-184 aufgelöst werden, so dass eine umfassende Stabilisierung der Schleife nicht stattfindet. Hierbei befinden sich definierte Reste wie Lysin 182 oder Aspartat 179 ca. 4,4 Å bzw. 6,4 Å von den am nächsten gelegenen Resten von sdAb19 entfernt und damit zu weit für direkte Interaktionen (Abbildung 31).

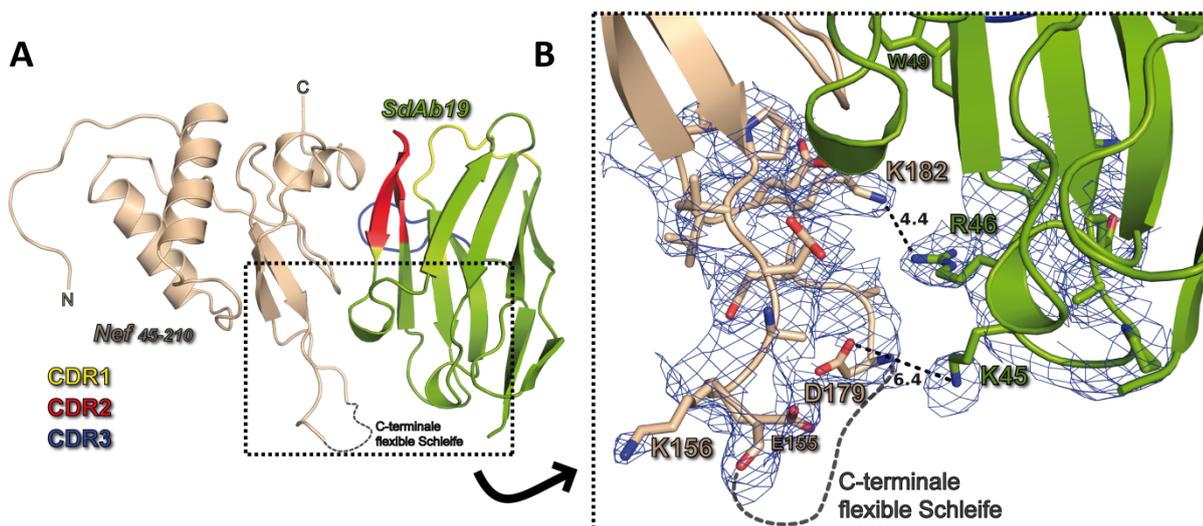


Abbildung 31: Struktur und Analyse der C-terminalen flexiblen Schleife hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Interaktion mit sdAb19. (A) Gesamtansicht der Komplexstruktur von Nef₄₅₋₂₁₀ und sdAb19. Die durch unzureichende Auflösung nicht definierten Bereiche der C-terminalen flexiblen Schleife von Nef wurden mittels gestrichelter Linie ergänzt. **(B)** In der Elektronendichtekarte ist zu erkennen, dass sich keine Aminosäurereste der Schleife von Nef und von sdAb19 näher als 4,4 Å zueinander befinden.

4.1.4 Mutationsstudien innerhalb der Interaktionsfläche von Nef und sdAb19

4.1.4.1 Biochemische Mutationsstudien auf sdAb19 und Nef in Hinblick auf die Nef-Bindung

Um zu überprüfen, ob es sich bei der zuvor beschriebenen Bindungsfläche zwischen Nef und sdAb19 um das richtige Interface und nicht um kristallisationsbedingte Kontakte handelt, wurden in sdAb19 die Mutationen D60R, G102R und S103E eingefügt, die voraussichtlich die Interaktion mit Nef unterbinden oder zumindest beeinträchtigen sollen. Aspartat 60 im CDR2 von sdAb19 befindet sich als Schlüsselrest inmitten der Bindungsfläche zwischen Nef und sdAb19 und bildet zum einen mit Lysin 148 eine Salzbrücke und zum anderen mit Tyrosin 139 eine Wasserstoffbrücke aus (Abbildung 32 A). Durch die Mutation zu einem positiv geladenen und längeren Arginin soll diese Interaktionen gestört und damit die Interaktion zwischen Nef und sdAb19 beeinträchtigt werden (Abbildung 32 B). Glycin 102 und Serin 103 befinden sich in der CDR3-Region von sdAb19, wobei das Serin eine Wasserstoffbrücke mit Histidin 203 von Nef ausbildet. Durch die Mutation zu einem längeren Glutamat sowie die des benachbarten Glycins 102 zu einem längeren und positiv geladenen Arginin sollte auch hier die Interaktion mit Nef gestört werden (Abbildung 32 B, oben). Diese Doppelmutationen wurden in sdAb19 in Kombination mit der D60R-Mutation eingebracht. Dadurch werden die Mutanten sdAb19_{D60R}, sdAb19_{G102R,S103E}, sowie eine mit allen drei Mutationen namens sdAb19_{3*} erhalten. Außerdem wurden die gleichen Aminosäuren in Nefin mutiert (Nefin_{3*}), um zu testen, ob sdAb19 von Nefin nicht mehr an Nef bindet und sich die Affinität damit auf den Anteil der SH3_{B6}-Domäne reduziert (Abbildung 32 B, Mitte). Alle Mutanten wurden in der analytischen Gelfiltration und in ITC-Experimenten eingesetzt, um den Einfluss auf die Bindung an Nef zu überprüfen. Die in Abbildung 32 vorhandenen Nef-Mutanten (B, unten) werden später in Abschnitt 4.1.4.2 beschrieben und verwendet.

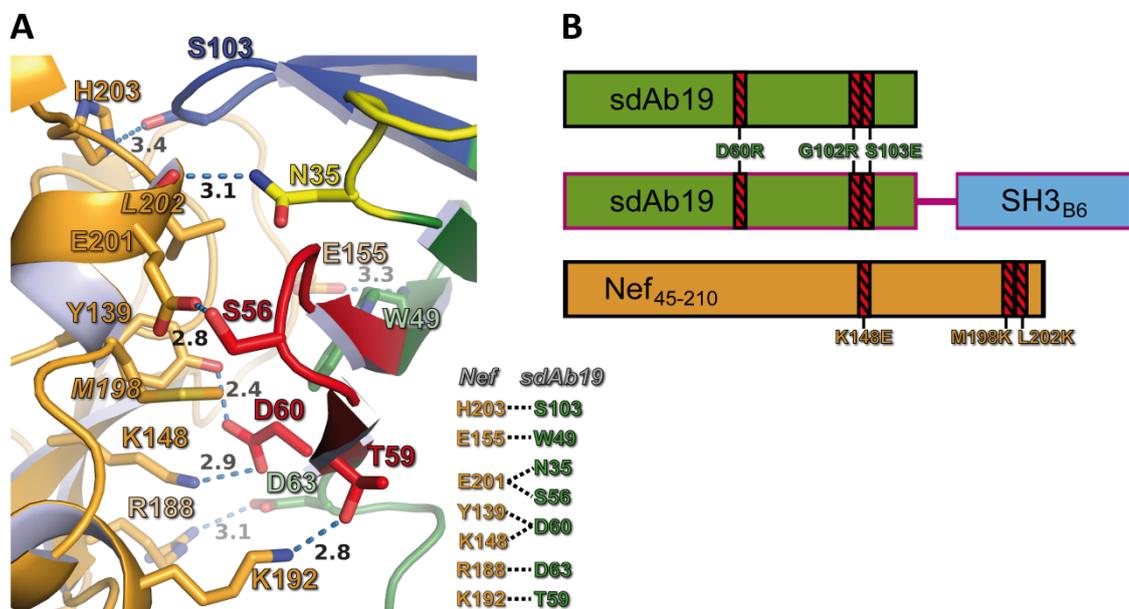
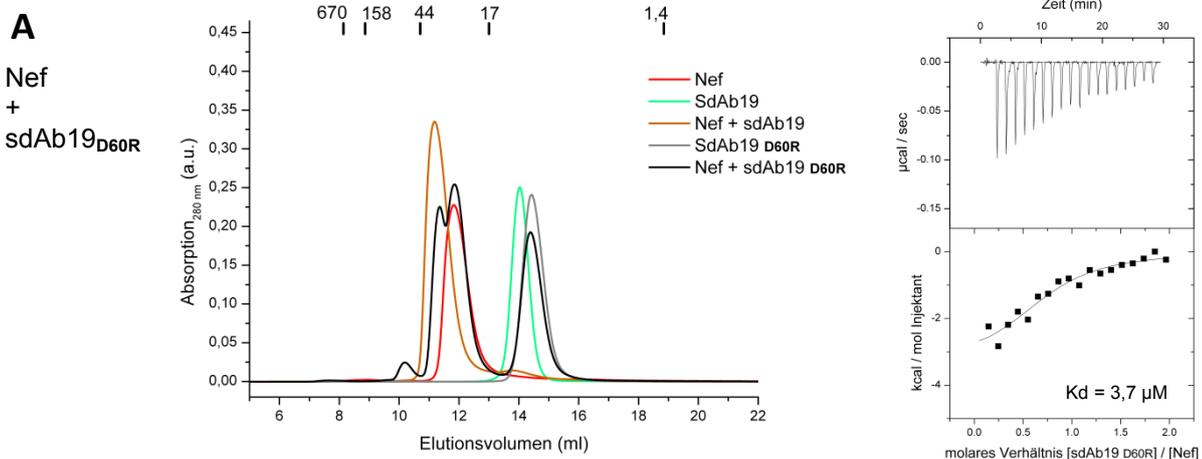
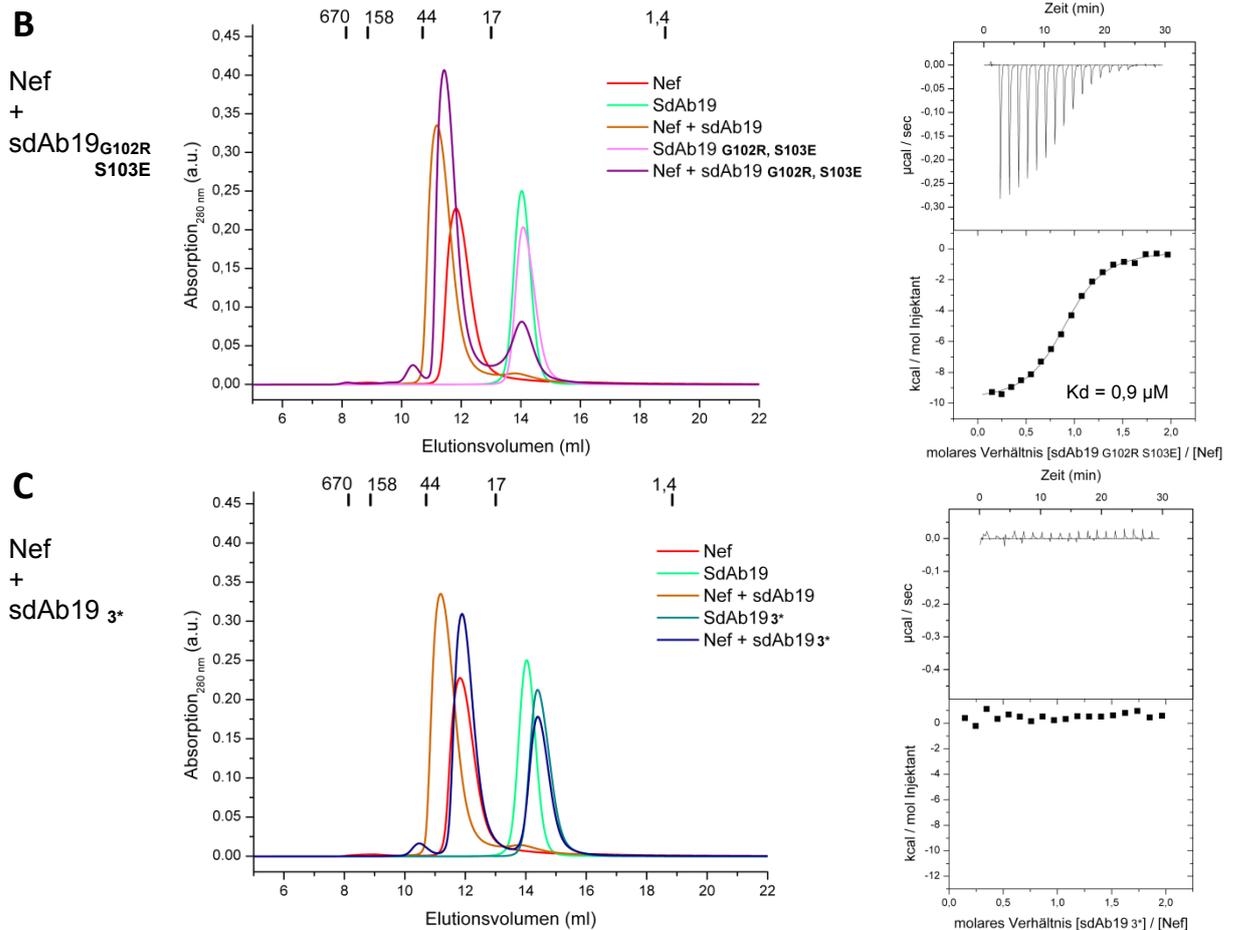


Abbildung 32: Analyse der Bindungsfläche zwischen Nef_{45-210,Δ158-178} und sdAb19, sowie die Beschreibung von bindungsdefizienten Mutanten. (A) Darstellung der an der Interaktion direkt beteiligten Reste von Nef und sdAb19. Die Abstände der interagierenden Reste sind in Ångström angegeben. (B) Zur Überprüfung der Bindungsfläche bzw. Reduzierung der Affinität wurden zum einen auf Seiten des sdAb19 drei Aminosäurereste sowie auf Seiten des Nef Proteins drei Reste mutiert. Die Bereiche der Proteine in denen die Mutationen in sdAb19 (oben), Nefin (mittig) und Nef (unten) eingebracht wurden, sind schematisch dargestellt.

In den ITC-Experimenten mit den sdAb19-Mutanten und Nef ist zu beobachten, dass die Mutation des Schlüsselrestes Aspartat 60 von sdAb19 zu einem Arginin im Vergleich zur Interaktion zwischen sdAb19 Wildtyp und Nef zu einer 100-fach schlechteren Affinität von 3,7 μM führt (Abbildung 33). Dies spiegelt sich auch in dem Laufverhalten in der analytischen Gelfiltration wider, in der der Komplex mit Nef in sdAb19_{D60R}-gebundener und -ungebundener Form vorliegt und bei etwa 11,8 ml eng nebeneinander laufen und damit nur ein Teil an Nef bindet (Abbildung 33 A). Die Doppelmutante sdAb19_{G102R,S103E} interagiert nur etwa 25-fach schlechter mit Nef als der sdAb19 Wildtyp (Abbildung 33 B), so dass der Komplex mit Nef normal geformt wird. Die Stöchiometrie der Bindungen beträgt in beiden Messungen etwa 1:1 und die Enthalpieänderungen liegen im negativen Bereich. Interessanterweise ist die ermittelte Entropieänderungen der Reaktion zwischen Nef und SdAb19_{G102R,S103E} nur leicht im negativen Bereich, und zwischen Nef und sdAb19_{D60R} im positiven Bereich, so dass bei der letzteren Reaktion die Entropie leicht zunimmt. Beide Reaktionen laufen aber mit einer negativen freien Enthalpie spontan ab und sind daher exergon.

Die Trippelmutante sdAb19_{3*}, in der alle drei Mutationen D60R, G102R und S103E vorhanden sind, bindet hingegen gar nicht mehr an Nef (Abbildung 33 C), so dass in den Experimenten gezeigt werden konnte, dass zum einen die untersuchte Bindungsfläche die richtige ist und dass durch die gezielte Mutationen ausgewählter Reste die Affinität beliebig variiert werden kann, was für eine zukünftige zielgerichtete Wirkstoffentwicklung wichtig sein kann. In allen drei analytischen Gelfiltrationen mit den sdAb19-Mutanten ist ein kleiner Peak bei etwa 10 ml Elutionsvolumen zu erkennen, bei dem es sich um kleine Mengen aggregiertes Protein handelt. Die letztere dreifache Mutation wurde in Neffin_{3*} ebenfalls eingebracht, so dass in diesem Fall sdAb19 nicht mehr an Nef bindet, aber dessen SH3_{B6}-Domäne weiterhin schon. Dadurch liegt die im ITC-Experiment ermittelte Affinität zu Nef mit 23,3 nM, sowie die Bindungsenergien der Reaktion in dem gleichen Bereich wie zwischen der SH3_{B6}-Domäne und Nef (Abbildung 34 A, Vergleich Abbildung 17 A). In der analytischen Gelfiltration läuft der Nef-Neffin_{3*}-Komplex deutlich kleiner als der Nef-Neffin-Komplex, aber auch etwas größer als der Nef-sdAb19-SH3_{B6}-Komplex, was möglicherweise mit dem größeren hydrodynamischen Radius von Nef-Neffin_{3*} zu erklären ist (Abbildung 34 B). Während Nef-sdAb19-SH3_{B6} einen stabilen Komplex bilden, bindet Neffin_{3*} nur mit der SH3_{B6}-Domäne an Nef, während die sdAb19-Domäne flexibel in Lösung ist. Auch hier sind Aggregationen von Neffin im Ausschlussvolumen zwischen 7 und 9 ml Elutionsvolumen zu erkennen.





	K _d (µM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol/deg)	T ΔS (kcal/mol)	n (^[L] / _[L])
(A) SdAb19 _{D60R} /Nef	3,7	-7,40	-3,38 (±0,56)	0,014	4,02	0,74 (±0,009)
(B) SdAb19 _{G102R,S103E} /Nef	0,92	-8,25	-9,93 (±0,56)	-0,006	-1,68	0,9 (±0,085)
(C) SdAb19 _{3*} /Nef	-	-	-	-	-	-

Abbildung 33: Analytische Größenausschlusschromatographie und kalorimetrische Messungen der Interaktion zwischen Nef und den Mutanten sdAb19_{D60R}, sdAb19_{G102R,S103E} und sdAb19_{3*}. (A) Analytische Gelfiltration mit den Einzelläufen von Nef (rot), sdAb19 (türkis) und sdAb19_{D60R} (grau) alleine und den Komplexen Nef-sdAb19 (hellbraun) und Nef-sdAb19_{D60R} (schwarz). Außerdem ist zur Ermittlung der Affinität die ITC-Messung von sdAb19_{D60R} zu Nef gezeigt. (B) Analytische Gelfiltration von Nef (rot), sdAb19 (türkis) und sdAb19_{G102R,S103E} (rosa) alleine und den Komplexen Nef-sdAb19 (hellbraun) und Nef-sdAb19_{G102R,S103E} (lila). Daneben ist die ITC-Titration von sdAb19_{G102R,S103E} zu Nef dargestellt. (C) Analytische Gelfiltration von Nef (rot), sdAb19 (türkis) und sdAb19_{3*} (hellblau) alleine und den Komplexen Nef-sdAb19 (hellbraun) und Nef-sdAb19_{3*} (dunkelblau). Außerdem ist das ITC-Experiment von sdAb19_{3*} zu Nef gezeigt. In den Gelfiltrationen wurden 100 µl jedes Protein in einer Konzentration von 1,5 mg/ml auf einer 10/30 Superdex 75-Säule aufgetragen, so dass die kleineren Bindungspartner im Überschuss vorlagen. In den ITC-Experimenten wurden 200 µM Ligand zu 20 µM Nef in 19 Injektionen mit je 2 µl titriert. Die relevanten Messwerte der ITC-Experimente sind tabellarisch zusammengefasst. In beiden Methoden wurde ein entgaster Laufpuffer aus 20 mM Tris-HCl, (pH 9) und 100 mM NaCl verwendet.

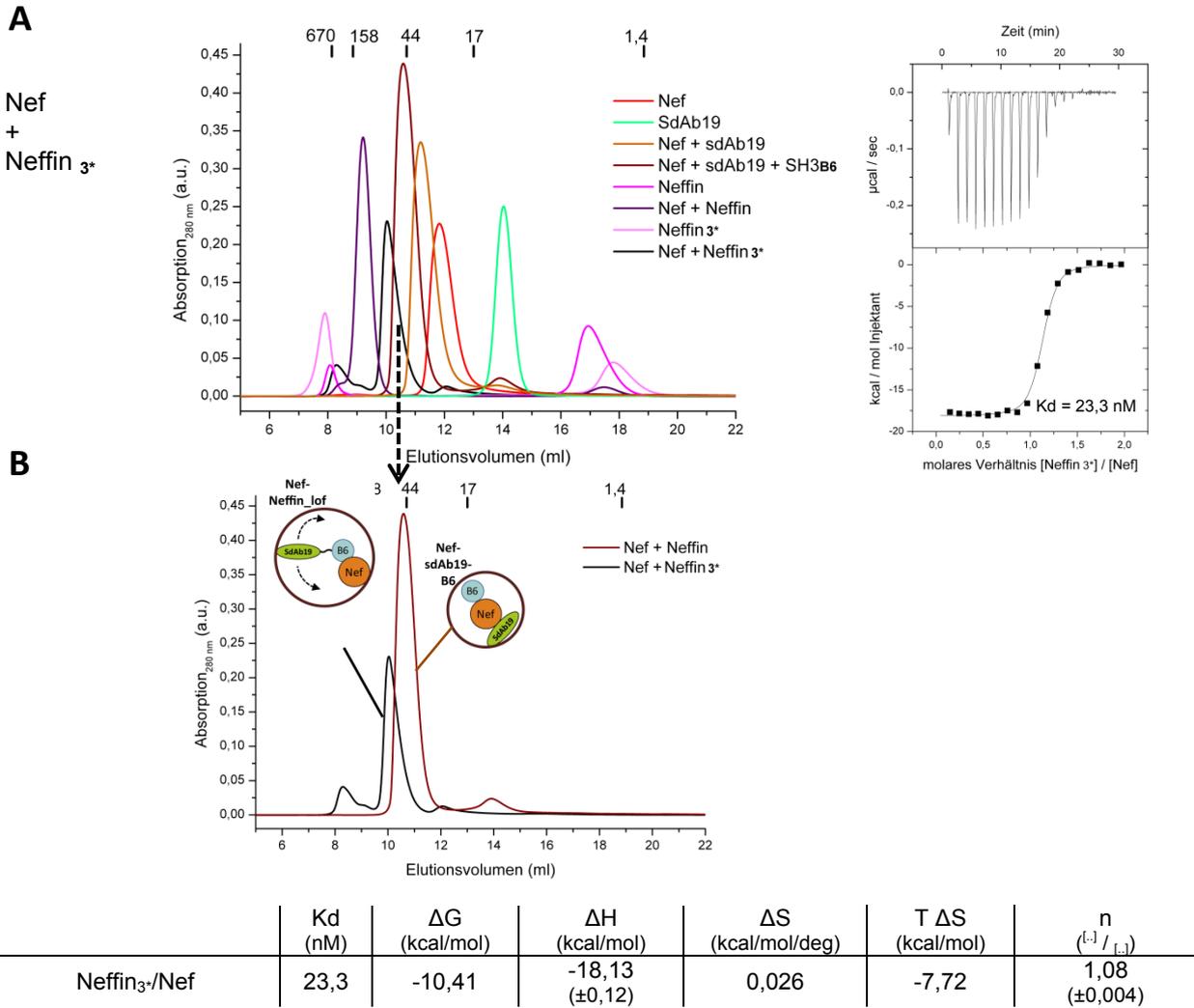


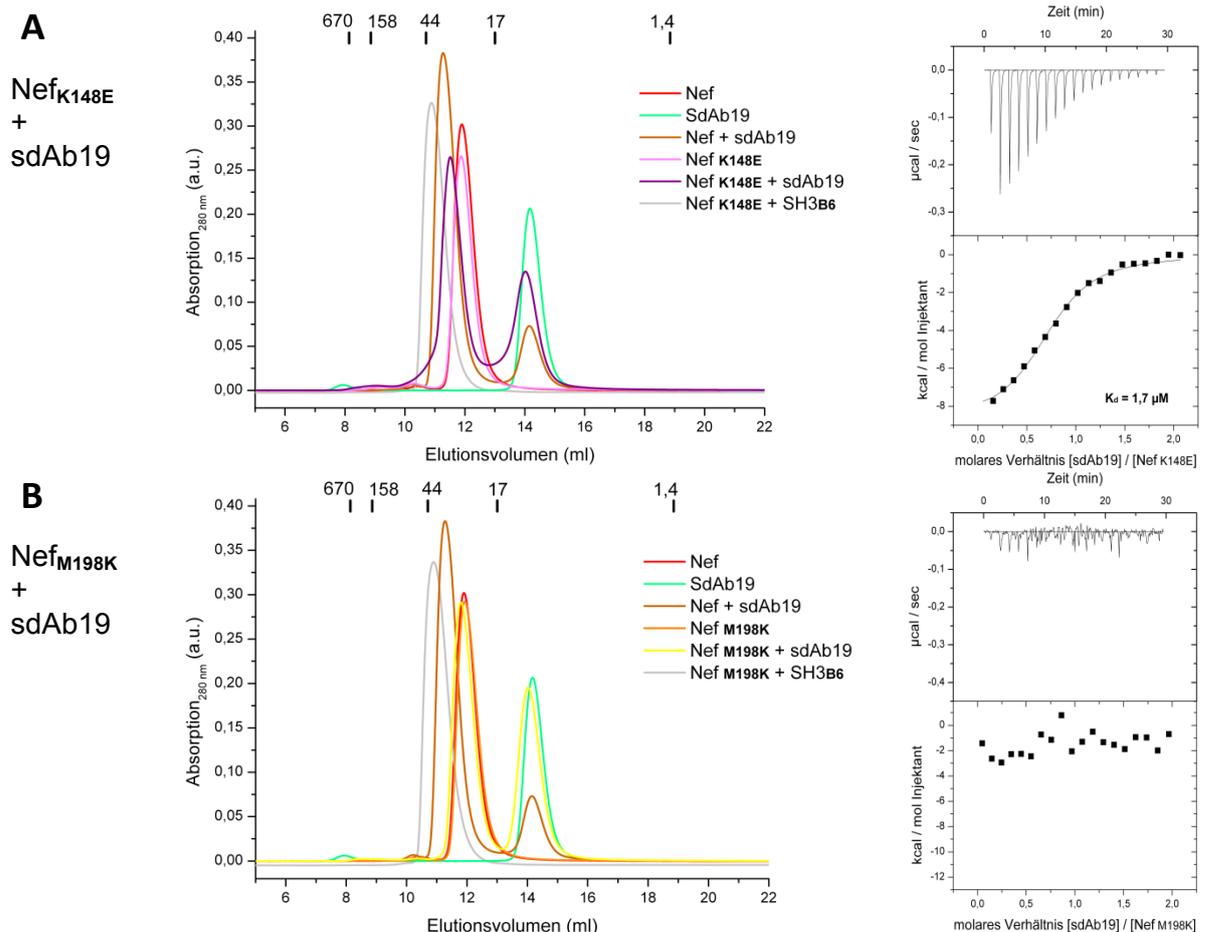
Abbildung 34: Analytische Größenausschusschromatographie und kalorimetrische Messungen der Interaktion zwischen Nef und der Mutante Neffin_{3*}. (A) Analytische Gelfiltration von acht einzelnen Läufen von Nef (rot), sdAb19 (türkis), Neffin_{3*} (rosa) und Neffin (magenta) alleine und der Komplexe Nef-sdAb19 (hellbraun), Nef-sdAb19-SH3_{B6} (dunkelbraun), Nef-Neffin_{3*} (schwarz) und Nef-Neffin (lila). Weiterhin ist das ITC-Experiment von Neffin_{3*} zu Nef dargestellt. (B) Separate Abbildung der Elutionsprofile von Nef-sdAb19-SH3_{B6} (dunkelbraun) und Nef-Neffin_{3*} (schwarz) wie in (A) mit schematischer Darstellung der formierten Komplexe. In den Gelfiltrationen wurden 100 µl jedes Proteins in einer Konzentration von 1,5 mg/ml auf einer 10/30 Superdex 75-Säule aufgetragen, so dass die kleineren Bindungspartner im Überschuss vorlagen. In den ITC-Experimenten wurden 200 µM Ligand zu 20 µM Nef in 19 Injektionen mit je 2 µl titriert. Die relevanten Messwerte der ITC-Experimente sind tabellarisch zusammengefasst. In beiden Methoden wurde ein entgaster Laufpuffer aus 20 mM Tris-HCl, (pH 9) und 100 mM NaCl verwendet.

4.1.4.2 Biochemische Mutationsstudien in Nef in Hinblick auf die Interaktion mit sdAb19 und Neffin

Neben den Mutationen auf sdAb19 und Neffin, wurden ebenso auf Seiten von Nef drei Reste ausgewählt, um sie zu mutieren und die Bindung an sdAb19 und damit auch an Neffin zu beeinflussen. Hierbei wurden die Reste Lysin 148, das mit dem Schlüsselrest Aspartat 60 von sdAb19 interagiert, zu einem negativ geladenen Glutamat mutiert, sowie Methionin 198 und Leucin 202 jeweils zu Lysinen, um die Interaktion mit sdAb19 zu beeinflussen oder zu schwächen (Abbildung 32 B, unten). Diese Mutationen sind auch aus evolutionsbiologischen

Gesichtspunkten ausgewählt worden, da bei 1643 untersuchten Nef Allelen über alle HIV-1 Subtypen und allen klinischen Studien hinweg in 22% der Fälle die Mutation L202K, in 7% aller Sequenzen M198K, aber nur bei 0,3% die Mutation K148E vorliegt (O'Neill et al., 2006). Um den Einfluss dieser Reste auf die Interaktion mit sdAb19 zu untersuchen, wurden die Mutanten Nef_{K148E}, Nef_{M198K} und Nef_{L202K} ebenfalls in analytischen Gelfiltrationen und ITC-Experimenten eingesetzt (Abbildung 35). Hierbei konnte durch die Mutation des positiv geladenen Lysins 148 zu einem negativ geladenen Glutamat die Affinität zu sdAb19 um das etwa 40-fache auf 1,7 μM reduziert werden. Durch die eher schwache Affinität kommt es in der analytischen Gelfiltration zu einem breiten Peak zwischen den Elutionsvolumina für Nef-sdAb19 und Nef allein (Abbildung 35 A). Die Reaktion weist Bindungsenergien mit negativen Enthalpieänderungen und negativen Entropieänderungen auf sowie eine Komplexstöchiometrie von etwa 1:1.

Durch die Mutationen M198K und L202K in Nef, verlieren diese Proteine die komplette Fähigkeit mit sdAb19 zu interagieren (Abbildung 35 B und C), was sich durch die fehlende Verschiebung der Elutionsvolumina in den analytischen Gelfiltrationen und den fehlenden Wärmetönungen in den ITC-Messungen bemerkbar macht, wobei die Bindung der SH3_{B6}-Domänen in alle drei Mutanten unverändert blieb (nicht gezeigt). Aufgrund der Häufigkeit dieser Mutationen in verschiedenen Nef Allelen ist dies virologisch und evolutionsbiologisch interessant.



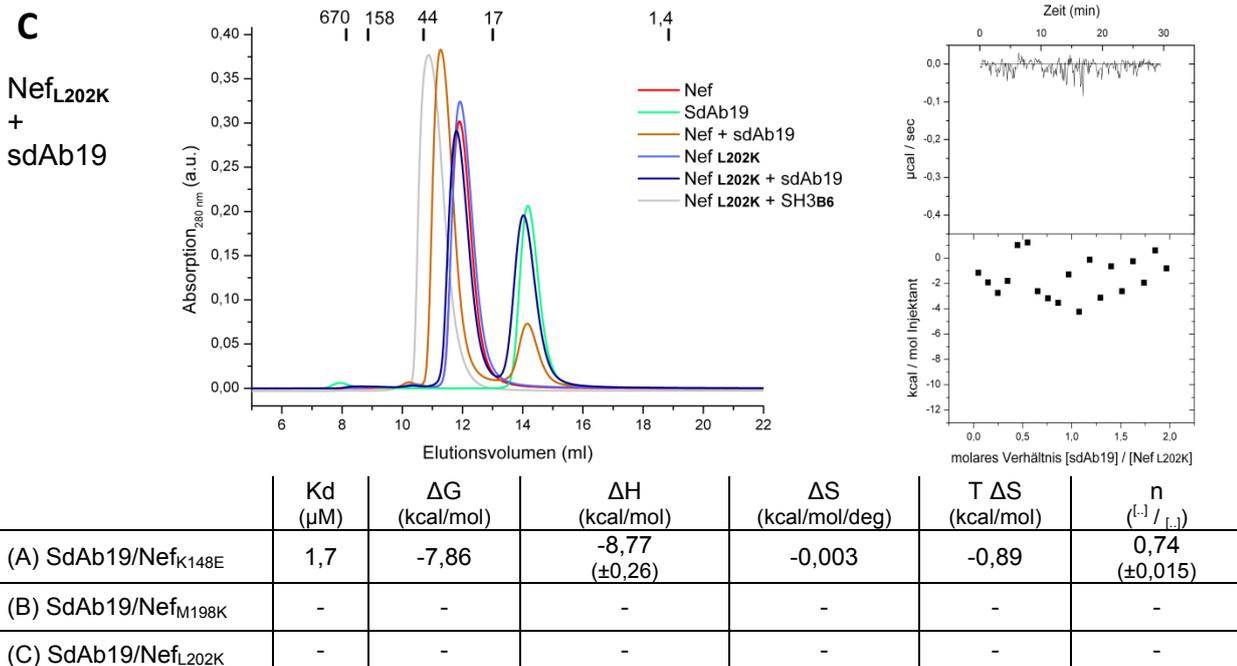


Abbildung 35: Analytische Größenausschlusschromatographie und kalorimetrische Messung der Interaktion zwischen sdAb19 und den Nef-Mutanten Nef_{K148E}, Nef_{M198K}, Nef_{L202K}. (A) Analytische Gelfiltration mit sechs Einzelläufen von Nef (rot), sdAb19 (türkis) und Nef_{K148E} (hellrosa) alleine und den Komplexen Nef-sdAb19 (hellbraun), Nef_{K148E}-sdAb19 (lila) und Nef_{K148E}-SH3_{B6} (hellgrau). Außerdem wurde die Affinität der Interaktion zwischen Nef_{K148E} und sdAb19 mittels ITC-Messungen ermittelt. (B) Analytische Gelfiltration mit Nef (rot), sdAb19 (türkis) und Nef_{M198K} (orange) alleine und der Komplexe Nef-sdAb19 (hellbraun), Nef_{M198K}-sdAb19 (gelb) und Nef_{M198K}-SH3_{B6} (hellgrau), sowie die ITC-Messung mit sdAb19 und Nef_{M198K}. (C) Analytische Gelfiltration mit Nef (rot), sdAb19 (türkis) und Nef_{L202K} (hellblau) alleine und der Komplexe Nef-sdAb19 (hellbraun), Nef_{L202K}-sdAb19 (dunkelblau) und Nef_{L202K}-SH3_{B6} (hellgrau). Dazu gehörend die ITC-Messung von sdAb19 und Nef_{L202K}. In den Gelfiltrationen wurden 100 μl jedes Protein in einer Konzentration von 1,5 mg/ml auf einer 10/30 Superdex 75-Säule aufgetragen, so dass die kleineren Bindungspartner im Überschuss vorlagen. In jedem Experiment wurden 200 μM Ligand in 19 Injektionen mit je 2 μl zu 20 μM Nef titriert. Alle relevanten Messwerte der ITC-Experimente sind tabellarisch zusammengefasst. In beiden Methoden wurde ein entgaster Laufpuffer aus 20 mM Tris-HCl, (pH 9) und 100 mM NaCl verwendet.

4.1.5 Untersuchung der an der Interaktion mit sdAb19 beteiligten Reste von Nef in Hinblick auf den Grad der Konservierung

Bei HIV-1 Nef handelt es sich um ein retrovirales Protein, so dass es wie alle Proteine von HIV einer hohen Mutationsrate unterliegt. Dadurch ist HIV-1 in der Lage Resistenzmutationen gegen Inhibitoren zu entwickeln, falls es sich bei der Bindungsfläche nicht um essenzielle und damit konservierte Bereiche handelt. Es finden zwar ständig auf allen Resten von Nef Mutationen statt, doch setzen sich diese Veränderungen evolutionsbiologisch üblicherweise nur durch, wenn sie sich für Nef und damit für HIV funktionell nicht nachteilig auswirken und sich gegenüber anderen Viren als einen Selektionsvorteil herausstellt. Daher kann die Stärke der Konservierung der Aminosäurereste auf der Oberfläche von Nef als Hinweis genutzt werden, ob ein Potential zur Bildung von Resistenzmutationen gegenüber sdAb19 besteht.

Um zu untersuchen, in wie weit die Bereiche an dem sdAb19 an Nef bindet konserviert sind, wurde ein Sequenzvergleich mit Aminosäuresequenzen von 150 verschiedenen Nef Allelen durchgeführt und diese nach Grad der Konservierung auf die Oberfläche des Nef Proteins der Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6} Struktur projiziert. Hierbei

werden die Bereiche auf der Oberfläche von Nef im Komplex mit sdAb19 von konserviert (weinrot) bis variabel (türkis) dargestellt (Abbildung 36). Hierdurch ist zu erkennen, dass viele Reste von Nef in der Interaktionsfläche mit sdAb19 türkis und damit variabel sind (Abbildung 36 A). Auch von den sieben Resten, die mittels Wasserstoffbrücken und ionischen Bindungen direkt an der Interaktion mit sdAb19 beteiligt sind, sind vier sehr variabel (Abbildung 36 B). Während Lysin 148, Glutamat 201 und Histidin 203 konservierte Reste sind, kommen Tyrosin 139 nur zu 70% (25% ein Phenylalanin), Glutamat 155 nur zu 76% (18% ein Aspartat), Arginin 188 nur zu 36% (62% ein Lysin, 0,5% ein Glutamat) und Lysin 192 sogar nur zu 4% (75% ein Arginin, 9% ein Histidin, 7% ein Serin) in 1643 verschiedenen Nef Allelen vor (O'Neill et al., 2006). Damit ist es für HIV-1 schnell möglich, wie schon für die Mutationen von L202K und M198K gezeigt (Abbildung 32 und 35), Mutanten von Nef zu erhalten, die gegen die Bindung von sdAb19 resistent sind.

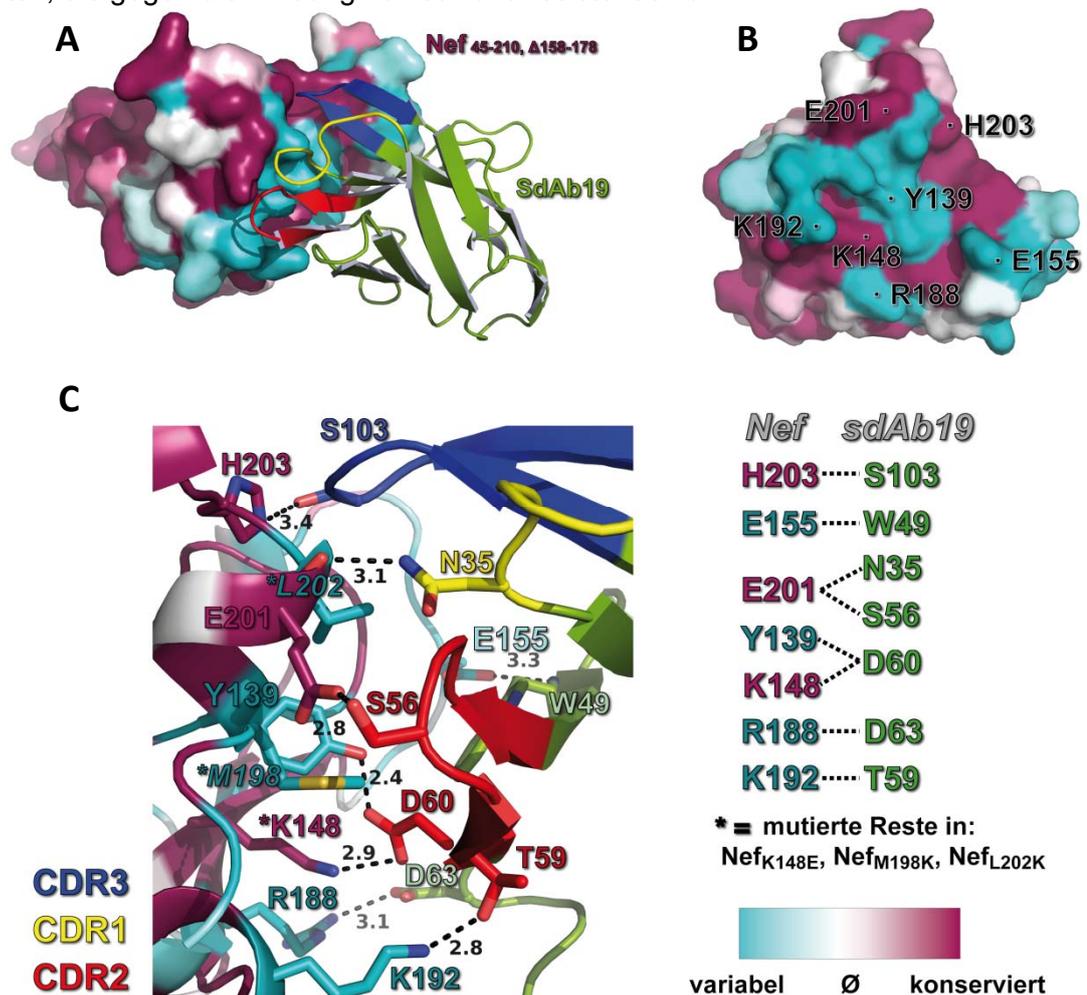


Abbildung 36 : Untersuchung des Konservierungsgrads von Resten auf der Oberfläche von Nef die an der Bindung mit sdAb19 beteiligt sind. Durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von 150 verschiedenen Nef Allelen wurde der Grad der Sequenzkonservierung farblich von variabel (türkis) bis konserviert (weinrot) auf die Oberfläche von Nef im Nef_{45-210, Δ 158-178}-sdAb19-Komplex projiziert. **(A)** Gesamtüberblick über die Interaktion zwischen Nef (konservierungsabhängig angefärbt) als Oberflächendarstellung und sdAb19 (grün) als Schleifendiagramm. **(B)** Frontale Ansicht der an der Interaktion mit sdAb19 beteiligten Oberfläche von Nef mit Beschriftung der direkt beteiligten Reste. **(C)** Darstellung der an der Interaktion direkt beteiligten Reste von Nef und sdAb19 wie in Abbildung 32 A, mit Fokus auf die Stärke ihrer Konservierung. Die drei Reste K148, M198 und L202 sind mit einem Stern markiert, da diese in den sdAb19-bindungsdefizienten Nef-Mutanten wie beschrieben mutiert wurden. Die Abstände der interagierenden Reste sind in Ångstrom angegeben, sowie CDR1 gelb, CDR2 rot und CDR3 blau eingefärbt. Die strukturelle Überlagerung der Nef Sequenzen erfolgte mit dem ConSurf-Server und die Darstellung der Oberflächenkonservierungen mit PyMol.

4.1.6 Funktionelle Experimente mit den bindungsdefizienten Mutanten von Nef, sdAb19 und Neffin

Zusammen mit unserem Kooperationspartner Serge Benichou vom Institut Cochin in Paris wurden die zuvor beschriebenen Nef-sdAb19-bindungsdefizienten Mutanten sdAb19_{D60R}, sdAb19_{3*}, Neffin_{D60R} und Neffin_{3*}, sowie Nef_{K148E}, Nef_{M198K} und Nef_{L202K} in *in vivo*-Experimenten auf deren Einfluss auf die Nef-vermittelte Endozytose von CD4 getestet. Hierfür wurden in HeLa-Zellen, die den humanen Rezeptor CD4 auf der Zelloberfläche exprimieren (HeLa-CD4), Plasmide mittels Transfektion eingebracht, die die gewünschten Proteine exprimieren. Die Nef-Mutanten wurden als GFP und die sdAb19/Neffin-Mutanten als c-Myc Fusionsproteine exprimiert. Anschließend erfolgten Immunopräzipitationen mittels Anti-GFP bzw. Anti-c-myc Antikörpern und die Analyse der Oberflächenexpression von farbstoffmarkiertem CD4 mittels Durchflusszytometrie (FACS). Durch die Expression des Wildtyps Nef-GFP des NL4-3 Allels konnte im Vergleich mit GFP alleine eine deutliche Runterregulierung von CD4 von 100% bis auf etwa 20% beobachtet werden (Abbildung 37 A). Ein vergleichbares Resultat wurde auch bei der Verwendung des SF2 Allels von Nef erhalten, wobei hier noch um die 30% der CD4-Rezeptoren an der Oberfläche vorhanden waren (Abbildung 37 B). Bei gleichzeitiger Coexpression des Wildtyps von sdAb19 (sdAb19 wt) oder Neffin (Neffin wt), kommt es zur Inhibition der Nef-vermittelten CD4-Endozytose, so dass weiterhin zwischen 90-100% der CD4-Moleküle an der Zelloberfläche verbleiben (Abbildung 37 A und B). Werden dann anstatt des Wildtyps die bindungsdefizienten Mutanten sdAb19_{3*} und Neffin_{3*} verwendet, ist das coexprimierte Nef wieder in der Lage CD4 zu internalisieren, da dessen Inhibition nicht erfolgen kann. Interessanterweise ist dies auch der Fall bei den sdAb19_{D60R} und Neffin_{D60R}-Mutanten, obwohl in kaliometrischen Messungen für sdAb19_{D60R} noch eine Affinität von 3,7 μM ermittelt wurde und damit in biochemischen Experimenten die Bindung an Nef noch möglich ist (Abbildung 33 A).

In den Experimenten, in denen die sdAb19-, sowie Neffin-bindungsdefizienten Nef-Mutanten eingesetzt wurden, wurde zunächst untersucht, ob diese noch fähig sind CD4 runterzuregulieren. Dazu wurde zur Kontrolle GFP, Nef_{SF2} Wildtyp (Nef-GFP wt) sowie die Mutanten Nef_{K148E}, Nef_{M198K} und Nef_{L202K} alleine in HeLa-CD4 Zellen exprimiert. Im Vergleich zur negativen GFP Kontrolle, sind alle eingesetzten Nef Proteine in der Lage CD4 auf etwa 20% der Oberflächenexpression runterzuregulieren (Abbildung 37 C). Werden im folgenden Ansatz die Neffin-Expressionsplasmide relativ zu Nef in 4-facher und 8-facher Konzentration eingesetzt, inhibiert dieses die CD4-Endozytose des Nef Wildtyps so stark, dass anstatt nur 20%, jetzt 70% bzw. 90% der CD4-Moleküle an der Zelloberfläche verbleiben. Wird dasselbe Experiment mit der Nef_{K148E}-Mutante durchgeführt, verbleiben nur noch etwa 40% bei der 4-fachen bzw. 80% bei der 8-fachen Neffin-Plasmidkonzentration des CD4-Rezeptors an der Oberfläche, was mit den ITC-Experimenten korreliert, in der sdAb19 noch mit einer Affinität von 1,7 μM an Nef bindet (Abbildung 35 A). Währenddessen interagiert sdAb19 nicht mehr mit Nef_{M198K} und Nef_{L202K} (Abbildung 35 B und C), was sich auch in der fehlenden Inhibition der Nef-vermittelten CD4-Runterregulierung im FACS-Experiment widerspiegelt (Abbildung 37 D). Damit wird deutlich, dass es für HIV-1 ausreichen würde die variablen Reste Methionin 198 und Leucin 202 zu Lysine zu mutieren, was bei 22% bzw. 7% von 1643 Nef Allele vorkommt (O'Neill et al., 2006), um eine Resistenz gegenüber sdAb19 zu entwickeln.

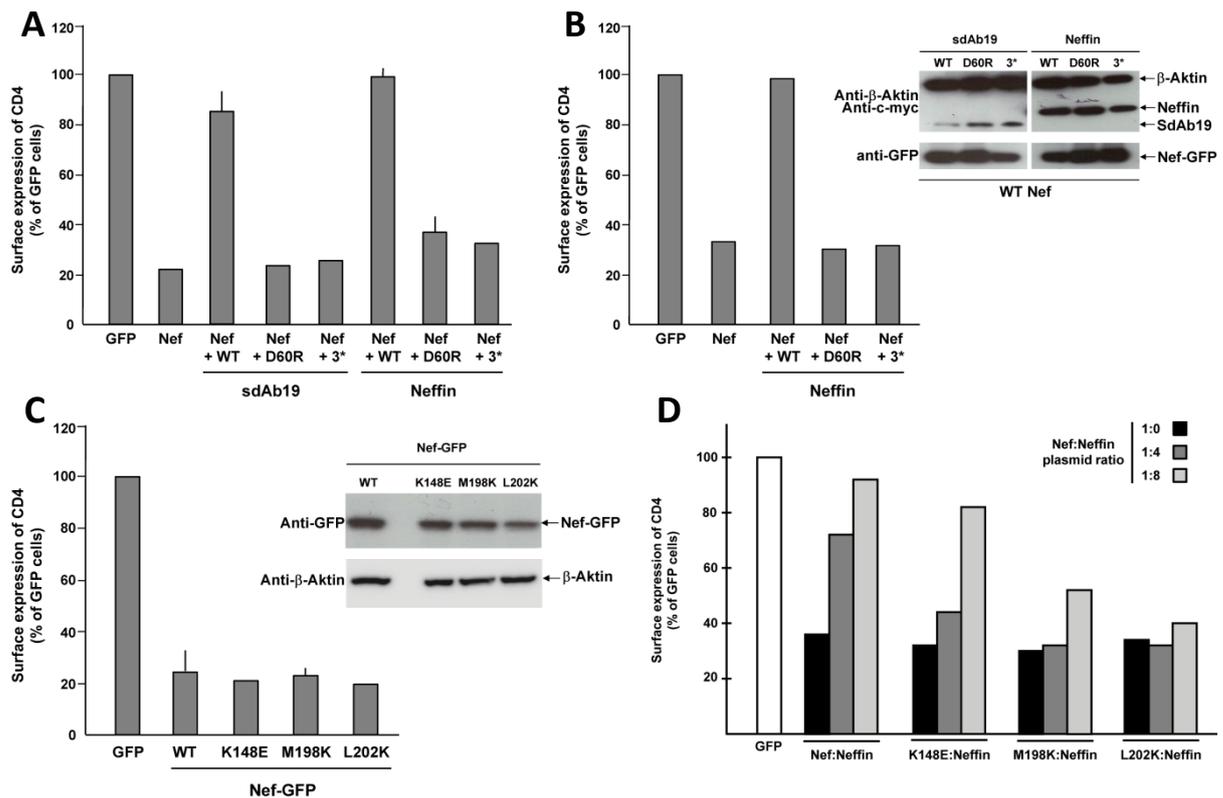


Abbildung 37: Einfluss der sdAb19, Nefin und Nef-bindungsdefizienten Mutanten auf die Nef-vermittelte Endozytose von CD4. Zur Untersuchung der Menge der an der Zelloberfläche von HeLa-CD4 Zellen exprimierten CD4-Rezeptoren wurden diese entsprechend mit PE-gekoppelten anti-CD4 Antikörpern markiert und deren Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie überprüft. Zur Expression von Nef-GFP_{NL4-3} und GFP in den HeLa-CD4 Zellen wurden diese mit entsprechenden kodierenden Plasmiden transfiziert. **(A)** Außerdem erfolgte die Coexpression des sdAb19 Wildtyps (sdAb19 wt), sowie von sdAb19_{D60R} und sdAb19_{3*} als c-Myc Fusionsproteine zusammen mit Nef_{NL4-3}. In weiteren Experimenten wurde auf identischer Weise Nefin wt, Nefin_{D60R} und Nefin_{3*} zum einen mit Nef_{NL4-3} **(A)**, aber auch **(B)** mit Nef_{SF2} coexprimiert. Die Überprüfung der Proteinexpressionen erfolgte durch die Immunopräzipitation von Nefin und sdAb19 mittels Anti-c-myc Antikörpern sowie von Nef mittels anti-GFP Antikörpern. **(C und D)** Expression von GFP als Kontrolle, sowie Nef Wildtyp, Nef_{K148E}, Nef_{M198K} und Nef_{L202K} als GFP-Fusionskonstrukte in HeLa-CD4 Zellen zur Überprüfung ihrer Funktionalität als CD4-runterregulierende Faktoren. Auch für die Nef-Mutanten erfolgte die Überprüfung der Expression mittels Immunopräzipitation wie in **(B)**. **(D)** Transfektion entsprechender Gen-kodierender Plasmide für die Expression der beschriebenen Nef-Konstrukte zusammen mit ansteigenden Mengen des Plasmides zur Coexpression von Nefin. Die Diagrammwerte stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die Fehlerbalken die Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

4.1.7 Funktionelle biochemische Experimente mit Nef, CD3 ζ , sdAb19 und Nefin zur Untersuchung der Gründe der Nef-Inhibition

Im Folgenden wird untersucht, ob die Bindung von sdAb19 an Nef allosterische, strukturelle Veränderungen an anderen Bereichen von Nef verursacht und ob dieses Einfluss auf die Inhibition von Nef hat. Hierzu wurde der Komplex zwischen Nef und der CD3 ζ -Untereinheit gebildet und versucht diese Komplexbildung durch die Bindung von sdAb19 zu stören. Hierbei ist zu beachten, dass HIV-1 Nef, sowie einige verwandte SIV Nef Proteine, nicht in der Lage sind mit CD3 ζ zu interagieren und dieses von der Oberfläche der Wirtszelle zu internalisieren. Da sdAb19 nicht mit SIV Nef_{mac239} interagiert (siehe Abbildung 19), aber HIV-1 Nef eben auch nicht mit CD3 ζ (Abbildung 39 C), wurde für das Experiment das chimäre

Protein Nef_{SF2}-SIV Nef_{mac239} hergestellt. Durch frühere Mutationsstudien konnten in der zytosolischen Domäne von CD3 ζ innerhalb von ITAMs (ITAM: *immunoreceptor tyrosin based activation motif*) zwei sogenannte SNID-Motive (SNID: *SIV Nef interaction domain*) als Nef-bindende Bereiche sowie die hydrophobe Tasche von Nef als Bindestelle des CD3 ζ identifiziert werden (Schaefer et al., 2000). Diese wurden durch die gelöste SIV Nef-CD3 ζ_{63-80} -Komplexstruktur bestätigt (Kim et al., 2010). Mit diesen Informationen wurden in einer Vielfach-Mutante die Reste der hydrophoben Tasche von HIV-1 Nef, die bei SIV Nef an der Bindung an CD3 ζ beteiligt sind, zu den entsprechenden Resten von SIV-Nef mutiert (HzuS-Mutante). Diese Mutante wurde innerhalb der Arbeitsgruppe durch Santiago Manrique Zuñiga (Universität Oxford) etabliert (Abbildung 38 B).

In den angestrebten Experimenten mit der HzuS-Mutante zur Inhibitor-induzierten Verdrängung von CD3 ζ aus der hydrophoben Tasche konnte Neffin nicht verwendet werden, da die RT-Schleifen Bindetasche der HzuS-Mutante innerhalb der hydrophoben Tasche der von SIV-Nef entspricht und dadurch die Interaktion mit der SH3_{B6}-Domäne von Neffin nicht mehr möglich ist (Abbildung 39 B). Dass SIV Nef mit CD3 ζ und nicht mit SH3_{B6}, sowie HIV-1 Nef wiederum mit SH3_{B6} und nicht mit CD3 ζ interagiert, hängt mit dem unterschiedlichen Aufbau der hydrophoben Taschen zusammen. In Abbildung 38 wurde eine strukturelle Überlagerung des Nef_{SF2}-SH3_{B6}-Komplexes aus der in dieser Arbeit gelösten Struktur Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6} mit der in Kim et al. im Jahre 2010 gelösten Komplexstruktur SIV_{mac239}-Nef₉₅₋₂₃₅-CD3 ζ_{63-80} durchgeführt. Auf Seiten der Nef-SH3_{B6}-Bindung interagiert die RT-Schleife über hydrophobe Wechselwirkungen mit Nef. Die hydrophobe Tasche ist in dem Bereich bei SIV-Nef enger, so dass sich die RT-Schleife mit F93 womöglich nicht so tief hineinschieben kann. Außerdem ist die Interaktion von Glutamin 122_{Nef} mit Aspartat 96_{SH3_{B6}} und Tryptophan 95_{SH3_{B6}} nicht möglich, weil dieser Rest im SIV-Nef zu einem Glutamat mutiert ist (Abbildung 38 A, B).

Mit Blick auf die Bindung zwischen Nef und CD3 ζ interagiert CD3 ζ durch Tyrosin 72 mit Aspartat 149 von SIV Nef, das im HIV-1 Nef_{SF2} zu Threonin 121 mutiert ist und damit diese Bindung nicht möglich ist. Zudem sind auch hier hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Resten wie L75_{CD3 ζ} und L77_{CD3 ζ} mit mehreren hydrophoben Resten von SIV-Nef wichtig, die möglicherweise bei HIV-1 Nef aufgrund der breiteren Konformation der beteiligten α -Helices nicht möglich sind. Die Interaktion zwischen Glutamat 74 und zweier Arginine von Nef ist prinzipiell auch bei HIV Nef (R109 und R110) wie bei SIV Nef (R137 und R138) möglich (Abbildung 38 A). Während die beiden letztgenannten Reste für die Herstellung einer CD3 ζ bindenden HIV-1 Nef-Mutante nicht mutiert werden müssen, wurden 18 weitere Reste entlang der α -Helices 4 und 5 der hydrophoben Tasche von HIV-1 Nef zu den entsprechenden Resten von SIV Nef mutiert, um zum einen die mit CD3 ζ interagierenden Reste sowie die Gesamtkonformation der hydrophoben Tasche zu erhalten. Dadurch entsteht die Mutante HzuS Nef_{18x}, die in der Lage sein soll mit CD3 ζ zu interagieren, mit gleichzeitigem Verlust der SH3_{B6}-Bindung. Um die Bindung zu CD3 ζ zu untersuchen, wurde im Folgenden zum einen ein auf dem SNID 2-Motiv basierendes Peptid sowie das Protein CD3 ζ mit den Grenzen 73-135 verwendet (Abbildung 38 C).

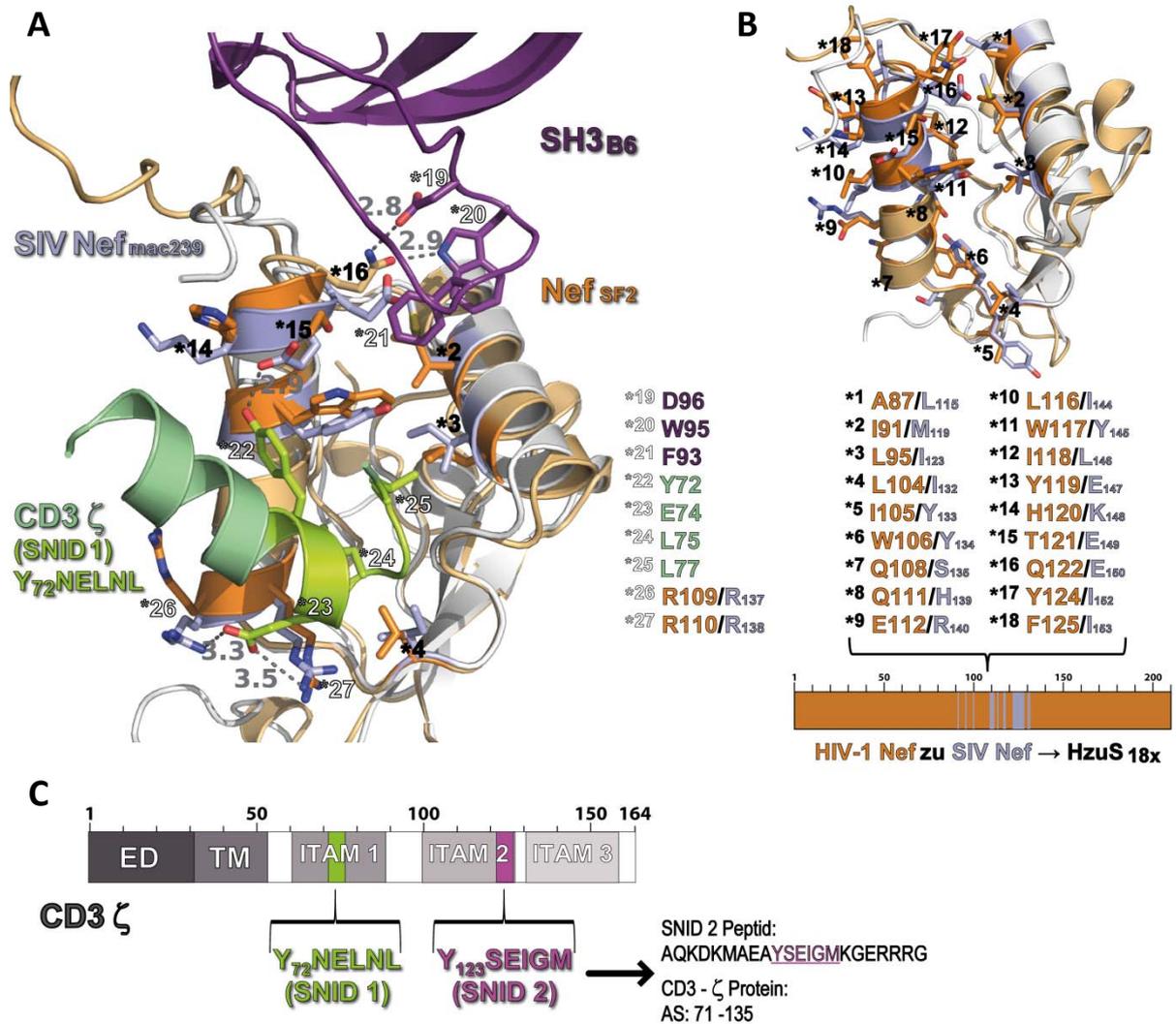
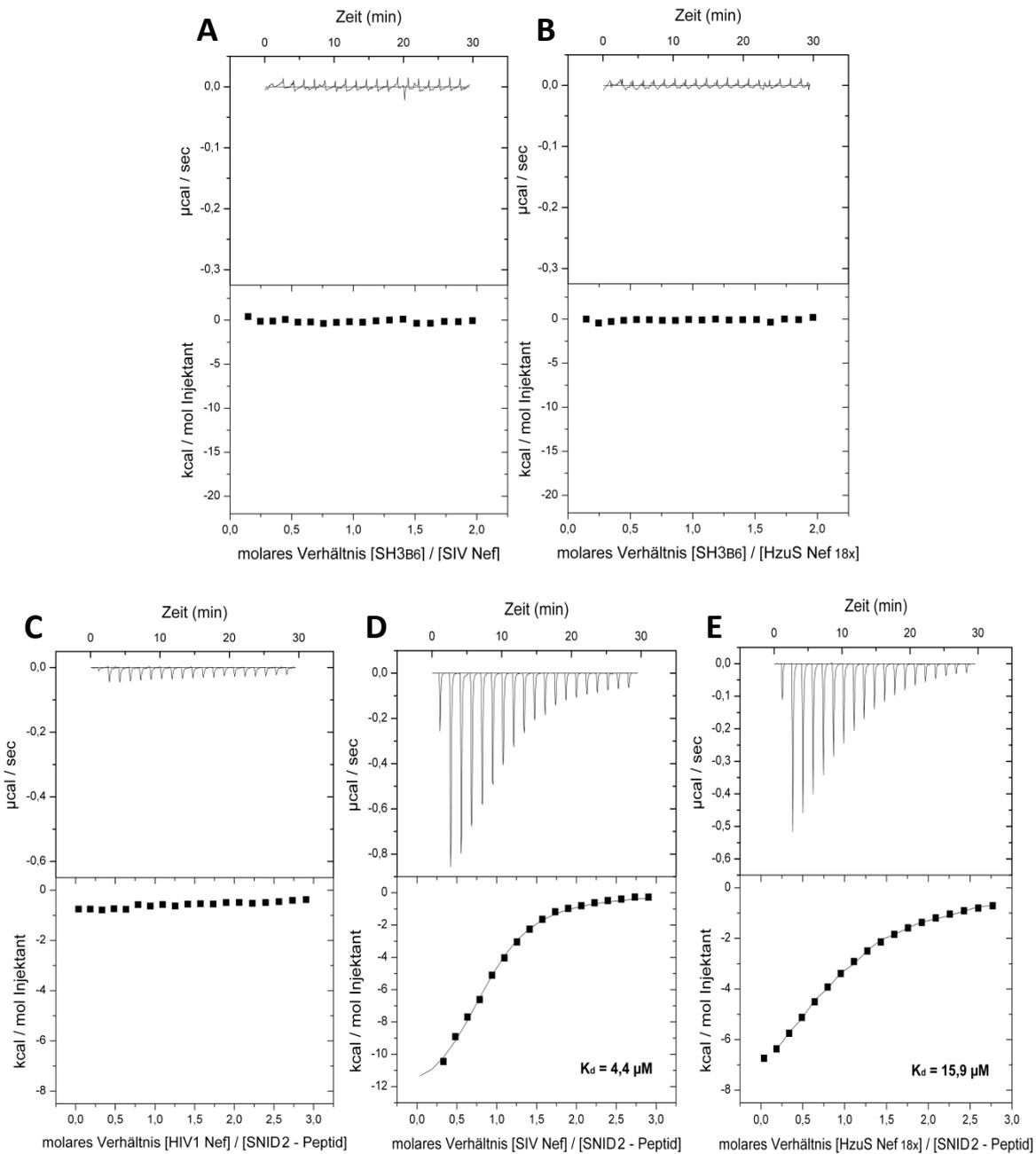


Abbildung 38: Struktureller Vergleich zwischen dem Komplex aus SIV-Nef und CD3 ζ mit dem Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-Komplex. (A) Strukturelle Überlagerung des Nef_{SF2}-SH3_{B6}-Komplexes (orange/ocher-violett) mit dem SIV Nef_{mac239}-CD3 ζ -Komplex (hellblau/weiß-hellgrün/grün) aus Kim *et al.* (2010). Wichtige an den Interaktionen beteiligte Reste sind wie beschrieben farblich zugeordnet. (B) Strukturelle Überlagerung von Nef_{SF2} und SIV Nef_{mac239} wie in (A). Die 18 schwarz beschrifteten Reste von Nef wurden in die von SIV-Nef komplementären Reste mutiert und die daraus resultierende Mutante schematisch dargestellt (Nef_{SF2}: orange, SIV Nef: weiß). (C) Schematische Darstellung der CD3 ζ -Volllängen-Struktur mit extrazellulärer Domäne (ED), Transmembrandomäne (TM) sowie der zytosolischen Domäne mit den ITAMS 1, 2 und 3. In ITAM 1 befindet sich mit SNID 1 (hellgrün) und im ITAM 2 mit SNID 2 (magenta) die SIV Nef-bindenden Bereiche. Aus diesen wurden für nachfolgende Experimente zum einen ein SNID 2-Peptid sowie ein CD3 ζ Protein hergestellt.

Um zu untersuchen, ob die HzuS Nef_{18x}-Mutante in der Lage ist mit CD3 ζ zu interagieren und ob das mit dem Verlust der SH3_{B6}-Bindung einhergeht, wurden zunächst entsprechende ITC-Experimente durchgeführt. Hierbei wurde ein auf SNID 2 basierendes CD3 ζ -Peptid synthetisiert. Die verwendeten Proteine SIV Nef, HzuS Nef_{18x}, HIV-1 Nef und SH3_{B6} wurden in einem Puffer aus 20 mM Tris-HCl, (pH 8) und 100 mM NaCl dialysiert, dieser anschließend gefiltert und entgast und das CD3 ζ -Peptid im Selbigen gelöst. In den ITC-Experimenten mit der SH3_{B6}-Domäne wurde diese in einer Konzentration von 200 μ M in 19 Injektionen mit je 2 μ l zu 20 μ M des Bindungspartners in der Zelle titriert. Weder SIV Nef, noch die HzuS Nef_{18x}-Mutante interagiert mit SH3_{B6} (Abbildung 39 A und B). Das heißt, dass

HzuS Nef_{18x} tatsächlich aufgrund der Mutationen in der hydrophoben Tasche, wie SIV Nef, SH3_{B6} nicht mehr binden kann, so dass im Folgenden Nefin als inhibitorischer Bindungspartner von HzuS Nef_{18x} nicht verwendet wird. Als nächstes folgten die ITC-Messungen mit dem CD3 ζ SNID 2-Peptid. Hierbei mussten 500 μM des jeweiligen Nef Proteins in 19 Injektionen mit je 2 μl zu 33 μM des SNID 2-Peptids titriert werden, um die entstehende Wärmetönung aufzunehmen. Wie zu erwarten konnte keine Bindung zwischen HIV-1 Nef und CD3 ζ gemessen werden. Im Bindungsexperiment mit SIV Nef und CD3 ζ konnte hingegen eine Affinität von 4,4 μM ermittelt werden, so dass diese noch um das etwa 3,5-fache stärker ist als die zwischen HzuS Nef_{18x} und CD3 ζ (15,9 μM). Die Bindungsenergien setzen sich in beiden Fällen aus hohen negativen Enthalpieänderungen und negativen Entropieänderungen zusammen.



	K_d (μM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol/deg)	$T \Delta S$ (kcal/mol)	n ($l^{-1} / l.l$)
(A) SH3 _{B6} /SIV Nef	-	-	-	-	-	-
(B) SH3/HzuS Nef _{18x}	-	-	-	-	-	-
(C) HIV-1 Nef/SNID 2	-	-	-	-	-	-
(D) SIV Nef/SNID 2	4,4	-7,38	-13,34 ($\pm 0,41$)	-0,020	-5,96	0,86 ($\pm 0,018$)
(E) HzuS Nef _{18x} /SNID 2	15,9	-6,66	-10,83 ($\pm 0,36$)	-0,014	-4,17	0,90 ($\pm 0,022$)

Abbildung 39: Bindungsstudien zwischen einem SNID 2-Peptid und verschiedenen Nef-Konstrukten. Dargestellt sind ITC-Experimente zwischen (A) SH3_{B6} und SIV Nef sowie (B) SH3_{B6} und der HzuS Nef_{18x}-Mutante. Außerdem sind Experimente mit dem SNID 2-Peptid und (C) HIV-1 Nef, (D) SIV Nef und (E) HzuS Nef_{18x} dargestellt. In (A) und (B) wurden 200 μM der SH3_{B6}-Domäne zu 20 μl Nef sowie in (C), (D) und (E) 200 μM Nef zu 20 μM des SNID 2-Peptids in 19 Injektionen mit je 2 μl titriert. Als Puffer diente 20 mM Tris-HCl, (pH 8,0) mit 100 mM NaCl und die Messtemperatur betrug 25°C. Die relevanten Messwerte sind tabellarisch zusammengefasst.

In den ITC-Experimenten (Abbildung 39) konnte gezeigt werden, dass die Vielfachmutante HzuS Nef_{18x} mit CD3 ζ interagiert. Da der komplette C-Terminus von HzuS Nef_{18x} der Aminosäuresequenz von HIV-1 Nef_{SF2} entspricht und daher sdAb19 binden kann, wurde im Folgenden versucht, durch dessen Zugabe die Komplexbildung zwischen HzuS Nef_{18x} und CD3 ζ zu stören. Um dies durchzuführen, wurde in einer analytischen Gelfiltration 100 μl jedes Protein in einer Konzentration von 1,5 mg/ml (150 μg) auf eine analytische 10/30 Superdex 75 (GE Healthcare) aufgetragen. Als entgaster Puffer diente derselbe wie bei den ITC-Messungen. In Abbildung 40 ist zu erkennen, dass die einzelnen Proteine HzuS Nef_{18x} (19 kDa) bei etwa 12 ml, sdAb19 (12,7 kDa) bei 14,2 ml und CD3 ζ (8 kDa) bei 13,8 ml eluieren. Wie bereits im ITC-Experiment interagiert auch hier die SH3_{B6}-Domäne nicht mit HzuS Nef_{18x}, wodurch es zu keiner Verschiebung des Peaks von HzuS Nef_{18x} kommt und SH3_{B6} ungebunden bei 31,5 ml eluiert wird (Abbildung 40 + kleines Bild). Der Komplex aus HzuS Nef_{18x} und CD3 ζ (27 kDa) hat ein Retentionsvolumen von etwa 11 ml und läuft damit etwas größer als der HzuS Nef_{18x}-sdAb19-Komplex (31,7 kDa) der bei 11,2 ml eluiert wird. Hiermit konnte gezeigt werden, dass sdAb19 mit HzuS Nef_{18x} interagiert, so dass in der folgenden Messung zu HzuS Nef_{18x} und CD3 ζ zusätzlich sdAb19 zugegeben wurde. Es kommt zu einer weiteren Verschiebung des Peaks auf ein Retentionsvolumen von 10,6 ml, was einem tertiären Komplex aus HzuS Nef_{18x}, CD3 ζ und sdAb19 (45,7 kDa) entspricht (Abbildung 40). Damit konnte gezeigt werden, dass sdAb19 einen Liganden wie CD3 ζ nicht direkt über allosterische strukturelle Veränderungen aus der hydrophoben Tasche verdrängen kann. Da CD4 vermutlich in derselben Region wie CD3 ζ mit der hydrophoben Tasche von Nef interagiert, sdAb19 aber die Runterregulierung von CD4 inhibiert, scheint dies nicht mit einer Unterbindung der Interaktion zwischen Nef und dem Liganden zu geschehen. Vielmehr scheint sdAb19 die Interaktion mit weiteren Komponenten der Rezeptorinternalisierungsmechanik zu inhibieren, genauso wie möglicherweise die Interaktion mit Pak2.

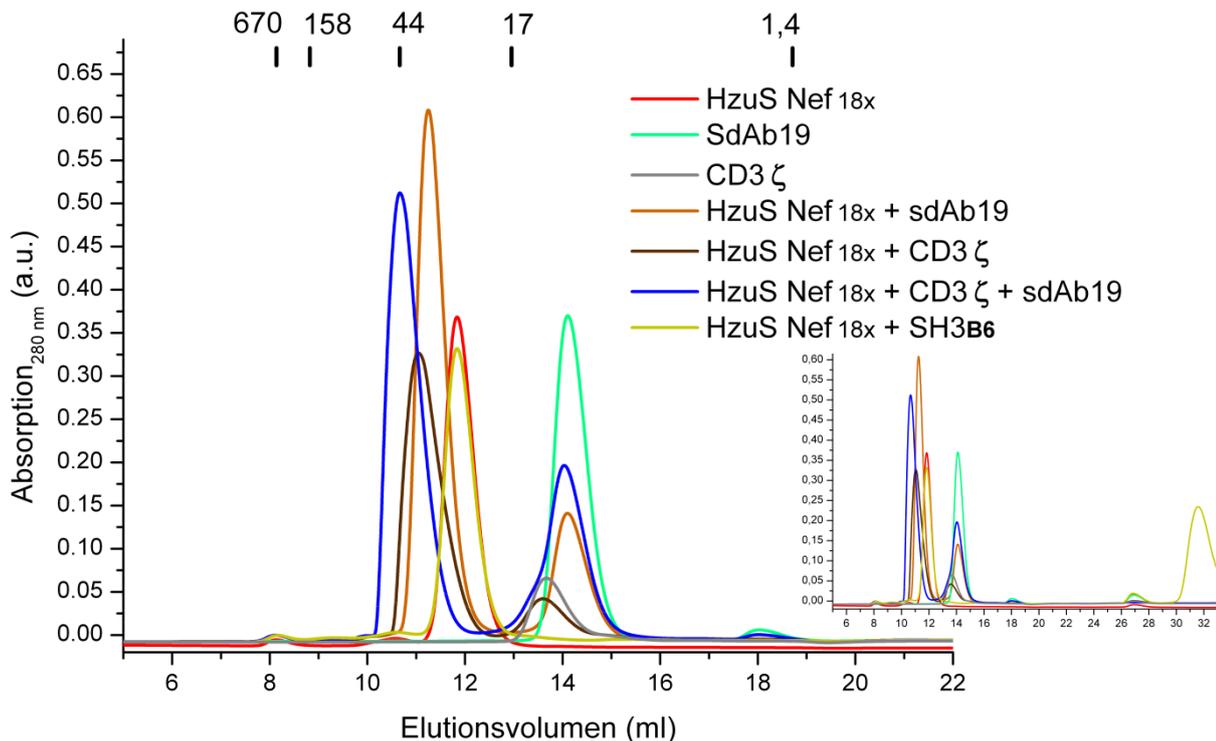


Abbildung 40: Analytische Größenausschlusschromatographie zur Untersuchung des Einflusses von sdAb19 auf die Interaktion zwischen HzuS Nef_{18x} und CD3 ζ. (A) Analytische Gelfiltration mit sieben Einzelläufen von HzuS Nef_{18x} (rot), sdAb19 (türkis) und CD3 ζ (grau) alleine und den Komplexen aus HzuS Nef_{18x} und sdAb19 (hellbraun), HzuS Nef_{18x} und CD3 ζ (dunkelbraun), HzuS Nef_{18x}, CD3 ζ und sdAb19 (blau) sowie dem Ansatz HzuS Nef_{18x} mit SH3_{B6} (gelb). Von jedem Protein wurden 100 µl einer 1,5 mg/ml konzentrierten Lösung und damit 150 µg auf einer 10/30 Superdex 75-Säule aufgetragen, so dass die kleineren Bindungspartner im Überschuss vorlagen. Als entgaster Laufpuffer diente 20 mM Tris-HCl, (pH 8) und 100 mM NaCl. Das kleine Elutionsprofil repräsentiert den gesamten Lauf bis 33 ml um den Peak von SH3_{B6} darzustellen.

4.2 Biochemische Untersuchung der Nef-interagierenden Adaptorproteinkomplexe AP1 und AP2

4.2.1 Darstellung des heterotetrameren AP1-Komplexes

Um die inhibitorischen Effekte von sdAb19 und Nefin auf die Endozytose von CD4 zu untersuchen, sowie biochemische Daten zur Funktionsweise der Nef-vermittelten Internalisierung von CD4 zu erhalten, wurde im Zuge dieser Arbeit auch mit CD4 sowie mit dem heterotetrameren Adaptorproteinkomplex 2 (AP2) gearbeitet. AP2 ist zusammen mit Cathrin die wichtigste Komponente bei der Endozytose von CD4 mittels umhüllter Vesikel. Für die zelluläre Endozytose von CD4 durch Clathrin und AP2 sind zwei Leucine in der zytoplasmatischen Domäne von CD4 essenziell, sowie die Phosphorylierung eines vorangegangenen, benachbarten Serins (Shin et al., 1990; Shin et al., 1991). Es konnte aber gezeigt werden, dass die CD4-Runterregulierung durch Nef unabhängig von der Phosphorylierung der Serine abläuft (Garcia and Miller, 1991). Das Dileucinmotiv von CD4 mit der Konsensussequenz SxxxLL ähnelt dem der C-terminalen flexiblen Schleife mit der Sequenz E/DxxxLL von Nef, die womöglich auf gleicher Weise mit der α- und σ2-Untereinheit von AP2 interagiert, in der sich eine Bindestelle für Dileucinmotive befindet. Damit, zusammen mit der Bindung von CD4 mittels der hydrophoben Tasche, vermittelt Nef möglicherweise direkt die Interaktion zwischen CD4 und AP2 (Doray, Lee et al. 2007).

Mit MHC-I existiert ein weiterer Rezeptor der durch Nef internalisiert wird und dessen Mechanismus Gegenstand vieler Untersuchungen ist. Hierbei wird ein Komplex aus Nef, AP1 und der zytoplasmatischen Domäne von MHC-I gebildet (Noviello et al., 2007). Anders als zwischen Nef, CD4 und AP2, in der eine natürlich vorkommende Interaktion zwischen AP2 und CD4 vermittelt wird, ist die durch Nef induzierte Interaktion zwischen AP1 und MHC-I eine nicht natürlich vorkommende. Kürzlich konnte die Struktur eines Komplexes aus einer MHC-I-CD-Nef Fusion (MHC-I-CD = zytosolische Domäne von MHC-I) und der C-terminalen Domäne der μ 1-Untereinheit von AP1 kristallografisch gelöst werden (Jia et al., 2012). Wie zuvor schon vermutet bindet MHC-I-CD nur zusammen mit Nef an AP1, so dass MHC-I mittels einer tertiären kooperativen Interaktion runterreguliert wird (Noviello et al., 2007; Singh et al., 2009).

Zur biochemischen Untersuchung dieser Rezeptorinternalisierungen wurden zunächst die Kernkomplexe der heterotetrameren Adaptorproteinkomplexe AP1 und AP2 exprimiert und gereinigt. Für AP1 wurde zusätzlich eine Mutante hergestellt, in der Threonin 154 auf der μ 1-Untereinheit gegen zwei Aspartate ausgetauscht wurden, um die natürliche Phosphorylierung nachzustellen, die für die Bindung an Cargoproteinen ohne die Anwesenheit von Nef essenziell ist. Zur Expression wurden BL21(DE3)-R/Rosetta Zellen verwendet, die für AP1 mit den Plasmiden pRSF-duet MCS 1: His- β 1 (1-600) ; MCS2: μ 1 (1-423) und pET-duet MCS1: His- γ (1-616) ; MCS 2: σ 1(1-158) und für AP2 mit den Plasmiden pRSF-duet MCS 1: His- β 2 (1-591) ; MCS2: μ 2 (1-435) und pET-duet MCS1: His- α (1-660) ; MCS 2: σ 2(1-142) transformiert wurden. Die Expression und die Reinigung von AP1, AP1 μ DD und AP2 erfolgte wie in Abschnitt 3.9.10-3.9.12 beschrieben. Während den präparativen Gelfiltrationen konnte bereits festgestellt werden, dass die Komplexbildung von AP1 und AP1 μ DD wesentlich besser verlief als die von AP2, was sich bei AP2 in der Gelfiltration in zwei aufeinander folgenden Peaks widerspiegelt (siehe Abbildung 42). Aus diesem Grund wurden die saubersten Fraktionen nach der präparativen Gelfiltration vereinigt und nach erfolgter Konzentrierung der Proben zunächst analytische Gelfiltrationen der Komplexe durchgeführt und die Reinheit auf weiteren SDS-Gelelutions überprüft (Abbildungen 41 und 42). In Abbildung 41 ist ersichtlich, dass die analytische Gelfiltration von AP1 und AP1 μ DD einen einzelnen monodispersen Peak ergibt. Auch in der denaturierenden SDS-PAGE kann auf dem SDS-Gel AP1 als stöchiometrischen 1:1:1:1-Komplex mit den Untereinheiten γ , β 1, μ 1 und σ 1 bei einem Retentionsvolumen von etwa 13,6 ml identifiziert werden, was mit der theoretischen Masse von 207,85 kDa übereinstimmt. Gleiches gilt für AP1 μ DD mit einer gesamten Masse des heterotetrameren Komplexes von 208 kDa.

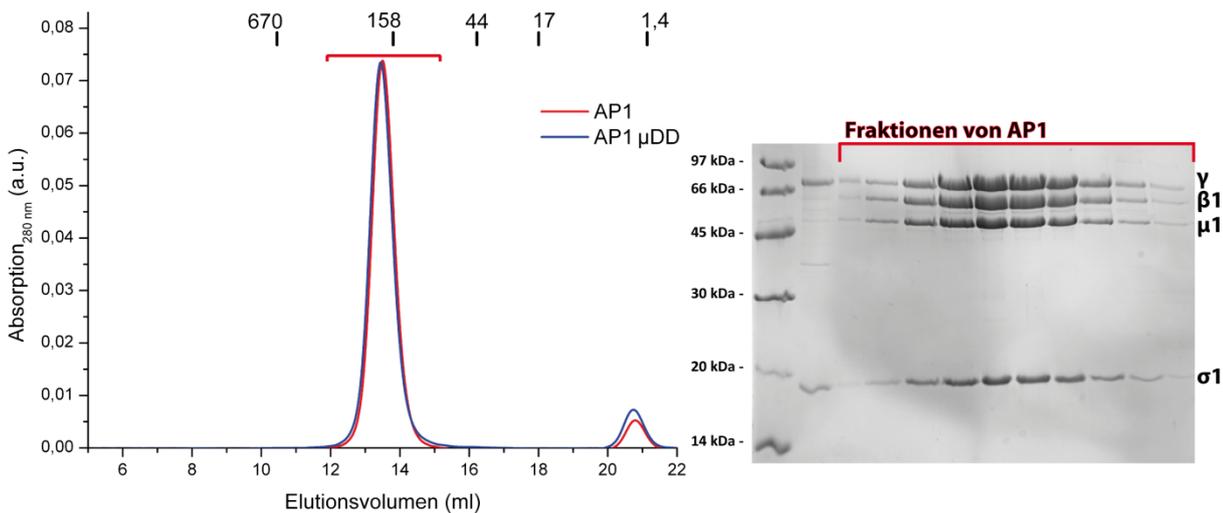


Abbildung 41: Analytische Größenausschlusschromatographie zur Analyse der Stöchiometrie des heterotetrameren Adaptorproteinkomplex 1 (AP1), sowie der Mutante AP1 μ DD. Analytische Gelfiltration von AP1 (rot) und AP1 μ DD (blau) nach erfolgter Reinigung. Die Fraktionen des Peaks von AP1, die mittels denaturierender SDS-PAGE analysiert wurden, sind rot markiert. Die γ -Untereinheit hat eine Masse von etwa 70 kDa, β 1 von 68 kDa, μ 1 von 48,5 kDa und σ 1 von 18,7 kDa, so dass alle Untereinheiten auf dem SDS-Gel in einer 1:1:1:1-Stöchiometrie zu erkennen sind. In der analytischen Größenausschlusschromatographie wurden 150 μ g des Komplexes auf einer 10/30 Superdex 75-Säule aufgetragen. Als entgaster Laufpuffer diente 20 mM Tris-HCl, (pH 8,7) mit 100 mM NaCl und 10 mM TCEP. Beim SDS-Gel handelt es sich um das Ergebnis der denaturierenden SDS-PAGE eines 20%-igen Gels nach erfolgter Coomassie-Färbung.

4.2.2 Darstellung des heterotetrameren AP2-Komplexes

Im Fall des AP2-Komplexes gestaltete sich die Komplexbildung schwieriger. In der analytischen Gelfiltration mit AP2 wird nicht wie bei AP1 ein einzelner Peak im Retentionsvolumen von etwa 13,8 ml erhalten, was der Masse von 208 kDa entsprechen würde, sondern zusätzlich ein Peak bei 15 ml (Abbildung 42). Nach der Auftrennung einzelner Fraktionen der analytischen Gelfiltration konnte in allen durchgängig die σ 2-Untereinheit mit seiner Masse von 17 kDa identifiziert werden. Die Zuordnung der anderen Banden zwischen 50 und 70 kDa war schwieriger. Die His- α -Untereinheit hat eine Masse von 75 kDa, während die β 2-Untereinheit eine Masse von 70 kDa besitzt. Möglicherweise befinden sich beide Untereinheiten in der Bande kurz unter der 66 kDa-Bande des LMW-Markers. Die μ 1-Untereinheit befindet sich mit einer Masse von etwa 49,6 kDa hingegen unterhalb dieser Bande, wobei diese in der analytischen Gelfiltration nur im vorderen Peak zu erkennen ist (Abbildung 42). Im hinteren Peak scheint diese zu fehlen, was möglicherweise mit der Instabilität des AP2-Komplexes einhergeht.

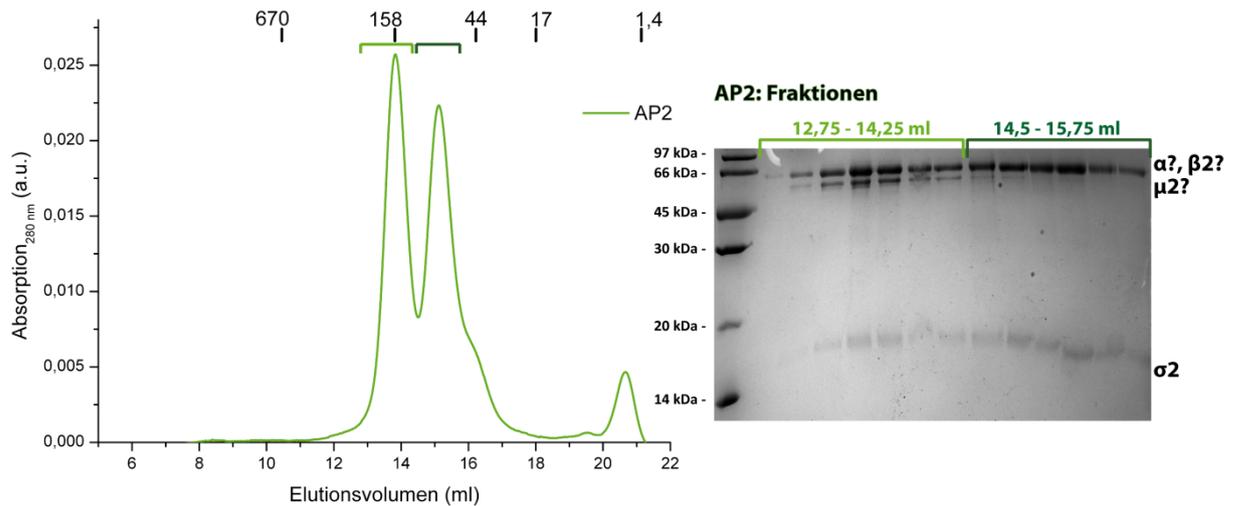


Abbildung 42: Analyse der Komplexbildung des heterotetrameren Adaptorproteinkomplex 2. Analytische Gelfiltration von AP2 (grün) nach erfolgter Reinigung. Die Fraktionen des vorderen Peaks (grün, 12,75 ml bis 14,25 ml) und des hinteren Peaks (dunkelgrün, 14,5 ml bis 15,75 ml) wurden mittels denaturierender SDS-PAGE analysiert. Die α -Untereinheit hat eine theoretische Masse von 75 kDa, β 2 70 kDa, μ 2 49,6 kDa und σ 2 17 kDa, so dass auf dem SDS-Gel nur die σ 2-Untereinheit einwandfrei zu erkennen ist. In der analytischen Größenausschlusschromatographie wurden 100 μ g des Komplexes auf einer 10/30 Superdex 75 Säule aufgetragen. Als entgaster Laufpuffer diente 20 mM Tris-HCl, (pH 8,7) mit 100 mM NaCl und 10 mM TCEP. Dargestellt ist das Ergebnis der denaturierenden SDS-PAGE eines 20%-igen SDS-Gels nach Coomassie-Färbung.

4.2.3 Massenspektrometrische Untersuchungen des AP2-Komplexes

Um alle vier Untereinheiten zu identifizieren, wurden Proben aus der Reinigung von AP2 über 20%ige und 12%ige SDS-Gele getrennt, die gewünschte Banden ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine mittels MALDI-TOF-basierten PMF (*Peptid Mass Fingerprint*) analysiert (Abbildung 43 und Abbildung 79 im Anhang). Es wurde dabei eine Bande kurz unterhalb des 66 kDa Markers (1, rot), eine bei 17 kDa (2, blau), eine mit der Masse von 66 kDa (3, violett) sowie eine von 50 kDa (4, grün) ausgeschnitten und der PMF-Service am Zentrum für Molekulare Medizin in Köln genutzt. Hierbei wird als Protease für den Peptidverdau Trypsin verwendet, das in der Peptidkette spezifisch C-terminal hinter den Arginin- und Lysinresten schneidet, woraufhin die erhaltenen Peptidmassen in der MALDI mit den Massen des theoretischen Trypsinverdau der gesuchten Proteinsequenzen verglichen werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich in der breiten Bande kurz unterhalb von 66 kDa (Bande 1, rot) die α -Untereinheit zusammen mit der β 1-Untereinheit befindet, wofür auch die erhaltene Masse des Komplexes bei der analytischen Gelfiltration und die starke Intensivität der Bande spricht (Abbildung 43). Im PMF dieser Bande wurden für die α -Untereinheit 70 verschiedene Peptide mit einer Sequenzabdeckung von 69,6% sowie für die β 1-Untereinheit 117 Peptide mit einer Sequenzabdeckung von 81,8% gefunden (Abbildung 79 A und B im Anhang). Auch die σ 2-Untereinheit konnte in der zweiten Bande (Bande 3, blau) durch 8 gefundene Peptide in der Proteinsequenz mit einer Abdeckung von 44,4% (Abbildung 79 C im Anhang) sowie in der vierten Bande (Bande 4, grün) 94 Peptide der μ 2-Untereinheit mit einer Abdeckung von 77,7% gefunden werden (Abbildung 79 D im Anhang). In der dritten analysierten Bande befindet sich nach dem PMF ein mitgereinigtes nicht zu identifizierendes Protein aus *E. coli*.

Aus den bisherigen Analysen der drei exprimierten Komplexe AP1, AP1 μ DD und AP2 ist zu entnehmen, dass AP1 und AP1 μ DD in einer sauberen 1:1:1:1-Stöchiometrie erhalten wurde, so dass mit diesem Protein weitere biochemische Experimente durchgeführt werden konnten. Der AP2-Komplex hingegen scheint in einer Mischung aus 1:1:1:1-Stöchiometrie mit allen vier Untereinheiten zusammen und einem instabilen 1:1:1-Komplex, in der möglicherweise die μ 2-Untereinheit fehlt, vorzuliegen. Es werden im folgenden Abschnitt der Arbeit auch Experimente mit diesem Komplex durchgeführt, doch benötigt dieser möglicherweise molekularbiologische Veränderungen in den Untereinheiten, um diesen zu stabilisieren.

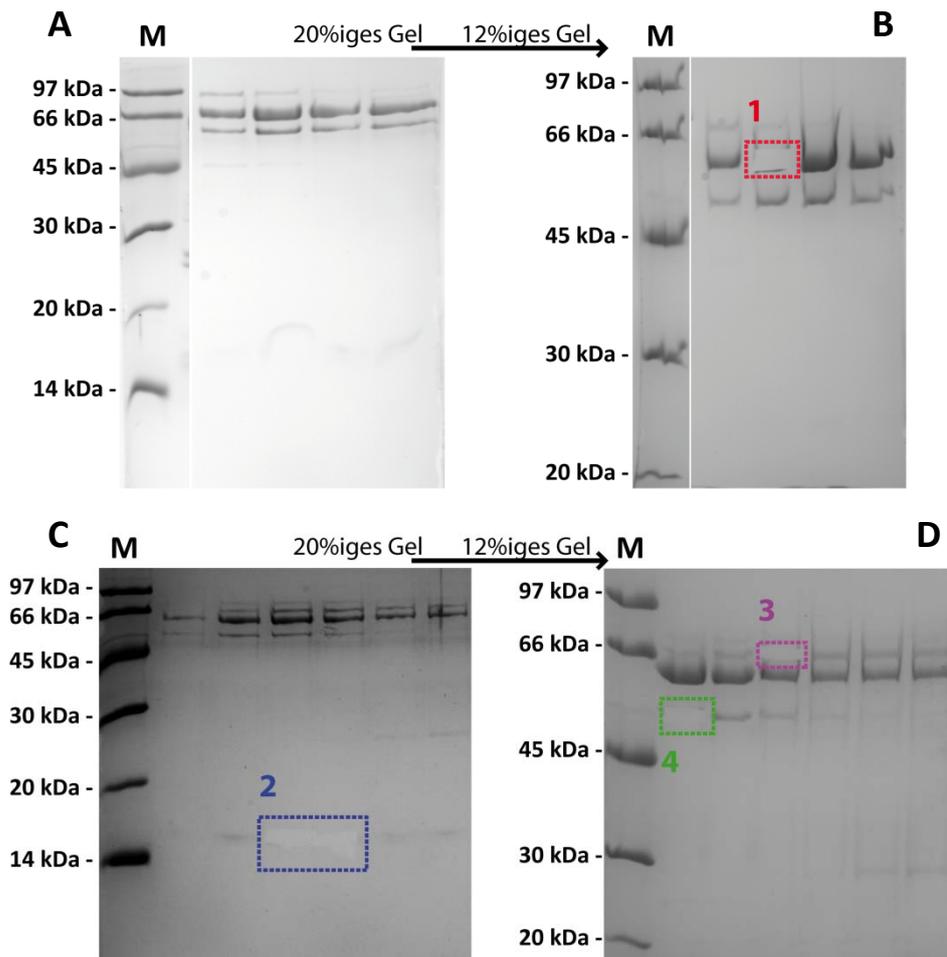


Abbildung 43: SDS-PAGE zur Analyse der Zusammensetzung des AP2-Komplexes. Dargestellt ist das Ergebnis der denaturierenden SDS-PAGE-Analyse mit Proben von AP2 nach der präparativen Gelfiltration während der Reinigung von AP2 über ein 20%iges (**A und C**), sowie über ein 12%iges SDS Gel (**B und D**) mit identischen Proben nach Coomassie-Färbung. Zur Analyse der Untereinheiten wurden die vier farblich markierten Banden ausgeschnitten und mittels PMF analysiert (Abbildung 79 im Anhang).

4.2.4 Biochemische Experimente zur Untersuchung der Interaktion zwischen AP1, MHC-I und Nef

Wie schon für den Komplex zwischen Nef, MHC-I und der C-terminalen Domäne der μ 1-Untereinheit von AP1 in Jia et al. (2012) gezeigt wurde, werden für die heterotrimeren Komplexformierung alle drei Proteine gemeinsam benötigt, wodurch ein tertiärer kooperativer Komplex gebildet wird. Hierbei ist zu erwähnen, dass in der Studie von Jia et al. (2012) für die Kristallisation des Komplexes die Fusion zwischen Nef und MHC-I unabdingbar war. Um in dieser Arbeit die Interaktionen der einzelnen Proteine zu untersuchen, wurden mit diesen analytische Gelfiltrationen sowie ITC-Messungen in verschiedenen Kombinationen durchgeführt. Hierbei sollte zum einen die Nef-vermittelte Interaktion zwischen AP1, bzw. der Mutante AP1 μ DD (phosphorylierungs-Mimikry), mit HLA-A2 bzw. HLA-B untersucht werden. Die verwendeten MHC-I-Peptide ähneln sehr denen, die für die Lösung der Nef-MHC-I-CD- μ 1 Struktur verwendet wurden (siehe Abschnitt 3.4 und Abbildung 38: HLA-A2₃₃₇₋₃₆₅, HLA-B₃₃₄₋₃₆₂, MHC-I-CD (HLA-A₃₃₈₋₃₆₅)). In der analytischen Gelfiltration wurden einzelnen Peaks bei einem Elutionsvolumen von etwa 20 ml für HLA-B (\approx 2,7 kDa), von 17 ml für Nef₁₋₂₁₀ (24,1 kDa), von etwa 13,5 ml für AP1 und AP1 μ DD (207,9 kDa bzw. 208 kDa) erhalten. Weder nach der Mischung von Nef mit AP1, noch nach der Mischung von Nef mit AP1 μ DD mit und ohne Zugabe des HLA-B-Peptids wurden Verschiebungen der Retentionsvolumina oder Änderungen der Elutionsvolumina beobachtet. In jedem Fall wurden nach versuchter Komplexbildung ausschließlich die einzelnen Peaks von Nef, AP1, AP1 μ DD und HLA-B erhalten (Abbildung 44). Mit dieser Methode konnte daher keine heterotrimeren Komplexbildungen nachgewiesen werden.

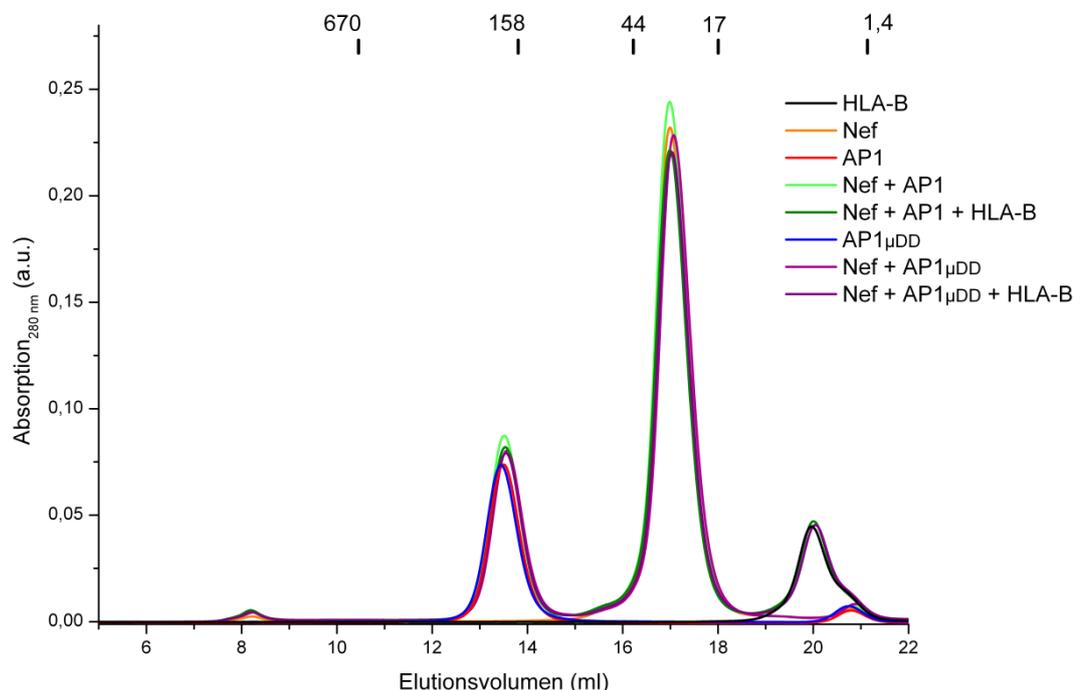


Abbildung 44: Analytische Größenausschlusschromatographie zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Nef, AP1 und MHC-I. Es wurden acht Einzelläufe durchgeführt mit HLA-B (schwarz), Nef₁₋₂₁₀ (orange), AP1 (rot) und AP1 μ DD (blau) alleine. Außerdem wurden Ansätze aus Nef und AP1 (hellgrün), Nef, AP1 und HLA-B (dunkelgrün), Nef und AP1 μ DD (magenta) sowie Nef, AP1 μ DD und HLA-B (violett) aufgetragen. Von jedem Protein wurden 100 μ l einer 1,5 mg/ml konzentrierten Lösung und damit 150 μ g eingesetzt, so dass die kleineren Bindungspartner im Überschuss vorlagen. Zur Durchführung wurde eine 10/30 Superdex 200 Säule und ein entgaster Laufpuffer aus 20 mM Tris-HCl, (pH 8,7) mit 100 mM NaCl und 10 mM TCEP verwendet.

Um zu untersuchen, ob die Affinitäten zu gering sind um in der analytischen Gelfiltration einen stabilen Komplex zu bilden oder die Proteine nicht miteinander interagieren, wurden außerdem ITC-Messungen durchgeführt. Hierzu wurden zum einen 400 μM des HLA-B-Peptids zu einer 20 μM Lösung aus Nef₁₋₂₁₀ und AP1, sowie 400 μM des HLA-A2-Peptids zu einer 20 μM Lösung aus Nef₁₋₂₁₀ und AP1 μDD titriert und die Wärmetönung aufgenommen (Abbildung 45 A und C). Hierbei konnte keine Interaktion von MHC-I mit Nef/AP1 bzw. mit Nef/AP1 μDD gemessen werden. In zwei anderen Messungen wurde anstatt des MHC-I-Peptids als Ligand Nef verwendet und dieses zu 20 μM Lösungen aus HLA-B und AP1 bzw. HLA-A2 und AP1 μDD titriert, wobei auch hier keine Bindung detektiert werden konnte.

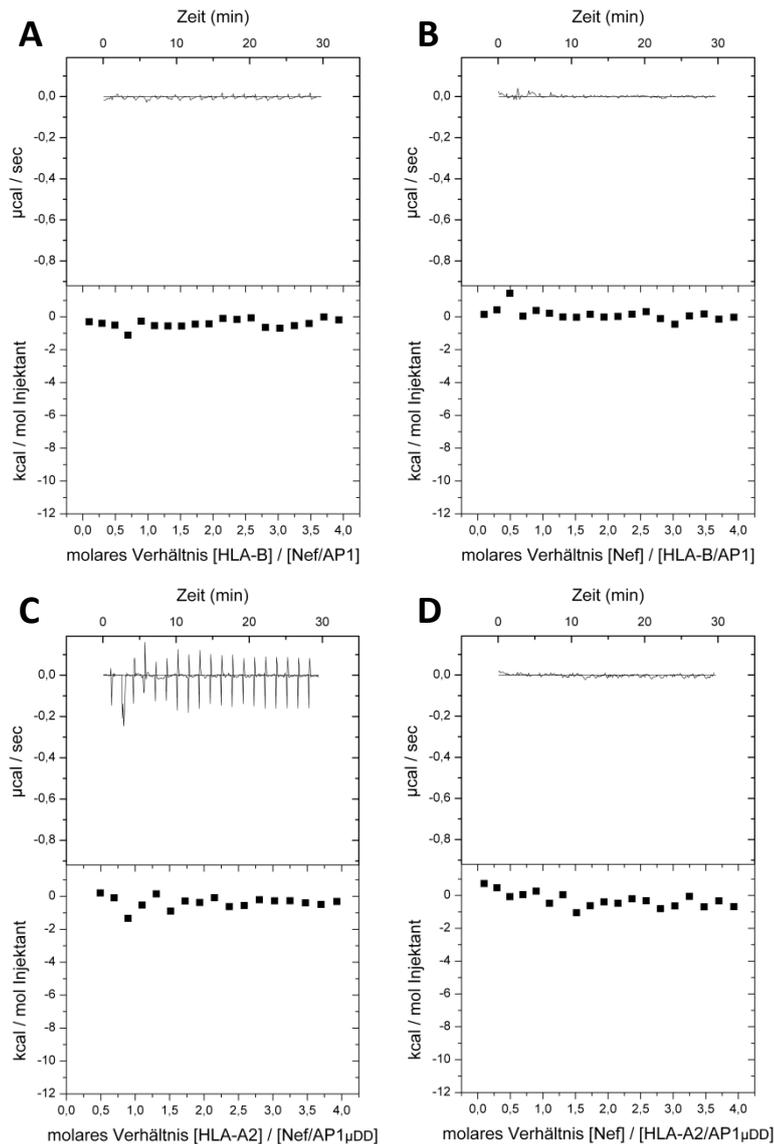


Abbildung 45: Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Nef, AP1 und MHC-I mittels isothermaler Titrationskalorimetrie. (A) Für die kalorimetrische Messung wurden in 19 Injektionen mit je 2 μl zum einen 400 μM HLA-B zu einer 20 μM Lösung aus Nef und AP1 sowie (B) 400 μM Nef zu einer 20 μM Lösung aus HLA-B und AP1 titriert. (C) Außerdem wurden 400 μM HLA-A2 zu 20 μM Nef und AP1 μDD sowie (D) 400 μM Nef zu 20 μM HLA-A2 und AP1 μDD titriert. Als entgaster Puffer wurden 20 mM Tris-HCl, (pH 8,7) mit 100 mM NaCl und 10 mM TCEP eingesetzt und die Messungen bei 25°C durchgeführt.

4.2.5 Biochemische Untersuchung der Interaktion zwischen AP2, CD4 und Nef

Zur biochemischen Untersuchung der Interaktion zwischen Nef, AP2 und CD4 wurde ähnlich wie bei Nef, AP1 und MHC-I analytische Gelfiltrationen und ITC-Messungen durchgeführt. Hierfür wurde ein CD4-Peptid der zytosolischen Domäne des CD4-Rezeptors verwendet, welches das Dileucinmotiv enthält (CD4_{LL}: AYQQAERMSQIKRLLS). Das Peptid CD4_{LL} hat aufgrund seiner geringen Masse von etwa 1,9 kDa ein Retentionsvolumen von 20,8 ml, während Nef₁₋₂₁₀ wie zuvor bei seiner Masse von 24,14 kDa bei etwa 17 ml eluiert wird und AP2 den wie in Abschnitt 4.1.8.2 beschriebenen doppelten Peak bei 13,5 ml und 15,2 ml aufweist (Abbildung 46). Weder nach dem gemeinsamen Auftragen von Nef und AP2 noch von Nef, AP2 und dem CD4_{LL}-Peptid auf die Gelfiltrationssäule konnten Veränderungen der Retentionsvolumina beobachtet werden, so dass sich keine Komplexe formierten. Dieses Ergebnis wird auch durch die anschließenden ITC-Experimente bestätigt, in denen zum einen 400 μ M des CD4-Peptids zu 20 μ M Nef₁₋₁₂₀ allein und dann zu einer 20 μ M Lösung aus Nef₁₋₂₁₀ und AP2 titriert wurde (Abbildung 46).

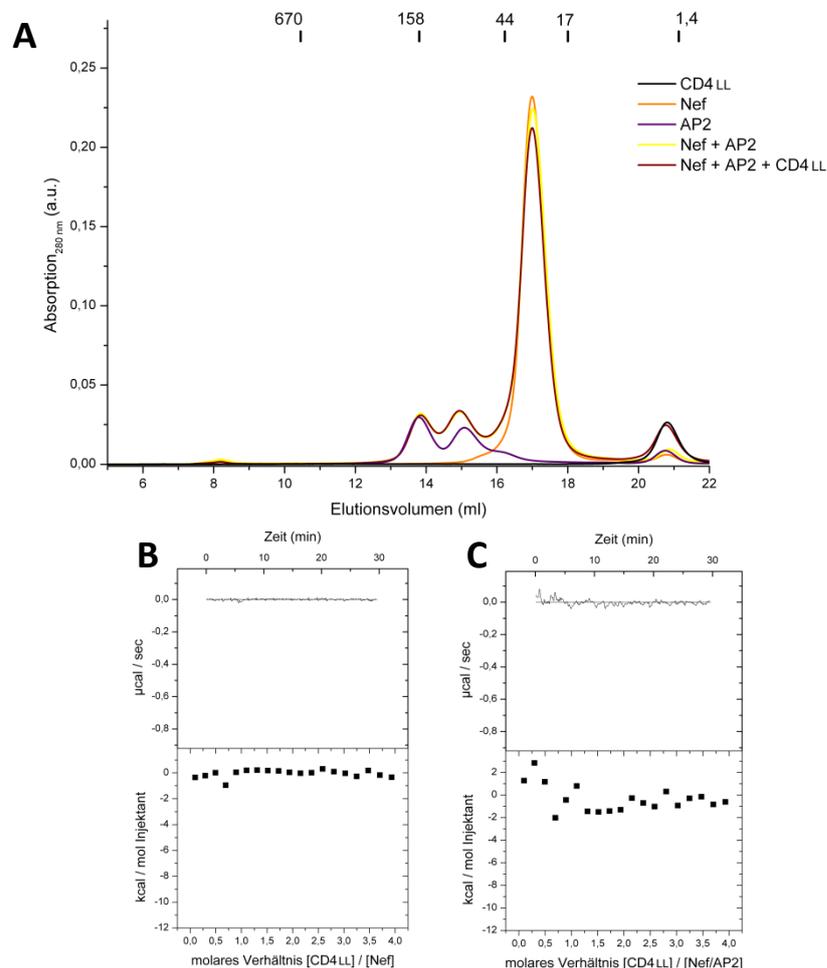


Abbildung 46: Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Nef, AP2 und CD4. (A) Analytische Größenausschlusschromatographie mit den fünf Einzelläufen des CD4_{LL}-Peptids (schwarz), Nef₁₋₂₁₀ (orange) und AP2 (violett) alleine. Außerdem wurden die Ansätze aus Nef und AP2 (gelb) und Nef, AP2 und CD4_{LL} (braun) aufgetragen. Von jedem Protein wurden 100 μ l einer 1 mg/ml Lösung und damit 100 μ g eingesetzt, so dass die kleineren Bindungspartner im Überschuss vorlagen. (B und C) Isothermale Titrationskalorimetrie zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Nef, AP2 und CD4. Es wurden in 19 Injektionen mit je 2 μ l zum einen 400 μ M des CD4_{LL}-Peptids zu 20 μ M Nef₁₋₂₁₀ sowie (C) 400 μ M CD4_{LL} zu einer 20 μ M Lösung aus Nef₁₋₂₁₀ und AP2 titriert. Als entgaster Puffer wurde bei beiden Methoden einer mit 20 mM Tris-HCl, (pH 8,7), 100 mM NaCl und 10 mM TCEP eingesetzt. Die Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

4.3 Screen eines kleinen molekularen Inhibitors gegen Nef

Da es sich bei Nef um ein retrovirales Protein handelt, das durch hohe Mutationsraten ständigen Veränderungen ausgesetzt ist, kann der Blick auf variable und konservierte Bereiche auf der Oberfläche in besonderem Maße Hinweise auf die Bedeutsamkeit von Sequenz-Motiven geben. Dazu wurde zunächst für diese Arbeit aufgrund des Fehlens einer Vollängenstruktur von Nef eine Modellstruktur generiert, unter Verwendung des N-Terminus 1-57 der Struktur 1QA5 (Geyer et al., 1999), der Reste 57-72 der Struktur 3REA (Breuer et al., 2011) und der Reste 72-208 der Struktur 3RBB (Horenkamp et al., 2011). Durch die strukturelle Überlagerung von 150 verschiedenen Nef Allelen, konnten der Grad der Sequenzkonservierung von variable bis konserviert auf der Oberfläche dargestellt werden (Abbildung 47) (Lülf et al., 2011).

Das P₇₆xxPxR Motiv ist dabei sehr stark konserviert, genauso wie das Dileucinmotiv in der C-terminalen flexiblen Schleife. Beide Motive sind dementsprechend nicht nur funktionell ein gutes Ziel für mögliche Inhibitoren. Im Kern sind im besonderen Maße zwei Bereiche stark konserviert: Zum einen einer mit den Resten Q122, T121, W117, L116, L114, I113, R110, L104, G100, G99 und L101, die zusammen mit dem etwas weniger konservierten L95 die hydrophobe Tasche bilden, bei der es sich um die Sortierungsmotiv-Erkennungsdomäne handelt (Horenkamp et al., 2011; Lee et al., 1996). Außerdem die Trennungsbarriere zwischen distaler Sortierungsmotiv-Erkennungsdomäne und proximaler RT-Schleifen-Erkennungsdomäne durch die Aminosäuren Phenylalanin 94 und Tryptophan 117. Die hydrophobe Tasche bindet das Dileucinmotiv von CD4 und ist damit ebenfalls ein gutes Ziel für mögliche Inhibitoren (Grzesiek et al., 1996b). Insbesondere handelt es sich hierbei um eine tiefe Tasche, in die eine niedermolekulare chemische Verbindung gut binden könnte. Bei SIV-Nef interagiert der gleiche Bereich außerdem mit der CD3 ζ -Kette zur Runterregulierung des CD3-Rezeptors (Kim et al., 2010). Somit ist die hydrophobe Tasche von Nef ein geeignetes Ziel für kleine molekulare Inhibitoren, die im Zuge dieser Arbeit innerhalb eines europäischen iNEF Konsortiums entwickelt werden sollten.

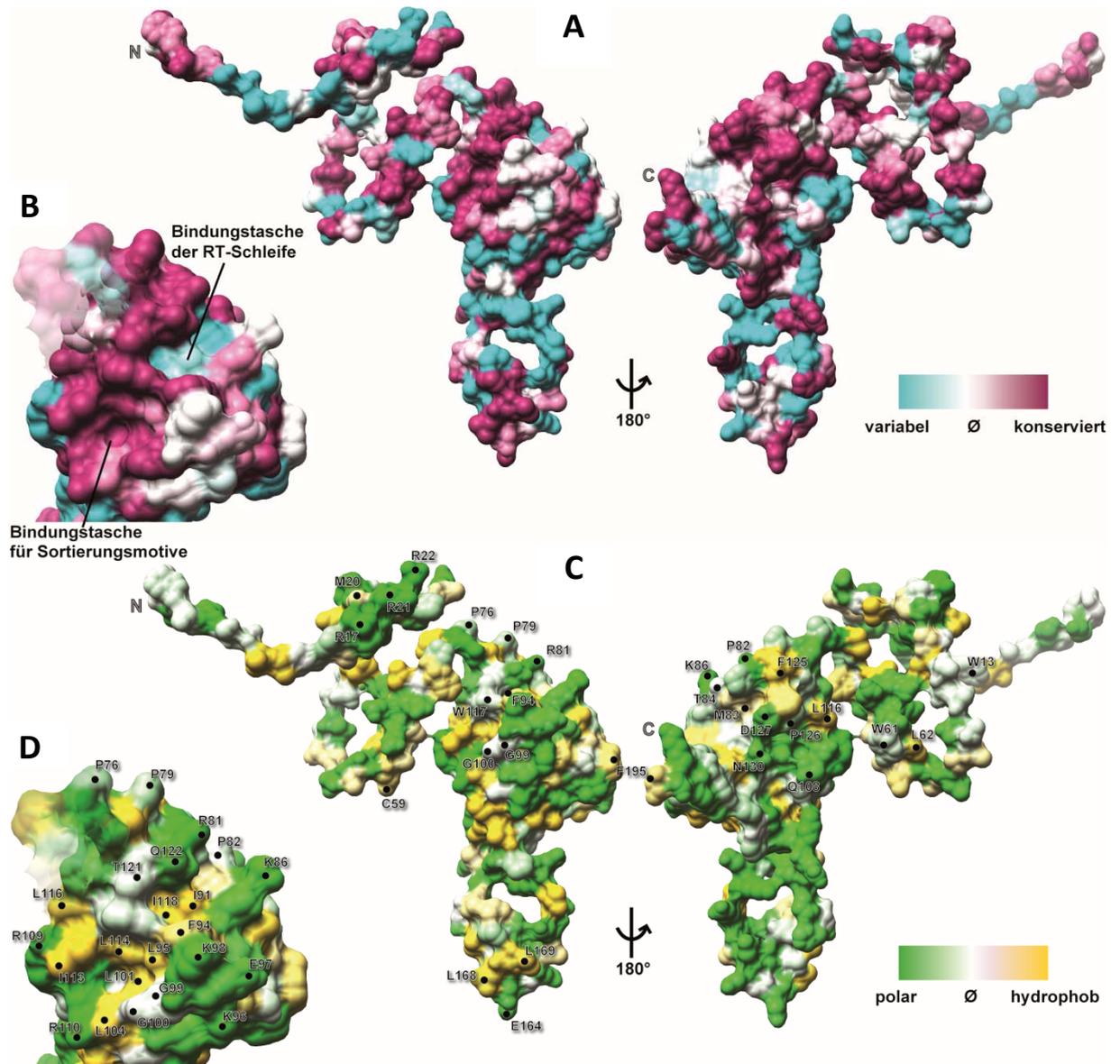


Abbildung 47: Konservierungsgrad und Hydropheizität von HIV-1 Allelen dargestellt auf der Oberfläche von Nef_{SF2}. (A) Darstellung der Stärke der Variabilität und Konservierung aller Reste auf der Oberfläche anhand eines Nef Modells zusammengesetzt aus den pdb-Eintragen 1QA5 (Geyer et al., 1999), 3REA (Breuer et al., 2011) 3RBB (Horenkamp et al., 2011). Die Konservierungsstärke ist von konserviert (rot) bis variabel (türkis) gezeigt. (B) Die Nahaufnahme der hydrophoben Tasche zeigt, dass die Reste der Aminosäuren Phenylalanin 94 und Tryptophan 117 diese in eine proximale Bindetasche für RT-Schleifen sowie in eine distale Bindetasche für Sortierungsmotive unterteilt. Hierbei ist die Letztere weit stärker konserviert, was auch Phenylalanin 94 und Tryptophan 117 miteinschließt. (C) Darstellung der Polarität auf der Oberfläche von Nef_{SF2} des gleichen Modells wie in (A). Hierbei wird das Ausmaß der Polarität in sehr polar (grün) bis sehr hydrophob (gelb) gezeigt. (D) Die Ansicht der hydrophoben Tasche wie in (B) in Hinblick auf die Polarität zeigt, dass sich in den proximalen und distalen Bindetaschen viele hydrophobe Reste befinden. Die strukturellen Überlagerungen wurden mit dem Consurf-Server und dem Programm UCSF Chimera erstellt.

4.3.1 Arbeitsweise des iNEF Konsortiums im 7. EU-Forschungsrahmenprogramm

Im Rahmen des 7. Europäischen Forschungsrahmenprogramms, wurde innerhalb eines Zeitraums von 3,5 Jahren in einem europaweiten Konsortium nach inhibitorischen Substanzen gegen Nef gesucht, das unter der Leitung von Dr. Prof. Bruno Verhasselt im iNEF-Projekt (Inhibition von Nef) mit dem Arbeitstitel „*Inhibiting Nef: a novel drug target for HIV-host interactions*“ (FP7-HEALTH-2007-A) interdisziplinär zusammenarbeitete. Mit Frank Kirchhoff (Molekulare Virologie-Universitätsklinikum Ulm), Bruno Verhasselt (klinische Chemie, Mikrobiologie und Immunologie, Gent), Kalle Saksela (Virologie-Haartman Institute, Helsinki), Olivier Schwartz (Virologie-Institut Pasteur, Paris), Paul Jolicoeur (Experimentelle Medizin, University von Montreal (US)), Matthias Geyer (Physikalische Biochemie, MPI Dortmund), Marcel Hibert (Fakultät der Pharmazie von Straßburg) und Patrice Debré (Immunologie, INSERM Paris), in industrieller Zusammenarbeit mit der Firma Ecosynth® zur Herstellung der chemischen Verbindungen, arbeitete ein interdisziplinäres Konsortium international zusammen. Ausgangspunkt des Projektes waren erste Studien, in denen Nef als Ziel für kleine molekulare Inhibitoren getestet wurden (Olszewski et al., 2004; Oneyama et al., 2003). Vor allem eine Studie, in der mittels virtuellen Screening eine Leitstruktur namens D1 gefunden wurde (Betzi et al., 2007), war Ausgangspunkt der Herstellung mehrerer Derivate. In dieser Studie wurde für das virtuelle Screening die Bindungsoberfläche zwischen Nef und SH3-Domänen ausgewählt, die zwischen dem PxxP-Motiv und des RT-Schleifen Bindemotivs eine Tasche von 1264 Å² Größe ausbildet. Hierbei wurde mittels Hochdurchsatz-Docking Substanzen mit einer Affinität im mikromolaren Bereich (ITC) gefunden, die in der Nef-SH3 Interaktionsfläche binden (NMR) und diese Interaktion stören (zelluläre Versuche, Pull-Downs) (Betzi et al., 2007). Obwohl diese Studie erstmals zeigt, dass es möglich ist niedermolekulare chemische Verbindungen zu finden die an Nef binden um dieses zu inhibieren, sind die Affinitäten der D1-Derivate zu schwach und die Bindungsstelle auf Nef nicht ausreichend definiert, so dass eine potente Inhibition von Nef nicht erreicht werden konnte.

Unter anderem war das DLC-27 (*D1-like compound 27*), ein Derivat der Leitstruktur D1, zu Beginn des iNEF-Projektes Ausgangspunkt zur Herstellung neuer Derivate durch die Firma EcoSynth. Diese Substanzen wurden daraufhin innerhalb des Konsortiums durch verschiedene Hochdurchsatzmethoden vieler Arbeitsgruppen getestet. Sobald eine Substanz in entsprechenden Versuchen beispielsweise die Interaktion zwischen Nef und einer SH3-Domäne beeinflusste, wurden im Zuge dieser Arbeit biochemischen Experimente durchgeführt (Abbildung 48).

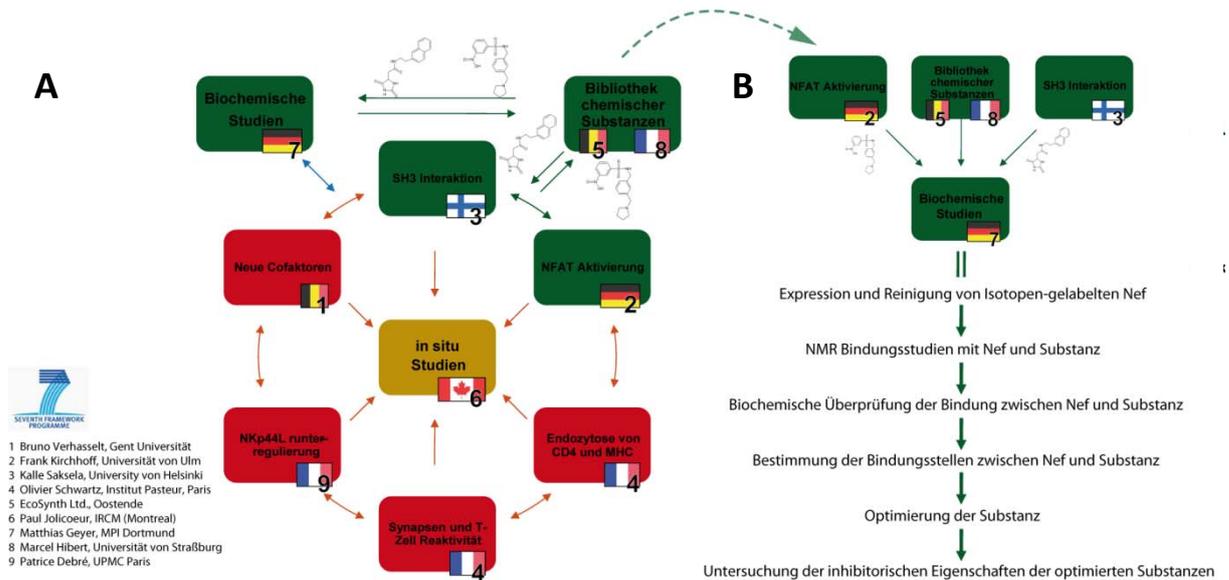


Abbildung 48: Arbeitsschema des iNEF Konsortiums. Von 2008 bis Mitte 2011 wurde innerhalb des iNEF Konsortiums im Rahmen des 7. europäischen Forschungsrahmenprogramm an der Suche nach Nef inhibierenden Substanzen gearbeitet. **(A)** Das Konsortium bestand aus 9 Mitgliedern, dessen Arbeitsgruppen sehr unterschiedliche Expertisen aufwiesen, so dass mit molekularbiologischen, biochemischen, biophysikalischen, immunologischen, virologischen und medizinischen Methoden ein großes methodisches Spektrum abgedeckt wurde. Die kleinen Moleküle wurden in zwei chemischen Bibliotheken in Paris und Oostende synthetisiert und an verschiedene Arbeitsgruppen geschickt, um sie auf mögliche inhibitorische Wirkungen mittels Hochdurchsatzmethoden zu testen (Netzwerk, rote Pfeile). Mit diesen Methoden ließen sich in kürzester Zeit tausende chemische Verbindungen darauf untersuchen, ob sie bestimmte Nef-vermittelte Funktionen stören. **(B)** Die in diesen Untersuchungen als positive Treffer identifizierten Moleküle (grüne Pfeile) wurden dann im Zuge dieser Arbeit mittels NMR und weiteren Methoden darauf getestet, ob sie direkt an Nef binden und welche biochemischen und strukturellen Auswirkungen dies hat.

4.3.2 Herstellung von isotoopenmarkierten Nef und Titrationsreihen mittels 2D HSQC-NMR-Spektroskopie

Um zu untersuchen, ob die in den Hochdurchsatzmethoden inhibierten Funktionen von Nef durch eine direkte Interaktion zwischen Substanz und Nef verursacht werden, wurden im Folgenden Titrationsreihen mittels heteronuklearer HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)-2D-Spektroskopie durchgeführt. Hierfür ist die ^{15}N -Isotopenmarkierung des Proteins notwendig, so dass Nef in entsprechendem Minimalmedium exprimiert (siehe Abschnitt 3.6) und anschließend gereinigt wurde. Aufgrund der Erfahrung in der NMR, dass sich der flexible N-Terminus negativ auf die Signalauflösung auswirkt, wurde für die Messungen N-terminal verkürztes ^{15}N -markiertes Nef₄₅₋₂₁₀ hergestellt (Abbildung 49) (Breuer et al., 2011). Zusätzlich wurde Nef vollständig ^{13}C - und ^{15}N -isotoopenmarkiert hergestellt, um in Kooperation mit PD Dr. Sonja Dames in München eine vollständige Zuordnung der einzelnen Aminosäuren zu den Resonanzfrequenzen im HSQC-Spektrum (*Assignment*) zu Erhalten. Bisher wurden dabei 103 Aminosäuren zugeordnet, was 49% aller Reste entspricht. Hiervon konnten aber nur 46 Reste in den in dieser Arbeit gemessenen HSQC-Spektren zugeordnet werden (gelb), da viele Peaks vor allem im Kernbereich im Zentrum des HSQC-Spektrums nicht so gut definiert sind (rot) (Abbildung 49).

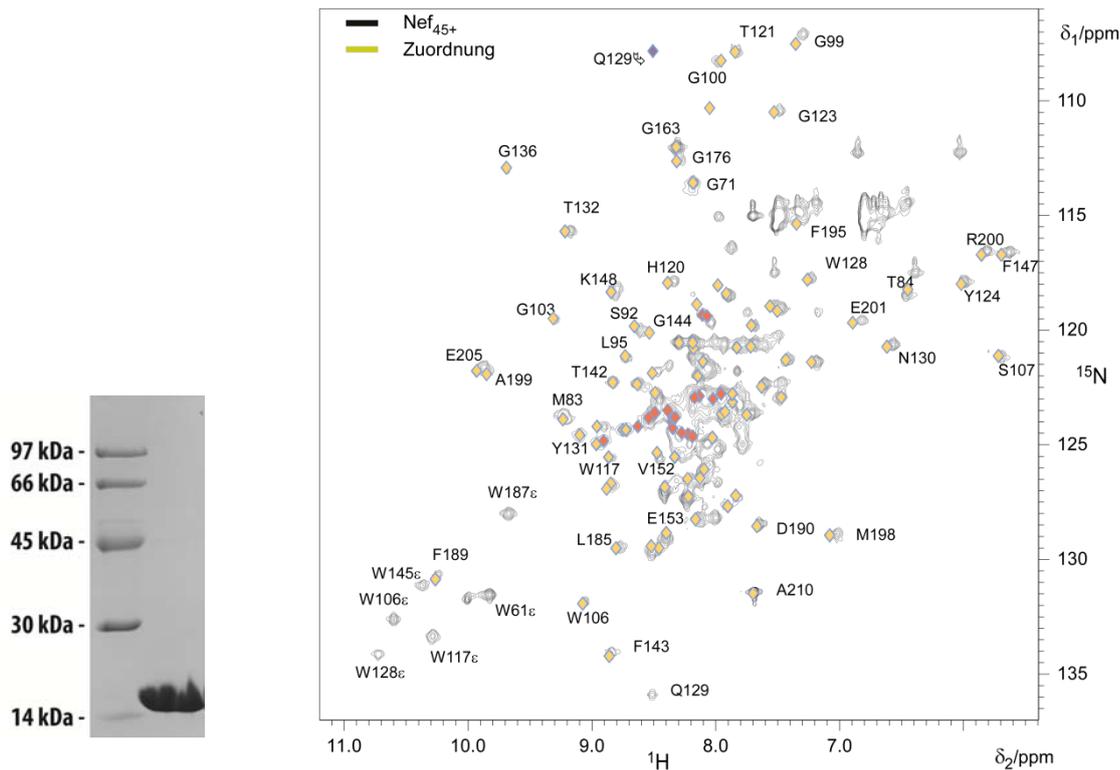


Abbildung 49: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren von Nef₄₅₋₂₁₀ und Aminosäuren-Zuordnung der Resonanzsignale. Über das Grundspektrum (schwarz) wurden das erhaltene Koordinatengitter der Zuordnung der Peaks gelegt, um diese im Grundspektrum identifizieren zu können. Hierbei sind die zuordnungsbaeren Peaks gelb und die aufgrund nicht ausreichend definierten Peaks nicht zuordnungsbaeren in rot eingefärbt. Auf der x-Achse ist die ^1H - und auf der y-Achse die ^{15}N -chemische Verschiebung aufgetragen.

Für die Aufnahme der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren in den Bindungsexperimenten wurde die Probe auf die Konzentration von 0,4 mM verdünnt und zunächst ein Grundspektrum von Nef allein aufgenommen und anschließend als Negativkontrolle DMSO zutitriert. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit der chemischen Verbindungen in wässrigen Lösungen, wurden zur Vergleichbarkeit der Titrationsmessungen grundsätzlich alle Substanzen in DMSO gelöst und anschließend zu Nef titriert. Hierbei wurden Zeitraum, die Anzahl der gemessenen Resonanzsignale und die Anzahl der Spuren so optimiert, dass ein angemessenes Signal zu Rausch-Verhältnis erzielt wurde. Hierbei wurde bei einer Messzeit von mindestens 3 Stunden und 10 Minuten, der Anzahl von 24 Scans und bei $180^\circ \times 2$ aufgenommenen Spuren die besten Spektren erhalten und dies für alle Messungen so beibehalten. Durch die Zugabe von DMSO zu 0,4 mM ^{15}N -markiertem Nef₄₅₋₂₁₀ konnten auch im zeitlichen Verlauf der Messung keine Veränderungen der chemischen Verschiebungen im HSQC-Spektrum beobachtet werden. Deshalb konnte ausgeschlossen werden, dass DMSO während den Titrationsmessungen einen negativen Einfluss auf die Stabilität von Nef hat (Abbildung 50).

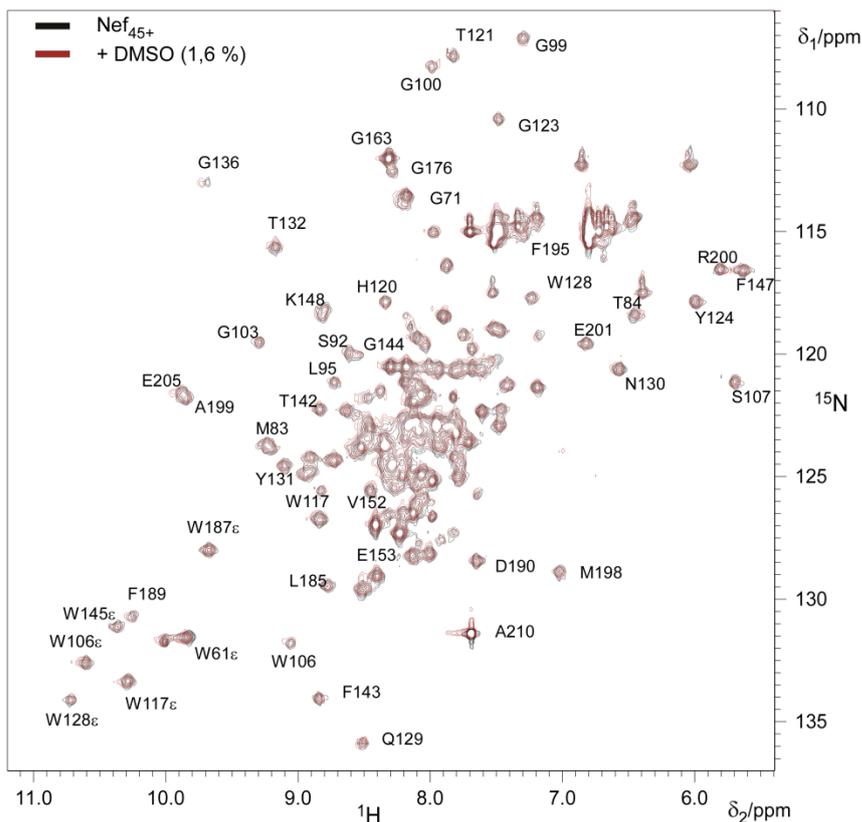
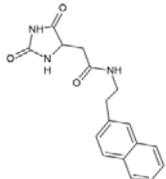
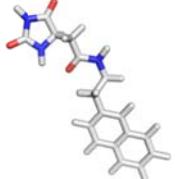
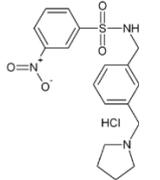
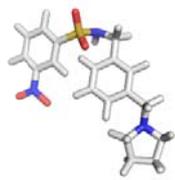


Abbildung 50: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren von Nef₄₅₋₂₁₀ ohne und mit DMSO. Es wurden 585 μl einer 0,4 mM Lösung von ^{15}N -markiertem Nef₄₅₋₂₁₀ in 5 mM Tris/HCl Puffer, (pH 8,0) und 8% D_2O bei 25°C und einer Feldstärke von 600 MHz gemessen. In schwarz ist das Grundspektrum vor und in roter Farbe das HSQC-Spektrum nach der Zugabe von 10,1 μl DMSO (1,6%) zu sehen. Durch die Zugabe von DMSO sind keine Veränderungen der chemischen Verschiebungen der Resonanzsignale der Aminosäuren von Nef₄₅₋₂₁₀ zu beobachten.

In mehreren Messreihen wurden alle in den Hochdurchsatzmethoden als positiv identifizierte Substanzen zu Nef titriert. Hierbei wurde von jeder Substanz jeweils 0,8 mM und somit die doppelte molare Menge von Nef eingesetzt und dabei immer zwei aufeinander folgende Messungen mit unterschiedlichen Substanzen durchgeführt. In einer dieser Titrationsreihen wurde zunächst ES000287 zugegeben und gemessen, mit anschließendem Hinzugeben von ES000219 (Tabelle 3). Es konnten nach der Zugabe von ES000287 nur eine leichte Verschiebung eines Peaks einer noch nicht zugeordneten Aminosäuren beobachtet werden (Abbildung 51, gelb umkreist), die nach der Zugabe von ES000219 deutlich stärker ausfiel. Außerdem kamen zusätzlich deutliche Veränderungen von W61, G99, G100, T121, W117 sowie eines noch nicht zugeordneten Peaks hinzu (Abbildung 51, rot umkreist).

Tabelle 3: Tabellarische Zusammenfassung der Eigenschaften und strukturelle Informationen von ES000287 und ES000219.

Substanz	MW [Da]	Summenformel	Strukturformel	Stäbchen-Modell
ES000287	311,34	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃		
ES000219	375,44	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₄ S		

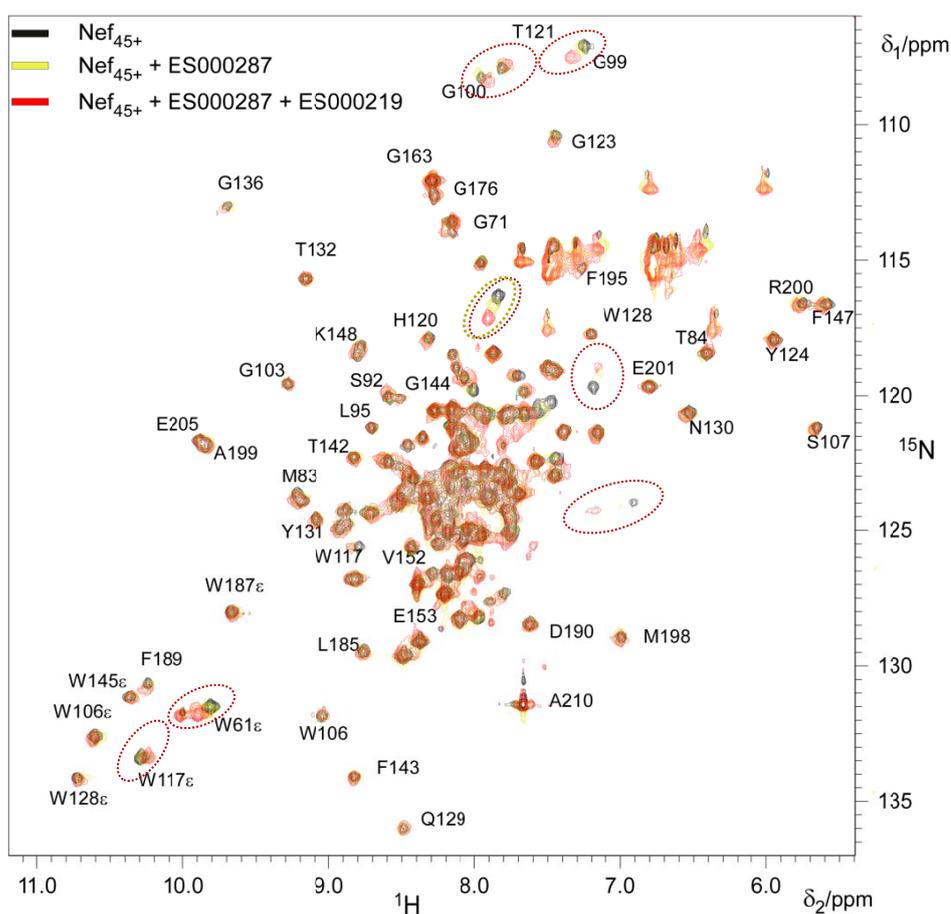


Abbildung 51: ¹H/¹⁵N HSQC-Spektren von Nef₄₅₋₂₁₀, sowie von Nef₄₅₋₂₁₀ + ES000287 und Nef₄₅₋₂₁₀ + ES000287 + ES000219 (1:2:2). Die Messung wurde wie in Abbildung 50 beschrieben durchgeführt. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz, das nach Zugabe von ES000287 gelb und das nach Zugabe von ES000219 rot gefärbt. Veränderungen chemischer Verschiebungen sind durch ES000287 durch gelbe und ES000219 durch rote Kreise markiert.

Aufgrund der deutlich zu beobachteten Veränderungen der chemischen Verschiebungen nach der Zugabe von ES000219 im HSQC-Spektrum, wurde eine Titrationsreihe allein mit ES000219 durchgeführt, in der dieses in fünf aufeinanderfolgenden Schritten zu Nef titriert

wurde. Dafür wurde das ES000219 in DMSO gelöst, eine Stammlösung von 100 mM angesetzt und dieses nach der Aufnahme des Grundspektrums von Nef₄₅₋₂₁₀ in den molaren Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 zu Nef gegeben (Abbildung 52). Durch diese Titrationsreihe konnte nach der im Verhältnis zu Nef 2-fachen Zugabe von ES000219 beobachteten Veränderungen der chemischen Verschiebungen aus Abbildung 51 bestätigt und sogar durch die weitere Erhöhung bis zu einem Verhältnis von 1:16 verstärkt werden. Es konnten Verschiebungen für die Aminosäuren W61 ϵ , G99, G100, T121, W117 ϵ , T84 sowie für drei noch nicht zugeordnete Reste verfolgt werden.

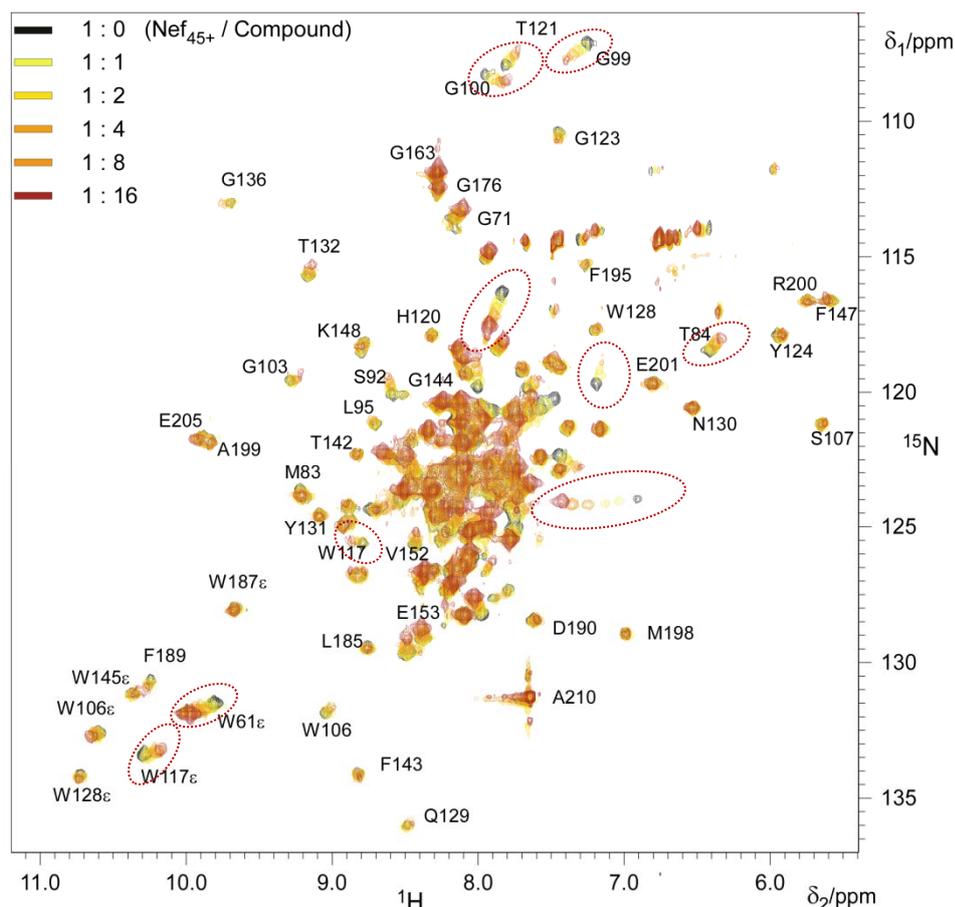


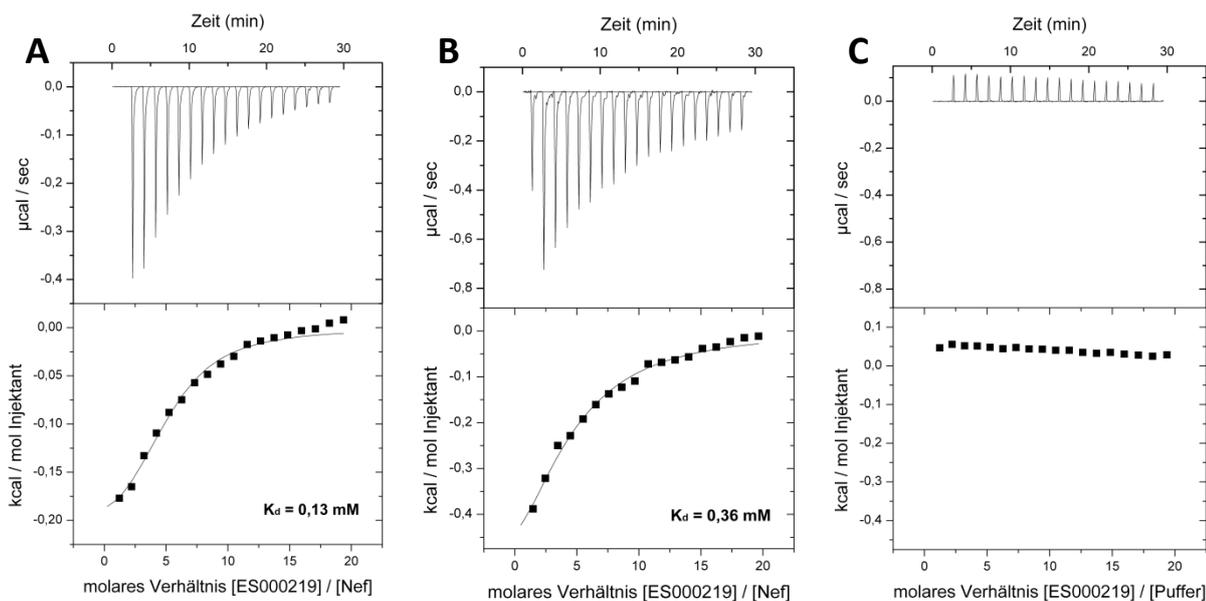
Abbildung 52: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000219.

Es wurden wie zuvor 585 μl einer 0,4 mM Lösung von ^{15}N -markieren Nef₄₅₋₂₁₀ in 5 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,0) und 8% D_2O bei 25°C und einer Feldstärke von 600 MHz gemessen. Die Substanz wurde in DMSO gelöst und eine Stammlösung von 100 mM angesetzt. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz dargestellt. Die Titration von ES000219 erfolgte in Konzentrationen von 0,4 mM bis 6,4 mM (1:1-1:16), farblich abgestuft gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Die markantesten Veränderungen der chemischen Verschiebungen sind markiert.

4.3.3 ITC-Messungen mit ES000219 und HIV-1 Nef

Nachdem mittels NMR die Bindung von ES000219 an Nef anhand der Veränderungen der chemischen Verschiebungen in HSQC-Spektren beobachtet werden konnte, wurde versucht diese Bindung mittels ITC zu bestätigen. Hierbei wurde ES000219 in Puffer gelöst und eine 50 mM Stammlösung angesetzt. Weder bei den Titrationsen von 200 μM ES000219 zu 20 μM Nef, noch bei 500 μM zu 25 μM oder 1 μM zu 100 μM konnte Reaktionswärme gemessen werden. Aufgrund der geringen Löslichkeit und der wahrscheinlich schwachen Affinität wurde

die Konzentration von ES000219 in der Spritze bis auf 2 mM erhöht und zu 100 μM Nef titriert. Hierbei konnte erstmalig reaktionsabhängige Temperaturänderungen in Folge des Titrierens von ES000219 detektiert werden (nicht gezeigt). Da es bis zum Ende der Messung zu keiner Sättigung der Bindung kam, wurde die molare Menge von ES000219 bis auf 10 mM erhöht, bei gleichbleibender molaren Menge von Nef von 100 μM , so dass die Substanz nicht wie üblicherweise in ITC-Messungen in etwa einem 10-fachen Überschuss vorlag, sondern in einem 100-fachen. In Abbildung 53 sind zwei ITC-Messungen abgebildet, in denen ES000219 zu Nef₄₅₋₂₁₀ titriert sowie eine Kontrollmessung in der ES000219 zu Puffer titriert wurde. Aus der dazugehörigen Tabelle wird ersichtlich, dass zwar die Bindung zwischen ES000219 und Nef aus den NMR-Messungen bestätigt werden konnte, doch ist die Ermittlung einer distinkten Affinität nicht möglich. Denn schon die sehr hohen n-Werte, die bei einer erwarteten äquimolaren Bindungsstöchiometrie zwischen Ligand und Nef um 1 liegen sollten zeigen, dass die Messungen hohe Fehlerraten aufweisen. Dadurch sind die folgenden ITC-Messungen der Substanzen nicht sehr genau, zeigen aber dass diese an Nef binden und die Affinitäten im millimolaren Bereich liegen, was mit den Veränderungen der chemischen Verschiebungen der NMR-Messungen übereinstimmt. Die Reaktion läuft aufgrund der negativen Enthalpieänderungen exotherm ab, bei gleichzeitiger Zunahme der Unordnung des Systems durch positive Entropieänderungen.



	K _d (mM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol/deg)	T ΔS (kcal/mol)	n (^l -1 / _{l,l})
(A) ES000219/Nef	0,13	-5,324	-0,23 (±0,02)	0,017	5,10	4,98 (±0,30)
(B) ES000219/Nef	0,36	-4,691	-0,845 (±0,17)	0,013	3,85	3,88 (±0,63)
(C) ES000219/Puffer	-	-	-	-	-	-

Abbildung 53: Bindungsstudien mit Nef und ES000219 mittels ITC. (A und B) Isothermale Titrationskalorimetrie zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Nef und ES000219. In beiden Messungen wurden in 19 Injektionen mit je 2 μl eine Lösung von 10 mM ES000219 zu 100 μM Nef₄₅₋₂₁₀ titriert. (C) Titration von 10 mM ES000219 zu Puffer. Als entgaster Puffer wurde 20 mM Tris-HCl, (pH 8,0) mit 100 mM NaCl, sowie 5% DMSO eingesetzt und die Messungen bei 25°C durchgeführt. Die relevanten Messwerte sind tabellarisch zusammengefasst.

4.3.4 NMR-Titrationsreihen mit Nef und Derivaten von ES000219

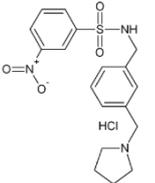
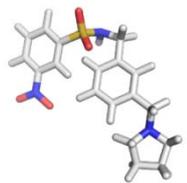
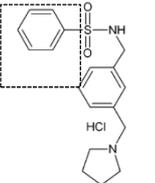
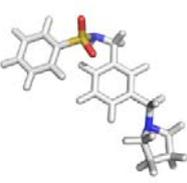
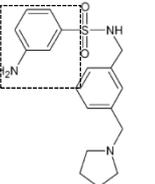
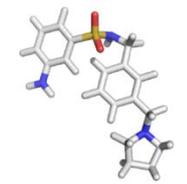
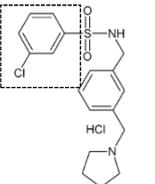
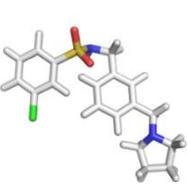
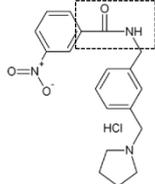
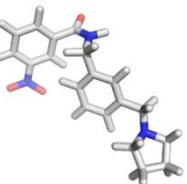
In NMR Titrationsversuchen, sowie in ITC-Experimenten konnte die Bindung von ES000219 an HIV-1 Nef gezeigt werden. Um die an der Interaktion beteiligten Bereiche zwischen ES000219 und Nef eingrenzen zu können und möglicherweise besser oder schlechter bindende Substanzen zu erhalten, wurden zusammen mit der Firma EcoSynth eine ganze Reihe von Derivate von ES000219 geplant, synthetisiert und in NMR-Bindungsstudien eingesetzt. Hierbei wurden verschiedene Bereiche der Substanz, wie in den Tabellen 4-6 gezeigt, sukzessiv verändert.

4.3.4.1 Derivate von ES000219 mit veränderter Nitro- und Sulfon-Gruppe

Der erste modifizierte Bereich von ES000219 besteht aus einem Nitrogruppe (R-NO₂), dessen Rest mit dem Kohlenstoffatom 6 (C6) eines Benzolrings verbunden ist. Diese wurde im Derivat ES000668 entfernt, in ES000378 gegen eine Aminogruppe und in ES000669 gegen ein Chloratom ausgetauscht (Tabelle 4). Darauf folgt eine Sulfon-Gruppe (R-(SO₂)-R), die mit dem C2 des Benzolrings verbunden ist und im Derivat ES000670 gegen ein Carbonylgruppe (R-CO-R) ersetzt wurde (Tabelle 4). Die verschiedenen Derivate weisen sehr unterschiedliche Löslichkeiten in wässrigen Lösungen auf, die in den NMR-Titrationsmessungen beachtet werden müssen, wenn man deren Bindungsaffinitäten an Nef anhand der HSQC-Spektren untereinander vergleichen möchte. Denn eine sehr schlecht lösliche Substanz, die während des Titrierens stark ausfällt, könnte die Stärke der Veränderungen der chemischen Verschiebungen negativ beeinflussen.

Aus diesem Grund wurde parallel zur Titrationsreihe die Gesamtmenge der eingesetzten Substanz einer Titrationsmessung in gleicher Menge Puffer (585 µl: 5 mM Tris-HCl, (pH 8)) ohne Anwesenheit des Proteins in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt, um die Stärke des Ausfallens zu dokumentieren. Zur Visualisierung wurde dann die Bewertung von 1 für sehr gut löslich bis 5 für unlöslich vorgenommen (Abbildungen 54-59 und im Anhang 80-86). Der Einfluss der Veränderungen der chemischen Verbindungen auf die Löslichkeit ist außerdem wichtig, um aus dieser Erfahrung heraus nachfolgend löslichere Derivate herzustellen. Im Falle der folgenden vier getesteten Derivate sind ES000668 und ES000669 wie auch ES000219 sehr gut löslich (Abbildungen 52, 54 und im Anhang 80), ES000378 etwas weniger löslich (Abbildung 55) und ES000670 unlöslich (Abbildung 81 im Anhang) in wässriger Lösung. Möglicherweise spiegelt sich dieses auch in den Stärken der Veränderungen der chemischen Verschiebungen wider. Während ES000668 und ES000669 im Prinzip identische Veränderungen der chemischen Verschiebungen wie ES000219 verursachen (Abbildungen 52, 54 und im Anhang 80), ist ES000378 etwas schlechter (Abbildung 55) und ES000670 (Abbildung 81 im Anhang) scheint kaum mit Nef zu interagieren. Diese NMR-Titrationsreihen zeigen, dass die Veränderungen der Nitro- und Sulfongruppe keinen Einfluss auf die Bindung an Nef haben. Außerdem hat der Austausch der Nitrogruppe zu einer Aminogruppe einen negativen Einfluss auf die Löslichkeit der Substanz, so dass folgende Derivate fast ausschließlich die Nitrogruppe besitzen.

Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung der Eigenschaften und strukturelle Informationen von ES000219, ES000668, ES000378, ES000669 und ES000670. Die Veränderungen der Derivate gegenüber der Leitstruktur ES000219 sind mit gestrichelten Rechtecken hervorgehoben.

Substanz	MW [Da]	Summenformel	Strukturformel	Stäbchen-Modell	Löslichkeit 1 [+] - 5 [-]
ES000219	375,44	$C_{18}H_{21}N_3O_4S$			1
ES000668 → Abbildung 54	330,45	$C_{18}H_{22}N_2O_2S$			1
ES000378 → Abbildung 55	345,46	$C_{18}H_{23}N_3O_2S$			2
ES000669 → Abb. 80 im Anhang	364,89	$C_{18}H_{21}N_2O_2S$			1
ES000670 → Abb. 81 Im Anhang	339,39	$C_{19}H_{21}N_3O_3$			4

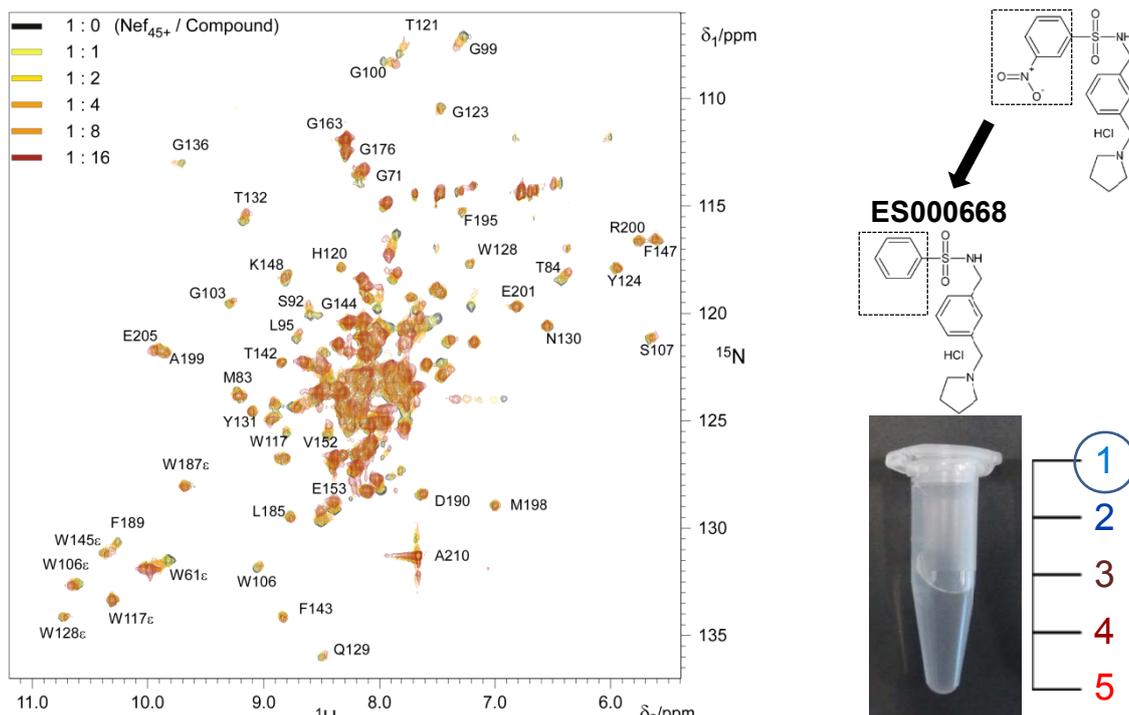


Abbildung 54: ¹H/¹⁵N HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000668 (1:0-1:16). Die Parameter entsprechen denen von Abbildung 52, so dass die Substanz und das Protein identisch eingesetzt wurden. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Die Titration von ES000668 erfolgte in den Schritten 1:1-1:16 im molaren Verhältnis zu Nef, farblich gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Die Veränderungen von ES000668 gegenüber ES000219 sowie ein Foto des Löslichkeitstest sind beigefügt.

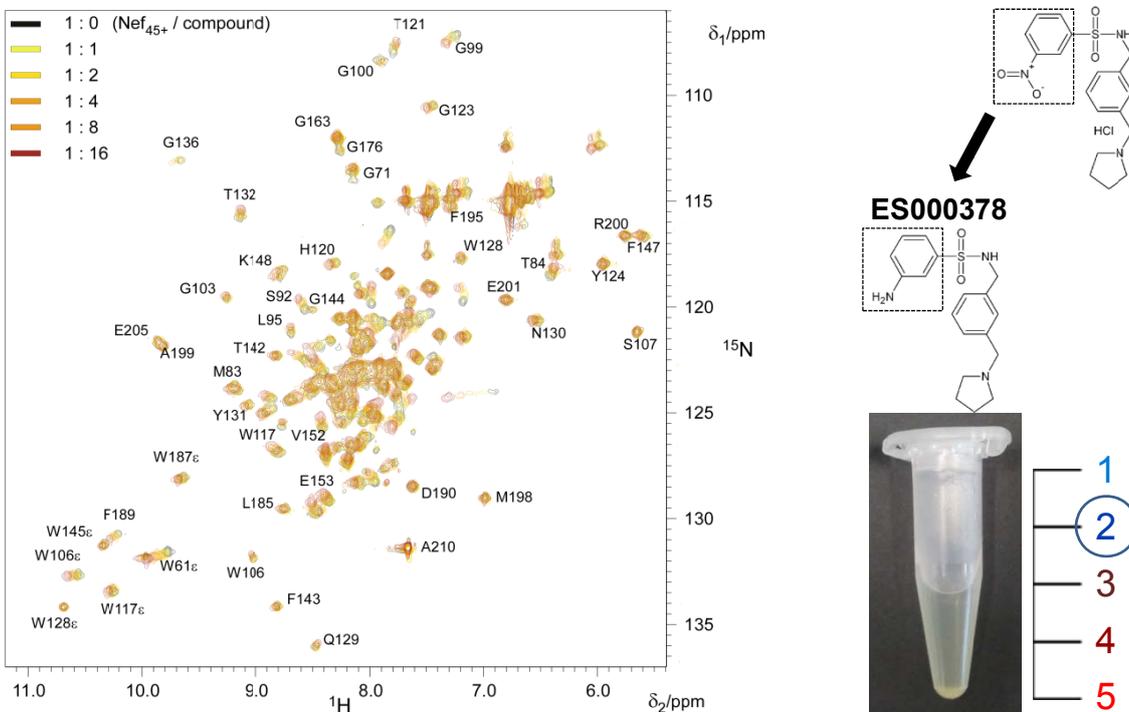
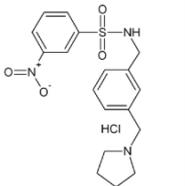
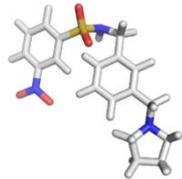
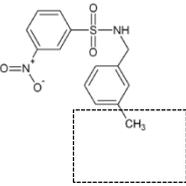
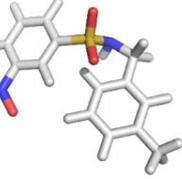
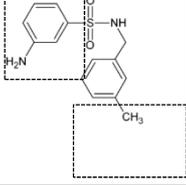
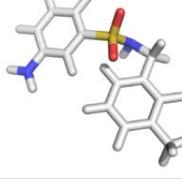
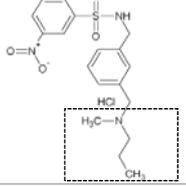
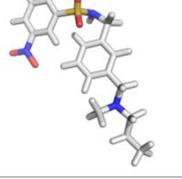


Abbildung 55: ¹H/¹⁵N HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000378 (1:0-1:16). Die Parameter entsprechen denen aus Abbildung 52, so dass die Substanz und das Protein identisch eingesetzt wurden. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Die Titration von ES000378 erfolgte wie in den Schritten 1:1-1:16 im molaren Verhältnis zu Nef, farblich gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Die Veränderungen von ES000378 gegenüber ES000219 sowie ein Foto des Löslichkeitstest sind beigefügt.

4.3.4.2 Derivate von ES000219 mit Veränderungen im Pyrrolidinring

Auf die Sulfon Gruppe von ES000219 folgt eine sekundäre Aminogruppe (R-NH-R), ein weiterer Benzolring und ein anschließender Pyrrolidinring. Die weiteren 8 Derivate weisen Veränderungen in den letzten beiden Bereichen und somit im Benzolring und Pyrrolidinring auf (Tabellen 5 und 6). Im Derivat ES000594 wurde der Pyrrolidinring entfernt und gegen eine Methylgruppe ausgetauscht, genauso wie bei ES000377, wobei hier zusätzlich die endständige Nitrogruppe gegen eine Aminogruppe ausgetauscht wurde, um die Substanz möglicherweise weniger toxisch zu machen. Das Derivat ES000675 hat im Gegensatz zu ES000219 im Prinzip einen geöffneten Pyrrolidinring (Tabelle 5). Diese Veränderungen haben Einfluss auf das Bindungsverhalten an Nef. Während ES000377 und ES000675 gut wasserlöslich sind, scheint ihre Affinität ähnlich gut wie ES000219 zu sein, wobei ES000675 sogar etwas stärkere Veränderungen der chemischen Verschiebungen verursacht (Abbildungen 56 und 57). ES000594 bindet nur noch sehr schwach an Nef, was darauf hinweist, dass der Pyrrolidinring an einer Interaktion beteiligt ist und dessen Deletion die Bindung verhindert. Hierbei ist auch zu beachten, dass die Löslichkeit sehr gering ist (Abbildung 82 im Anhang).

Tabelle 5: Tabellarische Zusammenfassung der Eigenschaften und strukturelle Informationen von ES000219, ES000594, ES000377 und ES000675. Die Veränderungen der Derivate gegenüber der Leitstruktur ES000219 sind mit gestrichelten Rechtecken hervorgehoben.

Substanz	MW [Da]	Summenformel	Strukturformel	Stäbchen-Modell	Löslichkeit 1 [+] - 5 [-]
ES000219	375,44	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₄ S			1
ES000594 → Abb. 82 Im Anhang	306,34	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₄ S			5
ES000377 → Abbildung 56	276,35	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ S			2
ES000675 → Abbildung 57	377,46	C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₄ S			1

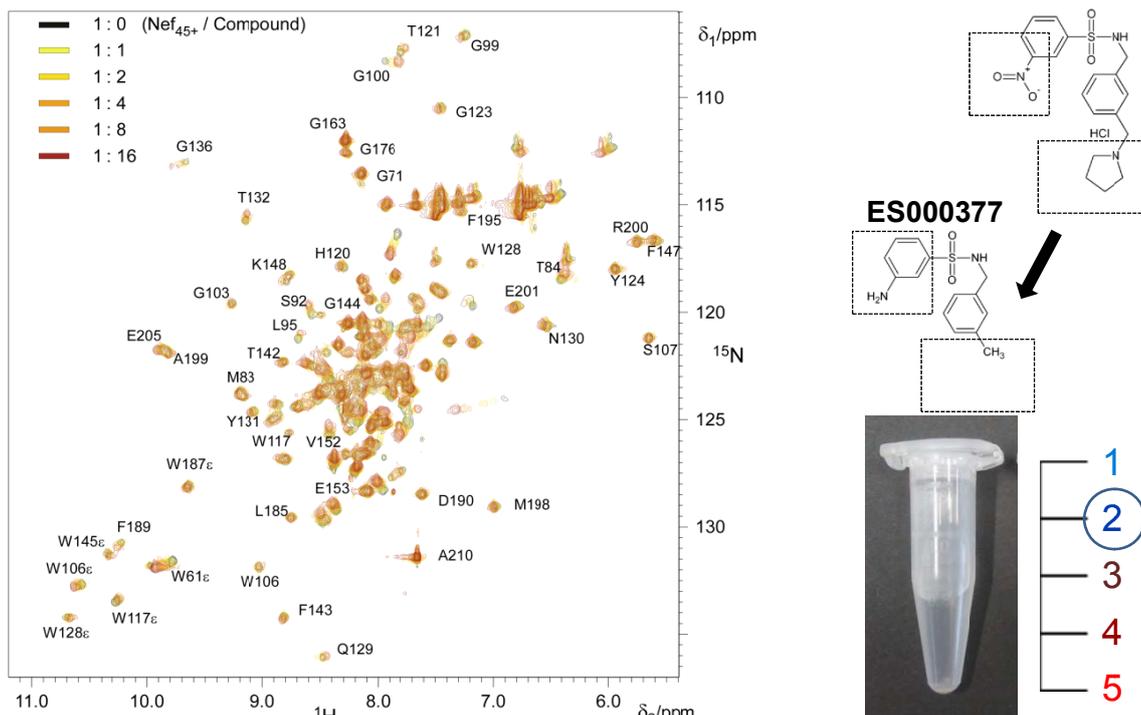


Abbildung 56: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000377.

Die Parameter entsprechen denen aus Abbildung 52, so dass die Substanz und das Protein identisch eingesetzt wurden. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Die Titration von ES000377 erfolgte wie in den Schritten 1:1-1:16 im molaren Verhältnis zu Nef, farblich gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Die Veränderungen von ES000377 gegenüber ES000219 sowie ein Foto des Löslichkeitstest sind beigefügt.

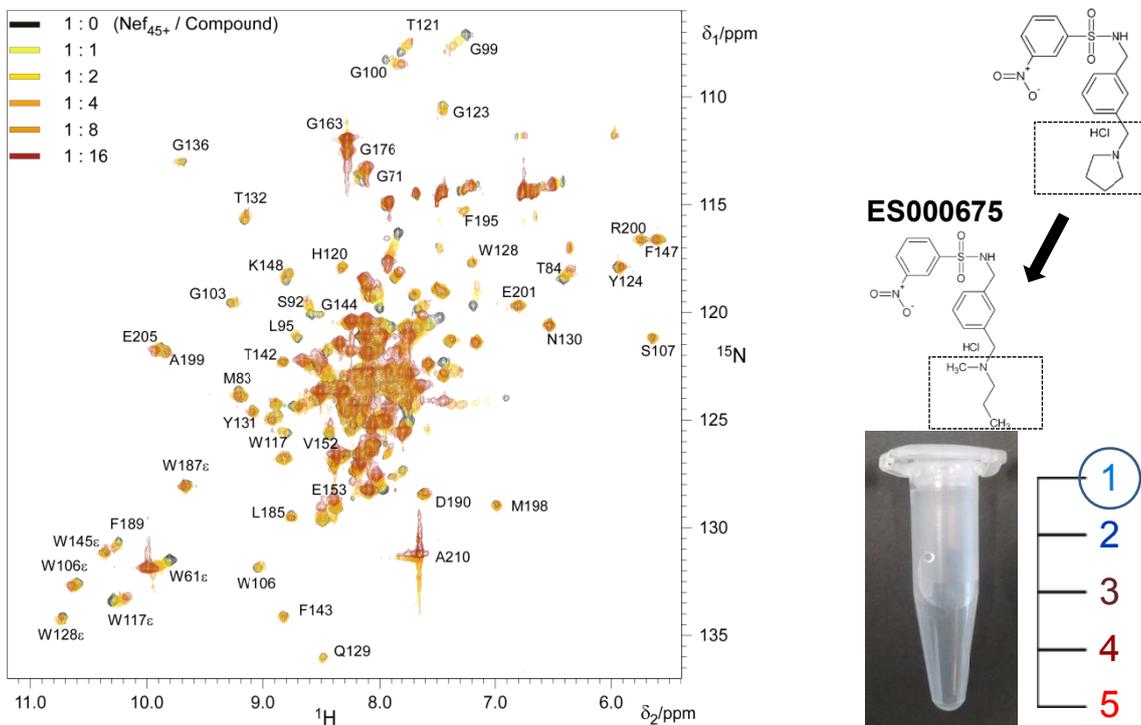


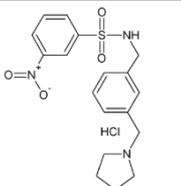
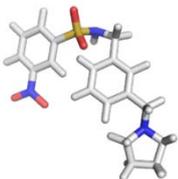
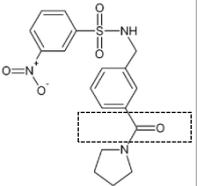
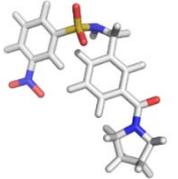
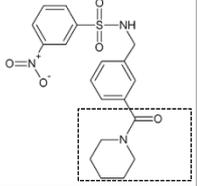
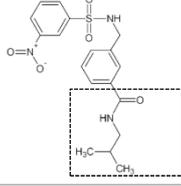
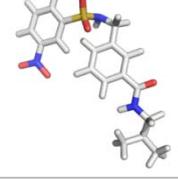
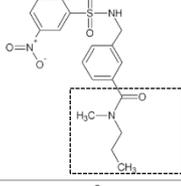
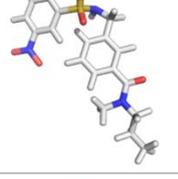
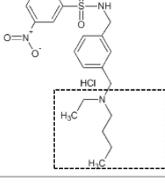
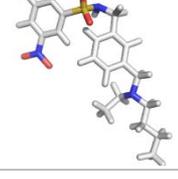
Abbildung 57: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000675.

Die Parameter entsprechen denen aus Abbildung 52, so dass die Substanz und das Protein identisch eingesetzt wurden. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Die Titration von ES000675 erfolgte wie in den Schritten 1:1-1:16 im molaren Verhältnis zu Nef, farblich gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Die Veränderungen von ES000675 gegenüber ES000219 sowie ein Foto des Löslichkeitstest sind beigefügt.

4.3.4.3 Derivate von ES000219 mit Veränderungen im und vor dem Pyrrolidinring

In den nächsten vier ES000219-Derivaten wurde zwischen Benzolring und Pyrrolidinring eine Carbonylgruppe eingebracht, was zum Derivat ES000671 führt (Tabelle 6). ES000672 besitzt zusätzlich anstelle des Pyrrolidinrings ein Pyridinring, während bei ES000673 und ES000674 der Pyrrolidinring geöffnet ist und gegen unterschiedlich lange aliphatische Kohlenwasserstoffe ersetzt wurde, was im Prinzip dem Myristylanker von Nef nachempfunden ist. In ES000794 wurde dabei die Carbonylgruppe wieder entfernt. In Tabelle 6 sind die Bezeichnungen der Derivate sowie deren Eigenschaften und Struktur zusammengefasst.

Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung der Eigenschaften und strukturelle Informationen von ES000219, ES000671, ES000672, ES000673, ES000674 und ES000794. Die Veränderungen der Derivate gegenüber der Leitstruktur ES000219 sind mit gestrichelten Rechtecken hervorgehoben.

Substanz	MW [Da]	Summenformel	Strukturformel	Stäbchen-Modell	Löslichkeit 1 [+] - 5 [-]
ES000219	375,44	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₄ S			1
ES000671 → Abb. 83 Im Anhang	389,43	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₅ S			3
ES000672 → Abb. 84 Im Anhang	403,45	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₅ S			3
ES000673 → Abbildung 58	391,44	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ S			5
ES000674 → Abb. 85 Im Anhang	391,44	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅ S			2
ES000794 → Abbildung 59	441,97	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₄ S			2

Das alleinige Einführen der Carbonylgruppe in ES000671 oder diese in Kombination mit dem Ersetzen des Pyrrolidinrings gegen einen Pyridinring im ES000672, setzt die Affinität zu Nef scheinbar genauso herab wie die Löslichkeit (Abbildungen 83 und im Anhang Abbildung 85). Dies verstärkt sich in ES000673 durch das Entfernen des Pyrrolidinrings, indem eine 2-Methylpropyl-Gruppe als Rest mit der sekundären Aminogruppe verknüpft ist (Abbildung 58). Im Derivat ES000674 wurden diese angeknüpften aliphatischen Kohlenwasserstoffe so verändert, dass diese ähnlich wie im ES000675 einem geöffneten Pyrrolidinrings entspricht (Abbildungen 57 und im Anhang 85). Die Affinität zwischen ES000675, bzw. ES000674 und Nef scheint anhand der Veränderungen der chemischen Verschiebungen mindestens gleich stark wie bei ES000219 (Abbildung 52) zu sein. Das gleiche gilt für ES000794, in dem an der tertiären Aminogruppe eine Ethylgruppe und eine Butylgruppe angehängt wurde (Abbildung 59). Dies führt scheinbar wie schon bei ES000674 und ES000675 zu einer etwas höheren Affinität zu Nef.

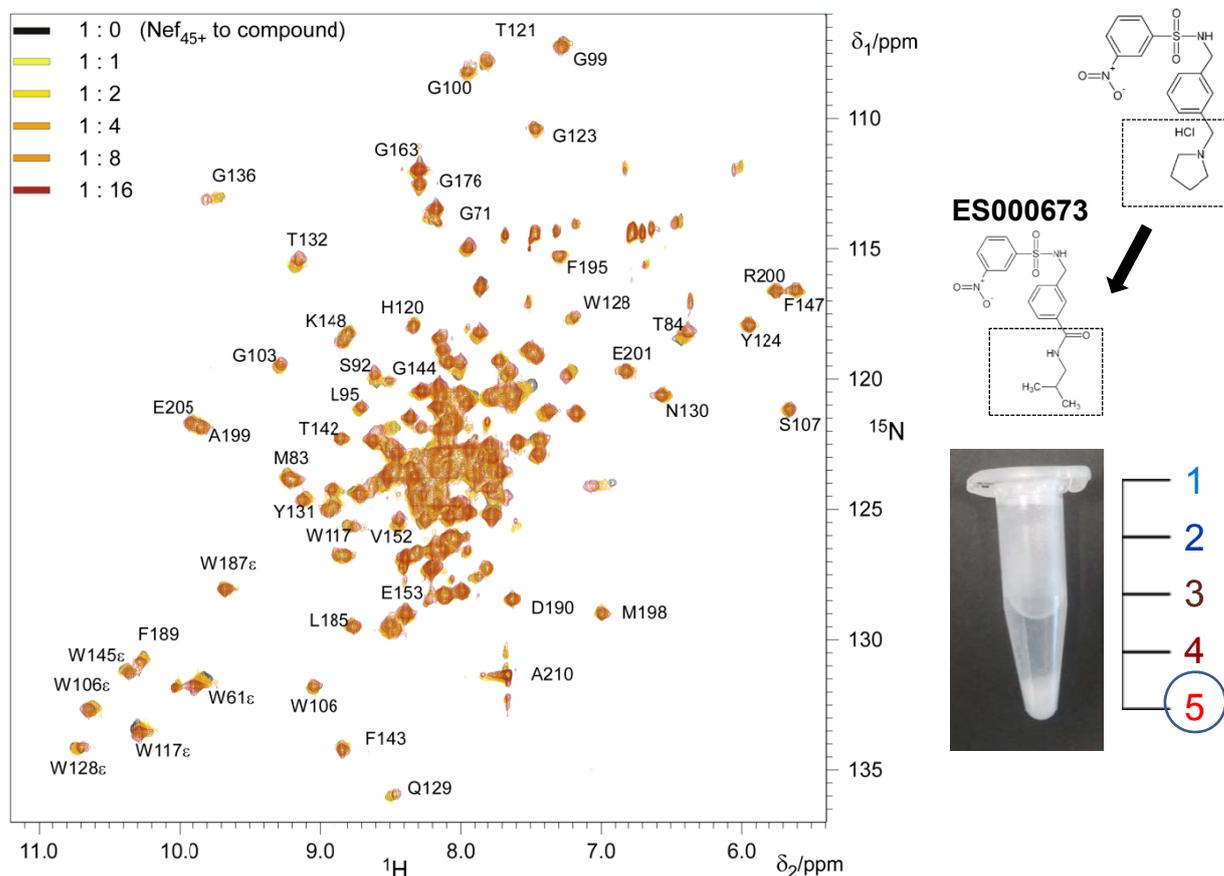
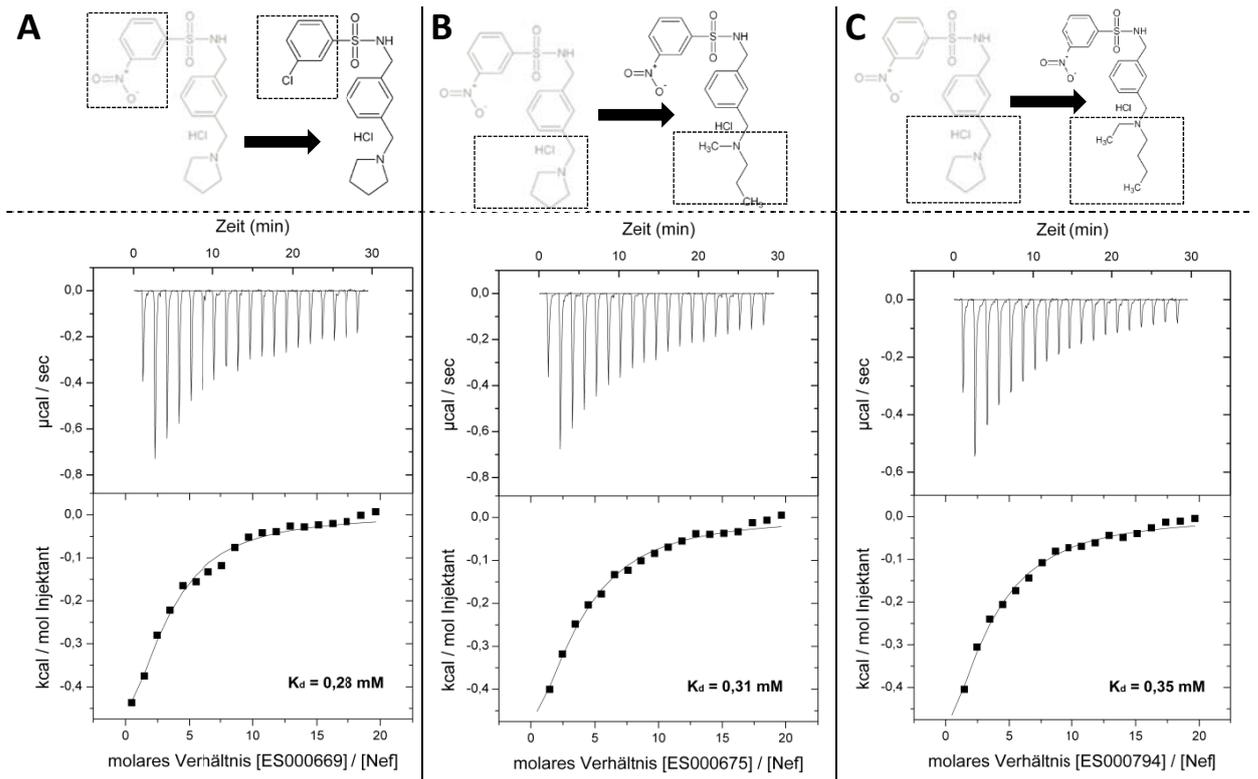


Abbildung 58: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000673.

Die Parameter entsprechen denen aus Abbildung 52, so dass die Substanz und das Protein identisch eingesetzt wurden. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Die Titration von ES000673 erfolgte wie in den Schritten 1:1-1:16 im molaren Verhältnis zu Nef, farblich gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Die Veränderungen von ES000673 gegenüber ES000219 sowie ein Foto des Löslichkeitstest sind beigefügt.



	K _d (mM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol/deg)	T ΔS (kcal/mol)	n (⁻¹ / _[L])
(A) ES000669	0,28	-4,847	-0,95 (±0,20)	0,013	3,90	2,61 (±0,47)
(B) ES000675	0,31	-4,784	-0,94 (±0,21)	0,013	3,85	3,09 (±0,58)
(C) ES000794	0,35	-4,723	-1,18 (±0,34)	0,012	3,55	2,49 (±0,62)

Abbildung 60: Bindungsstudien mit Nef und den Derivaten ES000669, ES000675 und ES000794 mittels ITC. (A) Isothermale Titrationskalorimetrie zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Nef und ES000669, (B) und ES000675, (C) und ES000794. In allen drei Messungen wurden 10 mM der Substanz in 19 Injektionen mit je 2 µl zu 100 µM Nef₄₅₋₂₁₀ titriert. Als entgaster Puffer wurde 20 mM Tris-HCl, (pH 8,0) mit 100 mM NaCl, sowie 5% DMSO eingesetzt und die Messungen bei 25°C durchgeführt. Die relevanten Messwerte sind tabellarisch zusammengefasst.

4.3.6 Kooperatives Bindungsexperiment mit Nef, CHAPS und ES000219

In vorangegangenen Studien konnte beobachtet werden, dass die Veränderungen der chemischen Verschiebungen von W61 und W117 auch durch die Interaktion mit CD4 verursacht werden (Breuer et al., 2011). Der gleiche Effekt ist auch durch die Zugabe von CHAPS sowie durch ES000219 zu beobachten. In einer früheren gelösten Struktur interagiert die N-terminale flexible Ankerdomäne von Nef mittels W61 der α₃-Helix (Trp61-Val70; pdb: 3REA) mit den hydrophoben Resten L104 im β₁-Strang von Nef, sowie I113, L114 und R110 (Breuer et al., 2011). Schon vorher konnte in einer mittels NMR gelösten Struktur mit CD4 in Grzesiek et al. (1996b) gezeigt werden, dass W61 in zwei verschiedenen Konformationen vorkommt. Dies ist auch in den NMR-Titrationsmessungen mit ES000219 und seinen Derivaten zu beobachten. Um den Effekt auf das HSQC-Spektrum von Nef durch CHAPS und ES000219 direkt zu vergleichen, wurde wie zuvor erst ein Grundspektrum von

Nef₄₅₋₂₁₀ allein und dann nach Zugabe von CHAPS (1:1) und nach darauffolgender Zugabe einer 8-fachen molaren Menge von ES000219 (1:1:8) aufgenommen (Abbildung 61). Es ist zu erkennen, dass CHAPS einige Resonanzsignale verändert die auch durch ES000219 verändert werden. Hierbei wird durch CHAPS wie durch ES000219 das Verhältnis der Hoch- und Tieffeldpopulation von W61 sowie das Resonanzsignal von W117 und T84 verschoben. (Abbildung 61, rot eingekreist). Auch G99 und zwei noch nicht zugeordnete Reste werden durch CHAPS leicht verschoben, durch die Zugabe von ES000219 aber stärker verändert. Andere Veränderungen der chemischen Verschiebungen sind nur nach der Zugabe von ES000219 zu erkennen, wie die von G100 und T121.

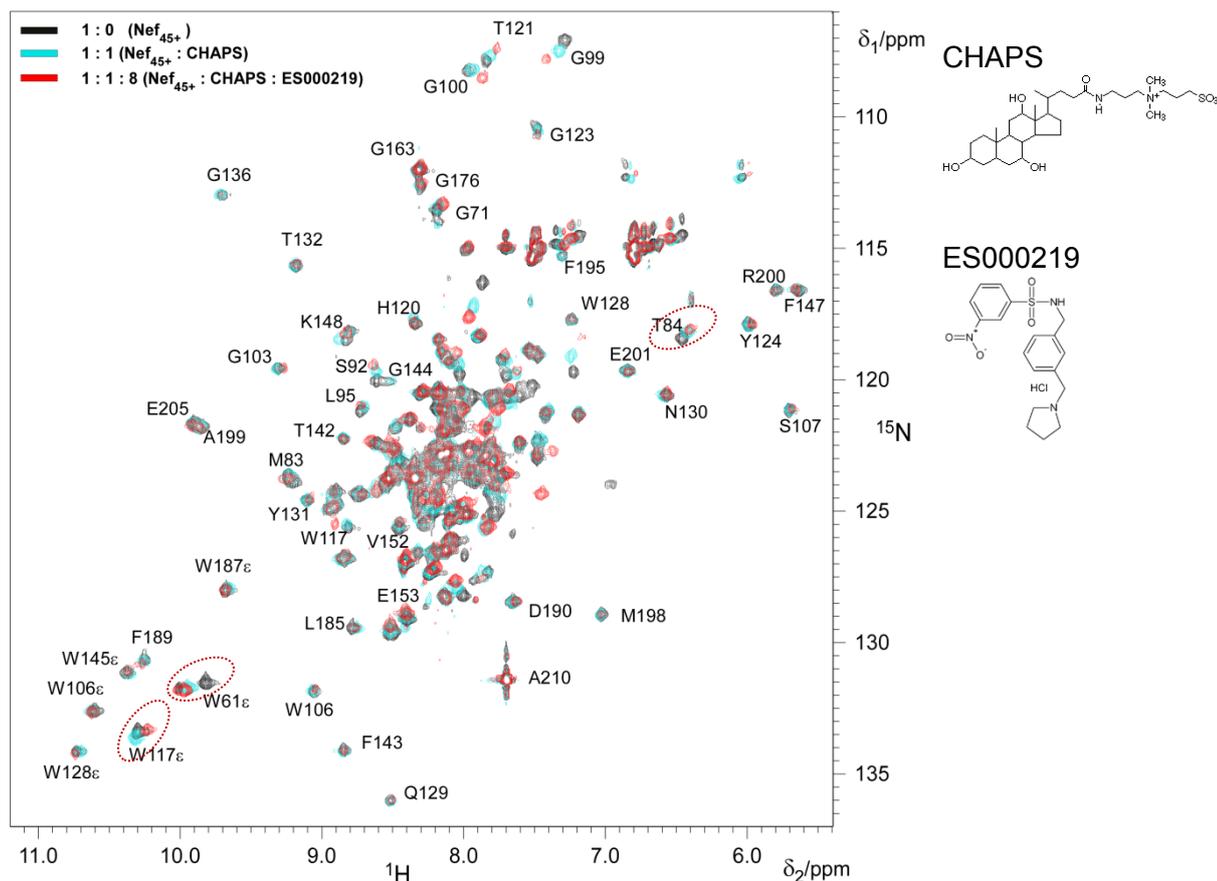


Abbildung 61: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren einer Tritration von Nef₄₅₋₂₁₀ mit CHAPS und ES000219. Es wurden 585 μl einer 0,4 mM Lösung mit ^{15}N -markiertem Nef₄₅₋₂₁₀ in 5 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,0) und 8% D_2O bei 25°C und einer Feldstärke von 600 MHz gemessen. Die Substanz wurde in DMSO gelöst und eine Stammlösung von 100 mM angesetzt, während CHAPS in der gleichen Konzentration in Puffer gelöst wurde. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Es wurde zunächst CHAPS im äquimolaren Verhältnis zu Nef (blaues Spektrum), sowie anschließend die 8-fache molare Menge von ES000219 titriert (rotes Spektrum). Die Moleküle CHAPS und ES000219 sind als Strukturformeln gezeigt.

4.3.7 Charakterisierung der Bindungsstellen von ES000219 auf Nef

Um die Bindungsstelle von ES000219 und der Derivate auf Nef einzugrenzen, wurden die identifizierten Reste, die sich in den HSQC-Spektren der NMR-Titrationsmessungen verschoben haben, auf der Oberfläche von Nef dargestellt. Hierfür wird eine generierte Modellstruktur von Nef₄₅₋₂₁₀ des SF2-Allels aus den pdb-Einträgen 3REA und 3RBB benutzt (Lülf et al., 2011), weil in der 3REA-Struktur der N-Terminus und in 3RBB die C-terminale

flexible Schleife besser aufgelöst ist und die Nef-Konstrukte beider Strukturen dem in den NMR-Messungen verwendeten Nef entsprechen (Abbildung 62). Aufgrund der ähnlichen Verschiebungen der Resonanzsignale von Nef durch CHAPS, kann für ES000219 dieselbe Bindestelle vermutet werden, die möglicherweise in der hydrophoben Tasche von Nef liegt. Die Darstellung der beteiligten Aminosäuren G99, G100, W117, T121 und T84 auf der Oberfläche von Nef zeigen, dass sich alle Reste im Bereich von Anfang der α_4 -Helix bis Ende der α_5 -Helix und damit in der hydrophoben Tasche von Nef befinden (Abbildung 62 C und D). Aufgrund der indirekten Veränderungen der Resonanzsignale von W61 im N-Terminus und den direkten des W117 in der Tasche, wird möglicherweise der N-Terminus aus der hydrophoben Tasche verdrängt. Denn in der durch Breuer et al. (2011) veröffentlichten Nef₄₅₋₂₁₀-Struktur (3REA), bindet der N-Terminus auf die hydrophobe Tasche der Kerndomäne (Abbildung 62). Um die Komplexstruktur aus Nef und ES000219 zu erhalten, wurde zunächst versucht diesen kristallografisch zu lösen, wofür ein Nef-Konstrukt verwendet wurde bei der die ersten 44 Reste im N-Terminus sowie die C-terminale flexible Schleife deletiert wurde.

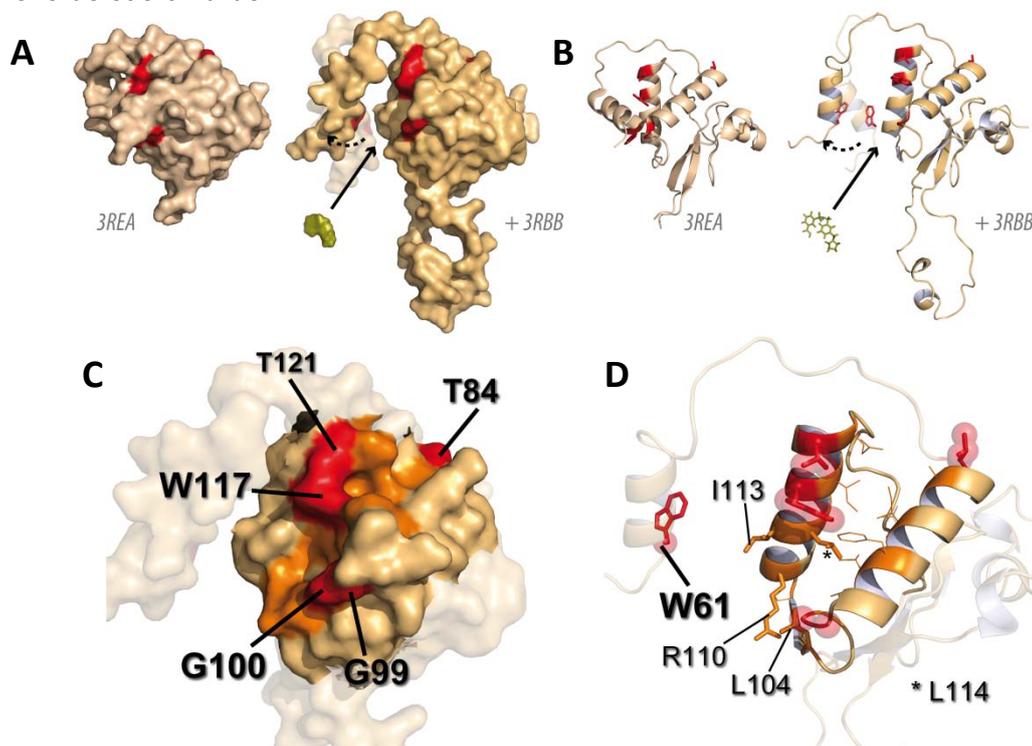


Abbildung 62: Darstellung der an der Interaktion zwischen Nef und ES000219 beteiligten Reste auf der Oberfläche von Nef. Darstellung von Nef₄₅₋₂₁₀ unter Verwendung des aufgelösten N-Terminus 55-72 der Struktur 3REA (Breuer et al., 2011) und der Aminosäurereste 72-208 der Struktur 3RBB (Horenkamp et al., 2011). Die in den NMR-Titrationsmessungen verschobenen und damit in der Interaktion involvierten Aminosäuren sind rot und Nef beige eingefärbt. Weitere sich in der Nähe befindlichen und in Richtung der möglichen ES000219-Interaktionsfläche gerichteten Reste sind orange gefärbt. **(A)** In der Oberflächendarstellung und **(B)** im Schleifendiagramm ist zu erkennen, dass in der Struktur 3REA der flexible N-Terminus das W61 von Nef in die Nähe der hydrophoben Tasche bringt, so dass dieser Rest durch ein in die Tasche bindendes Molekül verdrängt werden könnte. **(C)** Die durch NMR ermittelten Reste G99, G100, W117, T121 und T84 (rot) befinden sich entlang der hydrophoben Tasche (orange). **(D)** In der Interaktion zwischen N-Terminus und Kerndomäne wird die Beteiligung von W61 der α_3 -Helix und der hydrophoben Reste L104 im β_1 -Strang von Nef, I113, L114 sowie R110 postuliert (Breuer et al., 2011).

4.3.8 Co-Kristallisations- und Soakingversuche mit Nef und ES000219

Um eine Kristallstruktur des Komplexes aus Nef und ES000219 zu erhalten gibt es im Prinzip zwei Möglichkeiten. Zum einen kann versucht werden direkt Mischkristalle mit Nef und ES000219 zu erzeugen (Co-Kristallisation) oder den Liganden in bereits bestehende Kristalle durch Inkubation in einer ES000219-enthaltenen Lösung einzubringen. Letzteres wurde zunächst probiert, wobei die Schwierigkeit nicht nur darin besteht zunächst Kristalle zu erhalten, sondern auch freie Bindestellen für den im Nachhinein einzubringenden Liganden. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen eine Struktur von Nef zu erhalten, in der die hydrophobe Tasche offen und diese als vermeintliche Bindestelle für ES000219 oder seiner Derivate erreichbar ist, wurde für die Kristallisation eine Nef-Mutante verwendet, in der die ersten 44 Reste im N-Terminus sowie die C-terminale flexible Schleife deletiert wurden. Durch das Fehlen dieser flexiblen Bereiche von Nef wird außerdem die Keimbildung, die Stabilität und die Qualität entstehender Kristalle positiv beeinflusst.

Die Kristallisation von Nef_{45-210,Δ158-178} wurde im *hanging drop* und *sitting drop* Verfahren versucht, wobei nur beim *sitting drop* die Kristallisation erfolgreich war. Diese wurden in 24-well-Platten mit Proteinkonzentrationen von 10 und 15 mg/ml gezüchtet und wuchsen innerhalb von nur 3-4 Tagen auf eine Größe von über 200 µm. Salz und Fällungsmittelkonzentration sowie der pH-Wert wurden in den verschiedenen Ansätzen variiert, wobei der Kristall zur Lösung der Struktur bei 1 M Tris-HCl, (pH 8,1) mit 0,2 M Lithiumsulfat und 25% PEG 4000 wuchs. Mit diesem Kristall wurde am SLS-Synchrotron (Villingen, Schweiz) ein Röntgenbeugungsdatensatz mit einer Auflösung von 2,6 Å aufgenommen. Er hat eine primitive rhombohedrale Raumgruppe von H3 (R32 / 155) und Dimensionen der Einheitszelle von $a = b = 182 \text{ \AA}$, $c = 153 \text{ \AA}$ mit den Winkeln $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. Zur Lösung der Struktur durch molekularen Ersatz wurde die Struktur des pdb-Eintrags 3RBB verwendet. In Tabelle 7 sind die Kristallparameter sowie die Statistiken der Datenaufnahme und der Modellverfeinerung zusammengefasst.

Tabelle 7: Kristallparameter, sowie die Statistiken der Datenaufnahme und der Modellverfeinerung der Struktur von Nef_{45-210,Δ158-178}.

Datenaufnahme und Kristall	
Röntgenquelle	SLS X10SA
Wellenlänge (Å)	0,978940
Raumgruppe	H3 (R32 / 155)
Einheitszelle a, b, c, (Å) α, β, γ (°)	a=b=182,58, c=153,77 $\alpha=\beta=90, \gamma=120$
Auflösung (Å)	46-2,6
Aufgenommene Bilder	1-720
Anzahl der Reflexe	310487
Anzahl der einzigartigen Reflexe	30113
Vollständigkeit (%)	99,93
Multiplizität	10,3
Rsym (%)	8,1
I/ σ (I)	21,88
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da)	2,22
Lösungsmittelgehalt (%)	44,6
Verfeinerung	
Atome (Protein, Lösungsmittel)	3968
Wasser	95

R-Faktor (%)	22,8
Rfree (%)	27,2
Rmsd vom Idealwert	
rms der Bindung	0,015
rms der Winkel	1,508
Durchschnittlicher B-Wert	11,87
Ramachandran Plot	
Favorisiert (%)	91,02
Erlaubt (%)	8,35
Verboten (%)	0,45
Fehlende Aminosäuren	123

In der asymmetrischen Einheit (AU) des Kristalls befinden sich vier Nef_{45-210,Δ158-178}-Moleküle (Ketten A, B, C und D), so dass in einigen automatisierten Verfeinerungsschritten torsionsbasierte Nicht-Kristallographische Symmetrie (NCS)-Beschränkungen verwendet werden konnten (Abbildung 63 A). Hierbei konnten ausschließlich die Reste 65-208, Δ155-181 in das Modell integriert und verfeinert werden, weil einige Reste wie die flexiblen Bereiche 45-64 im Kristall zu ungeordnet vorlagen. Der tetramere Molekülkomplex in der AU ist nicht der Komplex der das Kristallgitter aufbaut, weil die Kette A in der Interaktion nicht mit eingebunden ist. Durch die Betrachtung der benachbarten symmetrieverwandten Moleküle der AU wird deutlich, dass die Kette A mit den symmetrieverwandten Ketten B', C' und D' interagiert und dadurch ein sehr stabiler tetramerer Komplex gebildet wird (Abbildung 63 A, B und C). In diesem interagieren die vier beteiligten Moleküle mittels ihrer N-Termini untereinander, in dem diese in die hydrophoben Taschen der benachbarten Nef-Moleküle binden (Abbildung 63 D und E). Dieser tetramere Komplex ist so symmetrisch, dass die im Folgenden beschriebene Interaktion für alle vier Moleküle gilt. So durchläuft der N-Terminus der Kette A (grün) zunächst die proximale hydrophobe Tasche zwischen α-Helices 4 und 5 (α₄ und α₅) der Kette B' (blau) sowie anschließend die distale hydrophobe Tasche von Nef der Kette D' (rot) (Abbildung 63 D, links oben). Genauso interagiert Nef der Kette C (gelb) mit Nef der Kette D und Nef der Kette B (Abbildung 63 D, links unten). Durch eine 180° Drehung dieses tetrameren Komplexes wird ersichtlich, dass auf diese Weise im Kristall auch die Ketten D mit C und A (Abbildung 63 E, rechts oben) sowie die Kette B mit A und C (Abbildung 63 E, rechts unten) interagieren. An den einzelnen Interaktionen mit den hydrophoben Taschen der benachbarten Moleküle sind vor allem die Reste E67, F72, V74, P49 und R81 im N-Terminus beteiligt. Hinzu kommt, dass das Glutamin 77 des jeweils vierten „nicht“ beteiligten Nef-Moleküls eine koordinative Bindung mit dem gegenüberliegenden N-Terminus eingeht (Abbildung 63, rot eingekreist). Diese große Anzahl an engen und großen Interaktionsoberflächen führt zu einer sehr kompakten Kristallstruktur.

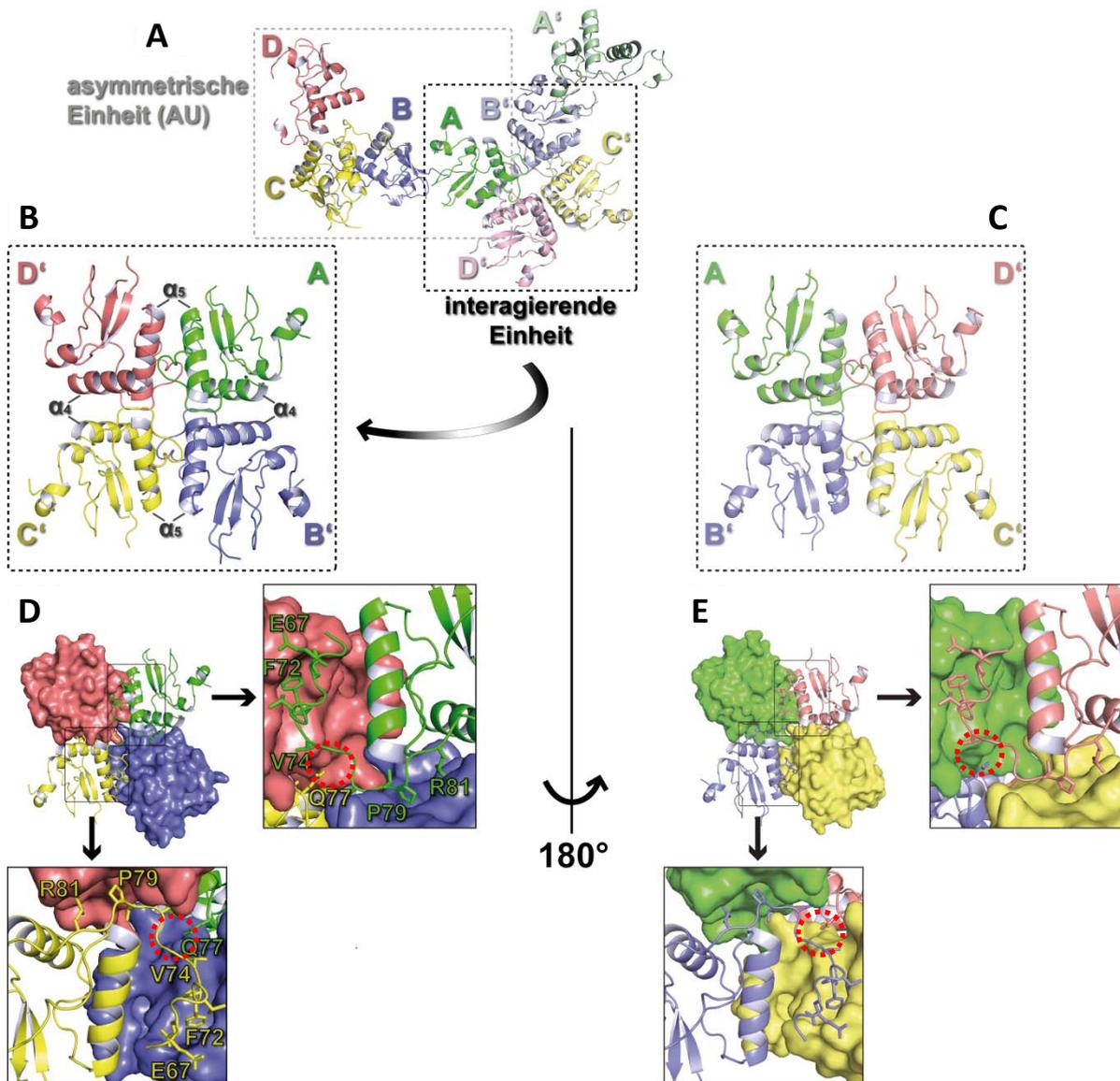


Abbildung 63: Struktur und Analyse der Bindungsflächen des kristallografischen tetrameren Komplexes aus vier Nef_{45-210,Δ158-178}-Molekülen. (A) Die asymmetrische Einheit (AU) besteht aus vier Molekülen Nef_{45-210,Δ158-178} der Ketten A (grün), B, C und D, wobei der interagierende Komplex innerhalb des Kristalls aus den Molekül der Kette A und den symmetrieverwandten Ketten B' (blau), C' (gelb), und D' (rot) besteht. Zur Verdeutlichung der Symmetrie sind die an der Interaktion beteiligten Bereiche des Tetramers von einer Seite (B und D) und um 180° gedreht (C und E) dargestellt. Hierbei durchläuft der N-Terminus jedes Moleküls die hydrophoben Taschen zweier benachbarter Nef-Moleküle, indem P79 und R81 mit einem und E67, F72 und V74 mit einem zweiten Nef interagieren, bei gleichzeitiger Koordination von Q77 und dem N-Terminus des gegenüberliegenden Moleküls (rot eingekreist).

Mit der Erzeugung von stabilen und mit 2,6 Å gut beugenden Kristallen von Nef_{45-210,Δ158-178} wurde versucht ES000219 und einige seiner Derivate in die Struktur nachträglich einzubringen. Hierzu wurden mehrere Kristalle in der Mutterlösung mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen gelösten Substanz unterschiedlich lange und in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Obwohl nach der Inkubation die Kristalle optisch noch vorhanden waren, konnten diese zur Aufnahme von Datensätzen nicht verwendet werden. Sobald diese berührt wurden, solubilisierten sie sofort. Aus der Struktur des Kristallgitters von Nef_{45-210,Δ158-178} ist ersichtlich, dass jede der hydrophoben Taschen der vier

im Tetramer enthaltenen Nef-Moleküle durch Teile der N-Termini benachbarter Nef-Moleküle geschlossen wird. Da ES000219 und dessen Derivate wahrscheinlich in diese Taschen binden, verlieren die Kristalle ihre Stabilität und gingen wieder in Lösung.

Neben dem Soaking-Ansatz wurden neue Kristallisationsansätze mit verschiedenen Nef-Konstrukten und unterschiedlichen Derivaten angesetzt. Hierbei wurden auch die zugegebenen Mengen der Substanzen sowie verschiedene Kristallisationsscreens und die Temperatur variiert. Bei jedem Ansatz wurde als Negativkontrolle auch eine Platte ohne die Zugabe der Substanz angesetzt. Auf diese Weise kann auf die Abhängigkeit der Kristallbildung von der Anwesenheit der Substanz geschlossen werden. In einer Bedingung mit 0,1 M HEPES, (pH 7) mit 18% Natriumpolyacrylat 5100 und 0,02 M $MgCl_2$ wurden Kristalle bei 4°C erhalten. Hierbei wurde erneut das Konstrukt Nef_{45-210,Δ158-178} in den Konzentrationen 5, 10 und 15 mg/ml eingesetzt, zusammen mit der 2-fachen molaren Menge von ES000219. In Folge dessen wurde eine weitere Platte mit gleicher Kristallisationsbedingung, aber variierenden Konzentrationen von ES000219 eingesetzt. Während Nef_{45-210,Δ158-178} alleine in dieser Bedingung nicht kristallisierte, war die 2 bis 4-fache molare Menge von ES000219 nötig, um Kristalle zu erhalten. Durch eine Verbesserung der Kristallisationsbedingung konnten die Kristalle reproduziert werden. Leider waren die Kristalle aber sehr labil und deren Röntgenbeugungsmuster sehr schlecht. Die einzelnen Röntgenbeugungspunkte sind stark verwischt, was auf ein schlecht geordnetes Kristallgitter oder auf eine Ansammlung vieler kleiner Kristalle mit unterschiedlichen Orientierungen und Winkeln hinweist. Diese Kristalle ließen sich zwar reproduzieren, aber nicht soweit verbessern als dass eine Struktur aufgeklärt werden konnte.

4.4 Biochemische und strukturelle Charakterisierung von einer aus dem Gorilla abstammenden HIV-1 Nef Variante gorNef

Das aus dem Gorilla stammende Nef Protein namens gorNef wurde erst 2009 als akzessorisches Protein eines neuen HIV-1 Subtyp P entdeckt (Plantier et al., 2009). Dieses Virus wurde möglicherweise in Kamerun von einem Gorilla auf den Menschen übertragen und führt aufgrund einer möglichen Wirtsanpassung nach bisherigen Erkenntnissen zu keinen AIDS-artigen Erkrankungen (Vallari et al., 2011). Bisher gibt es von dem Nef dieses Virus (gorNef) weder biochemische noch strukturelle Daten, so dass im Zuge dieser Arbeit versucht wurde dieses Nef Allel zu charakterisieren.

4.4.1 Mutationsstudien mit gorNef zur Bildung von Komplexen mit sdAb19 und Neffin

Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 erwähnt, ist gorNef nur zu 59% mit HIV-1 Nef_{SF2} identisch und interagiert nicht mit sdAb19 (Abbildungen 18 und 19). Aus diesem Grund wurden beide Aminosäuresequenzen auf die an der Interaktion mit sdAb19 beteiligten Reste hin verglichen. Es zeigt sich, dass sich vor allem der C-Terminus und damit viele Reste, die direkt oder indirekt an der Interaktion mit sdAb19 beteiligt sind, sich zwischen HIV-1 Nef_{SF2} und gorNef unterscheiden (Abbildung 64). Vor allem Lysin 192, was im gorNef ein Serin ist (S191), Tyrosin 139, in gorNef Phenylalanin (F137), Glutamat 155, in gorNef Valin (V153) sowie Glutamat 201, was zu einem Glutamin mutiert ist (Q200), können die Interaktionen mit Resten von sdAb19 verhindern (Abbildung 64). Aber auch nicht direkt beteiligte Reste, wie

sdAb19 bzw. gorNef und Neffin keine Komplexe aus (Abbildung 65). Während zum Vergleich Nef_{SF2} allein bei 12 ml, Nef_{SF2}-sdAb19 bei 11,2 ml, Nef_{SF2}-sdAb19-SH3_{B6} bei 10,8 ml, sowie Nef_{SF2}-Neffin bei 9,2 ml eluieren, befinden sich die Peaks für gorNef mit einer Masse von 19 kDa bei 12,1 ml was sich auch nach der Zugabe von sdAb19 nicht ändert. Nach Mischen von gorNef mit sdAb19 und SH3_{B6} und dem Auftragen auf die Säule kommt es nur zu einer Verschiebung des Nef-Peaks auf ein Elutionsvolumen von 11,4 ml was mit etwa 27 kDa dem Komplex aus Nef und SH3_{B6} entspricht, während sdAb19 wiederum als einzelner Peak wie sdAb19 alleine bei 14,2 ml eluiert wird. Nach dem Auftragen von gorNef zusammen mit Neffin, bindet wie zuvor bei Nef_{SF2} mit Neffin_{3*} (Abbildung 34) nur die SH3_{B6}-Domäne von Neffin an gorNef, wodurch dieser Komplex aufgrund des größeren hydrodynamischen Radius zwar etwas früher als der Komplex Nef_{SF2}-sdAb19-SH3_{B6}, aber bei weitem nicht so früh wie Nef_{SF2}-Neffin eluiert wird (Abbildung 65).

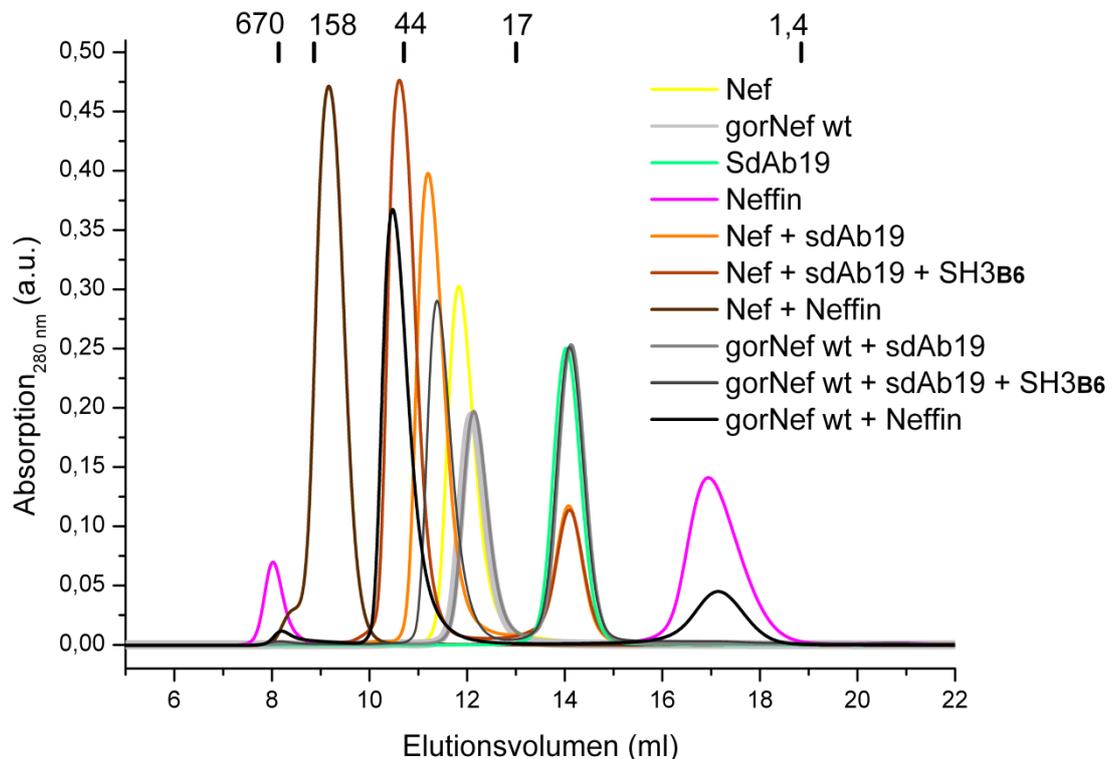


Abbildung 65: Analytische Größenausschlusschromatographie zur Untersuchung der Interaktion von gorNef oder Neffin. Zum Vergleich wurde im Experiment auch Nef_{SF2} (gelb), sdAb19 (türkis) und Neffin (magenta) sowie die Komplexe Nef_{SF2}-sdAb19 (orange), Nef_{SF2}-sdAb19-SH3_{B6} (braun) sowie Nef_{SF2}-Neffin (dunkelbraun) aufgetragen. Neben diesen Proben wurden zusammen mit gorNef Wildtyp (wt) allein (hellgrau), gorNef wt + sdAb19 (grau), gorNef wt + sdAb19 + SH3_{B6} (dunkelgrau) und gorNef wt + Neffin (schwarz) insgesamt 10 einzelne Läufe durchgeführt. Von jedem Protein wurden 100 µl einer 1,5 mg/ml konzentrierten Lösung eingesetzt, so dass die kleineren Bindungspartner im Überschuss vorlagen. Zur Durchführung wurde eine 10/30 Superdex 75-Säule und ein entgaster Laufpuffer aus 20 mM Tris-HCl, (pH 9) und 100 mM NaCl verwendet.

Nachfolgend wurden dann Bindungsexperimente mit den gorNef-Mutanten gorNef-6er und gorNef-9er durchgeführt, um zu untersuchen ob eine Bindung an sdAb19 erzielt werden konnte und wie hoch die erreichten Affinitäten sind. Hierzu wurden wie zuvor mit dem Wildtyp von gorNef zunächst analytische Gelfiltrationen mit sdAb19 und Neffin durchgeführt, wobei auch zum Vergleich wieder Nef_{SF2}, sowie die Komplexe Nef_{SF2}-sdAb19,

Nef_{SF2}-sdAb19-SH3_{B6} und Nef_{SF2}-Neffin mitaufgetragen wurden (Abbildung 66). Während gorNef-9er mit seinen neun Mutationen eindeutig in der Lage ist mit sdAb19 und Neffin Komplexe zu formen (Abbildung 66 B), bleibt die Interaktion zwischen gorNef-6er und sdAb19 in der analytischen Gelfiltration unklar (Abbildung 66 A). Der Peak des gorNef-9er Proteins (hellblau) verschiebt sich nach Zugabe von sdAb19 (blau) und sdAb19 + SH3_{B6} (dunkelblau) exakt genauso wie Nef_{SF2} mit denselben Liganden (Abbildung 66 B). Genauso verhält es sich auch in der Komplexbildung zwischen gorNef-9er und Neffin, in der wie bei Nef_{SF2}-Neffin der Komplex ausgebildet wird (Abbildung 66 B). Bei gorNef-6er ist dies im Komplex mit Neffin auch der Fall, doch verschieben sich die Peaks mit sdAb19 nicht ganz bis auf das Elutionsvolumen ihrer erwarteten Massen von ≈44 kDa für den trimeren Komplex, was möglicherweise auf eine geringere Affinität zu sdAb19 hindeutet (Abbildung 66 A).

Dieses Ergebnis wird durch die folgenden ITC-Experimente bestätigt, in dem zunächst als Kontrolle die Affinität zwischen SH3_{B6} und gorNef-6er von 64,6 nM und gorNef-9er von 90,1 nM ermittelt wurde. Dieser Unterschied der Affinitäten konnte in mehreren Messungen bestätigt werden (Abbildung 67 A und D). Während gorNef-6er nur eine geringe Affinität von 3,2 μM zu sdAb19 aufweist (Abbildung 67 B), beträgt diese bei gorNef-9er 270 nM (Abbildung 67 E) und ist damit nur 7-fach schlechter als die Affinität der Interaktion zwischen Nef_{SF2} und sdAb19 (38,6 nM, siehe Abbildung 17). Ein ähnliches Ergebnis ergaben die Messungen mit Neffin, in denen mit gorNef-6er eine Affinität von 16,3 nM (Abbildung 67 C) und mit gorNef-9er eine von 6,58 nM (Abbildung 67 F) erhalten wurde. Die vergleichsweise hohe Affinität zwischen Neffin und gorNef-6er liegt an der kombinatorischen Interaktion von sdAb19 zusammen mit der SH3_{B6}-Domäne des Neffins. Alle Reaktionen besitzen eine 1:1 Stöchiometrie mit hohen negativen Enthalpieänderungen und negativen Entropieänderungen.

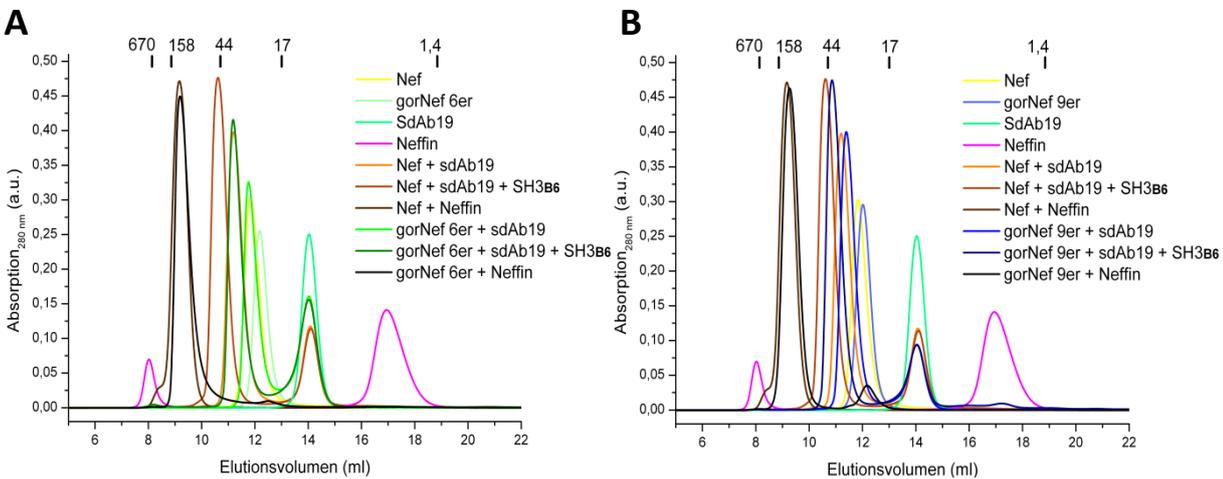
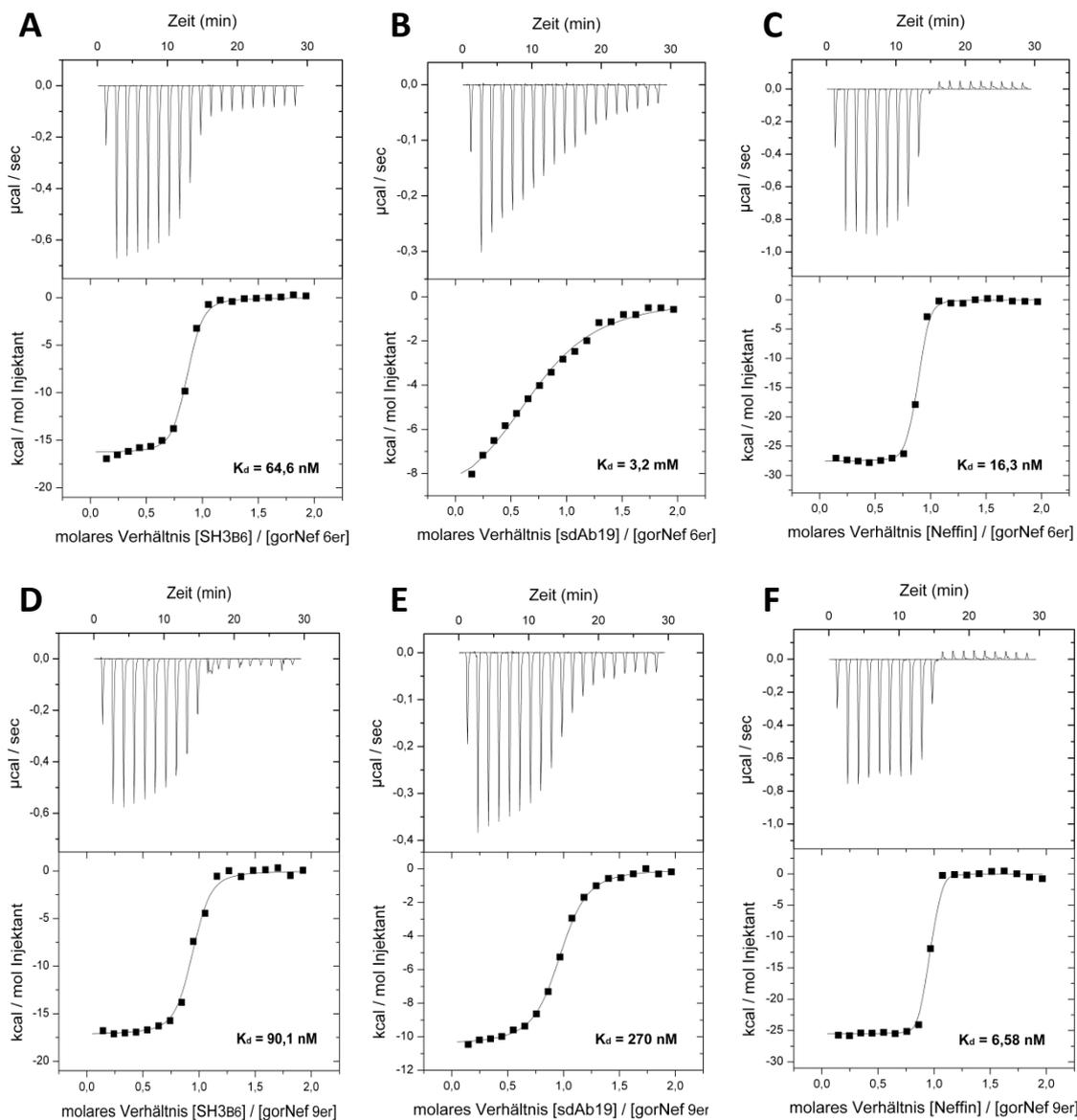


Abbildung 66: Analytische Größenausschlusschromatographie mit den sdAb19-Bindungsmutanten gorNef-6er und gorNef-9er. (A und B) Analytische Gelfiltrationen mit den Einzelläufen von Nef_{SF2} (gelb), sdAb19 (türkis), Nef_{SF2}-sdAb19 (orange), Nef_{SF2}-sdAb19-SH3_{B6} (braun), Neffin (magenta) und Nef_{SF2}-Neffin (dunkelbraun) sowie (A) gorNef-6er (hellgrün), gorNef-6er-sdAb19 (grün), gorNef-6er-sdAb19-SH3_{B6} (dunkelgrün) und gorNef-6er-Neffin (schwarz), (B) gorNef-9er (hellblau), gorNef-9er-sdAb19 (blau), gorNef-9er-sdAb19-SH3_{B6} (dunkelblau) und gorNef-9er-Neffin (schwarz). Es wurde jedes Protein in einer Konzentration von 1,5 mg/ml auf eine 10/30 Superdex 75-Säule aufgetragen, so dass die kleineren Bindungspartner im Überschuss vorlagen. Der verwendete entgaste Laufpuffer enthielt 20 mM Tris-HCl, (pH 9) und 100 mM NaCl.



	K _d (nM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol/deg)	T ΔS (kcal/mol)	n (^l - / _l -)
(A) SH3 _{B6} /gorNef-6er	64,6	-9,82	-16,32 (±0,15)	-0,022	-6,50	0,82 (±0,005)
(B) sdAb19/gorNef-6er	3215	-7,49	-9,818 (±0,46)	-0,008	-2,33	0,75 (±0,025)
(C) Neffin/gorNef-6er	16,3	-10,62	-27,55 (±0,12)	-0,057	-16,94	0,93 (±0,004)
(D) SH3 _{B6} /gorNef-9er	90,1	-9,60	-17,17 (±0,23)	-0,025	-7,57	0,90 (±0,007)
(E) sdAb19/gorNef-9er	270	-8,96	-10,46 (±0,46)	-0,005	-1,50	0,93 (±0,025)
(F) Neffin/gorNef-9er	6,58	-11,15	-25,52 (±0,14)	-0,048	-14,37	0,91 (±0,004)

Abbildung 67: ITC-Experimente zur Analyse der Interaktion zwischen sdAb19 und Neffin mit den sdAb19-bindenden Mutanten gorNef-6er und gorNef-9er. (A)-(F) Zur Ermittlung der Affinitäten zwischen sdAb19, Neffin und SH3_{B6} und den Mutanten gorNef-6er und gorNef-9er wurden ITC-Experimente durchgeführt. In jedem Experiment wurden 200 µM des jeweiligen Liganden zu 20 µM Nef in 19 Injektionen mit je 2 µl bei 25 °C titriert. Es wurde ein entgaster Laufpuffer aus 20 mM Tris-HCl, (pH 9) und 100 mM NaCl verwendet.

4.4.2 Strukturelle Charakterisierung des Komplexes aus gorNef, sdAb19 und SH3_{B6}

Neben den fehlenden biochemischen Daten gibt es vom gorNef auch keine strukturellen Studien, so dass im Zuge dieser Arbeit versucht wurde das Protein zu kristallisieren. Als Vollängenkonstrukt, N-terminal verkürzt (44+), mit oder ohne C-terminaler flexibler Schleife, sowie mit und ohne gebundener SH3_{B6}-Domäne konnten keine Kristalle erhalten werden. Nach der Herstellung der Mutante gorNef-9er stand ein Konstrukt zur Verfügung, dass in der Lage war sdAb19 zu binden. Deshalb wurde der Komplex aus gorNef-9er_{44-209,Δ156-177} (ohne C-terminale flexible Schleife), sdAb19 und der SH3_{B6}-Domäne kristallisiert. Hierzu wurde jedes Protein einzeln exprimiert, gereinigt und die Proteine anschließend in der gewünschten Kombination gemischt und als Komplexe über eine präparative Gelfiltrationssäule gereinigt. Der trimere Komplex aus gorNef-9er_{44-209,Δ156-177}, sdAb19 und SH3_{B6} kristallisierte in mehreren Bedingungen. Hierbei stellte sich die mit 0,1 M Tris-HCl, (pH 7,8) mit 19% PEG 4000 und 0,1 M Ammoniumsulfat als die beste heraus, in der ein am SLS-Synchrotron (Villingen, Schweiz) gemessener Kristall eine Auflösung von 3,2 Å erreichte. Der folgende aufgenommene Röntgenbeugungsdatensatz ergab für den Kristall die primitive orthorhombische Raumgruppe P2₁2₁2₁ (19) und Dimensionen der Einheitszelle von a = 154,660, b = 154,750 und c = 155,510 mit den Winkeln $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Zur Lösung der Struktur durch molekularen Ersatz, wurde die in dieser Arbeit gelöste Struktur Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19-SH3_{B6} verwendet. In Tabelle 8 sind die Kristallparameter sowie die Statistiken der Datenaufnahme und der Modellverfeinerung zusammengefasst.

Tabelle 8: Kristallparameter, sowie die Statistiken der Datenaufnahme und der Modellverfeinerung der Struktur von gorNef-9er_{44-209,Δ156-177}-sdAb19-SH3_{B6}.

Datenaufnahme und Kristall	
Röntgenquelle	SLS X10SA
Wellenlänge (Å)	0.978890
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Einheitszelle a, b, c, (Å) α, β, γ (°)	a=154,66, b=154,75, c=155,51 $\alpha=\beta=\gamma=90$
Auflösung (Å)	54,9-3,2 Å
Aufgenommene Bilder	1-720
Anzahl der Reflexe	415389
Anzahl der einzigartigen Reflexe	118865
Vollständigkeit (%)	99,95
Multiplizität	3,5
Rsym (%)	23
I/ σ (I)	9,51
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da)	2,39
Lösungsmittelgehalt (%)	48,48
Verfeinerung	
Atome (Protein, Lösungsmittel)	26943
R-Faktor (%)	18,2
Rfree (%)	23,9
Rmsd vom Idealwert	
rms der Bindung	0,020
rms der Winkel	1,863
Durchschnittlicher B-Wert	6,34
Ramachandran Plot	
Favorisiert (%)	85,23
Erlaubt (%)	11,44
Verboten (%)	3,33

Da es sich bei der Struktur des gorNef Proteins des HIV-1 Subtyps P um eine neue Struktur handelt, soll diese zunächst mit der bekannten Struktur des HIV-1 Nef_{SF2} verglichen werden. Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei dem gorNef nicht um den Wildtyp handelt, da es N-terminal bis zur Aminosäure 44 verkürzt ist, die C-terminale flexible Schleife deletiert wurde und 9 Reste zu den komplementären Restes des HIV-1 Nef Proteins mutiert wurden, um die Bindung mit sdAb19 und die Kristallisation zu erreichen. Somit sind Nef_{SF2 45-210,Δ158-178} und gorNef_{44-209,Δ156-177} zu 72,5% identisch, während ihre Vollängen Sequenzen nur zu 59% identisch sind. Eine strukturelle Überlagerung von Nef_{SF2 45-210,Δ158-178} und gorNef_{44-209,Δ156-177} zeigt, dass sich beide in ihren Domänen und Konformationen sehr ähnlich sind (Abbildung 68). Um eine mathematische Aussage zu treffen, wurde nach Überlagerung der Strukturen mit dem Programm PyMol die mittlere quadratische Abweichung der Atomkoordinaten berechnet, der als sogenannter RMSD-Wert angegeben wird. Dieser lässt als Differenz der internen Atomkoordinaten zweier Moleküle bezeichnen und sagt aus in wie weit diese strukturell identisch sind. In diesem Fall ergibt das einen RMSD-Wert von 0,508 für insgesamt 688 Atome. Die beiden Nef-Varianten aus der Gruppe M (SF2) und P (gor Allele) sind sich damit strukturell sehr ähnlich.

Die Bindung der Hck SH3-Domäne an Nef ist biochemisch und strukturell die am besten untersuchteste Interaktion zwischen Nef und einem Liganden. Um mögliche strukturelle Unterschiede zwischen gorNef und HIV-1 Nef_{SF2} zu untersuchen, wurde zunächst die Interaktion mit der SH3_{B6}-Domäne beider gelösten Strukturen verglichen (Abbildung 68). Es ist zu erkennen, dass sich SH3_{B6} (hellrosa) im Komplex mit gorNef (violett) etwas näher an der Bindetasche der RT-Schleife befindet als die selbe SH3_{B6}-Domäne (beige) im Komplex mit Nef_{SF2} (orange) (Abbildung 68 A-C). Die typische Insertion des Restes F93_{SH3} in die RT-Schleifen Bindetasche, sowie die Wasserstoffbrücken zwischen Q120_{SH3} und W95_{Nef}, sowie mit D96_{Nef} findet in beiden Fällen statt (Abbildung 68 B und C). Trotzdem liegt die RT-Schleife von SH3_{B6} leicht verschoben in der Tasche, wodurch möglicherweise die geringfügig schwächere Affinität zwischen SH3_{B6} und gorNef zu erklären ist. Möglicherweise ist diese Konformationsänderung auch allosterisch mit der gleichzeitigen etwas unterschiedlichen Interaktion mit sdAb19 zu erklären, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

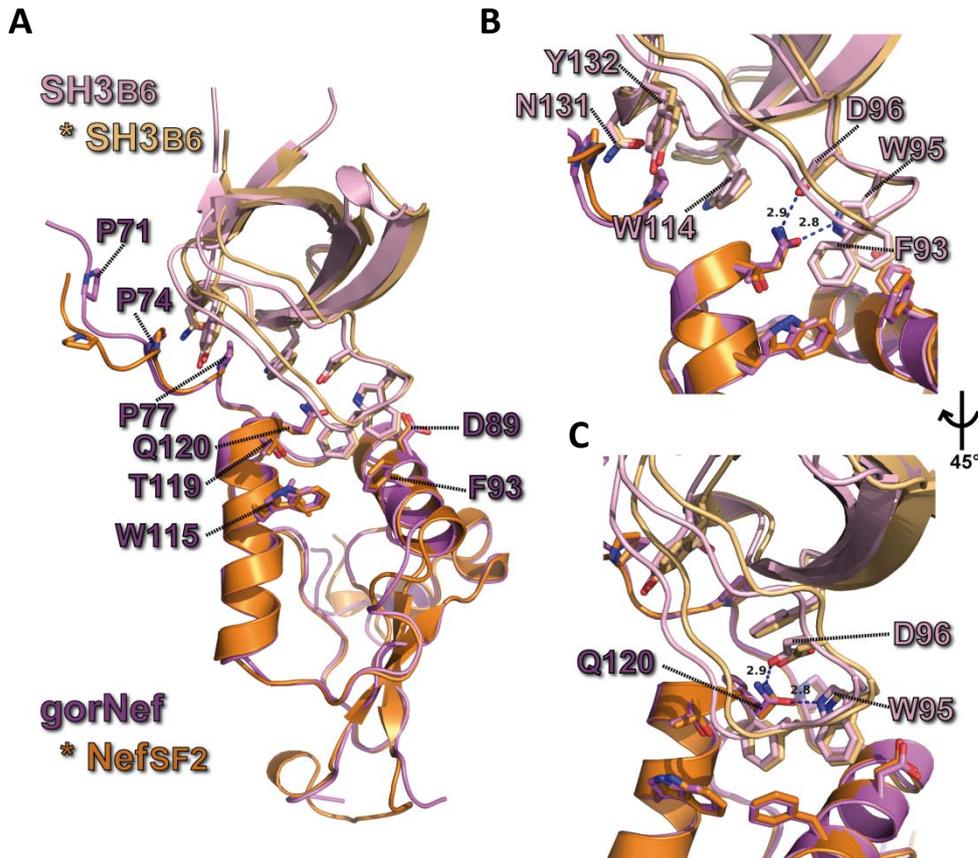


Abbildung 68: Struktureller Vergleich zwischen der SH3_{B6}-Bindung von gorNef und HIV-1 Nef_{SF2}. (A) Darstellung der Gesamtansicht der strukturellen Überlagerung des Komplexes aus gorNef (violett) und SH3_{B6} (rosa) mit HIV-1 Nef_{SF2} (orange) und der SH3_{B6}-Domäne (beige) mit der Beschriftung für die Interaktion wichtiger Reste. (B) Blick auf die Interaktionsfläche zwischen Nef und SH3_{B6} in der in (A) gezeigten strukturellen Überlagerung der Komplexe. (C) Die gleiche Abbildung wie in (B), nur zur Veranschaulichung um etwa 45° vertikal gedreht.

In der vergleichsweise großen Einheitszelle befinden sich 18 Einzelketten, die sich aus 6 Molekülen gorNef-9er_{44-209,Δ156-177}, 6 Molekülen sdAb19 und 6 Molekülen der SH3_{B6}-Domäne zusammensetzt. Innerhalb der asymmetrischen Einheit interagieren jeweils drei sdAb19-Moleküle (Ketten C, I, F bzw. Q, P, R) über die physiologisch relevante Nef-sdAb19 Bindungsfläche mit drei Nef-Moleküle (Ketten B, H, E bzw. L, J, N), während letztere miteinander jeweils einen trimeren Komplex bilden (Abbildung 69 A). Wie bei Nef_{SF2} interagiert die gorNef-9er-Mutante mit CDR1 (gelb), CDR2 (rot) und CDR3 (blau) des sdAb19 Proteins (Abbildung 69 A, rechts). Trotz abgeschnittener C-terminaler flexibler Schleife, sind die verbleibenden Reste nicht ganz aufgelöst, so dass drei Reste in der Struktur fehlen (als Δflex. markiert). Aus der Überlagerung von gorNef-9er_{44-209,Δ156-177}-sdAb19 (rosa/grün) mit der zuvor gelösten Struktur des Komplexes Nef_{45-210,Δ158-178}-sdAb19 (orange/weiß) ist zu erkennen, dass gorNef leicht vom sdAb19 weggedreht ist (Abbildung 69 B). Durch diese Drehung liegen die distalen an der Interaktion mit sdAb19 beteiligten Reste von gorNef wie Histidin 202 und Glutamat 200 näher an den interagierenden Resten Serin 103 und Serin 56 von sdAb19. Die proximalen Reste innerhalb der Interaktionsfläche hingegen liegen sehr viel weiter auseinander, so dass die Wechselwirkungen vergleichsweise schwächer sind (Abbildung 40 D). Besonders das Fehlen der Interaktion zwischen Arginin 188, was im gorNef in ein Lysin mutiert ist, vermindert die Bindung zwischen gorNef-9er und sdAb19.

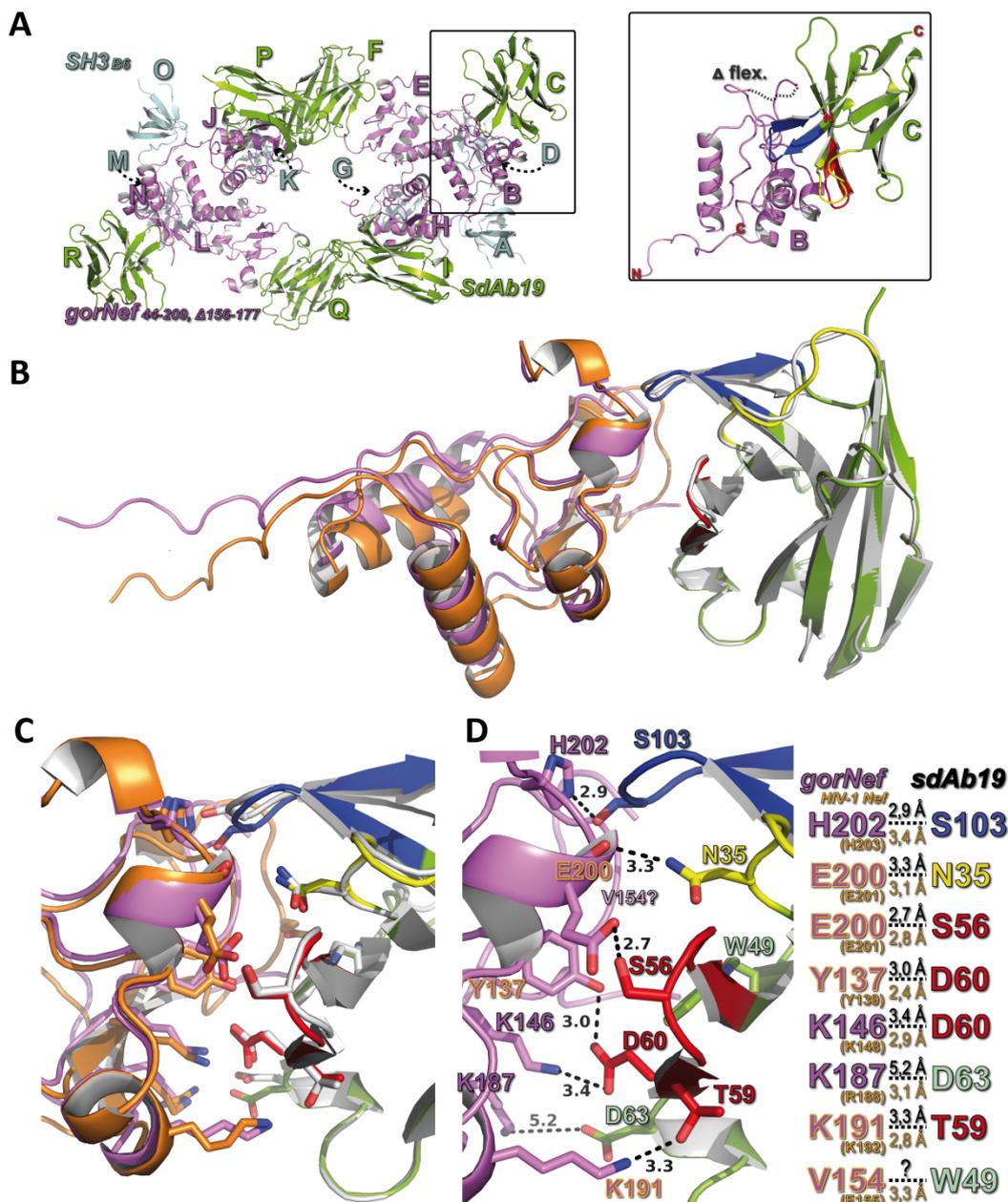


Abbildung 69: Struktur des Komplexes aus gorNef-9er^{44-209,Δ156-177}, sdAb19 und SH3_{B6}. (A) Die asymmetrische Einheit (AU) besteht aus je 6 Molekülen SH3_{B6} (Ketten A, D, G, K, M, O: hellblau), gorNef-9er^{44-209,Δ156-177} (Ketten B, E, H, J, L, N: dunkelrosa) und sdAb19 (Ketten C, F, I, P, Q, R: grün). Im Kristall gibt es mehrfach verschiedene Kristallkontakte, wobei wie bei den Ketten B und C jedes sdAb19 mit den Antigen-erkennenden CDRs mit einem gorNef interagieren (H-I, E-F, B-C, J-P, L-Q, N-R). (B) Strukturelle Überlagerung des Komplexes aus gorNef (violett) und sdAb19 (grün) mit dem Komplex aus HIV-1 Nef_{SF2} (orange) und sdAb19 (weiß). (C) Blick auf die Bindungsfläche mit den fünf direkt an der Interaktion beteiligten Resten in der strukturellen Überlagerung wie in (B). (D) Fokus auf die im Komplex zwischen HIV-1 Nef_{SF2} und sdAb19 beteiligten Reste in der Struktur des Komplexes gorNef-sdAb19. Die Abstände dieser Reste von gorNef und sdAb19 werden mit den Abständen der Reste zwischen HIV-1 Nef und sdAb19 verglichen und sind in Ångstrom angegeben.

Bei genauerer Untersuchung der drei miteinander interagierenden gorNef-Moleküle der Ketten B, E und H, fallen im Zentrum der Interaktionsfläche drei lange Ketten mit undefinierter Elektronendichte auf (Abbildung 70). Es handelt sich weder um fehlende Dichte des N- und C-Terminus von Nef oder der benachbarten SH3_{B6}-Domänen, noch um Reste der C-terminalen flexiblen Schleife von Nef, da sich diese in der Struktur zu weit entfernt

befinden (Abbildung 70 B). In der Kristallisationsbedingung befindet sich das Präzipitationsmittel Polyethylenglycol 4000, das in der Elektronendichtekarte typischerweise ein mäanderartiges Aussehen hat. Es ließ sich ein PEG-Molekül mit sieben und zwei mit sechs monomeren Einheiten (1 Monomer $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$) einbauen und verfeinern (Abbildung 70 B-D). Diese sind aber um einiges länger, da nur die Elektronendichte der Kette definiert zu sehen ist, die durch die Interaktion mit Nef fixiert wird. Die hydrophoben Taschen sind nicht wie bei den meisten Nef-Kristallen durch Seiten- und Peptidketten verschlossen und somit möglicherweise für Lösungsmittel zugänglich, so dass die Möglichkeit besteht Liganden wie kleine niedermolekulare chemische Verbindungen hineinzubringen. Der Durchmesser des Lösungsmittelkanals beträgt an den engsten Stellen etwa $11 \text{ \AA} \times 9 \text{ \AA} \times 8,5 \text{ \AA}$, so dass kleine Moleküle die PEG-Moleküle nachträglich verdrängen könnten, um die Struktur eines Nef-Liganden-Komplexes zu lösen (Abbildung 70 C). Die PEG-Moleküle interagieren aufgrund der großen Entfernung von $3,5-4,1 \text{ \AA}$ zu den interagierenden Resten in den α_5 -Helices der gorNef-Moleküle nur recht schwach über elektrostatische Wechselwirkungen mit zwei Salzbrücken. Diese Interaktion findet kooperativ durch das Tryptophan 115 eines gorNef-Moleküls und durch das Histidin 118 eines benachbarten gorNef statt (Abbildung 70 E). Somit könnte möglicherweise eine Substanz wie ES000219 aus Abschnitt 4.3 in die hydrophoben Taschen der Nef-Moleküle dieser Struktur eingebracht werden, ohne das die Kristalle brechen und solubilisieren, wie es in Abschnitt 4.3.8 bei den Kristallen von Nef_{45-210,Δ158-178} der Fall war.

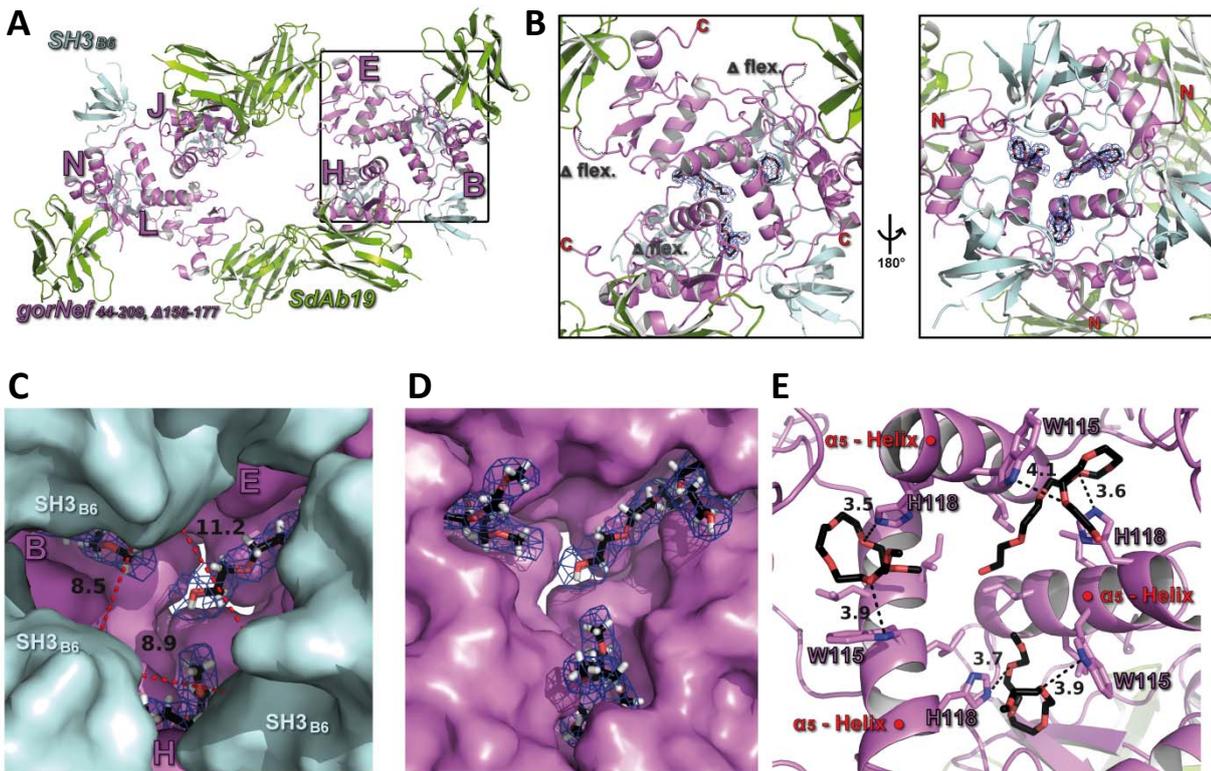


Abbildung 70: Trimerer Komplex aus drei gorNef-Molekülen innerhalb der AU des gorNef-9er-sdAb19-SH3_{B6}-Kristalls. (A) Es befinden sich innerhalb der asymmetrischen Einheit des Kristalls zwei trimerer Komplexes aus je drei gorNef-9er_{44-209,Δ156-177}-Molekülen. (B) In einem der beiden befindet sich zusätzliche Elektronendichte, bei der es sich um drei PEG-Moleküle handelt, die in die Bindungsfläche der drei gorNef-Moleküle binden. (C) Nach vorne hin ist die Bindetasche mit den drei PEG-Molekülen dem Lösungsmittel ausgesetzt, indem zwischen den SH3_{B6}-Domänen ein Kanal von etwa 80 \AA^3 existiert ($8,5 \times 8,9 \times 11,2 \text{ \AA}$). (D) Nach Entfernung der SH3_{B6}-Domäne sind die Furchen zu erkennen, in die die PEG-Moleküle binden. (E) Darstellung des Interaktionsnetzwerks zwischen PEG und den Resten von gorNef. Die Abstände der interagierenden Reste sind in Ångstrom angegeben.

5. Diskussion

5.1 Biochemische und strukturelle Charakterisierung von sdAb19 und Nefin als große molekulare Inhibitoren gegen HIV-1 Nef.

Seit der Entdeckung von HIV-1 als Krankheitserreger und Verursacher von AIDS, gibt es in der Grundlagenforschung und den angewandten Wissenschaften fortwährend das Bestreben Inhibitoren zu finden, um den Krankheitsverlauf zu verlangsamen oder die Vermehrung des HI-Virus ganz zu verhindern. Bis heute haben fast alle Inhibitoren die Reverse Transkriptase oder die für die Virusentwicklung wichtige HIV-1 Protease von HIV-1 als Ziel (Hammer et al., 1996; Saravolatz et al., 1996). Aufgrund der hohen Mutationsrate des Virus gibt es immer wieder Resistenzbildungen und damit unwirksame Medikamente, so dass Patienten seit Mitte der 90er Jahre die Kombinationstherapie (HAART) mit mehreren Wirkstoffen erhalten, um die Ausbildung von Resistenzen zu verlangsamen. Deshalb ist es wichtig immer wieder neue Inhibitoren zu suchen und dafür auch andere virale Zielproteine in Betracht zu ziehen.

Seit einigen Jahren steht auch das akzessorische Nef Protein im Fokus der Suche nach neuen HIV-Inhibitoren. Besonders die beachtliche Anzahl an Proteinen mit denen Nef direkt oder indirekt interagiert und der daraus resultierenden Veränderungen der Zelle und dessen Stoffwechsel die die effiziente Virusreplikation gewährleisten, macht es zu einem interessanten Ziel (Zhou et al., 2008). Auch wenn viele Funktionen aus zellulären Experimenten *in vivo* postuliert werden, sind die biochemische Funktionsweisen und beteiligte Interaktionspartner oftmals nicht bekannt, was die Entwicklung zielgerichteter Inhibitoren erschwert. In jedem Fall ist Nef ein wichtiger humaner Pathogenitätsfaktor von HIV (Kirchhoff et al., 2008), das als mögliches Ziel für Inhibitoren auch im Zuge dieser Arbeit in Betracht gezogen wurde.

Hierzu wurde Nef als Zielprotein für kleine und große molekulare Inhibitoren verwendet, indem zum einen verschiedene chemische Substanzen innerhalb des iNef-Konsortium und zum anderen ein Einzeldomänen-Antikörper in Bindungsexperimenten untersucht sowie mittels struktureller Überlagerung mit anderen Nef Allelen Ziele auf dessen Oberfläche definiert wurden.

Verwendung von V_{HH} -Domänen als Inhibitor gegen Nef

Im Gegensatz zu kleinen molekularen Inhibitoren, die aufgrund ihrer geringen Massen unter 800 Dalton Zellmembranen überwinden können, sind größere Moleküle ohne spezielle Signalsequenzen dazu nicht in der Lage. Die am weitesten verbreiteten größeren Inhibitoren sind Antikörper. Diese haben meist eine Affinität von 10^{-7} - 10^{-9} M und besitzen damit von Natur aus eine sehr hohe Affinität zu ihrem Antigen (Poulsen et al., 2011). Die Verwendung von Antikörpern als spezifische Inhibitoren stellt zunächst kein Problem dar, wenn diese extrazellulär Verwendung finden sollen. Intrazellulär hingegen sind sie mit einer Masse von etwa 160 kDa zu groß und im reduzierenden Milieu aufgrund zahlreicher intra- und intermolekularer Disulfidbrücken instabil und nicht funktionsfähig (Biocca et al., 1995; Cattaneo and Biocca, 1999). Da im Zuge dieser Arbeit das intrazelluläre Nef als Zielprotein diente, wurde die variable V_{HH} -Domäne namens sdAb19 eines Schwere-Ketten-Antikörpers verwendet. Diese hat identische Antigen-erkennende Eigenschaften wie der Schwere-Ketten Antikörper von dem er abstammt und bindet damit spezifisch an HIV-1 Nef. Dieser ist mit einer Masse von 12 kDa deutlich kleiner als der komplette Antikörper, aber bei weitem zu groß, um als injizierbares Medikament die Zellmembran durchdringen und Nef direkt

inhibieren zu können. Trotzdem ist er aber klein genug und frei von essenziellen Disulfidbrücken, um intrazellulär direkt gentherapeutisch oder als mögliches Startmolekül für eine weitere Wirkstoffentwicklung kleinerer Moleküle eingesetzt zu werden.

Im Jahre 2011 wurde sdAb19 generiert, indem in einer Studie rekombinant hergestelltes Nef mehrfach subkutan in Lamas injiziert wurde und mittels anschließender Selektion durch Phagen Display dieser Nef-spezifischen Einzeldomänen-Antikörper erhalten wurde. SdAb19 inhibiert viele Funktionen von Nef wie die CD4-Runterregulierung, die Nef-Pak2 Assoziation, die Reorganisation des Zytoskeletts, sowie die Nef vermittelte Erhöhung der Virusinfektiosität und -replikation (Bouchet et al., 2011). Um die biochemischen und strukturellen Eigenschaften der Bindung zwischen sdAb19 und Nef zu verstehen und so eine weitere Wirkstoffentwicklung möglich zu machen, wurden in dieser Arbeit entsprechende Experimente durchgeführt.

Strukturelle Eigenschaften von sdAb19

Nach der Expression und Reinigung von sdAb19₁₋₁₁₈ konnte mittels CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass das Protein gefaltet vorliegt und überwiegend aus β -Faltblättern bestehen. Letzteres ist nicht überraschend, da jede einzelne Kette eines Antikörpers eine typische Immunglobulin-Faltung aus stark gepackten β -Strängen besitzt. Außerdem wurde biochemisch mittels analytischen Gelfiltrationen gezeigt, dass Nef und sdAb19 interagieren indem sie einen Komplex mit einer 1:1-Stöchiometrie bilden. Dies konnte letztendlich auch mittels gelöster Nef-sdAb19-SH3_{B6}-Struktur bewiesen werden.

SdAb19 besitzt wie die Fab-Fragmente aller Antikörper eine typische β -Fass Form, mit hierbei 12 um das Zentrum des Proteins gedrehten β -Strängen. Das besondere ist, dass es sich um die V_{HH}-Domäne eines Schwere-Ketten-Antikörpers handelt, die mit 12,3 kDa relativ klein ist. Zum anderen wurde diese rekombinant in *E. coli* hergestellt und besitzt keine Disulfidbrücken. Die beiden Cysteine 24 und 97, die dazu in der Lage wären, liegen reduziert vor, was aber keinen Einfluss auf die inhibitorischen Funktionen von sdAb19 hat.

Somit kann sdAb19 auch intrazellulär als Inhibitor gegen HIV-1 Nef eingesetzt werden, wodurch eine gentherapeutische Anwendung möglich ist. Hierzu könnten HIV-1-abgeleitete Vektoren verwendet werden, um das Gen für sdAb19 in Wirtszellen zu exprimieren und Nef intrazellulär zu inhibieren. Dass so ein System funktioniert, konnte in einer Phase I Studie mit fünf chronisch infizierten HIV Patienten gezeigt werden. Hierfür wurden *ex vivo* in CD4⁺T-Zellen ein auf HIV-1 basierender lentiviraler Vektor eingebracht, der das antisense-Gen für HIV-1 env sowie LTRs enthielt, so dass bei einer Infizierung der Zelle mit HIV die Expression des Gens durch das Virus selbst hochreguliert wird. Den Probanden wurden durch Infusion eine Anzahl von 1×10^{10} modifizierten T-Zellen verabreicht und durch die Inhibition von Env eine Senkung der Viruslast festgestellt (Levine et al., 2006). Auf gleiche Weise wäre es auch möglich intrazellulär sdAb19 zu exprimieren und Nef zu inhibieren. Als Alternative zum *ex vivo* Gentransfer in die Zelle, wäre auch die Verwendung maßgeschneiderter retroviraler Partikel möglich, wodurch das Gen *in vivo* zielgerichtet in nicht teilende Zellen eingebracht werden könnte (Naldini et al., 1996). Eine effektive Verwendung von sdAb19 als Inhibitor hängt davon ab, an welche Bereiche von Nef dieser bindet, wie genau der Mechanismus der Inhibition aussieht und ob HIV-1 in der Lage ist Resistenzmutationen zu erzeugen.

Strukturelle Eigenschaften des Nef-sdAb19-Komplexes

Bei der Betrachtung des Komplexes aus Nef und sdAb19 ist zu erkennen, dass sich die Bindestelle auf Nef am C-terminus befindet. Dies wird auch durch die Analyse der Interaktionsflächen und der an den Interaktionen mit sdAb19 beteiligten Reste durch den PISA Server deutlich. Auf Seiten von sdAb19 interagieren vor allem Reste der variablen Bereiche der CDR2 mit Nef. Dies ist auch der Grund weshalb die üblicherweise längere CDR3-Schleife in sdAb19 stark verkürzt ist. CDR3 und CDR1 sind hierbei nur partial an der Interaktion beteiligt. Außerdem befindet sich die C-terminale flexible Schleife von Nef in der Nähe von Resten von sdAb19. Für die CD4-Runterregulierung durch HIV-1 Nef ist diese essenziell, da sie ein Dileucinmotiv besitzt über die sie wahrscheinlich mit AP2 interagiert. In mehrfachen ITC-Messungen konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass die Affinität zwischen Nef und sdAb19 durch die Deletion der C-terminalen flexiblen Schleife 2,5-fach reduziert ist, im Vergleich zu Konstrukten mit der Schleife. Dies deutet auf eine teilweise direkte Interaktion von sdAb19 mit dieser Schleife hin. Ob dies der Fall ist, konnte strukturell nicht hinreichend geklärt werden, da in der gelösten Struktur von Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19-SH3_{B6} und damit des Komplexes mit einem Nef mit C-terminaler flexibler Schleife, diese aufgrund seiner Flexibilität nicht ausreichend aufgelöst ist um die vollständige Struktur und Konformation zu entschlüsseln. Dies könnte bedeuten, dass die Schleife entweder gar nicht mit sdAb19, oder nur sehr schwach interagiert. Prinzipiell fehlen mit 23 Aminosäuren so viele Reste, dass mit einer räumlichen Nähe von etwa 4-7 Å zu sdAb19 eine Interaktion nicht erkennbar ist. Damit könnte sdAb19 auch direkt über die C-terminale flexible Schleife inhibitorischen Einfluss auf die Nef-vermittelte Endozytose von CD4 nehmen.

Zur näheren Charakterisierung der Interaktionen von Nef mit sdAb19 wurden ITC-Experimente durchgeführt. Für sdAb19 konnte zu dem myristoylierten Wildtyp Nef₁₋₂₁₀ des Allels SF2 eine Affinität von 32,7 nM ermittelt werden. Diese liegt damit im selben Bereich wie die Affinität zwischen sdAb19 und dem in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten stabileren N-terminal verkürzten Nef-Konstrukts Nef₄₅₋₂₁₀ (38,6 nM). Dies ist nicht überraschend, da für die Immunisierung des Lamas zur Erzeugung des Einzeldomänen-Antikörpers ein N-terminal verkürztes HIV-1 Nef verwendet wurde. Weitere ITC-Experimente mit den Nef Allelen NL4-3 und NA7 zeigen, dass sdAb19 eine sehr hohe Bindungsspezifität besitzt. Da das Lama zu Herstellung und Selektion von sdAb19 ursprünglich mit dem Nef Allel NL4-3 immunisiert wurde (Bouchet et al., 2011), ist auch die Affinität zwischen NL4-3 und sdAb19 im Vergleich zum SF2 Allel um etwas das 2-fache stärker (20,3 nM) und etwa 6-fach stärker als beim NA7 Allel (98 nM). Diese Ergebnisse passen zu früheren Experimenten, in denen die Inhibition der Nef-vermittelten CD4-Runterregulierung durch sdAb19 bei verschiedenen Nef Allelen überprüft wurde. SdAb19 inhibiert dabei Nef_{NL4-3} am besten, Nef_{SF2} geringfügig schlechter und Nef_{NA7} nur etwa halb so gut (Bouchet et al., 2011). Werden ITC-Messungen mit einem aus dem Gorilla stammenden Nef namens gorNef sowie mit SIV_{mac239} Nef durchgeführt und damit mit zwei sehr weit entfernten Nef Allelen, kann keine Interaktion mit sdAb19 mittels ITC festgestellt werden. Die beiden letzteren Nef-Moleküle sind auch nur zu 59% bzw. 50% mit dem verwendeten Nef_{SF2} Allel identisch, während Nef_{NA7} und Nef_{NL4-3} zu 89% bzw. 87% übereinstimmen. Damit hat sdAb19 eine hohe Bindungsspezifität gegenüber seinem Antigen HIV-1 Nef_{NL4-3}.

Einfluss von sdAb19 auf Nef-gebundene Liganden in der hydrophoben Tasche

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Bindestelle für sdAb19 im C-terminus von Nef und damit weit entfernt von der für CD4 befindet, die in der Sortierungsmotiv-Bindetasche der hydrophoben Tasche lokalisiert ist. Trotzdem ist sdAb19 in der Lage die Endozytose von CD4 zu inhibieren. Um dies biochemisch zu analysieren, wurde versucht ein in der hydrophoben Tasche von Nef bindenden Ligand durch die Zugabe von sdAb19 zu verdrängen. Hierzu wurde das chimäre Protein HzuS Nef_{18x} verwendet, das die Grundstruktur von HIV-1 Nef besitzt, aber die hydrophobe Tasche von SIV Nef_{mac239}. Denn die Bindung von CD4 direkt an Nef lässt sich biochemisch nicht durchführen, so dass stattdessen der CD3-Rezeptor als Ligand für die Sortierungsmotiv-Bindetasche der hydrophoben Tasche von Nef verwendet wurde. Sollte sdAb19 CD3 verdrängen, könnte dies auch für CD4 gelten. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die HzuS Nef_{18x}-Mutante ein CD3 ζ -Peptid (SNID 2-Peptid) mit einer Affinität von 15,9 μ M binden kann, wurde mittels analytischer Gelfiltration versucht CD3 ζ durch sdAb19 zu verdrängen. Interessanterweise geht die gewonnene Fähigkeit der HzuS Nef_{18x}-Mutante CD3 ζ zu binden mit dem Verlust der SH3_{B6}-Bindung einher, was mit einer gesamten veränderten Struktur der hydrophoben Tasche durch die Mutationen zu erklären ist.

In der analytischen Gelfiltration konnte wie schon bei sdAb19 und SH3_{B6} eine synergistische Interaktion mit Nef beobachtet werden. Es wird mit HzuS Nef_{18x}, sdAb19 und CD3 ζ ein stöchiometrischer 1:1:1-Komplex erhalten. Damit ist die gleichzeitige Bindung von sdAb19 und CD3 ζ an HzuS Nef_{18x} möglich und eine strukturelle Veränderung von Nef ausgeschlossen, die die Inhibition der Nef-vermittelten CD4-Runterregulierung erklären könnte. Möglicherweise verhindert sdAb19 die Interaktion von Nef mit weiteren Proteinen der Internalisierungsmechanismen wie AP2.

Interessanterweise wird die Nef-vermittelte Runterregulierung des MHC-I Rezeptors durch sdAb19 nicht inhibiert, so dass zum einen der intrazelluläre Mechanismus der Endozytose von CD4 und MHC-I unterschiedlich sein muss und sdAb19 auch hier nicht fähig ist die Interaktion zwischen Nef, MHC-I und der μ 1-Untereinheit von AP1 zu stören. Um dies strukturell zu untersuchen, ist in Abbildung 72 zunächst eine strukturelle Überlagerung des kürzlich gelösten Nef_{NL4-3}-MHC-I-CD- μ 1-Komplex (pdb: 4EN2) mit dem in dieser Arbeit gelösten Nef_{SF2}-sdAb19-Komplex zu sehen. Es wird deutlich, dass auch die μ 1-Untereinheit zusammen mit MHC-I synergistisch zusammen mit sdAb19 an Nef binden kann. Genauso wie bei der gleichzeitigen Interaktion des Nef-sdAb19-Komplexes mit SH3_{B6}, ist der Bereich an dem μ 1 und MHC-I an Nef bindet weit von der sdAb19-Bindestelle von Nef entfernt (Abbildung 72). Die Überlagerung des Komplexes Nef-MHC-I-CD- μ 1 (grau-violett-blassgrün) mit dem Nef-sdAb19-Komplex (orange-grün) weisen keine Kollisionen der Aminosäureketten und keine Strukturänderungen von Nef auf, die die gleichzeitige Interaktion stören könnten. Während der C-Terminus von Nef durch die sdAb19 Bindung leicht zum Liganden hingezogen wird, kann der N-Terminus mit Bereichen der Kerndomäne die koordinative Interaktion mit MHC-I und der μ 1-Untereinheit eingehen. Interessant ist hierbei, dass sdAb19 weder die Interaktion von Nef mit MHC-I und μ 1 inhibiert, noch die Internalisierung von MHC-I, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die sdAb19 Bindestelle keine Rolle für die MHC-I-Internalisierung spielt.

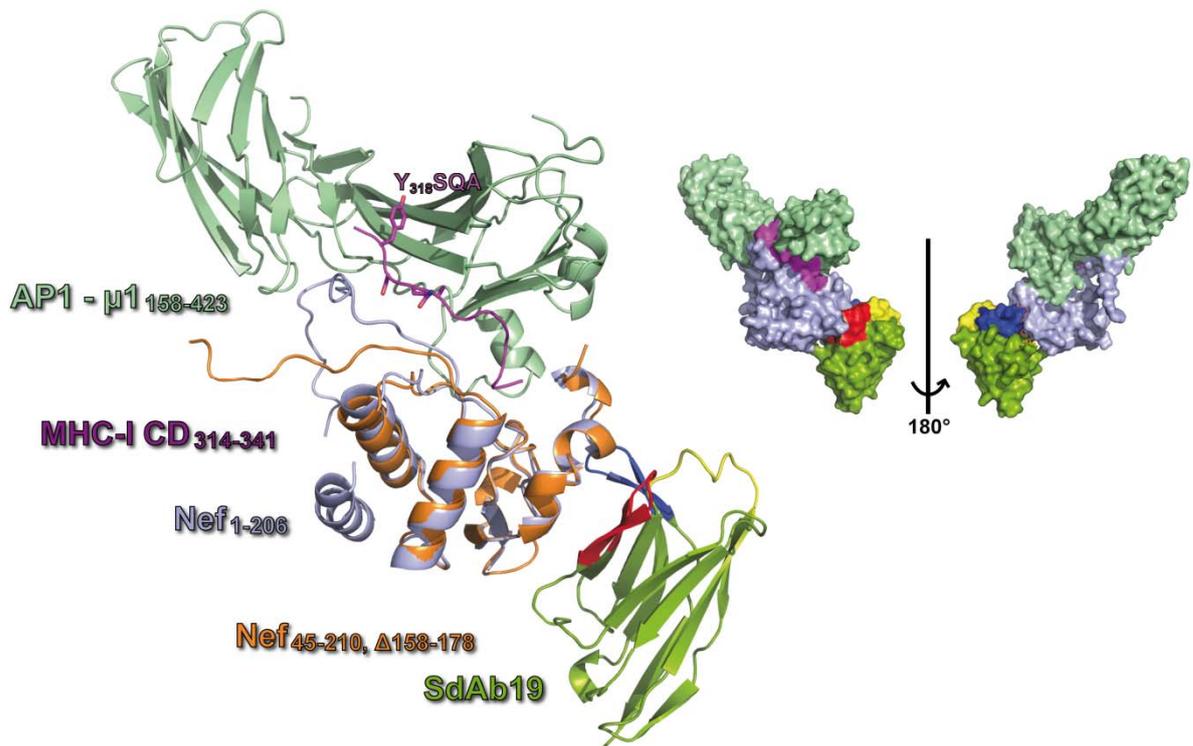


Abbildung 72: Modell des Komplexes aus Nef, sdAb19, MHC-I und der μ 1-Untereinheit von AP1. Dargestellt ist eine strukturelle Überlagerung des in dieser Arbeit gelösten Komplex aus Nef_{SF2: 45-210, Δ158-178} (orange) und sdAb19 (grün) mit dem veröffentlichten Komplex aus Nef_{NL4-3: 1-206} (grau), MHC-I₃₁₄₋₃₄₁ (magenta) und μ 1₁₅₈₋₄₂₃ (pdb: 4EN2) (blassgrün) als Schleifendiagramm. Derselbe Komplex ist zusätzlich in der Oberflächendarstellung von der Seite und 180° gedreht gezeigt. Von sdAb19 ist CDR1 gelb, CDR2 rot und CDR3 blau angefarbt.

SdAb19 als mögliches Startmolekül für die Wirkstoffentwicklung kleinerer Inhibitoren

Die inhibitorischen Fähigkeiten von sdAb19 liegen nicht darin Nef strukturell so zu verändern, dass die Interaktion mit Cargoproteinen wie CD4 oder MHC-I gestört werden, sondern die Interaktion mit nachgeschalteten zellulären Proteinen zu verhindern. Damit ist die Möglichkeit gegeben kleinere molekularer Inhibitoren auf Basis der Bindungsfläche zwischen sdAb19 und Nef zu entwickeln, die möglicherweise als injizierbare Medikamente eingesetzt werden könnten. Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurde die Bindungsfläche zwischen sdAb19 und Nef auf Veränderungen der Oberflächenstruktur hin untersucht. Für Hochdurchsatzmethoden zur Identifizierung von kleinen Molekülen, die an derselben Interaktionsfläche wie sdAb19 binden, werden üblicherweise Verdrängungsexperimente durchgeführt. Das heißt, es wird nach einem Molekül gesucht, das in der Lage ist mit einer höheren Affinität in die gleiche Bindungsfläche wie sdAb19 an Nef zu binden und den Komplex damit zu trennen. Da injizierbare Inhibitoren für die Überwindung von zellulären Barrieren auch zu einem gewissen Grad wasserlöslich sein sollten, wurde das Wassernetzwerk der Interaktionsoberfläche von Nef daraufhin untersucht, ob es auch in anderen gelösten Strukturen konserviert ist. Hilfreich sind in diesem Zusammenhang Furchen, in denen Wassermoleküle binden, die durch eine wasserlösliche niedermolekulare chemische Substanz ersetzt werden und an derselben Stelle binden könnten. Die strukturelle Überlagerung des in dieser Arbeit gelösten dimeren Nef-sdAb19-Komplex mit zwei gelösten und publizierten Nef Strukturen (3REA und 3RBB (Breuer et al., 2011; Horenkamp et al.,

2011)) zeigten, dass das Wassernetzwerk der ungebundenen Nef Proteine an der sdAb19-Bindungsfläche stark konserviert ist. Durch die Bindung von sdAb19 werden auch einige Wassermoleküle verdrängt oder es binden weitere an der Oberfläche. Doch sind die Veränderungen im Ganzen eher gering einzustufen, so dass mittels Hochdurchsatzmethoden Leitstrukturen gefunden werden könnten, die an die Nef-sdAb19-Interaktionsfläche auch im sdAb19-ungebundenen Zustand an Nef binden könnten.

Für die Durchführung von Hochdurchsatzmethoden zur Identifizierung von kleinen Molekülen kann es hilfreich sein, dass die Affinität von sdAb19 so weit reduziert wird, dass die gesuchte initiale Leitstruktur nicht bereits eine höhere Affinität als 30 nM aufweisen muss. Deshalb wurden in sdAb19 Mutationen eingeführt, die das Bindungsverhalten an Nef beeinflussen sollen. Innerhalb der Bindungsoberfläche zwischen sdAb19 und Nef interagieren sieben Reste von Nef mit sieben verschiedenen Resten von sdAb19 durch direkte Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische Wechselwirkungen innerhalb einer Hülle von 3,5 Å. Besonders Aspartat 60 von sdAb19 innerhalb der CDR2 interagiert als Schlüsselrest mit Lysin₁₄₈^{Nef}, sowie Tyrosin₁₃₉^{Nef} zum einen ionisch zum anderen über eine Wasserstoffbrücke. Das negativ geladene Aspartat 60 wurde daraufhin zu einem positiv geladenen Arginin mutiert, wodurch sich die Affinität zu Nef von 38,7 nM auf 3,7 µM und damit etwa 100-fach verschlechtert. Als weitere Mutation wurde das ebenfalls an der Interaktion beteiligte Serin 103 in sdAb19 zu einer negativ geladenen Glutaminsäure mutiert, mit gleichzeitiger Mutation des benachbarten Restes Glycin 102 im CDR3 zu einem Arginin. Obwohl CDR3 an der Interaktion mit Nef kaum beteiligt ist, wird durch die gemeinsamen Mutationen G102R und S103E mit 0,9 µM eine 23-fach schlechtere Affinität zu Nef erhalten. Mit diesen Mutanten sdAb19_{D60R} und sdAb19_{G102R,S103E} stehen damit bereits Mutanten von sdAb19 zu Verfügung, die möglicherweise in der Wirkstoffentwicklung kleinerer molekularer Inhibitoren einsetzbar sind. Außerdem zeigen diese Mutationen, dass die untersuchte Interaktionsfläche zwischen Nef und sdAb19 die richtige ist.

Kombinatorische Verwendung von sdAb19 und SH3_{B6}-Domäne als Inhibitor (Neffin)

Bevor die biochemischen und strukturellen Daten des Nef-sdAb19-Komplexes aus dieser Arbeit vorlagen, wurde im Stil des „*wrapping-Nef*“-Ansatzes (Breuer et al., 2011) sdAb19 mit der SH3_{B6}-Domäne durch einen flexiblen Linker miteinander verknüpft und das resultierende Protein Neffin genannt. Das Ziel war mittels zweier an Nef bindenden Domänen mehrere Interaktionsstellen von Nef gleichzeitig gegen mögliche Interaktionspartner zu blockieren und damit die inhibitorischen Fähigkeiten des Ausgangsmoleküls zu verbessern sowie die Affinität zu erhöhen. Voraussetzung für die Bindung von Neffin an ein einzelnes Nef war, dass die Länge des Linkers die gleichzeitige Bindung beider Domänen an Nef gewährleistet. Dieser Ansatz entspricht eher einem Wirkstoffdesign, in dem ein in der Natur nicht vorkommendes Molekül generiert wird, um eine höhere Affinität und neue inhibitorische Eigenschaften gegen Nef zu erzielen. Auf ähnlicher Weise konnten in einer anderen Studie bereits drei Inhibitoren hergestellt werden, in denen eine SH3-Domäne (RRT.A1) und die zytosolische Domäne von CD4 (422-458) mit einem kurzen Linker verknüpft wurden, wodurch die CD4-Runterregulierung und die Erhöhung der Infektiosität von Virionen durch Nef inhibiert werden konnte (Breuer et al., 2011).

In zwei bereits publizierten Studien wird durch Neffin eine höhere Affinität zu Nef als durch sdAb19 alleine sowie verstärkte inhibitorische Fähigkeiten beschrieben (Bouchet et

al., 2012; Jarviluoma et al., 2012). Besonders auffällig ist, dass Nefin im Gegensatz zu sdAb19 auch die Nef-vermittelte Endozytose des MHC-I-Rezeptors inhibiert. Dieses Ergebnis war überraschend, da der einzige Unterschied zwischen sdAb19 und Nefin die zusätzliche SH3_{B6}-Domäne von Nefin ist und diese Domäne alleine keinen Einfluss auf die MHC-I-Runterregulierung hat.

Nach der Komplexformierung zwischen Nef und Nefin in dieser Arbeit wurde mittels analytischer Gelfiltration eine unerwartete hohe Komplexstöchiometrie erhalten. Denn im Vergleich zu dem Nef-sdAb19-SH3_{B6}-Komplex, der eine Masse von etwa 44 kDa aufweist, bildet Nef mit Nefin einen weit größeren Komplex aus. Damit muss sich dieser Komplex deutlich von dem Nef-sdAb19-SH3_{B6}-Komplex unterscheiden und entspricht von seiner ermittelten Masse eher einem 2:2-Komplex oder sogar einem 3:3-Komplex. Somit interagieren sdAb19 und SH3_{B6} von Nefin nicht mit einem einzelnen Nef-Molekül, sondern mit mindestens zwei anderen gleichzeitig. Interessanterweise entstehen dabei aber keine Oligomere mit einer offenen Symmetrie, da in der analytischen Gelfiltration ein einzelner monodisperser Peak erhalten wurde und keine Aggregationspeaks im Ausschlussvolumen. Auch nach Verlängerungen des Linkers zwischen sdAb19 und SH3_{B6} in Nefin von 8 bis auf 18 bzw. 38 Reste (Nefin18x und Nefin38x), wurde in allen Fällen ein Komplex mit gleicher Masse erhalten. Daher scheinen sich im Nef-Nefin-Komplex die Bindestellen der sdAb19- und die SH3_{B6}-Domäne von Nefin auf den Nef-Molekülen in unmittelbarer räumlichen Nähe zu befinden. Die Bildung dieser Dimere oder Trimere zwischen Nef und Nefin könnte auch der Grund sein, weswegen Nefin unter anderem auch die Nef-vermittelte MHC-I-Runterregulierung inhibieren kann, während sdAb19 dazu nicht in der Lage ist (Bouchet et al., 2012).

Aus den bisher gesammelten strukturellen Daten des Nef-sdAb19-SH3_{B6}-Komplexes lassen sich Schlüsse auf die Formierung des Nef-Nefin Komplexes ziehen. In Abbildung 71 sind schematisch, sowie als Oberflächenpräsentation strukturell der dimere Komplex aus Nef und sdAb19, sowie der trimere Komplex Nef-sdAb19-SH3_{B6} dargestellt. Die Bindestelle von sdAb19 am C-Terminus von Nef befindet sich genau an der gegenüberliegenden Seite der SH3_{B6}-Bindestelle, so dass ein Linker zur Verknüpfung beider Moleküle zu lang sein müsste, um die Bindung an ein einzelnes Nef Protein zu bewerkstelligen. Trotz allem wird mit Nef und Nefin ein stabiler inhibitorischer Komplex mit einer höheren Komplexstöchiometrie erhalten. Höchstwahrscheinlich wird durch Nef und Nefin ein sandwichartiger 2:2-Komplex gebildet, in dem sich zwei Nef-Moleküle im Zentrum befinden, umschlossen von zwei sdAb19- und zwei SH3_{B6}-Molekülen. Der kürzeste getestete Linker hat eine Länge von 8 Aminosäuren (Nefin), so dass sich in dem 2:2-Komplex der C-Terminus von sdAb19 und der N-Terminus von SH3_{B6} in einer entsprechend kurzen Distanz zueinander befinden müsste. Da die Entfernung zwischen zwei benachbarten C α -Atomen in einer elongierten Peptidkette etwa 3,8 Å beträgt und Nef mit Nefin einen stabilen Komplex ausbildet, muss der Abstand zwischen dem C-Terminus von sdAb19 und dem N-Terminus von SH3_{B6} etwa unter 30,4 Å betragen. Legt man zwei Nef-sdAb19-SH3_{B6}-Komplexe 180° gedreht nebeneinander und dreht beide so zueinander, dass der C-Terminus von sdAb19 und der N-Terminus von SH3_{B6} ohne Kollisionen der Aminosäureketten so nah wie möglich zueinander ausgerichtet sind, kann als kleinste Entfernung zwischen diesen Termini ca. 27 Å gemessen werden (Abbildung 71 C), was für einen Nef-Nefin 2:2 Komplex bei einem 8-fachen Linker passen würde. Prinzipiell ist auch die Ausbildung eines 3:3-Komplexes wie er in Abbildung 71 D dargestellt ist möglich. Hierbei können sogar geringe Entfernungen zwischen dem C-Terminus von sdAb19 und dem N-Terminus von SH3_{B6} von bis zu 11,4 Å erzielt werden. Ein

solcher Komplex hätte aufgrund der kugelförmigen Struktur und einem großen Lösungsmittelkanal im Zentrum eine immense Größe und würde bei weitem die Masse übersteigen, die in der analytischen Gelfiltration ermittelt wurde. Zudem wäre so ein Komplex nicht so stabil, wie er sich in den biochemischen Experimenten zeigte und es könnten sich vermehrt offene Symmetrien ausbilden, die ebenso nicht beobachtet wurden. Aus diesem Grund kann eher von einem 2:2-Komplex ausgegangen werden (Abbildung 71). Um die Struktur des Komplexes aus Nef und Neffin zu lösen, wurden mehrfach Kristallisationsansätze mit verschiedenen Nef Allelen und -Konstrukten in unterschiedlichen Bedingungen angesetzt. Nur in einem Fall mit Nef_{45-210,Δ158-178} und Neffin wurden reproduzierende Kristalle erhalten, die aber auch nach Verbesserungsschritten nicht ausreichend streuten, um die Struktur lösen zu können.

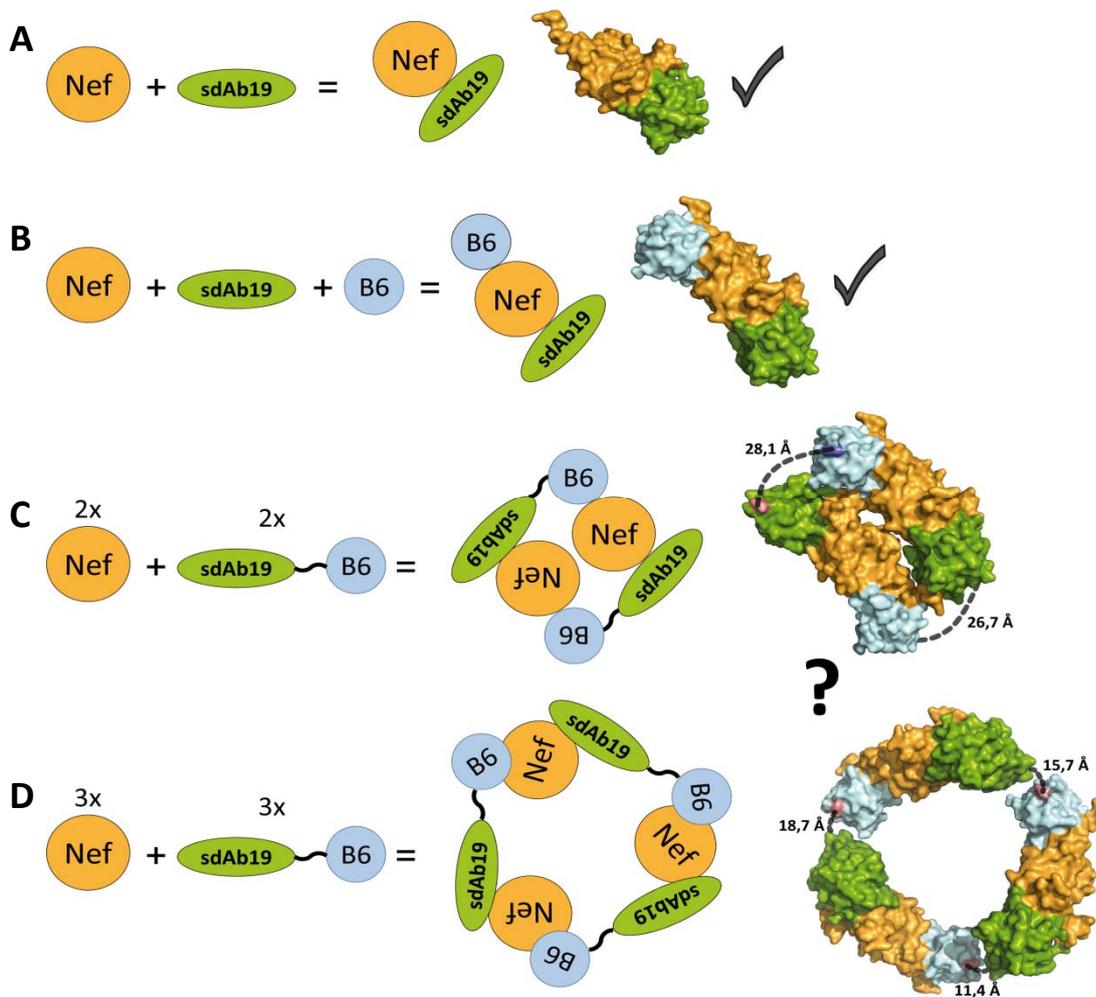


Abbildung 71: Schematisch und als Oberflächendarstellung Modelle der Komplexe Nef-sdAb19 mit und ohne SH3_{B6}-Domäne und Nef-Neffin. (A) Durch das Zusammenbringen von Nef (orange) und sdAb19 (grün) wird ein dimerer 1:1-Komplex gebildet, in dem sdAb19 an den C-Terminus von Nef bindet. **(B)** Wird zu Nef und sdAb19 zusätzlich die SH3_{B6}-Domäne (blau) gegeben, bildet sich ein trimerer 1:1:1-Komplex aus, in dem die SH3_{B6}-Domäne an der gegenüberliegende Seite von sdAb19 mit der RT-Schleifen Bindetasche interagiert. Anhand des gelösten 1:1:1-Komplex in **(B)** sind aufgrund der erhaltenen apparenten Massen in der Gelfiltration zwischen 80 und 120 kDa prinzipiell zwei Modelle für den Nef-Neffin-Komplex vorstellbar **(C und D)**. **(C)** Nef bildet zusammen mit dem sdAb19-SH3_{B6}-Fusionsprotein Neffin einen 2:2-Komplex aus, in dem zwei Nef-Moleküle sandwichartig durch zwei Neffin-Moleküle umschlossen werden. **(D)** Prinzipiell wäre zwischen Nef und Neffin auch die Ausbildung eines 3:3-Komplexes möglich, in dem sich drei Nef- und drei Neffin-Moleküle annähernd kreisförmig anordnen. Die Linkerlängen in den jeweils dargestellten Modellen sind in Å angegeben.

Charakterisierung der Interaktion zwischen Nef und Neffin

Mit Blick auf Neffin ist interessant, dass die Affinität zwischen Nef und sdAb19 mit rund 40 nM in einem ähnlichen Bereich wie die Affinität zwischen Nef und der SH3_{B6}-Domäne mit etwa 20 nM liegt. Im Hinblick auf die Bindung der verknüpften sdAb19- und SH3_{B6}-Domänen von Neffin an Nef und der daraus resultierenden Komplexbildung könnte das von Vorteil sein, weil bei der Interaktion mit mindestens einem weiteren Nef Protein beide Domänen als gleichrangige Partner auftreten. Wenn eine der beiden Domänen von Neffin eine erheblich niedrigere Affinität zu Nef besitzen würde, könnten sich möglicherweise, anders als in Abbildung 71 beschrieben, schnell offene Komplexsymmetrien bilden da der stärker bindende Partner sehr viel schneller mit weiteren Nef-Molekülen interagieren würde.

Neffin hingegen hat aufgrund der gemeinsamen Affinitäten der einzelnen Domänen sdAb19 und SH3_{B6} eine so hohe Bindungsstärke zu Nef, dass sie mittels ITC kaum noch messbar ist. Es wurden auch hier die Messungen mit den drei Nef Allelen SF2, NL4-3 und NA7 durchgeführt. Während die Affinität zwischen Neffin und Nef_{SF2} bzw. Nef_{NL4-3} zwischen 1 und 4 nM liegt, beträgt sie bei Nef_{NA7} 14,4 nM und ist damit aufgrund der etwas geringeren Affinität von sdAb19 zu Nef_{NA7} etwas niedriger. Bei den ermittelten Affinitäten ist nicht auszuschließen, dass diese auch weit höher sind und im subnanomolaren Bereich liegen, da mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden die Ermittlung von Affinitäten unterhalb von 1 nM schwierig ist. Die Arbeitsgruppe von Kalle Saksela hat dazu innerhalb einer gemeinsamen Studie mittels k_{on} -Werten aus Biacore-Experimenten, sowie k_{off} -Werten aus einem selbst entwickelten ELISA Affinitäten von 0,54 pM erhalten (Jarviluoma et al., 2012). Hierbei ist zu beachten, dass mit den gleichen Methoden auch zwischen Nef und sdAb19 höhere Affinitäten von bis zu 15 pmol erhalten worden sind, so dass diese auch 1000-fach höher sind als die in dieser Arbeit mittels ITC ermittelten Dissoziationskonstanten. Innerhalb dieser Methode liegt also die Affinität von Neffin zu Nef um etwa 28-fach höher als von sdAb19 (15 pmol zu 0,54 pmol), was wiederum etwa dem gleichen Vielfachen (24-fach) der hier ermittelten Messwerte entspricht (38,6 nM zu 1,6 nM).

Ausgehend von dem oben diskutierten Modell des Nef-Neffin-Komplexes mit der 2:2-Stöchiometrie ist ersichtlich, weshalb im Unterschied zu sdAb19 Neffin auch in der Lage ist die Nef-vermittelte MHC-I-Internalisierung bzw. den Transport des Rezeptors zur Plasmamembran zu inhibieren. Im Gegensatz zum sdAb19 blockiert Neffin in dem 2:2-Komplex mit Nef viel größere Bereiche und unterbindet jegliche Interaktionen mit anderen Interaktionspartnern. Damit steht mit Neffin neben sdAb19 ein weiterer sehr potenter Inhibitor für zukünftige immunologischen und gentherapeutischen Experimente zur Verfügung.

Potential von Nef zur Bildung von Resistenzmutationen gegen sdAb19 und Neffin

Aufgrund der bereits erhaltenen Hinweise auf die hohe Spezifität der Bindung von sdAb19 an Nef_{NL4-3} wurde überprüft, in wie weit HIV-1 in der Lage ist Resistenzmutationen auf Nef gegen sdAb19 zu entwickeln. Ein Hinweis auf dieses Potential geben strukturelle Überlagerungen vieler verschiedener Nef Allele mit Fokus auf die an der Interaktion mit sdAb19 beteiligten Reste. Denn je konservierter Bereiche sind, desto wichtiger könnten diese strukturell und funktionell für Nef sein.

Im Fall des Nef Proteins gibt es einige variable Aminosäurereste, die direkt oder indirekt an der Interaktion mit sdAb19 beteiligt sind. Von den sieben Aminosäureresten die direkt Wasserstoff- oder Salzbrücken mit Restens von sdAb19 ausbilden sind vier sehr variabel.

Es wurden drei Reste von Nef nach immunologischen Gesichtspunkten ausgewählt um diese zu mutieren. Das Leucin202 befindet sich im Zentrum der Interaktionsfläche und ist im Vergleich von 1643 verschiedenen Nef Allelen zu 70% nicht mutiert, aber in 22% der Fälle ein Lysin, so dass diese eine für HIV einfach zu bewerkstellende Mutation darstellt. Der Rest des Methionin198 wurde zu einem Lysin mutiert, was in nur 7% der verglichenen Nef Allele zu finden ist, während es in 50% der Fälle ein Methionin ist. Beide Mutanten Nef_{M198K} und Nef_{L202K} zeigten den Verlust der sdAb19 Interaktion, sowohl *in vitro* in analytischen Gelfiltrationen und ITC-Experimenten, als auch *in vivo* indem diese Nef-Mutanten weiterhin in der Lage sind den CD4-Rezeptor trotz der Anwesenheit von Neffin zu internalisieren. In diesen *in vivo*-Experimenten wurde nach der 4-fachen eingesetzten Menge von Neffin weiterhin CD4 internalisiert, wie es durch den Nef-Wildtyp ohne Inhibitor zu beobachten ist. Erst nach der im Vergleich zu Nef 8-fach exprimierten Menge von Neffin, wird Nef_{M198K} und Nef_{L202K} leicht inhibiert, wodurch mehr CD4-Moleküle an der Plasmamembran verbleiben. Dies zeigt, dass diese Einzelmutationen ausreichen, um die sdAb19 und Neffin Bindung und damit die Inhibition der CD4-Runterregulierung zu verhindern. Obwohl Neffin, wie die Neffin_{3*}-Mutante, mittels seiner SH3_{B6}-Domäne weiterhin an Nef binden kann, wird dadurch die Internalisierung von CD4 nicht gestört. Darum kann daraus geschlossen werden, dass für die Inhibition durch Neffin die Ausbildung des 2:2-Komplexes mit der gleichzeitigen Bindung von SH3_{B6} und sdAb19 an Nef notwendig ist.

Ein weiterer Rest, der in einer weiteren Nef-Mutante zu einer Glutaminsäure mutiert wurde ist das zu 99% konservierte Lysin148_{Nef}, das als Schlüsselrest mit Aspartat 60 von sdAb19 interagiert. In diesem Fall bindet sdAb19 weiterhin, so dass eine Affinität von 1,7 μM ermittelt werden konnte und Nef_{K148E} trotz der Anwesenheit von Neffin *in vivo* CD4 runterregulieren kann. Diese Mutation findet im Nef Protein jedoch nur in 0,3% der Fälle statt (O'Neill et al., 2006).

In diesem Zusammenhang ist nicht geklärt, wie schnell sich in einer HIV-1 infizierten Zelle diese Mutationen durchsetzen können, bevor Neffin den Großteil der Nef-Moleküle inhibiert und damit das Immunsystem in der Lage ist, die infizierte Zelle zu erkennen und zu zerstören. Hierzu könnten beispielsweise in Zellkultur *in vivo* zeitabhängige Studien durchgeführt werden, mit Fokus auf entstehende Mutationen während der Herstellung viraler Partikel bei gleichzeitiger Expression von Neffin. Möglicherweise wäre immunologisch auch der synergistische Einsatz zusammen mit anderen antiviralen Medikamenten zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion sinnvoll.

5.2 Untersuchung der Nef-interagierenden Adaptorproteinkomplexe AP1 und AP2

Charakterisierung der Bindung zwischen Nef, AP1 und MHC-I

Um die fehlende Inhibition der MHC-I-Runterregulierung von sdAb19 biochemisch zu erklären, musste zunächst die Interaktion zwischen Nef, AP1 und MHC-I untersucht werden. Hierzu wurde im Zuge dieser Arbeit die Expression und Reinigung des heterotetrameren AP1-Komplexes angestrebt. Dies konnte rekombinant in *E. coli* durchgeführt werden, indem mittels des pET Duet Systems alle Untereinheiten zusammen coexprimiert wurden. Es konnte so ein stöchiometrischer 1:1:1:1-Komplex aller Untereinheiten γ , $\beta 2$, $\mu 2$ und $\sigma 2$ erhalten werden. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde der Komplex Nef-MHC-I-CD- $\mu 1$ publiziert (pdb: 4EN2) (Jia et al., 2012). Die Struktur zeigt, dass es sich um einen trimeren kooperativen Komplex handelt, der nur durch die Fusion zwischen Nef und der zytosolischen Domäne von MHC-I erhalten wurde. AP1 erkennt grundsätzlich Tyrosinmotiv-basierende Proteinsortierungssignale mit der Konsensussequenz Yxx Φ , mit Φ als große hydrophobe Aminosäure (Leucin, Isoleucin, Methionin oder Phenylalanin) (Boll et al., 1996). Diese Bindungstasche ist aber nur nach der Phosphorylierung des Threonin 154 des Linkers zwischen der N-terminalen und C-terminalen Domäne von $\mu 1$ zugänglich. Dadurch klappt die C-terminale Domäne der $\mu 1$ -Untereinheit auf, wodurch die Bindungstaschen für die Konsensussequenz Yxx Φ zugänglich wird. Interessanterweise beinhalten die zytosolischen Domänen der MHC-I-Rezeptoren HLA-A2 und HLA-B eine kryptische Konsensussequenz mit YxxA, so dass die Bindung an die $\mu 1$ -Untereinheit nur Nef-vermittelt stattfinden kann. Dies konnte durch die in Jia et al. (2012) gelöste Nef-MHC-I-CD- $\mu 1$ -Struktur gezeigt werden, in der durch die Assoziation von Nef und AP1 kooperativ ohne Beteiligung des Isoleucinmotivs von Nef eine schmale Furche entsteht, in die MHC-I-CD bindet und anschließend internalisiert wird (Jackson, Kelly et al. 2010; Jia, Singh et al. 2012). Diese Struktur lässt die Frage offen, ob Nef auch ohne die Phosphorylierung von Thr154 der $\mu 1$ -Untereinheit in der Lage ist die kooperative Bindung mit MHC-I und $\mu 1$ einzugehen, da die $\mu 1$ -Bindestelle in der geschlossenen Konformation durch die $\beta 1$ -Untereinheit verdeckt wird (Abbildung 73). Um das Yxx Φ -Motiv für MHC-I zu erreichen, muss die $\mu 1$ -Untereinheit große strukturelle Veränderungen durchmachen, die normalerweise durch die Phosphorylierung von Thr154 durch Adaptor-assoziierte Kinasen wie AAK1 hervorgerufen wird (Henderson and Conner, 2007). Aus diesem Grund wurde zusätzlich zum AP1-trunk Wildtyps ein Komplex exprimiert und gereinigt, in der Thr154 in der $\mu 1$ -Untereinheit gegen zwei Aspartate ausgetauscht wurden, um die natürliche Phosphorylierung nachzustellen die für die Bindung an Cargoproteinen essenziell ist.

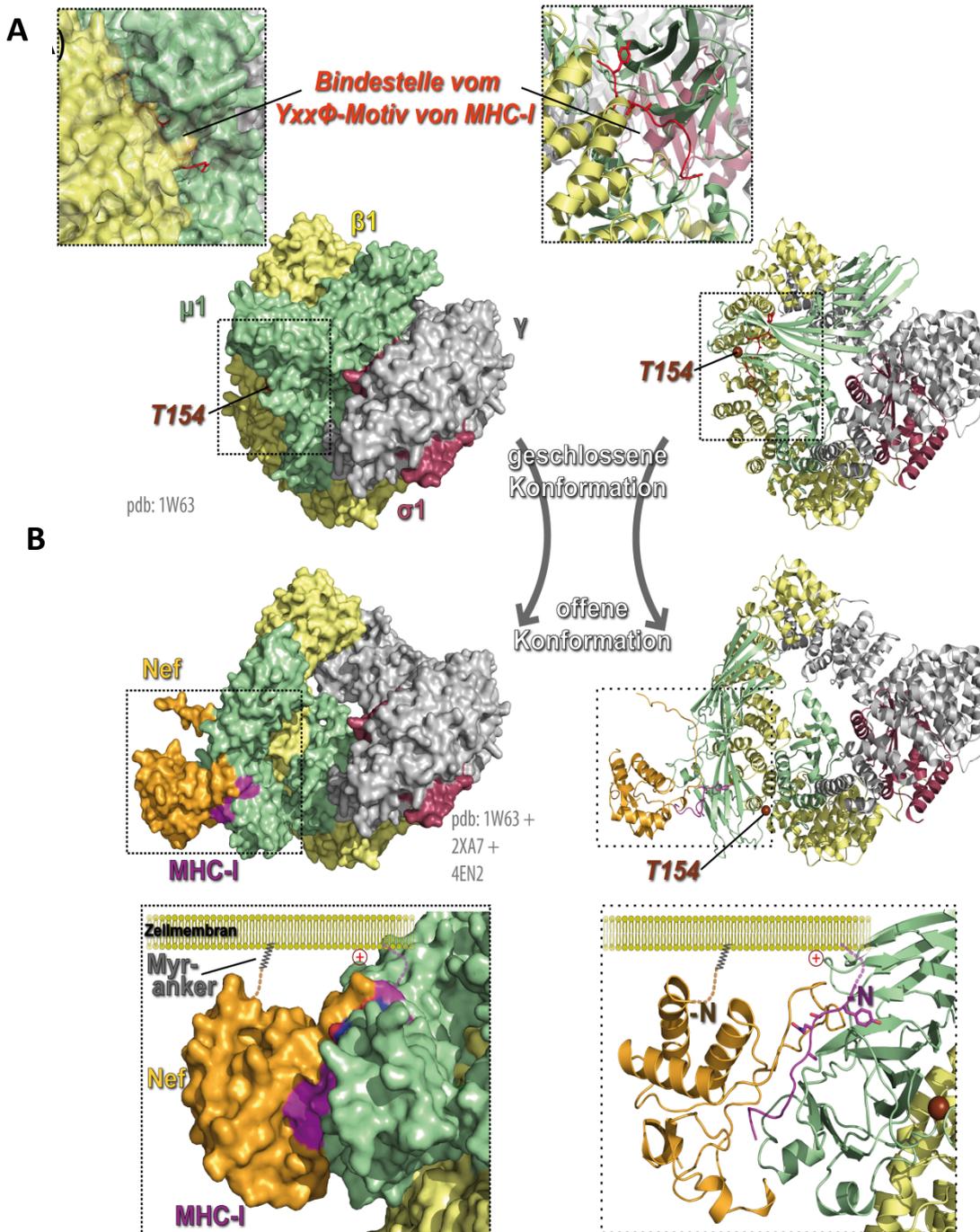


Abbildung 73: Struktureller Vergleich zwischen der geschlossenen Konformation von AP1 und dem Modells einer offenen Konformation. (A) In der geschlossene AP1 Struktur (pdb: 1W63) ist in der Oberflächendarstellung (links) zu erkennen, dass das Tyrosin Bindungsmotiv (rot) der μ 1-Untereinheit (blassgrün) verdeckt auf der β 1-Untereinheit (gelb) liegt (dargestellt durch das generierte MHC-I-Peptid der Nef-MHC-I-CD- μ 1 Struktur aus Jia et al. 2012). Das unphosphorylierte Thr154 von μ 1 ist in der Schleifendiagramm-Darstellung des Komplexes als rote Kugel zu erkennen. **(B)** Eine mögliche Konformation für die offene AP1 Struktur wurde modelliert, genauso wie dessen Komplex mit Nef und MHC-I. Hierzu wurden die Strukturkoordinaten von AP2 in offener Konformation (pdb: 2XA7) mit Fokus auf die μ -Untereinheit mittels struktureller Überlagerung über die geschlossene AP1 Struktur (pdb: 1W63) gelegt. Anschließend wurde dann der Nef-MHC-I-CD- μ 1-Komplex (pdb: 4EN2) wieder mit Fokus auf μ 1 mit der offenen μ 2-Untereinheit passend überlagert und AP2 entfernt. Nach der Überlagerung befand sich ein Tyrosin-basierendes Motiv der offenen AP2 Struktur mit der Sequenz DYQRL an der identischen Stelle wie das Tyrosinmotiv der MHC-I-Peptid der überlagerten Nef-MHC-I-CD- μ 1 Struktur. Außerdem ist die μ 1-Untereinheit strukturell zwischen AP1 und AP2 sehr konserviert (Heldwein et al., 2004; Jackson et al., 2010; Jia et al., 2012).

In den Bindungsexperimenten mit AP1 und AP1 μ DD wurden Peptide von HLA-A2 und HLA-B verwendet, die mit dem MHC-I-CD-Peptid der gelösten Komplexstruktur identisch sind (siehe Abschnitt 3.4) und deren Konsensussequenz YSQA konserviert sind. Trotzdem konnten weder der AP1 Wildtyp, noch die AP1 Mutante mit der Thr154 Phosphomimikry zusammen mit den HLA-Peptiden und Nef₁₋₂₁₀-Komplexe bilden. Dies wird zum einen in den durchgeführten analytischen Gelfiltrationen, sowie mittels ITC-Messungen deutlich. Es konnte in beiden Fällen keine Interaktion zwischen Nef₁₋₂₁₀, AP1 und HLA-B, bzw. zwischen Nef₁₋₂₁₀, AP1 μ DD und HLA-A2 detektiert werden. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben: Zum einen könnte in der natürlichen Umgebung die Zellmembran eine wichtige Funktion bei der Interaktion zwischen Nef, AP1 und MHC-I spielen. Denn einerseits könnten erst durch die Membranbindung von MHC-I und Nef die nötigen strukturellen Veränderungen induziert werden, die es möglich macht mit der μ 1-Untereinheit einen koordinativen Komplex zu bilden. Andererseits befinden sich Nef und MHC-I an der Plasmamembran in einer weit engeren räumlichen Nähe, weshalb auch in Jia et al. (2012) die Fusion der Proteine Nef und MHC-I nötig war um mit der μ 1-Untereinheit einen Komplex zu bilden. Erst in dieser räumlichen Nähe kann Nef und die zytosolische Domäne von MHC-I mit der μ 1-Untereinheit von AP1 interagieren, woraufhin der Rezeptor mittels Clathrin-vermittelter Endozytose internalisiert wird.

Charakterisierung der Bindung zwischen Nef, AP2 und CD4

Im Fall der Interaktion zwischen Nef, AP2 und CD4 muss AP2 nicht notwendigerweise phosphoryliert werden, um mit CD4 und Nef interagieren zu können. Anstatt durch die Phosphorylierung von AP2, wird die Interaktion zwischen AP2 und CD4 zellulär durch die Phosphorylierung eines Serins in der zytosolischen Domäne von CD4 reguliert, das sich neben einem Dileucinmotiv befindet. Das heißt AP2 müsste direkt mit Peptiden mit frei zugänglichen Dileucinmotiven interagieren können. Dies konnte in früheren Studien kristallografisch gezeigt werden, indem AP2 in geschlossener Konformation zusammen mit einem Dileucinmotiv (QIKRLLS) enthaltenen Peptid kristallisiert wurde (pdb: 2JKR) (Kelly et al., 2008). Zwei Jahre später wurde AP2 in offener Konformation kristallisiert, wobei in dieser Struktur durch symmetrieverwandte Moleküle die Interaktion von Resten mit der Sequenz MEQKLI beschrieben werden konnte (pdb: 2XA7) (Jackson et al., 2010). In beiden Fällen bindeten die Dileucinmotive an denselben Bereich der σ 2-Untereinheit, wobei die Bindung der Dileucin-Peptide keinen Einfluss auf die strukturellen Veränderungen der μ 2-Untereinheit hat (Abbildung 74). Es ist zu erkennen, dass sowohl bei einer offenen, als auch bei einer geschlossenen AP2-Konformation das Dileucin Bindungsmotiv von AP2 für potentielle Interaktionspartner erreichbar ist. Theoretisch sollte damit auch Nef mit seinem Dileucinmotiv mit der Konsensussequenz ENTSLI in der C-terminalen flexiblen Schleife in der Lage sein mit der σ 2-Untereinheit zu interagieren und bei gleichzeitiger Bindung von CD4 mit der hydrophoben Tasche die Interaktion zwischen CD4 und AP2 zu vermitteln.

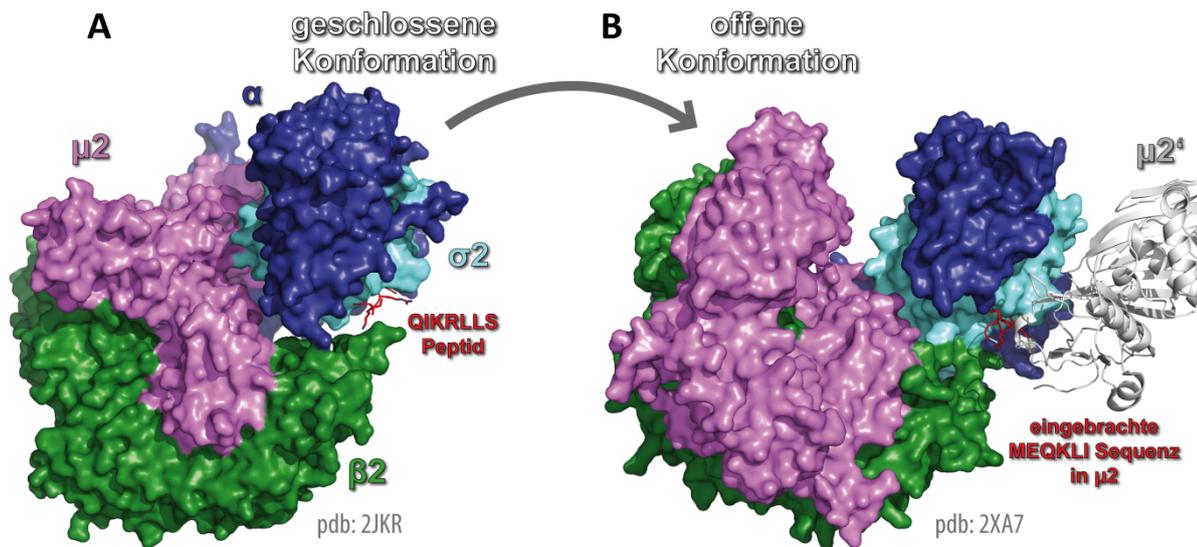


Abbildung 74: Struktureller Vergleich zwischen geschlossenem und offenem AP2, mit gebundenem Dileucinmotiv. (A) In der veröffentlichten geschlossenen Struktur von AP2 (pdb: 2JKR) bindet ein Dileucinmotiv enthaltendes Peptid (rot) an die σ 2-Untereinheit (türkis) von AP2 (Kelly et al., 2008). **(B)** Auch nach der Phosphorylierung der μ 2-Untereinheit (magenta) und der daraus resultierenden offenen AP2 Konformation, bindet in einer weiteren gelösten Struktur (pdb: 2XA7) ein Dileucinmotiv eines kristallografisch symmetrieverwandten μ 1'-Untereinheit an die identische Stelle wie das Peptid mit dem Tyrosinmotiv in der geschlossenen Konformation (Jackson et al., 2010).

Um die Interaktion zwischen Nef, AP2 und CD4 zu überprüfen, wurde wie schon für AP1 zunächst die Expression des heterotetrameren AP2-Komplexes durchgeführt. Dieser wurde mit dem gleichen dualen Vektorsystem wie AP1 exprimiert, wobei die Gene von His- α und σ 2 auf einem sowie His- β 2 und μ 2 auf einem anderen Plasmid kodiert waren. Nach erfolgter Expression und Reinigung wurde mittels SDS-PAGE festgestellt, dass die Untereinheiten nicht so klar differenziert waren wie es für AP1 beobachtet werden konnte. Mit MALDI basierten Peptidmassen Fingerabdrucks konnte gezeigt werden, dass alle vier Untereinheiten im gereinigten Komplex vorhanden sind, wobei sich α und β 2 zusammen in einer Bande befanden, während μ 2 und σ 2 deutlich differenzierter zu erkennen sind. Trotz der Anwesenheit aller Untereinheiten scheint der geformte Komplex instabil zu sein, da in der analytischen Gelfiltration nicht wie bei AP1 ein einzelner, sondern zwei Peaks zu beobachten waren. Werden Fraktionen auf einer SDS-PAGE analysiert, scheinen im ersten Peak alle vier Untereinheiten vorhanden zu sein, während im Zweiten die μ 2-Untereinheit fehlt. Die mittels Marker ermittelten Massen des eluierten Komplexes zeigen, dass die des ersten Peaks von AP2 etwa 158 kDa beträgt, und damit nur etwas kleiner ist als die des einzelnen Peaks von AP1. Der Komplex des zweiten Peaks von AP2 weist im Vergleich zum ersten Peak eine um etwa 50 kDa geringere Masse auf, die der Masse der μ 2-Untereinheit entspricht.

Trotz des instabilen Komplexes wurden Bindungsstudien mit Nef₁₋₂₁₀ und einem CD4-Peptid durchgeführt. Es konnten dabei weder mittels analytischer Gelfiltration noch ITC eine Interaktion zwischen Nef und AP2, oder Nef, AP2 und CD4 gemessen werden. Möglicherweise müsste in folgenden Studien versucht werden, den AP2-Komplex von Grund auf neu zu formen, um ihn stabiler zu erhalten. Andererseits könnte hier, wie schon bei Nef mit AP1 und MHC-I die Plasmamembran als weiterer Cofaktor fungieren, die zum einen strukturelle Veränderungen, zum anderen eine gewisse räumliche Nähe zueinander begünstigt und die Orientierung der Moleküle zueinander beeinflusst.

5.3 Die Suche nach einem kleinen molekularen Inhibitor von Nef

Charakterisierung der Bindung zwischen Nef und ES000219 mittels 2D HSQC-NMR-Spektroskopie

Nach Expression und Reinigung von ^{15}N -isotopen-markiertem Nef₄₅₋₂₁₀ mit ausreichenden Ausbeuten, konnte dieses in HSQC-Experimenten in der NMR eingesetzt werden. Die erhaltenen Peaks im HSQC-Spektrum von Nef_{SF2} konnten in Kooperation mit PD Dr. Sonja Dames von der TU München größtenteils zugeordnet werden, wobei die vollständige Zuordnung weiterhin angestrebt wird, um in den durchgeführten Titrationsmessungen mit den chemischen Substanzen für jede Verschiebung die dazugehörige Aminosäure definieren zu können. In der $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -HSQC Zuordnung fehlen methodenbedingt die Proline, da diese keine H_N -Resonanz aufweisen.

In jeder Titrationsreihe wurden 400 μM vom ^{15}N -markiertem Nef vorgelegt, zunächst ein Grundspektrum mit Nef alleine aufgenommen und anschließend in fünf Schritten die jeweilige Substanz DMSO-gelöst in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:16 zugegeben. Hierbei war oft zu beobachten, dass in der Messung mit einer 16-fachen Substanz-Konzentration die Spektren schlechter wurden. Entweder hängt dies damit zusammen, dass innerhalb der zweieinhalb Tage Nef bei 25°C langsam abgebaut wird oder die eingesetzte Menge an DMSO dann so hoch ist, dass das Protein dadurch ausfällt. Mit einer Kontrollmessung, in der eine so große Menge an DMSO zugegeben wurde die der einer kompletten Titrationsreihe entspricht, wurde ausgeschlossen, dass DMSO grundsätzlich einen negativen Einfluss auf die Stabilität von Nef hat. Denn hierbei wurde keine Änderung der chemischen Verschiebungen im HSQC-Spektrum beobachtet. Bei der Titration von ES000219 hingegen wurden einige Veränderungen der chemischen Verschiebungen erhalten. Hierbei konnten zehn Peaks beobachtet werden, die auf Grund der Bindung der Substanz und der damit einhergehenden veränderten magnetischen Abschirmungen der benachbarten oder beteiligten Reste, starke Veränderungen der Verschiebungen aufwiesen. Diese sind in den Abbildungen 52 markiert. Von ihnen konnten bisher die sechs Reste W61, G99, G100, T121, W117 und T84 von Nef einwandfrei zugeordnet werden. Diese befinden sich auf der Oberfläche, meist in oder nahe der hydrophoben Tasche von Nef (siehe Abbildung 62).

Charakterisierung der Bindungsoberfläche von ES000219 auf Nef

Es wurde beobachtet, dass Tryptophan 61 im Grundspektrum in zwei Konformationen vorliegt, weil die sekundäre Aminogruppe seiner Indol Gruppe als zwei Peaks auftreten. Durch die Zugabe von ES000219 wird eine Konformation von W61 stabilisiert, weil der eine Peak langsam verschwindet, während der Andere stärker und definierter zu erkennen ist. Das gleiche wurde beobachtet, nachdem das Detergenz CHAPS zu ^{15}N -markiertem Nef titriert wurde. Wahrscheinlich bindet hierbei CHAPS in die hydrophobe Tasche von Nef und verdrängt das W61, so dass eine Konformation stabilisiert wird (siehe Abbildung 62). Dasselbe scheint auch durch die Zugabe von ES000219 zu geschehen. Möglicherweise bindet der flexible N-Terminus von Nef mit einer sehr schwachen Affinität intermolekular an seine eigene Kerndomäne, wodurch Nef im Cytosol ohne Bindungspartner in einer Art inaktiven Zustand vorliegt. Dies würde auch begründen, weshalb HIV-1 Nef in der Zelle zum größten Teil zytoplasmisch vorliegt. Es gibt inzwischen viele gelöste Strukturen von Nef, aber gerade kristallografisch ist der N-terminus aufgrund seiner Flexibilität meist nicht gut aufgelöst, so dass dessen Konformation nicht bekannt ist.

Es gibt zwei Strukturen, in denen der N-Terminus teilweise aufgelöst vorlag. In einer bindet die α_3 -Helix von Nef in die eigene hydrophobe Tasche bei Ausbildung von mindestens einer Wasserstoffbrücke zwischen Glu63 und Lys98 (Breuer et al., 2011). Die Entfernung von 3,9 Å zwischen den Seitenketten von Glu68 und Arg109 ist möglicherweise zu groß für eine Wasserstoffbrücke und reicht höchstens für eine schwache elektrostatische Wechselwirkung (Abbildung 75 A). Es ist zu erkennen, dass sich Trp61 (W61) ebenfalls nah an der Oberfläche der Kerndomäne befindet, ohne eine stabile direkte Interaktion mit Seitenketten einzugehen. Möglicherweise ist die Bindung der α_3 -Helix an die hydrophobe Tasche so schwach, dass Trp61 ohne ES000219 oder seiner Derivate in zwei Konformationen vorliegt und nach deren Zugabe genauso wie durch CHAPS aus der Tasche gedrängt wird, wodurch dann eine Konformation stabilisiert vorliegt (siehe Abbildung 61 und 62).

In einer weiteren Struktur von Nef im Komplex mit MHC-I und der $\mu 1$ -Untereinheit von AP1 bindet zwar ebenfalls eine α -Helix wie zuvor an denselben Bereich der eigenen hydrophoben Tasche, doch handelt es sich hierbei um die α_1 -Helix weiter vorne im N-Terminus (Jia et al., 2012). Außerdem bindet diese in einem um etwa 90° gedrehten Winkel und ausschließlich über hydrophobe Wechselwirkungen vieler hydrophober Reste wie M20, W13, L91, L97, L110, oder W117 ohne Ausbildung von direkten Bindungen. Hierbei wird diese hydrophobe Bindungsfläche von den stark hydrophilen Argininen 17, 19, 21, 22 und Lys94 flankiert, die sich der wässriger Lösung hin ausrichten und dieses vom hydrophoben Zentrum abschirmen (Abbildung 75 B).

Während die Bindung der α_3 -Helix möglicherweise im Cytosol im Ligandenungebundenen Zustand vorliegt, scheint die Bindung der α_1 -Helix in der kooperativen Interaktion mit MHC-I und AP-1 wichtig für die Membranbindung zu sein. Denn die Mutation von bestimmten Resten wie M20 zu Alanin hatte in früheren Studien zur Inhibition der Nef-vermittelten MHC-I-Runterregulierung gesorgt (Williams et al., 2005; Wonderlich et al., 2007). Damit könnte eine niedermolekulare chemische Verbindung wie ES000219 durch die Bindung in die hydrophobe Tasche neben der Inhibition Nef-vermittelten CD4-Internalisierung möglicherweise auch die Membranbindung von Nef beeinflussen.

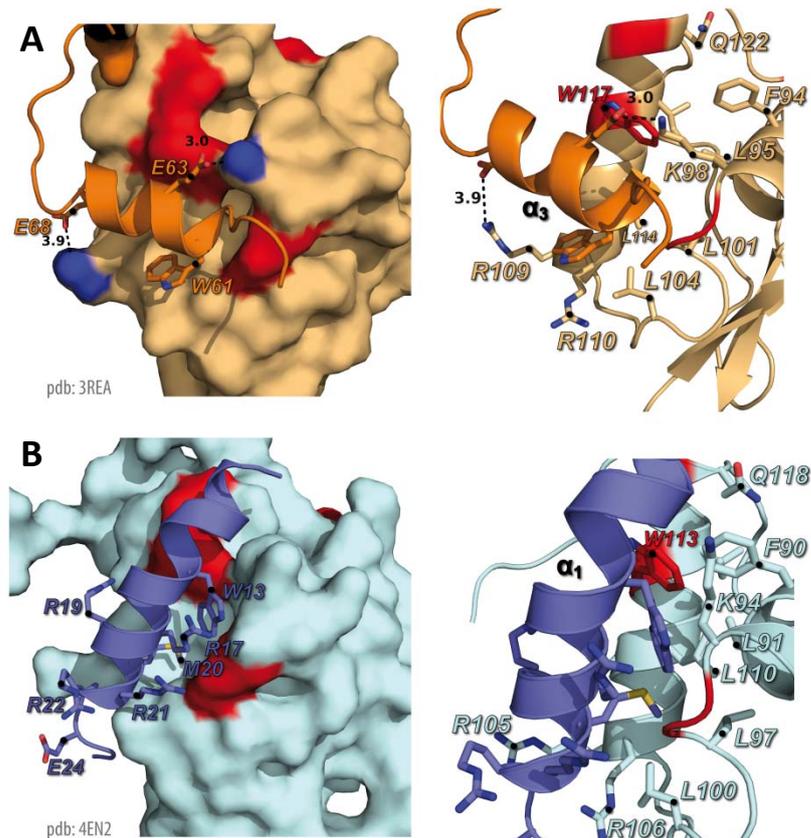


Abbildung 75: Charakterisierung der Bindung des N-Terminus von Nef an die eigene hydrophobe Tasche der Kerndomäne. (A) Darstellung von Nef_{SF2} aus der Komplexstruktur aus Nef_{SF2} (hell orange) und SH3_{A1} (pdb: 3REA) als Oberflächenmodell bzw. als Scheifendiagramm. Von den an der Interaktion zwischen hydrophober Tasche und N-Terminus (orange) beteiligten sowie von weiteren Resten der hydrophoben Tasche sind die Seitenketten zu erkennen. Hierbei interagieren die Carbonyl-Gruppen von E63 und E68 mit Amino-Gruppen von K98 und R109 (Breuer et al., 2011). **(B)** Darstellung von Nef_{NL4-3} aus der Komplexstruktur von Nef_{NL4-3} (türkis) mit MHC-I CD und der μ 1-Untereinheit (pdb: 4EN2) als Oberflächenmodell, bzw. als Scheifendiagramm (Jia et al., 2012). Der N-Terminus (lila) interagiert hier mit den beschriebenen Seitenketten über hydrophobe Wechselwirkungen mit der eigenen hydrophoben Tasche. Die durch ES000219 in den NMR-Experimenten beeinflussten Reste sind rot gefärbt.

Biochemische Charakterisierung der Komplexbildung zwischen Nef und ES000219

Die Reste mit starken Veränderungen der chemischen Verschiebungen in den HSQC-Spektren befinden sich in oder nahe der hydrophoben Tasche. In den Titrationsreihen ist auffällig, dass vor allem in höheren Konzentrationen ES000219 immer weniger wasserlöslich wird, was sich durch einen weißen Niederschlag am Grund des NMR-Röhrchens bemerkbar macht. Dies hat auch Auswirkungen auf die durchgeführten ITC-Messungen. Nachdem zunächst in Experimenten kleineren Mengen von ES000219 (200 μ M) zu Nef (20 μ M) titriert wurde, konnte keine Bindungswärme gemessen werden. Erst bei der Verwendung von 10 mM von ES000219 und 0,1 mM Nef konnte Bindungswärme mit einer Sättigungskurve erhalten werden die auswertbare Messergebnisse lieferte. Es wurden hierbei nur sehr schwache Affinitäten zwischen 0,13 und 0,36 mM erhalten, was mit den beobachteten konzentrationsabhängigen Veränderungen der chemischen Verschiebungen in den HSQC-Spektren der Titrationsreihen übereinstimmt. Auffällig sind die sehr hohen n-Werte der Messungen, die etwas über die Bindungsstöchiometrie der beteiligten Moleküle aussagt. Diese liegen meist zwischen 4 und 5, und damit jenseits einer stöchiometrischen 1:1

Bindung. Diese Messwerte sind möglicherweise durch Ungenauigkeiten des Einsatzes der sehr großen Menge der Substanzen sowie dessen geringen Löslichkeit in der eingesetzten wässrigen Lösung geschuldet. Letzteres wurde versucht zu minimieren, indem auch Puffer mit 5% DMSO eingesetzt wurde, was die maximal zulässige Menge für die Isotherme Titrationskalorimetrie ist. Es ist aber definitiv mittels NMR und ITC zu erkennen, dass ES000219 an Nef bindet, wenn auch mit geringer Affinität.

Aufgrund der Affinität von ES000219 zu Nef im hohen mikromolaren Bereich, wurden innerhalb des iNef-Konsortiums Derivate von ES000219 hergestellt und diese ebenfalls in NMR-Titrationsreihen mit ^{15}N -markierten Nef eingesetzt, um diese auf eine mögliche verbesserte Bindungsaffinität hin zu testen. Problematisch bei dem Vergleich der Veränderungen der chemischen Verschiebungen bei der Titration verschiedener Derivate zu Nef ist, dass diese sich auch stark in ihrer Wasserlöslichkeit unterscheiden. Dadurch fielen einige stärker während der NMR-Messungen aus, wodurch sie daraufhin scheinbar auch schlechter in der Lage waren mit Nef zu interagieren. Würde eines der Substanzen eine weit bessere Affinität zu Nef besitzen, wäre es prinzipiell möglich, dass Nef dieses durch die Interaktion in Lösung bringt, doch konnte für keine Substanz signifikant stärkere Veränderungen der chemischen Verschiebungen als durch ES000219 beobachtet werden. Einige wie ES000671, ES000672, ES000670 und vor allem ES000673 und ES000594 zeigten schlechtere Bindungen in den Titrationsreihen, was einen Hinweis auf die Beteiligung der veränderten Reste in der Interaktion mit Nef sein könnte. Doch fielen diese Substanzen vergleichsweise stark aus. Um zu untersuchen, ob es sich beim ausgefallenen Sediment um Nef oder um die eingesetzte Substanz handelt, wurde für jede Titrationsreihe ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem eingesetzten Puffer versetzt und die identische Menge der jeweiligen Substanz ohne Nef zugegeben. Die Fotos dieses Reaktionsgefäß zeigen in den dazugehörigen Abbildungen der jeweiligen Messung, dass es sich in dem Sediment um die Substanz handelt. Damit hängen die geringeren beobachteten Veränderungen der chemischen Verschiebungen eher mit der verminderten Löslichkeit der Derivate zusammen, so dass sie mit Nef nicht mehr so gut interagieren. Hierbei setzte vor allem das Ersetzen der Sulfon Gruppe gegen eine Carbonylgruppe in ES000670 die Löslichkeit so weit herunter (Abbildung 81 im Anhang), dass in allen anderen Derivaten diese Sulfon Gruppe nicht verändert wurde. In anderen Fällen ist die Korrelation zwischen bestimmten Veränderungen und der Löslichkeit schwieriger, wie beispielsweise der Unterschied zwischen ES000594 und ES000377, die sich nur in der Nitrogruppe unterscheiden und hier zur Unlöslichkeit führt, während diese bei ES000219 kein Problem darstellt.

Durch den Vergleich der HSQC-Spektren zwischen den gut löslichen Substanzen ES000219, ES000668 und ES000669 scheint das Fehlen der Nitrogruppe oder dessen Mutation zu einem Chloratom keinen Einfluss auf die Bindung zu haben, so dass eine direkte Beteiligung nicht gegeben zu sein scheint. Auf der anderen Seite bindet ES000377 auch weiterhin an Nef nach der Entfernung des endständigen Pyrrolidinrings, auch wenn die Affinität aufgrund der etwas langsameren und geringeren Veränderungen der chemischen Verschiebungen vielleicht nicht so hoch ist (Abbildung 56). Diese ist wiederum wieder besser nach der Öffnung des Pyrrolidinrings bei ES000674 und ES000675 (Abbildungen 85 im Anhang und 57) sowie nach der Substitution mehrerer Kohlenstoffketten bei ES000794 sichtbar (Abbildung 59).

Die Substanzen ES000669, ES000675 und ES000794 wurden in ITC-Experimenten eingesetzt und wiesen zwischen 0,28 und 0,35 mM ähnlich hohe Affinitäten wie ES000219 zu Nef auf. Es konnten im Zuge dieser Arbeit kein Derivat von ES000219 gefunden werden,

die eine ausreichend hohe Affinität zu Nef besitzen, um weitere biochemische Experimente durchzuführen und die Komplexstruktur zwischen Nef und Substanz kristallografisch lösen zu können. Nur in einem Fall konnten mittels Co-Kristallisation Substanz-abhängige und reproduzierbare Kristalle von Nef_{45-210,Δ158-178} und 2-facher und 4-facher ES000219 Konzentration hergestellt werden, doch wurde kein geeignetes Röntgenbeugungsmuster zur Strukturaufklärung erhalten.

Strukturelle Charakterisierung des Komplexes aus Nef und ES000219

Als Alternative zur Co-Kristallisation der Komplexstruktur wurde Nef_{45-210,Δ158-178} alleine kristallisiert, um ein Kristall zu erhalten in dem die hydrophobe Tasche von Nef offen vorliegen soll. Anschließend könnten dann niedermolekulare chemische Verbindungen nachträglich eingebracht werden, um die Komplexstruktur zu lösen. Die Kristallisation führte zu sehr stabilen und großen Einkristallen, doch beinhaltet dessen Einheitszelle vier Nef-Moleküle in der jedes mit seinem N-Terminus die hydrophoben Taschen benachbarter Nef-Moleküle durchläuft und diese damit blockiert (siehe Abbildung 63). Dadurch wurde ein sehr stabiler tetramerer Komplex erhalten, in dem sich die α_4 - sowie die α_5 -Helices gegenüberstehen, doch lösten sich diese nach der Zugabe von ES000219 auf. Diese zeigt, dass die Substanz scheinbar mit Nef interagiert, und dadurch möglicherweise diesen stabilen Komplex und folglich auch den Kristall auflöst.

Durch die Zuordnung der in den HSQC-Spektren veränderten chemischen Verschiebungen der Aminosäurenreste auf der Oberfläche von Nef konnte bereits die hydrophobe Tasche von Nef als mögliche Bindungsstelle von ES000219 diskutiert werden. Um einen detaillierteren Eindruck zu bekommen, wo sich auf Nef mögliche Bindungstaschen für die getesteten niedermolekularen chemischen Verbindungen befinden, wurden alternativ zur Kristallisation in Zusammenarbeit mit Santiago Manrique Zuñiga (Universität Oxford) computerbasierte Docking Experimente mit ES000219 und verschiedenen Derivaten mit den Programmen AutoDockTools-1.5.4 und AutoDock Vina 1.1.2 durchgeführt. In Abbildung 76 ist das Ergebnis des Docking-Experiments mit ES000675 dargestellt. Vier Taschen wurden auf der Oberfläche der Kerndomäne von HIV-1 Nef identifiziert, in die exemplarisch ES000675 binden könnte. Eine ist die RT-Schleifen Bindetasche (Abbildung 76 A [1]), die Sortierungsmotiv Bindetasche (Abbildung 76 A [2]), sowie zwei Bindetaschen auf der Rückseite von Nef (Abbildung 76 B: [3 und 4]). Aufgrund verschiedenster möglicher Konformationen der Substanzen gibt es auch viele Möglichkeiten wie es in die Taschen binden könnte. Exemplarisch ist in Abbildung 76 für jede Tasche eine Möglichkeit gezeigt. Ausgehend von den Veränderungen der chemischen Verschiebungen einiger Reste von Nef, die in der Abbildung rot gefärbt sind, ist die Bindung der Substanzen in der hydrophoben Tasche am wahrscheinlichsten. Hierbei könnte die Bindung prinzipiell in der Sortierungsmotiv Bindetasche, aber auch in der RT-Schleifen Bindetasche stattfinden. Eine exaktere Aussage über die Bindestelle und der Art der Bindung konnte im Zuge dieser Arbeit nicht gemacht werden. Jedoch ist die Verdrängung von Trp61 neben den identifizierten Resten innerhalb der hydrophoben Tasche ein weiteres Indiz für die Bindetasche 2 als Bindefläche für ES000219.

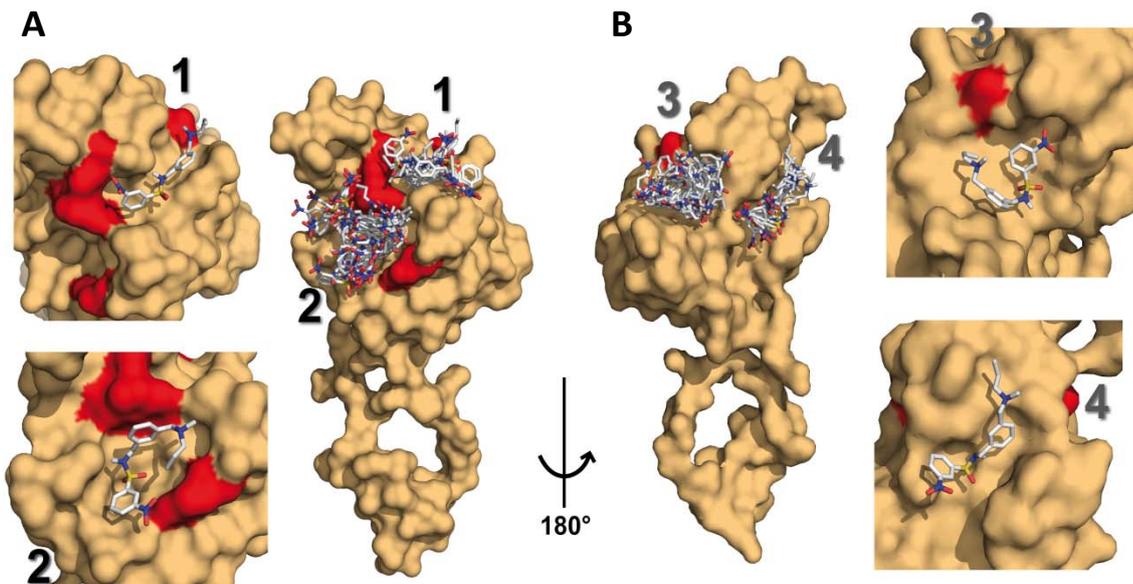


Abbildung 76: Ergebnis des Docking-Experiments mit der Kerndomäne von Nef und ES000675. Es wurden mittels AutoDockTools-1.5.4 und AutoDock Vina 1.1.2 in vier Bereichen von Nef (orange) auf dessen Oberfläche Taschen gefunden, in die ES000675 binden kann. **(A)** Das Ergebnis des Docking-Experiments mit Blick auf die RT-Schleifen Bindetasche (1), sowie auf die Sortierungsmotiv Bindetasche (2). **(B)** Durch eine Drehung des Moleküls um 180° sind auf der Rückseite zwei weitere Taschen auf der Oberfläche von Nef erkennbar (3 und 4). Die in den NMR-Experimenten als Interaktionsflächen identifizierten Reste sind rot gefärbt.

5.4 Biochemische und strukturelle Charakterisierung des HIV-1 Nef Proteins des Subtyps P

Im Jahre 2009 wurde ein neues HI-Virus des Subtyps P in einer Patienten aus Kamerun entdeckt, das von einem Gorilla auf den Menschen übertragen wurde (Plantier et al., 2009). Später bei einer anderen Person aus Kamerun wurde dieser erneut gefunden (Vallari et al., 2011). In beiden Fällen gab es keine Anzeichen von AIDS-Symptomen, so dass sich das Virus möglicherweise an seinen Wirt angepasst hat. Damit stand auch ein weiteres Nef Allel zur Verfügung, von dem es bisher keine strukturellen und biochemischen Daten gab. Basierend auf die Erfahrung, dass die SH3_{B6}-Domäne und sdAb19 kristallisationsfördernd auf Nef einwirkt, wurde die Kristallisation des trimeren Komplex mit gorNef angestrebt.

Da gorNef nicht mit sdAb19 interagiert, mussten zunächst die Aminosäuresequenzen des C-Terminus von gorNef so verändert werden, dass sdAb19 binden kann. Durch sechs Mutationen von Resten im C-terminus von gorNef zu den komplementären Resten von Nef_{SF2}, wurde zunächst die Mutante gorNef-6er erhalten. Hierbei fällt auf, dass gorNef auch die in Abschnitt 4.1.4.2 als sdAb19-bindungsdefizient charakterisierte Mutation L202K enthält, die daraufhin im gorNef-6er korrigiert wurde. Die Mutante gorNef-6er interagiert zwar bereits mit sdAb19, doch wird bei einer Affinität von 3,2 mM bei den eingesetzten Mengen noch kein stabiler 1:1-Komplex ausgebildet. Auch die Affinität zu Neffin beträgt nur 16,3 nM im Vergleich zu 1 bis 4 nM bei Nef_{SF2}. Erst nach dem Einfügen von drei weiteren Mutationen (gorNef-9er), die auch die Korrigierung der in Abschnitt 4.1.4.2 vorgestellten Mutation M198K beinhaltet (K197M), führt zu einer Affinität von 270 nM zu sdAb19 und von 6,6 nM zu Neffin.

Mit der gorNef-9er Mutante wurde der Komplex aus sdAb19, SH3_{B6} und gorNef-9er_{44-209,Δ156-177} ohne C-terminale flexible Schleife Kristalle erhalten und die Struktur

gelöst. Mit Blick auf die Bindung der SH3_{B6}-Domäne durch gorNef liegt diese im Ganzen etwas näher am Nef-Molekül und ist dabei leicht nach hinten verschoben, was möglicherweise die etwas geringere Affinität zu SH3_{B6} im Vergleich mit HIV-1 Nef zu SH3_{B6} ausmacht. In der Gesamtansicht ist in der Überlagerung der Komplexe Nef_{SF2}-sdAb19 und gorNef·9er-sdAb19 zu erkennen, dass das gorNef im Vergleich zu Nef_{SF2} vom sdAb19 leicht weggedreht ist und die Interaktionsfläche eine abweichende Konformation besitzt. Dies zeigt, wie spezifisch variable Domänen von Antikörpern mit Proteinen interagieren. Von den neun in gorNef mutierten Resten gehört keiner den bekannten Domänen von Nef an, die wichtig für Interaktionen mit anderen Proteinen sind. Es wurde angelehnt an der Abbildung 6 der Einleitung eine strukturelle Überlagerung der Struktur von Nef und der gelösten Struktur von gorNef durchgeführt. Aufgrund des Konstrukts fehlt hierbei die C-terminale flexible Schleife mit dem Dileucinmotiv, so dass über die Interaktion mit AP2 keine Aussage getroffen werden kann. Außerdem fehlt der N-Terminus bis zur Aminosäure 70, weil die AS 1-44 deletiert waren, und die folgenden 25 Reste aufgrund der Flexibilität nicht gut genug aufgelöst sind. Es ist trotzdem deutlich zu erkennen, dass die Konformation nur in einem sehr geringen Maße von der des Nef_{SF2} Proteins abweicht, wodurch auch bei der Überlagerung beider Strukturen ein geringer RMSD-Wert von 0,508 zustande kommt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass gorNef mit der SH3_{B6}-Domäne und damit höchstwahrscheinlich auch mit der Hck-Tyrosinkinase interagieren kann. Konservierte Bereiche wie das VGF₇₁-Motiv oder das FPD₁₂₅-Motiv sind ebenso im gorNef vorhanden, wobei letzteres auch hier an Dimerisierungsprozessen und an der Bindung an die Thioesterase beteiligt sein könnte (Abbildung 77). Sehr konserviert ist in seiner Konformation auch die Brücke zwischen W116 und F93, die die hydrophobe Tasche in eine proximale RT-Schleifen-Erkennungsdomäne und in eine distale Sortierungsmotiv-Erkennungsdomäne unterteilt. Prinzipiell wäre damit auch die Bindung des CD4-Rezeptors an die hydrophobe Tasche möglich, für dessen Beweis aber weitere Studien mit gorNef nötig sind. Genauso kann auch die koordinative Bindung zwischen gorNef, MHC-I und der μ 1-Untereinheit von AP1 anhand der Struktur weder belegt noch bewiesen werden. Einen deutlichen Unterschied gibt es im Fall des F195 von HIV-1 Nef_{SF2}. Dieses ist in 1643 verschiedenen Nef Allelen so stark konserviert, dass es in 97% der Fälle ein Phenylalanin ist. Im SIV_{mac239} Nef ist das Phenylalanin zu einem Tyrosin mutiert und kann trotzdem wie HIV-1 Nef_{SF2} mit Pak2 interagieren, wie etwa 1,3% aller Nef Allele. Doch die Mutation zu einem Glutamat im gorNef kommt in keinem HIV-1 Nef Allel vor und könnte die Interaktion mit Pak2 unmöglich machen. Zudem sollen auch die Arginine 109 und 110 im HIV-1 Nef eine Rolle in der Pak2 Interaktion spielen. Im gorNef ist das vordere Arginin aber zu einem Glycin mutiert (G108), wodurch es möglicherweise ebenfalls nicht in der Lage ist, mit Pak2 zu interagieren. Dadurch könnte sich auch der NAKC-Komplex nicht bilden, wodurch Nef und TACE nicht vesikulär sekretiert werden und damit möglicherweise benachbarte T-Zellen nicht aktiviert werden würden, wodurch eine effiziente HI-Virus-Vermehrung eingeschränkt wäre. Außerdem stehen Nef und NAKC im Zusammenhang nachgeschaltete Signalwege zu aktivieren und damit die Virusinfektiosität und die Transkriptionsrate zu steigern (Wolf et al., 2008). Möglicherweise könnte die fehlende Pak2-Interaktion ein Grund sein, warum gorNef keine pathogene Wirkung mehr entfaltet.

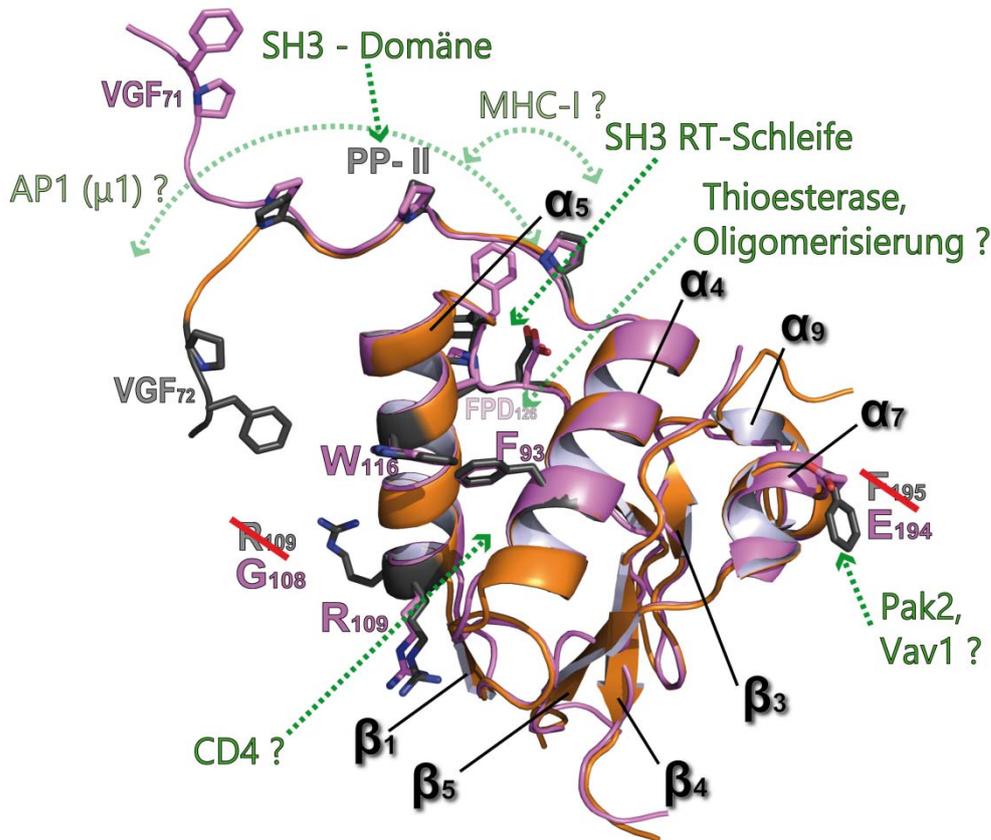


Abbildung 77: Strukturelle Überlagerung von Nef_{SF2} und gorNef. Als Model des Nef_{SF2} wurden die Reste 57-72 der Struktur 3REA (Breuer et al., 2011) und die Reste 72-208 der Struktur 3RBB (Horenkamp et al., 2011) verwendet (orange) und dabei nur die in gorNef aufgelösten Bereiche dargestellt. Genauso ist außerdem die überlagerte gorNef Struktur (rosa) als Schleifendiagramm zu erkennen. Die Sekundärstrukturelemente sind schwarz sowie die mit Nef interagierenden Proteine grün und dessen postulierten Motive grau angefärbt. Die in gorNef im Vergleich zu Nef_{SF2} veränderten Reste G108 und E194 sind beschriftet.

5.5 Oligomerisierungen von Nef-Molekülen

Schon in früheren Strukturen von Nef_{NL4-3} und Nef_{LAI} wurden innerhalb der Kristallgitter Dimere und Trimere von Nef erhalten, wobei an der Bildung immer dieselben hydrophoben Reste der α5-Helix beteiligt waren (Nef_{NL4-3}: I109, D108, L112, Y115 und F121) (Arold et al., 1997; Arold et al., 2000; Poe and Smithgall, 2009). Es handelt sich dabei um sehr stark konservierte Reste, wodurch diese für Nef funktionell wichtig zu sein scheinen. In einer Studie wurde 1997 zum einen die Struktur von Nef_{LAI} ohne Liganden sowie mit der SH3-Domäne von Fyn veröffentlicht. Im ersten Fall bildet Nef Dimere mit Beteiligung der α5-Helices aus mit einer Interaktionsfläche von 900 Å² (pdb: 1AVZ). Im Komplex mit Fyn bilden sich hingegen Trimere mit einer Bindungsfläche von 1680 Å² aus (pdb: 1AAV), in dem ebenfalls die gleichen hydrophoben Reste der α5-Helices beteiligt sind (Abbildung 78) (Arold et al., 1997). Ein Jahr zuvor wurde ebenfalls eine Struktur publiziert, in der zwei symmetrieverwandte Nef_{NL4-3}-Moleküle, die jeweils eine Fyn SH3-Domäne gebunden hatten, auf identischer Weise ein Dimer bildeten wie in Arold et al. 1997 gezeigt (pdb: 1EFN) (Abbildung 78) (Lee et al., 1996).

Die in dieser Arbeit gelöste Struktur aus gorNef-9er_{44-209,Δ156-177}, sdAb19 und SH3_{B6} wurde innerhalb der AU ein Trimer aus drei gorNef-Molekülen gefunden. Dieser wird ähnlich

wie beim Trimer in Arold et al. (1997) durch hydrophobe Interaktionen zwischen dem E110, I111, L114 und Y117 gebildet (Abbildung 78 B, rechts) (pdb: 1AAV). Die gorNef-Moleküle sind aber im Vergleich stärker und enger ineinander verdreht, was möglicherweise durch die Bindung der PEG-Moleküle innerhalb der Bindungsflächen zustande kommt. Auch im Vergleich zwischen dem gorNef Trimer und den dimeren Nef-Komplexen sind die gleichen hydrophoben Reste beteiligt, wobei im gorNef aber der Rest D108_{LAI} zu einem Glutamat (E110) mutiert ist und F123 für die Interaktion keine Rolle spielt. Die veröffentlichten Nef Dimere und Trimere wurden dabei stets als mögliche physiologische Oligomere mit funktionsentscheidenden Bedeutungen für Nef diskutiert. Nach der Mutation mehrerer dieser hydrophoben Reste konnte in *in vivo*-Experimenten der Verlust mehrerer Nef-Funktionen beobachtet werden. Durch einzelne und gemeinsame Mutation von I109D/L112D/Y115D/F121D wurde mittels Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (BiFC) eine fehlende Nef-Dimerisierung gezeigt, die mit dem Verlust der Nef-vermittelten CD4-Runterregulierung, sowie einer gehemmten HIV Replikation einhergeht (Poe and Smithgall, 2009). Außerdem soll die Oligomerisierung von Nef *in vivo* die Aktivierung der gebundenen Hck-Kinasen erhöhen, indem dadurch die Autophosphorylierung verstärkt wird (Ye et al., 2004). Letzteres ist aus strukturebiologischer Sicht eher fraglich, da die Bindung der SH3-Domäne von Hck an Nef ausreichen müsste, um diese von der autoinhibierenden SH2-Domäne zu verdrängen und die Phosphorylierung von Tyr416 und damit die Aktivierung der Kinase zu ermöglichen. Im Laufe dieser Arbeit konnte außerdem in keinen Gelfiltrationen, weder bei verschiedenen Nef Allelen noch bei unterschiedlichen Nef-Konstrukten, Oligomerisierungen beobachtet werden, so dass diese *in vitro* nicht bestätigt werden können.

Aus den gegebenen strukturellen Daten, die ausschließlich mittels der Proteinkristallographie erhalten wurden, fällt die Aussage über eine physiologisch relevante Oligomerisierung auch schwer, da aufgrund der Methode innerhalb des Kristallgitters auch artifizielle Proteinkontakte zustande kommen. Dies ist auch der Grund für die Mutationsstudien auf Nef und sdAb19 in Abschnitt 4.1.4, in denen ausgeschlossen wurde dass es sich bei der untersuchten Bindungsfläche um Kristallkontakte anstatt um die physiologisch relevante Bindungsfläche handelt. Zum Thema der physiologischen Oligomerisierung von Nef müssen daher weitere Forschungen betrieben werden.

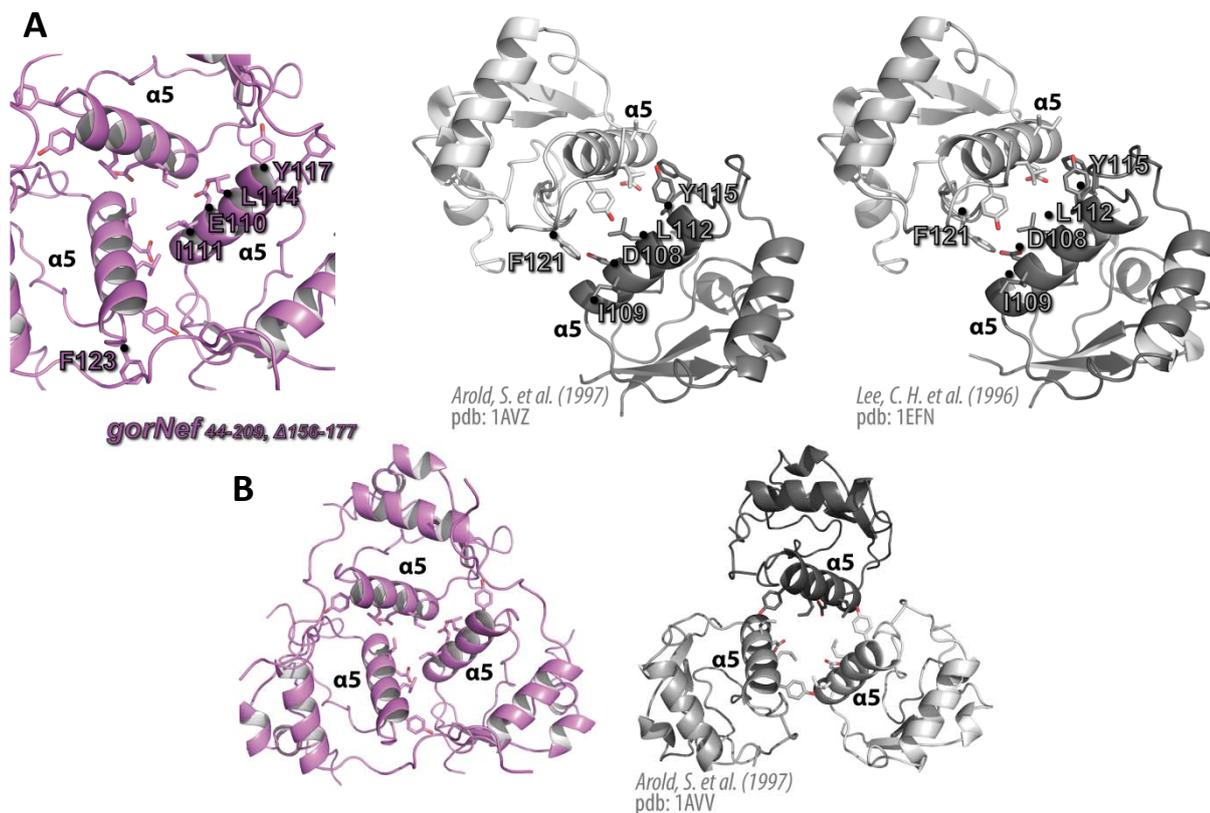


Abbildung 78. Untersuchung des kristallografischen gorNef Trimers. Innerhalb der AU des Kristalls mit dem gorNef-9er_{44-209,Δ156-177}-sdAb19-SH3_{B6}-Komplex befinden sich zwei trimere gorNef-Komplexe, von dem einer hier dargestellt ist. **(A)** Die an der Oligomerisierung beteiligten Reste von gorNef entsprechen denen, die an der Dimerisierung von Nef in Arold et al. (1997) und Lee et al. (1996) beteiligt sind, von denen letzteres zudem als Modell für eine Dimerisierungsfläche von Nef verwendet wurde (Poe and Smithgall, 2009). **(B)** Außerdem ähnelt der trimere Komplex aus gorNef-Molekülen einem trimeren Komplex eines P23 Kristalls mit ausschließlich Nef_{LAI}-Molekülen aus Arold et al. (2000), der als natürliches Oligomer diskutiert wird (Arold et al., 1997; Arold et al., 2000). Die Abstände der interagierenden Reste sind in Ångstrom angegeben.

6 Anhang

Tabelle 9: Kristallparameter, sowie die Statistiken der Datenaufnahme und der Modellverfeinerung der Struktur von Nef₄₅₋₂₁₀-sdAb19-SH3_{B6}.

Datenaufnahme und Kristall	
Röntgenquelle	SLS X10SA
Wellenlänge (Å)	0.978880
Raumgruppe	P6 ₅ 22 (179)
Einheitszelle a, b, c, (Å) α , β , γ (°)	a=72,050, b=72,050, c=354,300; $\alpha=\beta=90$, $\gamma=120^\circ$
Auflösung (Å)	58,85-3,2
Aufgenommene Bilder	1-1440
Anzahl der Reflexe	349546
Anzahl der einzigartigen Reflexe	16920
Vollständigkeit (%)	99,93
Multiplizität	20,7
Rsym (%)	8,0
I/ σ (I)	5,75
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da)	3,4
Lösungsmittelgehalt (%)	63,88
Verfeinerung	
Atome (Protein, Lösungsmittel)	2338
R-Faktor (%)	23,2
Rfree (%)	29,4
Rmsd vom Idealwert	
rms der Bindung	0,011
rms der Winkel	1.45
Durchschnittlicher B-Wert	5,15
Ramachandran Plot	
Favorisiert (%)	83.6%
Erlaubt (%)	11,8%
Verboten (%)	4.6%
Fehlende Aminosäuren	33

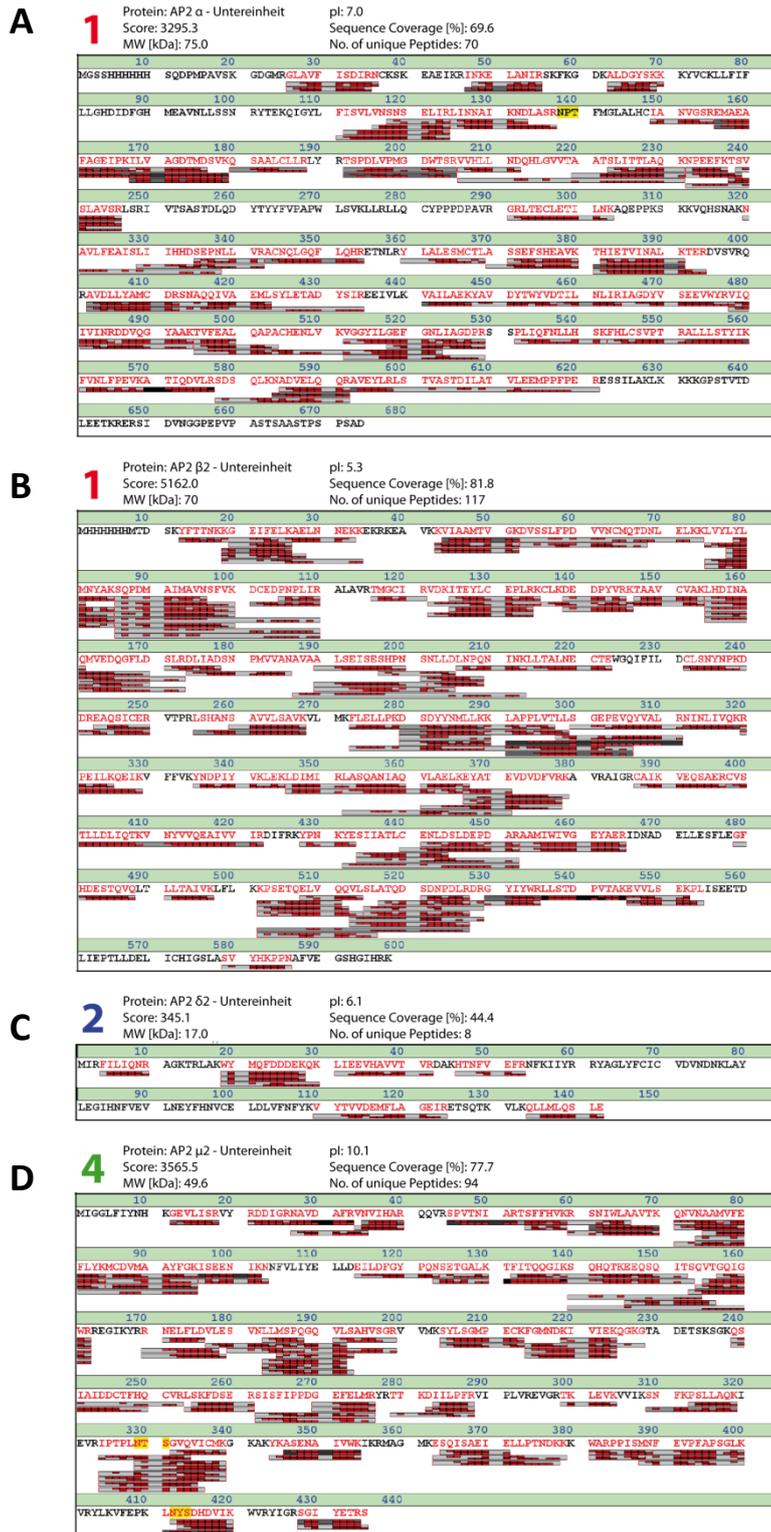


Abbildung 79: Peptidmassen-Fingerabdruck mit Proben von AP2. Darstellung der Sequenzvergleiche zwischen den durch Massenspektrometrie- und *in silico*-Analysen ermittelten Peptidsequenzen und den Aminosäuresequenzen der Untereinheiten von AP2. **(A)** In der Bande Nr.1 (Abbildung 43 B) konnten 70 einzigartige Peptide gefunden werden, die 69,6% der Aminosäuresequenz der α -Untereinheit abdecken. **(B)** In derselben Bande wurden zudem auch 117 Peptide mit einer Sequenzabdeckung von 81,1% gefunden, die den Massen des theoretischen Verdau der β 2-Untereinheit entsprechen. **(C)** In der Bande Nr.2 (Abbildung 43 C) wurden 8 Peptide mit einer Sequenzabdeckung von 44,4% gefunden, die der σ 2-Untereinheit entsprechen. **(D)** In der Bande Nr.4 (Abbildung 43 D) konnte letztendlich mit 94 Peptiden und einer Abdeckung von 77,7% auch die μ 2-Untereinheit gefunden werden.

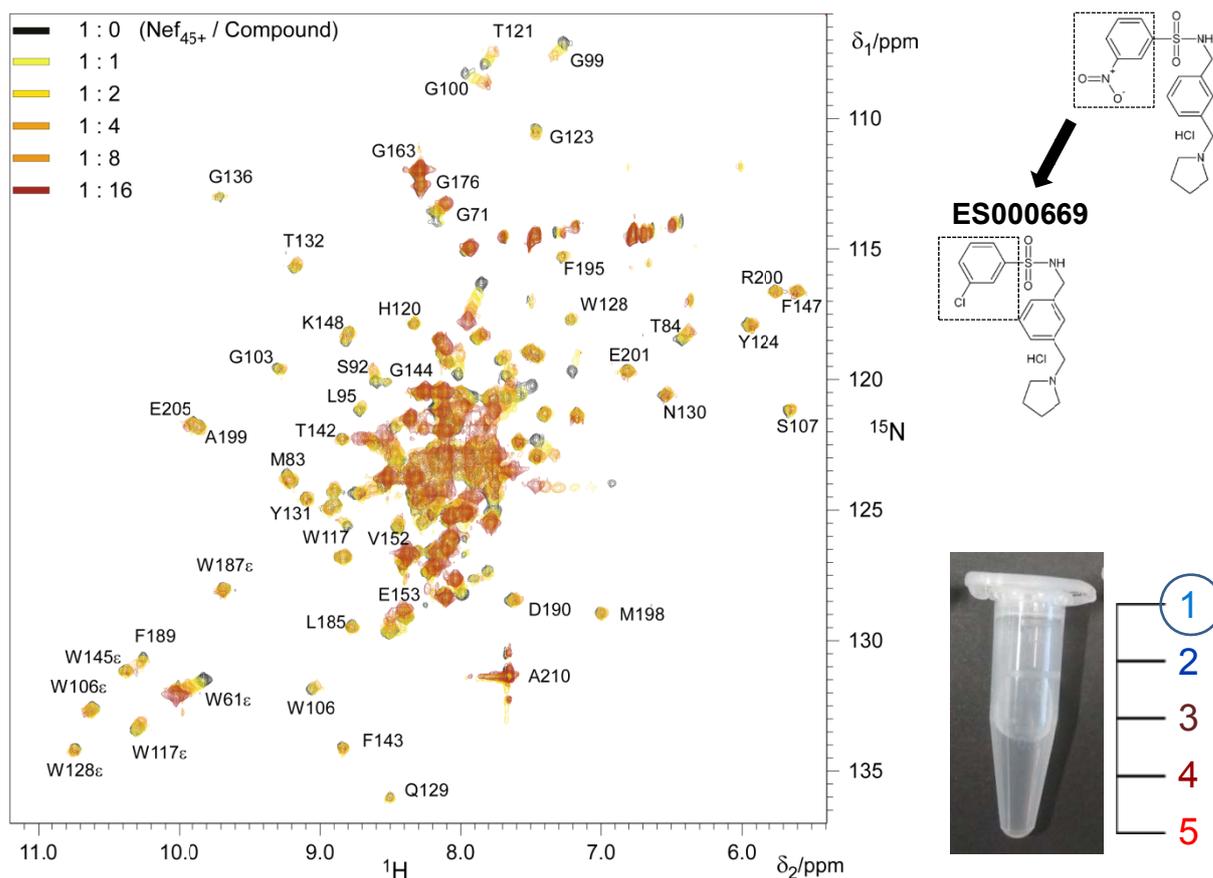


Abbildung 80: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000669 (1:0-1:16). Die Parameter entsprechen denen von Abbildung 52, so dass die Substanz und das Protein identisch eingesetzt wurden. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Die Titration von ES000669 erfolgte wie in den Schritten 1:1-1:16 im molaren Verhältnis zu Nef, farblich gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Auf der x-Achse ist die ^1H -chemische Verschiebung und auf der y-Achse die ^{15}N -chemische Verschiebung aufgetragen. Die Veränderungen von ES000669 gegenüber ES000219 sowie ein Foto des Löslichkeitstest sind beigefügt.

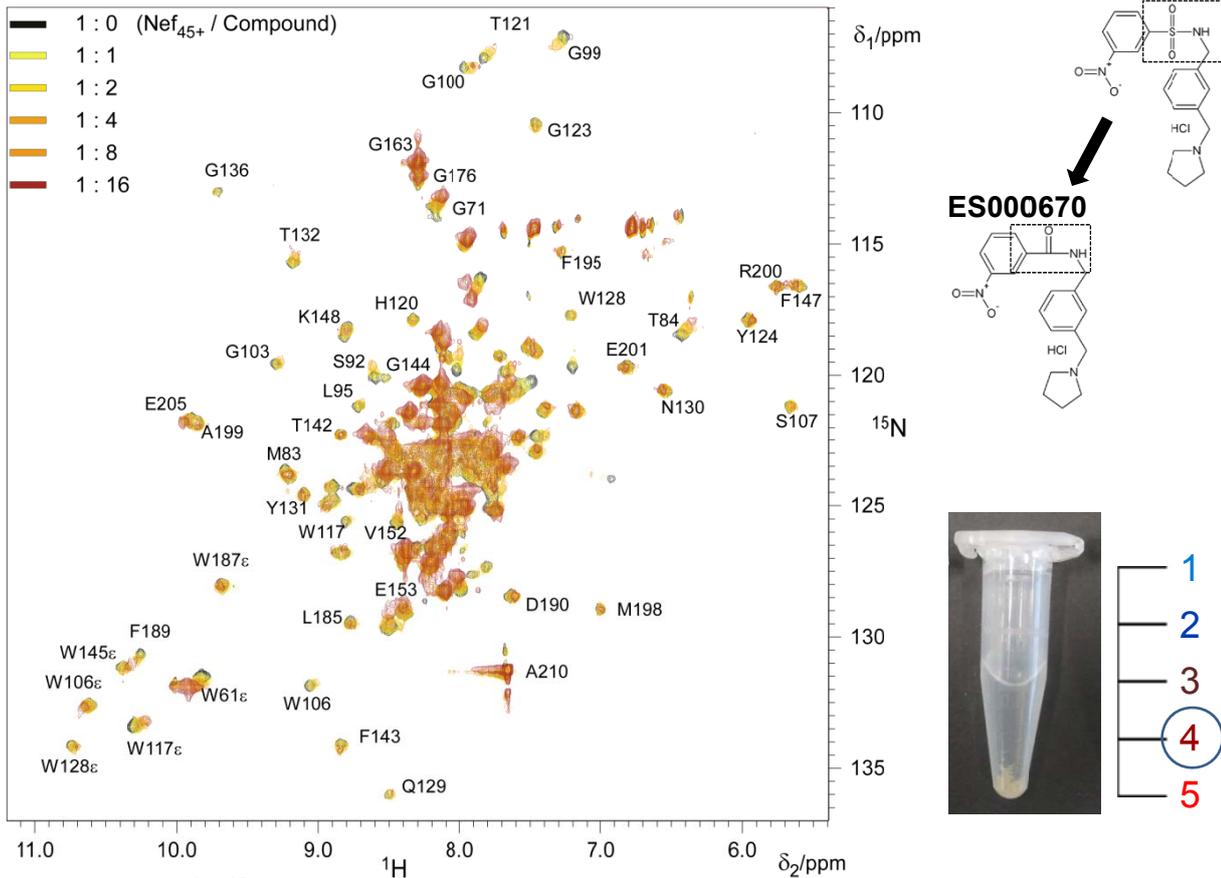


Abbildung 81: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000670 (1:0-1:16). Die Parameter entsprechen denen von Abbildung 52, so dass die Substanz und das Protein identisch eingesetzt wurden. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Die Titration von ES000670 erfolgte wie in den Schritten 1:1-1:16 im molaren Verhältnis zu Nef, farblich gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Auf der x-Achse ist die ^1H -chemische Verschiebung und auf der y-Achse die ^{15}N -chemische Verschiebung aufgetragen. Die Veränderungen von ES000670 gegenüber ES000219 sowie ein Foto des Löslichkeitstest sind beigegefügt.

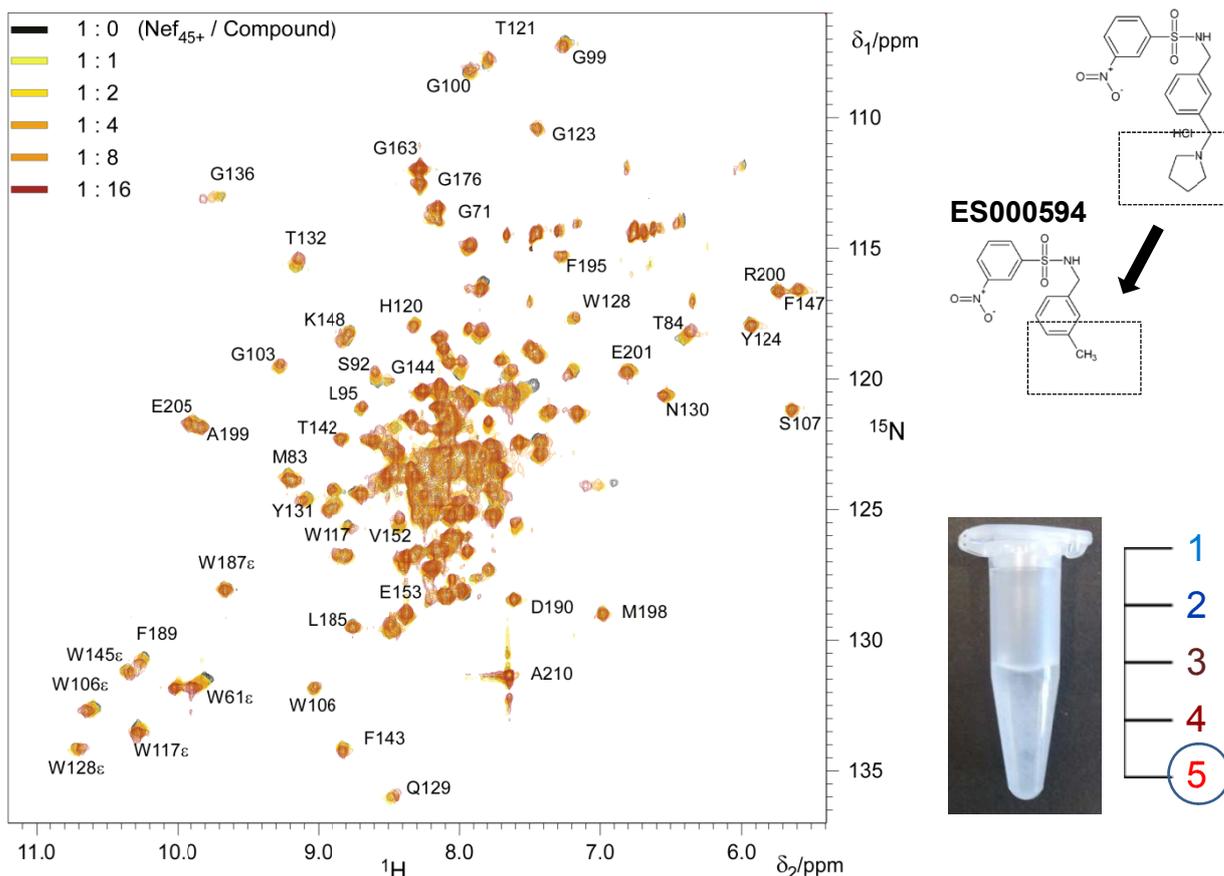


Abbildung 82: ¹H/¹⁵N HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000594 (1:0-1:16). Die Parameter entsprechen denen von Abbildung 52, so dass die Substanz und das Protein identisch eingesetzt wurden. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Die Titration von ES000594 erfolgte wie in den Schritten 1:1-1:16 im molaren Verhältnis zu Nef, farblich gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Auf der x-Achse ist die ¹H-chemische Verschiebung und auf der y-Achse die ¹⁵N-chemische Verschiebung aufgetragen. Die Veränderungen von ES000594 gegenüber ES000219 sowie ein Foto des Löslichkeitstest sind beigefügt.

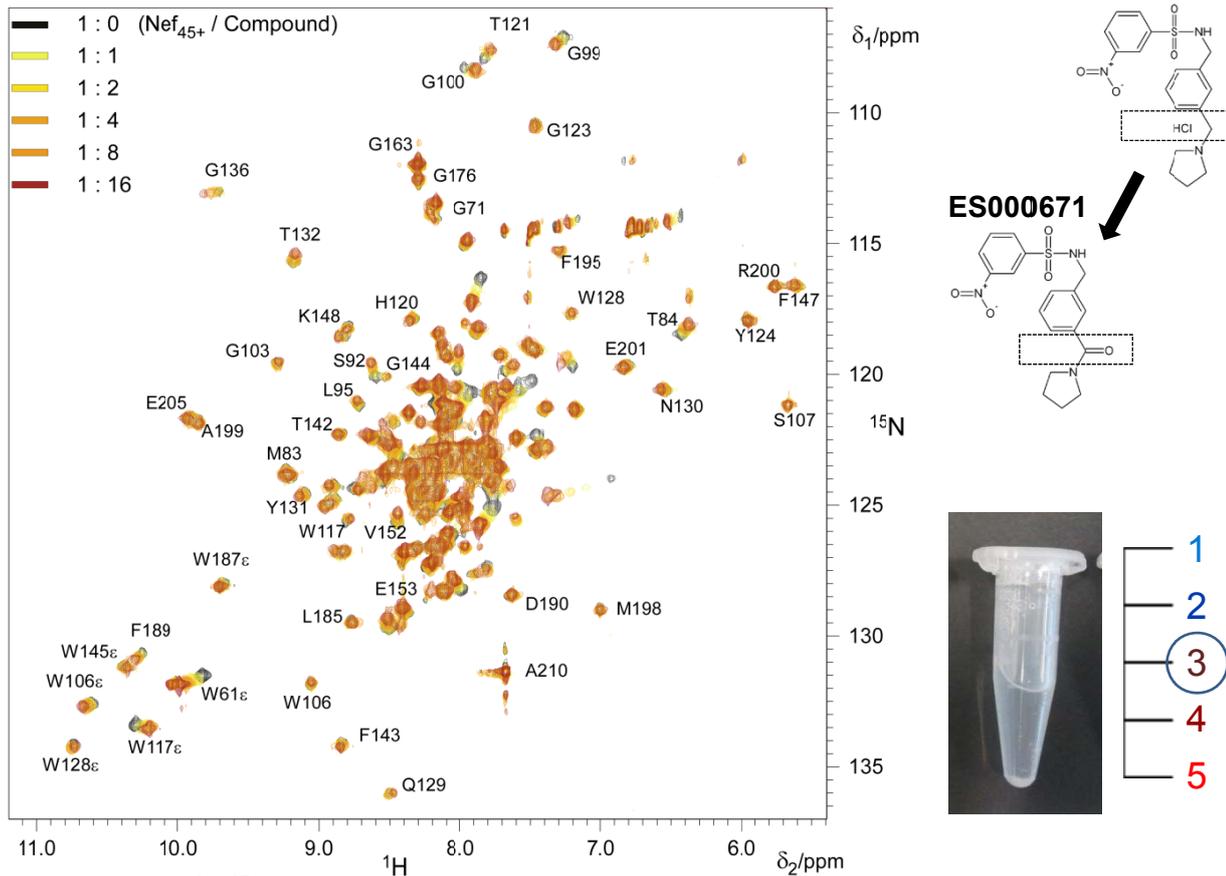


Abbildung 83: ¹H/¹⁵N HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000671 (1:0-1:16). Die Parameter entsprechen denen von Abbildung 52, so dass die Substanz und das Protein identisch eingesetzt wurden. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Die Titration von ES000671 erfolgte wie in den Schritten 1:1-1:16 im molaren Verhältnis zu Nef, farblich gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Auf der x-Achse ist die ¹H-chemische Verschiebung und auf der y-Achse die ¹⁵N-chemische Verschiebung aufgetragen. Die Veränderungen von ES000671 gegenüber ES000219 sowie ein Foto des Löslichkeitstest sind beigefügt.

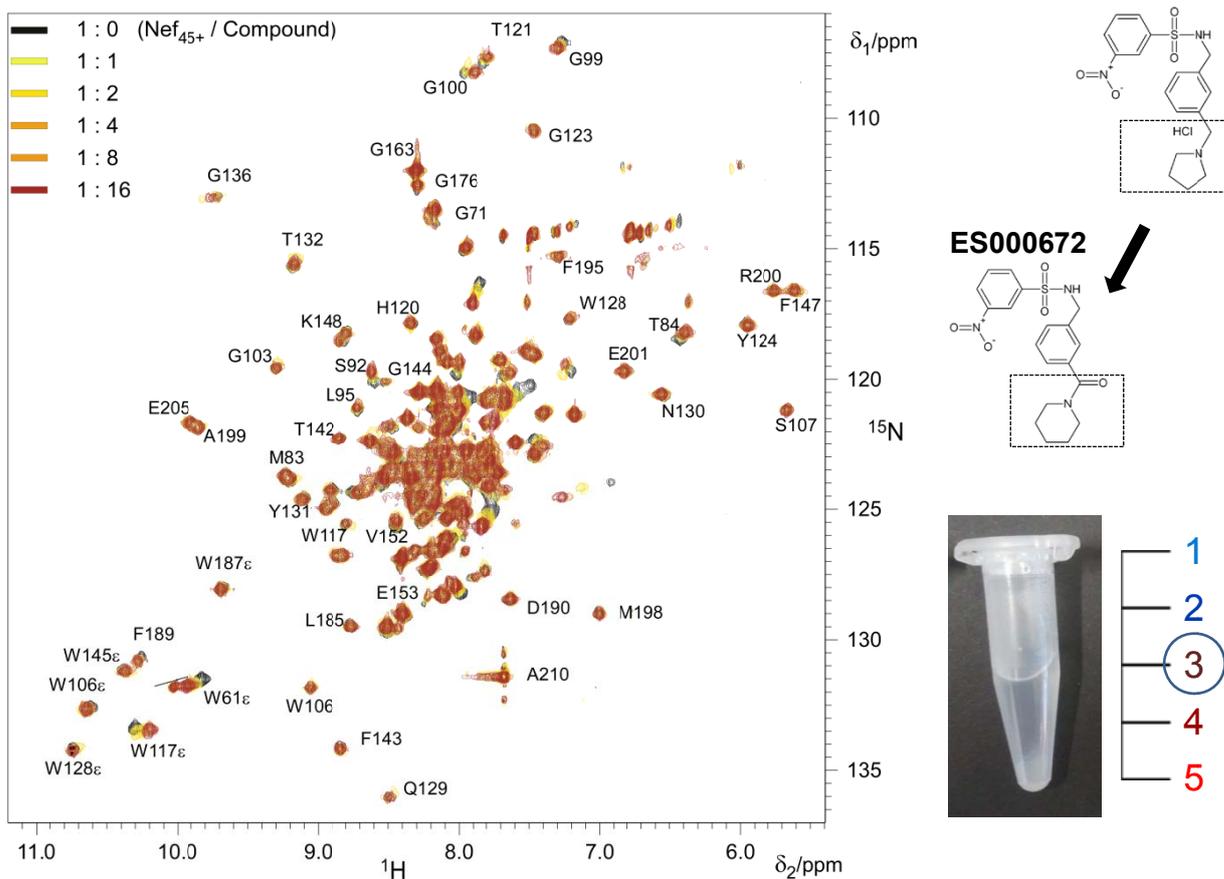


Abbildung 84: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren der Titrationsreihe von Nef₄₅₋₂₁₀ mit ES000672 (1:0-1:16). Die Parameter entsprechen denen von Abbildung 52, so dass die Substanz und das Protein identisch eingesetzt wurden. Das HSQC-Spektrum von Nef₄₅₋₂₁₀ allein ist schwarz gefärbt. Die Titration von ES000672 erfolgte wie in den Schritten 1:1-1:16 im molaren Verhältnis zu Nef, farblich gekennzeichnet von gelb über orange nach rot. Auf der x-Achse ist die ^1H -chemische Verschiebung und auf der y-Achse die ^{15}N -chemische Verschiebung aufgetragen. Die Veränderungen von ES000672 gegenüber ES000219 sowie ein Foto des Löslichkeitstest sind beigegefügt.

7 Literaturverzeichnis

- Adams P. D., Afonine P. V., Bunkoczi G., Chen V. B., Davis I. W., Echols N., Headd J. J., Hung L. W., Kapral G. J., Grosse-Kunstleve R. W., McCoy A. J., Moriarty N. W., Oeffner R., Read R. J., Richardson D. C., Richardson J. S., Terwilliger T. C. and Zwart P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213-21.
- Agopian K., Wei B. L., Garcia J. V. and Gabuzda D. (2006) A hydrophobic binding surface on the human immunodeficiency virus type 1 Nef core is critical for association with p21-activated kinase 2. *J Virol* **80**, 3050-61.
- Agopian K., Wei B. L., Garcia J. V. and Gabuzda D. (2007) CD4 and MHC-I downregulation are conserved in primary HIV-1 Nef alleles from brain and lymphoid tissues, but Pak2 activation is highly variable. *Virology* **358**, 119-35.
- Ahmad N. and Venkatesan S. (1988) Nef Protein of Hiv-1 Is a Transcriptional Repressor of Hiv-1 Ltr. *Science* **241**, 1481-1485.
- Aiken C., Konner J., Landau N. R., Lenburg M. E. and Trono D. (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**, 853-64.
- Allan J. S., Coligan J. E., Barin F., McLane M. F., Sodroski J. G., Rosen C. A., Haseltine W. A., Lee T. H. and Essex M. (1985a) Major Glycoprotein Antigens That Induce Antibodies in Aids Patients Are Encoded by Htlv-iii. *Science* **228**, 1091-1094.
- Allan J. S., Coligan J. E., Lee T. H., McLane M. F., Kanki P. J., Groopman J. E. and Essex M. (1985b) A New Htlv-iii Lav Encoded Antigen Detected by Antibodies from Aids Patients. *Science* **230**, 810-813.
- Amato Neto V., Uip D. E., Boulos M., Duarte M. I., Mendes C. M., Taketomi E., Longo I. M., Mattos Filho J. L., Moura N. C., Rocha T. R. and et al. (1983) [Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): report of the 1st autochthonous case in Brazil and immunological study]. *Rev Paul Med* **101**, 165-8.
- Anderson P., Blue M. L., Morimoto C. and Schlossman S. F. (1987) Cross-linking of T3 (CD3) with T4 (CD4) enhances the proliferation of resting T lymphocytes. *Journal of Immunology* **139**, 678-82.
- Arbabi Ghahroudi M., Desmyter A., Wyns L., Hamers R. and Muyldermans S. (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* **414**, 521-6.
- Arold S., Franken P., Strub M. P., Hoh F., Benichou S., Benarous R. and Dumas C. (1997) 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**, 1361-72.
- Arold S., Hoh F., Domergue S., Birck C., Delsuc M. A., Jullien M. and Dumas C. (2000) Characterization and molecular basis of the oligomeric structure of HIV-1 nef protein. *Protein Sci* **9**, 1137-48.
- Arora V. K., Molina R. P., Foster J. L., Blakemore J. L., Chernoff J., Fredericksen B. L. and Garcia J. V. (2000) Lentivirus Nef specifically activates Pak2. *J Virol* **74**, 11081-7.
- Arya S. K. and Gallo R. C. (1986) Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III Immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. *PNAS* **83**, 2209-2213.
- Auf der Maur A., Escher D. and Barberis A. (2001) Antigen-independent selection of stable intracellular single-chain antibodies. *FEBS Lett* **508**, 407-12.
- Auf der Maur A., Tissot K. and Barberis A. (2004) Antigen-independent selection of intracellular stable antibody frameworks. *Methods* **34**, 215-24.
- Auf der Maur A., Zahnd C., Fischer F., Spinelli S., Honegger A., Cambillau C., Escher D., Pluckthun A. and Barberis A. (2002) Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J Biol Chem* **277**, 45075-85.
- Auhuber I., Gattringer C., Wachter H. and Huber C. (1984) [The first case of AIDS in the Tyrol]. *Wien Klin Wochenschr* **96**, 426-7.
- Bachelerie F., Alcami J., Hazan U., Israel N., Goud B., Arenzana-Seisdedos F. and Virelizier J. L. (1990) Constitutive expression of human immunodeficiency virus (HIV) nef protein in human astrocytes does not influence basal or induced HIV long terminal repeat activity. *J Virol* **64**, 3059-62.

- Backer J. M., Mendola C. E., Fairhurst J. L. and Kovcsdi I. (1991) The HIV-1 nef protein does not have guanine nucleotide binding, GTPase, or autophosphorylating activities. *AIDS Res Hum Retroviruses* **7**, 1015-20.
- Barber E. K., Dasgupta J. D., Schlossman S. F., Trevillyan J. M. and Rudd C. E. (1989) The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3277-81.
- Barresinoussi F., Chermann J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dautuet C., Axlerblin C., Vezinetbrun F., Rouzioux C., Rozenbaum W. and Montagnier L. (1983) Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune-Deficiency Syndrome (Aids). *Science* **220**, 868-871.
- Baur A. S., Sass G., Laffert B., Willbold D., Cheng-Mayer C. and Peterlin B. M. (1997) The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. *Immunity* **6**, 283-91.
- Benson R. E., Sanfridson A., Ottinger J. S., Doyle C. and Cullen B. R. (1993) Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp Med* **177**, 1561-6.
- Bentham M., Mazaleyrat S. and Harris M. (2003) 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. *Journal of General Virology* **84**, 2705-2713.
- Bernard A. and Boumsell L. (1984) The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Hum Immunol* **11**, 1-10.
- Betzi S., Restouin A., Opi S., Arold S. T., Parrot I., Guerlesquin F., Morelli X. and Collette Y. (2007) Protein protein interaction inhibition (2P2I) combining high throughput and virtual screening: Application to the HIV-1 Nef protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 19256-19261.
- Bierer B. E., Sleckman B. P., Ratnofsky S. E. and Burakoff S. J. (1989) The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu Rev Immunol* **7**, 579-99.
- Biocca S., Ruberti F., Tafani M., Pierandrei-Amaldi P. and Cattaneo A. (1995) Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria. *Biotechnology (N Y)* **13**, 1110-5.
- Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S. M., Lee T., Pope S. H., Riordan G. S. and Whitlow M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-6.
- Bleul C. C., Farzan M., Choe H., Parolin C., Clark-Lewis I., Sodroski J. and Springer T. A. (1996) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**, 829-33.
- Bogan A. A. and Thorn K. S. (1998) Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* **280**, 1-9.
- Bolen J. B. (1993) Nonreceptor tyrosine protein kinases. *Oncogene* **8**, 2025-31.
- Bolen J. B. and Brugge J. S. (1997) Leukocyte protein tyrosine kinases: potential targets for drug discovery. *Annu Rev Immunol* **15**, 371-404.
- Boll W., Ohno H., Songyang Z., Rapoport I., Cantley L. C., Bonifacino J. S. and Kirchhausen T. (1996) Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO J* **15**, 5789-95.
- Bonifacino J. S. and Traub L. M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.
- Bouchet J., Basmaciogullari S. E., Chrobak P., Stolp B., Bouchard N., Fackler O. T., Chames P., Jolicoeur P., Benichou S. and Baty D. (2011) Inhibition of the Nef regulatory protein of HIV-1 by a single-domain antibody. *Blood* **117**, 3559-68.
- Bouchet J., Herate C., Guenzel C. A., Verollet C., Jarviluoma A., Mazzolini J., Rafie S., Chames P., Baty D., Saksela K., Niedergang F., Maridonneau-Parini I. and Benichou S. (2012) Single-Domain Antibody-SH3 Fusions for Efficient Neutralization of HIV-1 Nef Functions. *Journal of Virology* **86**, 4856-4867.
- Bowers K., Pitcher C. and Marsh M. (1997) CD4: a co-receptor in the immune response and HIV infection. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 871-5.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Breuer S., Schievink S. I., Schulte A., Blankenfeldt W., Fackler O. T. and Geyer M. (2011) Molecular design, functional characterization and structural basis of a protein inhibitor against the HIV-1 pathogenicity factor Nef. *PLoS One* **6**, e20033.

- Briggs S. D., Scholtz B., Jacque J. M., Swingler S., Stevenson M. and Smithgall T. E. (2001) HIV-1 Nef promotes survival of myeloid cells by a Stat3-dependent pathway. *J Biol Chem* **276**, 25605-11.
- Brown F. (1986) Human immunodeficiency virus. *Science* **232**, 1486.
- Brown M. T. and Cooper J. A. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* **1287**, 121-49.
- Call M. E. and Wucherpfennig K. W. (2005) The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol* **23**, 101-25.
- Cattaneo A. and Biocca S. (1999) The selection of intracellular antibodies. *Trends in Biotechnology* **17**, 115-121.
- Chakrabarti L., Guyader M., Alizon M., Daniel M. D., Desrosiers R. C., Tiollais P. and Sonigo P. (1987) Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* **328**, 543-7.
- Chan A. C., Irving B. A., Fraser J. D. and Weiss A. (1991) The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9166-70.
- Chan A. C., Iwashima M., Turck C. W. and Weiss A. (1992) ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**, 649-62.
- Chan A. Y. and Ng W. D. (1985) First case of AIDS in Hong Kong. *JAMA* **254**, 751.
- Chang M. P., Mallet W. G., Mostov K. E. and Brodsky F. M. (1993a) Adaptor self-aggregation, adaptor-receptor recognition and binding of alpha-adaptin subunits to the plasma membrane contribute to recruitment of adaptor (AP2) components of clathrin-coated pits. *EMBO J* **12**, 2169-80.
- Chang S. Y. P., Bowman B. H., Weiss J. B., Garcia R. E. and White T. J. (1993b) The Origin of Hiv-1 Isolate Htlv-liib. *Nature* **363**, 466-469.
- Chaudhuri R., Lindwasser O. W., Smith W. J., Hurley J. H. and Bonifacino J. S. (2007) Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J Virol* **81**, 3877-90.
- Chen Z., Luckay A., Sodora D. L., Telfer P., Reed P., Gettie A., Kanu J. M., Sadek R. F., Yee J., Ho D. D., Zhang L. and Marx P. A. (1997) Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol* **71**, 3953-60.
- Chutiwitoonchai N., Hiyoshi M., Mwimanzi P., Ueno T., Adachi A., Ode H., Sato H., Fackler O. T., Okada S. and Suzu S. (2011) The Identification of a Small Molecule Compound That Reduces HIV-1 Nef-Mediated Viral Infectivity Enhancement. *PLoS ONE* **6**.
- Cichutek K. and Norley S. (1993) Lack of immune suppression in SIV-infected natural hosts. *AIDS* **7 Suppl 1**, S25-35.
- Clackson T. and Wells J. A. (1995) A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **267**, 383-6.
- Clark K. R. and Walsh S. T. (2009) Crystal structure of a 3B3 variant--a broadly neutralizing HIV-1 scFv antibody. *Protein Sci* **18**, 2429-41.
- Cluet D., Bertsch C., Beyer C., Gloeckler L., Erhardt M., Gut J. P., Galzi J. L. and Aubertin A. M. (2005) Detection of human immunodeficiency virus type 1 Nef and CD4 physical interaction in living human cells by using bioluminescence resonance energy transfer. *J Virol* **79**, 8629-36.
- Cohen E., Terwilliger E., Sodroski J. and Haseltine W. A. (1990a) A Novel Hiv-1 Transactivator That Specifies Viral Rapid Growth - Rap (Vpr). *Aids Research and Human Retroviruses* **6**, 56-56.
- Cohen E. A., Terwilliger E. F., Jalinoos Y., Proulx J., Sodroski J. G. and Haseltine W. A. (1990b) Identification of Hiv-1 Vpr Product and Function. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* **3**, 11-18.
- Cohen G. B., Gandhi R. T., Davis D. M., Mandelboim O., Chen B. K., Strominger J. L. and Baltimore D. (1999) The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* **10**, 661-71.
- Cohen G. B., Rangan V. S., Chen B. K., Smith S. and Baltimore D. (2000) The human thioesterase II protein binds to a site on HIV-1 Nef critical for CD4 down-regulation. *J Biol Chem* **275**, 23097-105.
- Cohen G. B., Ren R. and Baltimore D. (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**, 237-48.
- Collins B. M., McCoy A. J., Kent H. M., Evans P. R. and Owen D. J. (2002) Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* **109**, 523-35.

- Craig H. M., Pandori M. W. and Guatelli J. C. (1998) Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11229-34.
- Crowther R. A., Finch J. T. and Pearse B. M. (1976) On the structure of coated vesicles. *J Mol Biol* **103**, 785-98.
- Cullen B. R. (1994) The role of Nef in the replication cycle of the human and simian immunodeficiency viruses. *Virology* **205**, 1-6.
- Curtain C. C., Lowe M. G., Macreadie I. G., Gentle I. R., Lawrie G. A. and Azad A. A. (1998) Structural requirements for the cytotoxicity of the N-terminal region of HIV type 1 Nef. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**, 1543-51.
- Davies D. R. and Metzger H. (1983) Structural basis of antibody function. *Annu Rev Immunol* **1**, 87-117.
- Davies J. and Riechmann L. (1995) Antibody Vh Domains as Small Recognition Units. *Bio-Technology* **13**, 475-479.
- Dayton A. I., Sodroski J. G., Rosen C. A., Goh W. C. and Haseltine W. A. (1986) The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**, 941-7.
- De Leys R., Vanderborcht B., Vanden Haesevelde M., Heyndrickx L., van Geel A., Wauters C., Bernaerts R., Saman E., Nijs P., Willems B. and et al. (1990) Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol* **64**, 1207-16.
- De Preval C. and Fougereau M. (1976) Specific interaction between VH and VL regions of human monoclonal immunoglobulins. *J Mol Biol* **102**, 657-78.
- de Silva T. I., Cotten M. and Rowland-Jones S. L. (2008) HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends Microbiol* **16**, 588-95.
- Deacon N. J., Tsykin A., Solomon A., Smith K., Ludford-Menting M., Hooker D. J., McPhee D. A., Greenway A. L., Ellett A., Chatfield C., Lawson V. A., Crowe S., Maerz A., Sonza S., Learmont J., Sullivan J. S., Cunningham A., Dwyer D., Downton D. and Mills J. (1995) Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**, 988-91.
- Desmyter A., Transue T. R., Ghahroudi M. A., Thi M. H., Poortmans F., Hamers R., Muyldermans S. and Wyns L. (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol* **3**, 803-11.
- Dikeakos J. D., Atkins K. M., Thomas L., Emert-Sedlak L., Byeon I. J. L., Jung J., Ahn J., Wortman M. D., Kukull B., Saito M., Koizumi H., Williamson D. M., Hiyoshi M., Barklis E., Takiguchi M., Suzu S., Gronenborn A. M., Smithgall T. E. and Thomas G. (2010) Small Molecule Inhibition of HIV-1-Induced MHC-I Down-Regulation Identifies a Temporally Regulated Switch in Nef Action. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 3279-3292.
- Dikeakos J. D., Thomas L., Kwon G., Elferich J., Shinde U. and Thomas G. (2012) An interdomain binding site on HIV-1 Nef interacts with PACS-1 and PACS-2 on endosomes to down-regulate MHC-I. *Mol Biol Cell* **23**, 2184-97.
- Doray B., Lee I., Knisely J., Bu G. and Kornfeld S. (2007) The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Mol Biol Cell* **18**, 1887-96.
- Dougherty D. A. (2012) The Cation-pi Interaction. *Acc Chem Res*.
- Dragic T., Litwin V., Allaway G. P., Martin S. R., Huang Y., Nagashima K. A., Cayanan C., Maddon P. J., Koup R. A., Moore J. P. and Paxton W. A. (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-73.
- Duan L., Bagasra O., Laughlin M. A., Oakes J. W. and Pomerantz R. J. (1994) Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5075-9.
- Ehrlich M., Boll W., Van Oijen A., Hariharan R., Chandran K., Nibert M. L. and Kirchhausen T. (2004) Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* **118**, 591-605.
- Emmrich F., Kanz L. and Eichmann K. (1987) Cross-linking of the T cell receptor complex with the subset-specific differentiation antigen stimulates interleukin 2 receptor expression in human CD4 and CD8 T cells. *Eur J Immunol* **17**, 529-34.
- Emsley P. and Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-32.
- Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G. and Cowtan K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501.

- Fackler O. T., Kienzle N., Kremmer E., Boese A., Schramm B., Klimkait T., Kucherer C. and Mueller-Lantzsch N. (1997) Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization. *Eur J Biochem* **247**, 843-51.
- Feinberg M. B., Jarrett R. F., Aldovini A., Gallo R. C. and Wong-Staal F. (1986) HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell* **46**, 807-17.
- Feng Y., Broder C. C., Kennedy P. E. and Berger E. A. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-7.
- Fisher A. G., Feinberg M. B., Josephs S. F., Harper M. E., Marselle L. M., Reyes G., Gonda M. A., Aldovini A., Debouk C., Gallo R. C. and Wongstaaal F. (1986) The Transactivator Gene of Htlv-iii Is Essential for Virus-Replication. *Nature* **320**, 367-371.
- Folks T., Benn S., Rabson A., Theodore T., Hoggan M. D., Martin M., Lightfoote M. and Sell K. (1985) Characterization of a continuous T-cell line susceptible to the cytopathic effects of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4539-43.
- Friedmann-Kien A., Laubenstein L. and Marmor M. (1981) Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia Among Homosexual Men - New York City and California. *Morbidity and Mortality Weekly Reports - CDC* **30**, 305-308.
- Gaidarov I. and Keen J. H. (1999) Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol* **146**, 755-64.
- Gallo R., Wongstaaal F., Montagnier L., Haseltine W. A. and Yoshida M. (1988) Hiv/Htlv Gene Nomenclature. *Nature* **333**, 504-504.
- Gao F., Bailes E., Robertson D. L., Chen Y., Rodenburg C. M., Michael S. F., Cummins L. B., Arthur L. O., Peeters M., Shaw G. M., Sharp P. M. and Hahn B. H. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**, 436-41.
- Garcia J. V. and Miller A. D. (1991) Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**, 508-11.
- Garg R. and Gupta S. P. (1997) Quantitative structure-activity relationship studies on some anti-human-immunodeficiency-virus-1 (anti-HIV-1) drugs: viral reverse transcriptase inhibitors. *J Enzyme Inhib* **12**, 1-12.
- Gazengel C., Vilmer E., Torchet M. F., Boiteux F., Cherman J. C. and Griscelli C. (1984) [A case of AIDS in a hemophilia B patient in France]. *Rev Fr Transfus Immunohematol* **27**, 479-86.
- Geleziunas R., Bour S., Boulerice F., Hiscott J. and Wainberg M. A. (1991) Diminution of CD4 surface protein but not CD4 messenger RNA levels in monocytic cells infected by HIV-1. *AIDS* **5**, 29-33.
- Gerlach H., Laumann V., Martens S., Becker C. F., Goody R. S. and Geyer M. (2010) HIV-1 Nef membrane association depends on charge, curvature, composition and sequence. *Nat Chem Biol* **6**, 46-53.
- Geyer M., Fackler O. T. and Peterlin B. M. (2001) Structure-function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep* **2**, 580-5.
- Geyer M., Munte C. E., Schorr J., Kellner R. and Kalbitzer H. R. (1999) Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *J Mol Biol* **289**, 123-38.
- Geyer M. and Peterlin B. M. (2001) Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS Lett* **496**, 91-5.
- Ghosh P. and Kornfeld S. (2003) AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation. *Journal of Cell Biology* **160**, 699-708.
- Gilbert M. T. P., Rambaut A., Wlasiuk G., Spira T. J., Pitchenik A. E. and Worobey M. (2007) The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 18566-18570.
- Gilmore N. J., Beaulieu R., Steben M. and Laverdiere M. (1983) Aids - Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Canadian Medical Association Journal* **128**, 1281-1284.
- Goh W. C., Rosen C., Sodroski J., Ho D. D. and Haseltine W. A. (1986) Identification of a Protein Encoded by the Trans Activator Gene Tatiii of Human T-Cell Lymphotropic Retrovirus Type-iii. *Journal Of Virology* **59**, 181-184.
- Gold J., Li Y. and Kaldor J. M. (1994) Premature mortality in Australia 1983-1992, the first decade of the AIDS epidemic. *Med J Aust* **161**, 652-6.
- Goldstein J. L., Brown M. S., Anderson R. G., Russell D. W. and Schneider W. J. (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 1-39.

- Greenberg A. S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E. C. and Flajnik M. F. (1995) A New Antigen Receptor Gene Family That Undergoes Rearrangement and Extensive Somatic Diversification in Sharks. *Nature* **374**, 168-173.
- Greenberg M. E., Bronson S., Lock M., Neumann M., Pavlakis G. N. and Skowronski J. (1997) Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J* **16**, 6964-76.
- Greenway A., Azad A. and McPhee D. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits activation pathways in peripheral blood mononuclear cells and T-cell lines. *J Virol* **69**, 1842-50.
- Greenway A. L., McPhee D. A., Allen K., Johnstone R., Holloway G., Mills J., Azad A., Sankovich S. and Lambert P. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *J Virol* **76**, 2692-702.
- Grzesiek S., Bax A., Clore G. M., Gronenborn A. M., Hu J. S., Kaufman J., Palmer I., Stahl S. J. and Wingfield P. T. (1996a) The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase. *Nat Struct Biol* **3**, 340-5.
- Grzesiek S., Stahl S. J., Wingfield P. T. and Bax A. (1996b) The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* **35**, 10256-61.
- Gurtler L. G., Hauser P. H., Eberle J., von Brunn A., Knapp S., Zekeng L., Tsague J. M. and Kaptue L. (1994) A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* **68**, 1581-5.
- Guy B., Kieny M. P., Riviere Y., Peuch C. L., Dott K., Girard M., Montagnier L. and Lecocq J.-P. (1987) HIV F3'orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**, 266-269.
- Guyader M., Emerman M., Sonigo P., Clavel F., Montagnier L. and Alizon M. (1987) Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**, 662-9.
- Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E. B., Bendahman N. and Hamers R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-8.
- Hamers R. L., Sigaloff K. C. E., Kityo C., Mugenyi P. and de Wit T. F. R. (2013) Emerging HIV-1 drug resistance after roll-out of antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa. *Current Opinion in HIV and Aids* **8**, 19-26.
- Hammer S. M., Katzenstein D. A., Hughes M. D., Gundacker H., Schooley R. T., Haubrich R. H., Henry W. K., Lederman M. M., Phair J. P., Niu M., Hirsch M. S. and Merigan T. C. (1996) A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med* **335**, 1081-90.
- Hammes S. R., Dixon E. P., Malim M. H., Cullen B. R. and Greene W. C. (1989) Nef Protein of Human Immunodeficiency Virus Type-1 - Evidence against Its Role as a Transcriptional Inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 9549-9553.
- Harding C. V. and Geuze H. J. (1993) Antigen processing and intracellular traffic of antigens and MHC molecules. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 596-605.
- Harris L. J., Larson S. B., Hasel K. W., Day J., Greenwood A. and McPherson A. (1992) The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma. *Nature* **360**, 369-72.
- Harris L. J., Larson S. B., Hasel K. W. and McPherson A. (1997) Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* **36**, 1581-97.
- Harris M. P. and Neil J. C. (1994) Myristoylation-dependent binding of HIV-1 Nef to CD4. *J Mol Biol* **241**, 136-42.
- Harrison G. S., Long C. J., Curiel T. J., Maxwell F. and Maxwell I. H. (1992) Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene. *Hum Gene Ther* **3**, 461-9.
- Heldwein E. E., Macia E., Wang J., Yin H. L., Kirchhausen T. and Harrison S. C. (2004) Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14108-13.
- Henderson D. M. and Conner S. D. (2007) A novel AAK1 splice variant functions at multiple steps of the endocytic pathway. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 2698-2706.
- Herskowitz I. (1987) Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* **329**, 219-22.

- Hiipakka M., Huotari P., Manninen A., Renkema G. H. and Saksela K. (2001) Inhibition of cellular functions of HIV-1 Nef by artificial SH3 domains. *Virology* **286**, 152-9.
- Hiipakka M., Poikonen K. and Saksela K. (1999) SH3 domains with high affinity and engineered ligand specificities targeted to HIV-1 Nef. *J Mol Biol* **293**, 1097-106.
- Hinz A., Lutje Hulsik D., Forsman A., Koh W. W., Belrhali H., Gorlani A., de Haard H., Weiss R. A., Verrips T. and Weissenhorn W. (2010) Crystal structure of the neutralizing Llama V(HH) D7 and its mode of HIV-1 gp120 interaction. *PLoS One* **5**, e10482.
- Hirst J. and Robinson M. S. (1998) Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 173-93.
- Hiyoshi M., Suzu S., Yoshidomi Y., Hassan R., Harada H., Sakashita N., Akari H., Motoyoshi K. and Okada S. (2008) Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* **111**, 243-50.
- Horenkamp F. A., Breuer S., Schulte A., Lulf S., Weyand M., Saksela K. and Geyer M. (2011) Conformation of the Dileucine-Based Sorting Motif in HIV-1 Nef Revealed by Intermolecular Domain Assembly. *Traffic* **12**, 867-877.
- Huang Y., Zhang L. and Ho D. D. (1995) Characterization of nef sequences in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **69**, 93-100.
- Huston J. S., Levinson D., Mudgetthunter M., Tai M. S., Novotny J., Margolies M. N., Ridge R. J., Bruccoleri R. E., Haber E., Crea R. and Oppermann H. (1988) Protein Engineering of Antibody-Binding Sites - Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analog Produced in Escherichia-Coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5879-5883.
- Inoue M., Koga Y., Djordjijevic D., Fukuma T., Reddy E. P., Yokoyama M. M. and Sagawa K. (1993) Down-regulation of CD4 molecules by the expression of Nef: a quantitative analysis of CD4 antigens on the cell surfaces. *Int Immunol* **5**, 1067-73.
- IUPAC-IUB. (1984) IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur J Biochem* **138**, 9-37.
- IUPAC-IUB. (1993) IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Corrections to recommendations 1983. *Eur J Biochem* **213**, 2.
- Jackson L. P., Kelly B. T., McCoy A. J., Gaffry T., James L. C., Collins B. M., Honing S., Evans P. R. and Owen D. J. (2010) A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell* **141**, 1220-9.
- Jarviluoma A., Strandin T., Lulf S., Bouchet J., Makela A. R., Geyer M., Benichou S. and Saksela K. (2012) High-affinity target binding engineered via fusion of a single-domain antibody fragment with a ligand-tailored SH3 domain. *PLoS One* **7**, e40331.
- Jia X., Singh R., Homann S., Yang H., Guatelli J. and Xiong Y. (2012) Structural basis of evasion of cellular adaptive immunity by HIV-1 Nef. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 701-6.
- Jin Y. J., Zhang X., Boursiquot J. G. and Burakoff S. J. (2004) CD4 phosphorylation partially reverses Nef down-regulation of CD4. *Journal of Immunology* **173**, 5495-500.
- Kabsch W. (2010) Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-32.
- Kaminchik J., Bashan N., Pinchasi D., Amit B., Sarver N., Johnston M. I., Fischer M., Yavin Z., Gorecki M. and Panet A. (1990) Expression and biochemical characterization of human immunodeficiency virus type 1 nef gene product. *J Virol* **64**, 3447-54.
- Kan N. C., Franchini G., Wongstaal F., Dubois G. C., Robey W. G., Lautenberger J. A. and Papas T. S. (1986) Identification of Htlv-III/Lav Sor Gene-Product and Detection of Antibodies in Human-Sera. *Science* **231**, 1553-1555.
- Keen J. H. (1990) Clathrin and associated assembly and disassembly proteins. *Annu Rev Biochem* **59**, 415-38.
- Kelly B. T., McCoy A. J., Späte K., Miller S. E., Evans P. R., Höning S. and Owen D. J. (2008) A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* **456**, 976-979.
- Kent S. B. (1988) Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem* **57**, 957-89.
- Kerkau T., Schmitt-Landgraf R., Schimpl A. and Wecker E. (1989) Downregulation of HLA class I antigens in HIV-1-infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **5**, 613-20.
- Kersh E. N., Shaw A. S. and Allen P. M. (1998) Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science* **281**, 572-575.
- Kestler H. W., 3rd, Ringler D. J., Mori K., Panicali D. L., Sehgal P. K., Daniel M. D. and Desrosiers R. C. (1991) Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**, 651-62.

- Killian J. A. and von Heijne G. (2000) How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 429-434.
- Kim W. M., Sigalov A. B. and Stern L. J. (2010) Pseudo-merohedral twinning and noncrystallographic symmetry in orthorhombic crystals of SIVmac239 Nef core domain bound to different-length TCRzeta fragments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 163-75.
- Kirchhausen T. (1993) Coated pits and coated vesicles - sorting it all out. *Current Opinion in Structural Biology* **3**, 182-188.
- Kirchhausen T. and Harrison S. C. (1981) Protein organization in clathrin trimers. *Cell* **23**, 755-61.
- Kirchhoff F. (2009) Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution? *Nat Rev Microbiol* **7**, 467-76.
- Kirchhoff F., Greenough T. C., Brettler D. B., Sullivan J. L. and Desrosiers R. C. (1995) Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* **332**, 228-32.
- Kirchhoff F., Schindler M., Specht A., Arhel N. and Münch J. (2008) Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 2621-2636.
- Korber B., Muldoon M., Theiler J., Gao F., Gupta R., Lapedes A., Hahn B. H., Wolinsky S. and Bhattacharya T. (2000) Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**, 1789-96.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Le Gall S., Erdtmann L., Benichou S., Berlioz-Torrent C., Liu L., Benarous R., Heard J. M. and Schwartz O. (1998) Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* **8**, 483-95.
- Lee C. H., Leung B., Lemmon M. A., Zheng J., Cowburn D., Kuriyan J. and Saksela K. (1995) 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**, 5006-15.
- Lee C. H., Saksela K., Mirza U. A., Chait B. T. and Kuriyan J. (1996) Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell* **85**, 931-42.
- Lee D. W., Wu X., Eisenberg E. and Greene L. E. (2006) Recruitment dynamics of GAK and auxilin to clathrin-coated pits during endocytosis. *J Cell Sci* **119**, 3502-12.
- Lee J. H., Wittki S., Brau T., Dreyer F. S., Kratzel K., Dindorf J., Johnston I. C., Gross S., Kremmer E., Zeidler R., Schlotzer-Schrehardt U., Lichtenheld M., Saksela K., Harrer T., Schuler G., Federico M. and Baur A. S. (2013) HIV Nef, Paxillin, and Pak1/2 Regulate Activation and Secretion of TACE/ADAM10 Proteases. *Mol Cell*.
- Lee T. H., Coligan J. E., Allan J. S., Mclane M. F., Groopman J. E. and Essex M. (1986) A New Htlv-III/Lav Protein Encoded by a Gene Found in Cytopathic Retroviruses. *Science* **231**, 1546-1549.
- Lemey P., Pybus O. G., Wang B., Saksena N. K., Salemi M. and Vandamme A. M. (2003) Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6588-92.
- Levine B. L., Humeau L. M., Boyer J., MacGregor R. R., Rebello T., Lu X. B., Binder G. K., Slepishkin V., Lemiale F., Mascola J. R., Bushman F. D., Dropulic B. and June C. H. (2006) Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 17372-17377.
- Levy J. A., Hoffman A. D., Kramer S. M., Landis J. A., Shimabukuro J. M. and Oshiro L. S. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**, 840-2.
- Lin K. T., Huang S. H., Kao C. L., Huang K. M., Yu J. C., Hung T. P., Chou M. Y., Liu W. T., Fang C. T. and Kuo Y. T. (1987) An autopsy-proved case of AIDS in Taiwan. *Asian Pac J Allergy Immunol* **5**, 25-31.
- Little S. J., Holte S., Routy J. P., Daar E. S., Markowitz M., Collier A. C., Koup R. A., Mellors J. W., Connick E., Conway B., Kilby M., Wang L., Whitcomb J. M., Hellmann N. S. and Richman D. D. (2002) Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* **347**, 385-94.
- Liu L. X., Heveker N., Fackler O. T., Arold S., Le Gall S., Janvier K., Peterlin B. M., Dumas C., Schwartz O., Benichou S. and Benarous R. (2000) Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions. *Journal of Virology* **74**, 5310-5319.
- Lo Conte L., Chothia C. and Janin J. (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* **285**, 2177-98.

- Lock M., Greenberg M. E., Iafrate A. J., Swigut T., Muench J., Kirchhoff F., Shohdy N. and Skowronski J. (1999) Two elements target SIV Nef to the AP-2 clathrin adaptor complex, but only one is required for the induction of CD4 endocytosis. *EMBO J* **18**, 2722-33.
- Love P. E. and Hayes S. M. (2010) ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002485.
- Lülf S., Horenkamp F. A., Breuer S. and Geyer M. (2011) Nef surfaces: where to interfere with function. *Curr HIV Res* **9**, 543-51.
- Mangasarian A., Piguet V., Wang J. K., Chen Y. L. and Trono D. (1999) 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**, 1964-73.
- Mangino G., Percario Z. A., Fiorucci G., Vaccari G., Acconcia F., Chiarabelli C., Leone S., Noto A., Horenkamp F. A., Manrique S., Romeo G., Polticelli F., Geyer M. and Affabris E. (2011) HIV-1 Nef Induces Proinflammatory State in Macrophages through Its Acidic Cluster Domain: Involvement of TNF Alpha Receptor Associated Factor 2. *PLoS One* **6**.
- Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T. and Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-34.
- Manosuthi W., Thongyen S., Nilkamhang S., Manosuthi S. and Sungkanuparph S. (2013) HIV-1 drug resistance-associated mutations among antiretroviral-naive thai patients with chronic HIV-1 infection. *Journal of Medical Virology* **85**, 194-199.
- Marasco W. A., Haseltine W. A. and Chen S. Y. (1993) Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7889-93.
- Mariani R. and Skowronski J. (1993) CD4 down-regulation by nef alleles isolated from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5549-53.
- Marilus R., Spierer Z., Michaeli D., Soferman G. and Blum I. (1984) First case of AIDS in a homosexual in Israel. Results of different therapeutic regimens. *Isr J Med Sci* **20**, 249-51.
- Marks M. S., Ohno H., Kirchnausen T. and Bonracino J. S. (1997) Protein sorting by tyrosine-based signals: adapting to the Ys and wherefores. *Trends Cell Biol* **7**, 124-8.
- Marsh M., Armes J. E. and Pelchen-Matthews A. (1990) Endocytosis and recycling of CD4. *Biochem Soc Trans* **18**, 139-43.
- Massol R. H., Boll W., Griffin A. M. and Kirchhausen T. (2006) A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10265-70.
- Matsuda Z., Chou M. J., Matsuda M., Huang J. H., Chen Y. M., Redfield R., Mayer K., Essex M. and Lee T. H. (1988) Human Immunodeficiency Virus Type-1 Has an Additional Coding Sequence in the Central Region of the Genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 6968-6972.
- Mayer B. J. and Baltimore D. (1993) Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol* **3**, 8-13.
- McClure M. O., Sattentau Q. J., Beverley P. C., Hearn J. P., Fitzgerald A. K., Zuckerman A. J. and Weiss R. A. (1987) HIV infection of primate lymphocytes and conservation of the CD4 receptor. *Nature* **330**, 487-9.
- McCoy A. J., Grosse-Kunstleve R. W., Adams P. D., Winn M. D., Storoni L. C. and Read R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674.
- McDougal J. S., Kennedy M. S., Sligh J. M., Cort S. P., Mawle A. and Nicholson J. K. (1986) Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* **231**, 382-5.
- Meuwissen P. J., Stolp B., Iannucci V., Vermeire J., Naessens E., Saksela K., Geyer M., Vanham G., Arien K. K., Fackler O. T. and Verhasselt B. (2012) Identification of a highly conserved valine-glycine-phenylalanine amino acid triplet required for HIV-1 Nef function. *Retrovirology* **9**, 34.
- Michel N., Allespach I., Venzke S., Fackler O. T. and Keppler O. T. (2005) The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr Biol* **15**, 714-23.
- Mitsuya H. and Broder S. (1986) Inhibition of the In vitro Infectivity and Cytopathic Effect of Human Lymphotropic-T Virus "Type-III/Lymphadenopathy-Associated Virus (Htlv-III/Lav) by 2',3'-Dideoxynucleosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 1911-1915.

- Mitsuya H., Weinhold K. J., Furman P. A., St Clair M. H., Lehrman S. N., Gallo R. C., Bolognesi D., Barry D. W. and Broder S. (1985) 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7096-100.
- Moarefi I., LaFevre-Bernt M., Sicheri F., Huse M., Lee C. H., Kuriyan J. and Miller W. T. (1997) Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* **385**, 650-3.
- Morgan R. A., Looney D. J., Muenchau D. D., Wong-Staal F., Gallo R. C. and Anderson W. F. (1990) Retroviral vectors expressing soluble CD4: a potential gene therapy for AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**, 183-91.
- Morgan R. A., Ragheb J., Chuah M., Vandendriessche T. and Bressler P. (1994) Development of Retroviral Vectors That Optimize the Inhibition of Hiv-1 at Multiple Points of the Viral Life-Cycle. *Journal of Cellular Biochemistry*, 243-243.
- Moss M. L., White J. M., Lambert M. H. and Andrews R. C. (2001) TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discovery Today* **6**, 417-426.
- Muratori C., Cavallin L. E., Kratzel K., Tinari A., De Milito A., Fais S., D'Aloja P., Federico M., Vullo V., Fomina A., Mesri E. A., Superti F. and Baur A. S. (2009) Massive secretion by T cells is caused by HIV Nef in infected cells and by Nef transfer to bystander cells. *Cell Host Microbe* **6**, 218-30.
- Muyldermans S., Atarhouch T., Saldanha J., Barbosa J. A. and Hamers R. (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Engineering* **7**, 1129-35.
- Muyldermans S., Cambillau C. and Wyns L. (2001) Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci* **26**, 230-5.
- Muyldermans S. and Lauwereys M. (1999) Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. *J Mol Recognit* **12**, 131-40.
- Nahmias A. J., Weiss J., Yao X., Lee F., Kodsi R., Schanfield M., Matthews T., Bolognesi D., Durack D., Motulsky A. and et al. (1986) Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959. *Lancet* **1**, 1279-80.
- Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F. H., Verma I. M. and Trono D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-7.
- Niederman T. M. J., Thielan B. J. and Ratner L. (1989) Human Immunodeficiency Virus Type-1 Negative Factor Is a Transcriptional Silencer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1128-1132.
- Noguerol P., Leal M. and Sosa R. (1984) Fourth case of AIDS in haemophilic children in Seville. *Lancet* **2**, 986.
- Novak R. M., Chen L., MacArthur R. D., Baxter J. D., Huppler Hullsiek K., Peng G., Xiang Y., Henely C., Schmetter B., Uy J., van den Berg-Wolf M. and Kozal M. (2005) Prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in chronically HIV-infected, treatment-naive patients: implications for routine resistance screening before initiation of antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* **40**, 468-74.
- Noviello C. M., Benichou S. and Guatelli J. C. (2007) Cooperative Binding of the Class I Major Histocompatibility Complex Cytoplasmic Domain and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef to the Endosomal AP-1 Complex via Its Subunit. *Journal of Virology* **82**, 1249-1258.
- Nowak M. (1990) HIV mutation rate. *Nature* **347**, 522.
- Nunn M. F. and Marsh J. W. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a member of the p21-activated kinase family. *J Virol* **70**, 6157-61.
- O'Neill E., Kuo L. S., Krisko J. F., Tomchick D. R., Garcia J. V. and Foster J. L. (2006) Dynamic Evolution of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Pathogenic Factor, Nef. *Journal of Virology* **80**, 1311-1320.
- Ohno H., Fournier M. C., Poy G. and Bonifacino J. S. (1996) Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J Biol Chem* **271**, 29009-15.
- Ohno H., Stewart J., Fournier M. C., Bosshart H., Rhee I., Miyatake S., Saito T., Gallusser A., Kirchhausen T. and Bonifacino J. S. (1995) Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**, 1872-5.
- Oldridge J. and Marsh M. (1998) Nef—an adaptor adaptor? *Trends Cell Biol* **8**, 302-5.
- Olszewski A., Sato K., Aron Z. D., Cohen F., Harris A., McDougall B. R., Robinson W. E., Overman L. E. and Weiss G. A. (2004) Guanidine alkaloid analogs as inhibitors of HIV-1 Nef interaction with p53, actin and p56(lck). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14079-14084.

- Oneyama C., Agatsuma T., Kanda Y., Nakano H., Sharma S. V., Nakano S., Narazaki F. and Tatsuta K. (2003) Synthetic inhibitors of proline-rich ligand-mediated protein-protein interaction: potent analogs of UCS15A. *Chem Biol* **10**, 443-51.
- Owen D. J., Vallis Y., Pearse B. M., McMahon H. T. and Evans P. R. (2000) The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J* **19**, 4216-27.
- Owens T., Fazekas de St Groth B. and Miller J. F. (1987) Coaggregation of the T-cell receptor with CD4 and other T-cell surface molecules enhances T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9209-13.
- Pawson T. and Schlessingert J. (1993) SH2 and SH3 domains. *Curr Biol* **3**, 434-42.
- Pearse B. M. (1975) Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* **97**, 93-8.
- Pelchen-Matthews A., Boulet I., Littman D. R., Fagard R. and Marsh M. (1992) The protein tyrosine kinase p56lck inhibits CD4 endocytosis by preventing entry of CD4 into coated pits. *J Cell Biol* **117**, 279-90.
- Perelson A. S., Neumann A. U., Markowitz M., Leonard J. M. and Ho D. D. (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**, 1582-6.
- Petersen C. M., Christensen E. I., Andresen B. S. and Moller B. K. (1992) Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphocytes and U-937 cells. *Exp Cell Res* **201**, 160-73.
- Piguet V., Schwartz O., Le Gall S. and Trono D. (1999) The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol Rev* **168**, 51-63.
- Piguet V., Wan L., Borel C., Mangasarian A., Demaurex N., Thomas G. and Trono D. (2000) HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nat Cell Biol* **2**, 163-7.
- Pitcher C., Honing S., Fingerhut A., Bowers K. and Marsh M. (1999) Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Mol Biol Cell* **10**, 677-91.
- Plantier J.-C., Leoz M., Dickerson J. E., De Oliveira F., Cordonnier F., Lemée V., Damond F., Robertson D. L. and Simon F. (2009) A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine* **15**, 871-872.
- Poe J. A. and Smithgall T. E. (2009) HIV-1 Nef Dimerization Is Required for Nef-Mediated Receptor Downregulation and Viral Replication. *Journal of Molecular Biology* **394**, 329-342.
- Pokrovskii V. V., Iankina Z. K. and Pokrovskii V. I. (1987) [Epidemiological investigation of the first case of AIDS detected in a citizen of the USSR]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 8-11.
- Popovic M., Sarngadharan M. G., Read E. and Gallo R. C. (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500.
- Porter R. R. (1973) Structural studies of immunoglobulins. *Science* **180**, 713-6.
- Potterton L., McNicholas S., Krissinel E., Gruber J., Cowtan K., Emsley P., Murshudov G. N., Cohen S., Perrakis A. and Noble M. (2004) Developments in the CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2288-94.
- Poulsen T. R., Jensen A., Haurum J. S. and Andersen P. S. (2011) Limits for antibody affinity maturation and repertoire diversification in hypervaccinated humans. *Journal of Immunology* **187**, 4229-35.
- Proba K., Worn A., Honegger A. and Pluckthun A. (1998) Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J Mol Biol* **275**, 245-53.
- Quaranta M. G., Falzano L., Vincentini O., Fiorentini C., Giordani L. and Viora M. (2011) Effects of HIV-1 Nef on virus co-receptor expression and cytokine release in human bladder, laryngeal, and intestinal epithelial cell lines. *Viral Immunol* **24**, 245-50.
- Ratner L., Haseltine W., Patarca R., Livak K. J., Starcich B., Josephs S. F., Doran E. R., Rafalski J. A., Whitehorn E. A., Baumeister K., Ivanoff L., Petteway S. R., Pearson M. L., Lautenberger J. A., Papas T. S., Ghayeb J., Chang N. T., Gallo R. C. and Wongstaal F. (1985) Complete Nucleotide-Sequence of the Aids Virus, Htlv-Iii. *Nature* **313**, 277-284.
- Rauch S., Pulkkinen K., Saksela K. and Fackler O. T. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 Nef recruits the guanine exchange factor Vav1 via an unexpected interface into plasma membrane microdomains for association with p21-activated kinase 2 activity. *J Virol* **82**, 2918-29.
- Ren R., Mayer B. J., Cicchetti P. and Baltimore D. (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**, 1157-61.

- Renkema G. H., Manninen A., Mann D. A., Harris M. and Saksela K. (1999) Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Current Biology* **9**, 1407-1410.
- Resh M. D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**, 1-16.
- Reth M. (1989) Antigen Receptor Tail Clue. *Nature* **338**, 383-384.
- Rhee S. S. and Marsh J. W. (1994) Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. *J Virol* **68**, 5156-63.
- Robey W. G., Safai B., Oroszlan S., Arthur L. O., Gonda M. A., Gallo R. C. and Fischinger P. J. (1985) Characterization of Envelope and Core Structural Gene-Products of Htlv-III with Sera from Aids Patients. *Science* **228**, 593-595.
- Robinson M. S. (1994) The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 538-44.
- Roeth J. F. (2004) HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *The Journal of Cell Biology* **167**, 903-913.
- Rondon I. J. and Marasco W. A. (1997) Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases. *Annu Rev Microbiol* **51**, 257-83.
- Roskoski R., Jr. (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 1155-64.
- Ross T. M., Oran A. E. and Cullen B. R. (1999) Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Current Biology* **9**, 613-621.
- Rossi F., Gallina A. and Milanese G. (1996) Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system. *Virology* **217**, 397-403.
- Roux K. H., Greenberg A. S., Greene L., Strelets L., Avila D., McKinney E. C. and Flajnik M. F. (1998) Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 11804-11809.
- Rudnick D. A., McWherter C. A., Gokel G. W. and Gordon J. I. (1993) MyristoylCoA:protein N-myristoyltransferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **67**, 375-430.
- Saksela K., Cheng G. and Baltimore D. (1995) 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**, 484-91.
- Salemi M., Strimmer K., Hall W. W., Duffy M., Delaporte E., Mboup S., Peeters M. and Vandamme A. M. (2001) Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J* **15**, 276-8.
- Sampalis J., Strawczynski H., Gold P. and Tsoukas C. M. (1993) Long term survival with HIV: ten year (1982-1992) prospective study of a hemophilia cohort before and after exposure to HIV. *Int Conf AIDS, Berlin* **9**.
- Sanchezpescador R., Power M. D., Barr P. J., Steimer K. S., Stempien M. M., Brownshimer S. L., Gee W. W., Renard A., Randolph A., Levy J. A., Dina D. and Luciw P. A. (1985) Nucleotide-Sequence and Expression of an Aids-Associated Retrovirus (Arv-2). *Science* **227**, 484-492.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Saravolatz L. D., Winslow D. L., Collins G., Hodges J. S., Pettinelli C., Stein D. S., Markowitz N., Reves R., Loveless M. O., Crane L., Thompson M. and Abrams D. (1996) Zidovudine alone or in combination with didanosine or zalcitabine in HIV-infected patients with the acquired immunodeficiency syndrome or fewer than 200 CD4 cells per cubic millimeter. Investigators for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *N Engl J Med* **335**, 1099-106.
- Sarmady M., Dampier W. and Tozeren A. (2011) Sequence- and interactome-based prediction of viral protein hotspots targeting host proteins: a case study for HIV Nef. *PLoS One* **6**, e20735.
- Sattentau Q. J. and Weiss R. A. (1988) The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* **52**, 631-3.
- Sauter D., Specht A. and Kirchhoff F. (2010) Tetherin: holding on and letting go. *Cell* **141**, 392-8.
- Sauter D., Vogl M. and Kirchhoff F. (2011) Ancient origin of a deletion in human BST2/Tetherin that confers protection against viral zoonoses. *Hum Mutat* **32**, 1243-5.
- Sawai E. T., Baur A., Struble H., Peterlin B. M., Levy J. A. and Cheng-Mayer C. (1994) Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1539-43.

- Sawai E. T., Baur A. S., Peterlin B. M., Levy J. A. and Cheng-Mayer C. (1995) A conserved domain and membrane targeting of Nef from HIV and SIV are required for association with a cellular serine kinase activity. *J Biol Chem* **270**, 15307-14.
- Schaefer T. M., Bell I., Fallert B. A. and Reinhart T. A. (2000) The T-cell receptor zeta chain contains two homologous domains with which simian immunodeficiency virus Nef interacts and mediates down-modulation. *J Virol* **74**, 3273-83.
- Schaefer T. M., Bell I., Pfeifer M. E., Ghosh M., Tribble R. P., Fuller C. L., Ashman C. and Reinhart T. A. (2002) The Conserved Process of TCR/CD3 Complex Down-Modulation by SIV Nef Is Mediated by the Central Core, Not Endocytic Motifs. *Virology* **302**, 106-122.
- Scheppler J. A., Nicholson J. K., Swan D. C., Ahmed-Ansari A. and McDougal J. S. (1989) Down-modulation of MHC-I in a CD4+ T cell line, CEM-E5, after HIV-1 infection. *Journal of Immunology* **143**, 2858-66.
- Schiffer M., Girling R. L., Ely K. R. and Edmundson A. B. (1973) Structure of a lambda-type Bence-Jones protein at 3.5-A resolution. *Biochemistry* **12**, 4620-31.
- Schindler M., Münch J., Kutsch O., Li H., Santiago M. L., Bibollet-Ruche F., Müller-Trutwin M. C., Novembre F. J., Peeters M., Cournaud V., Bailes E., Roques P., Sodora D. L., Silvestri G., Sharp P. M., Hahn B. H. and Kirchhoff F. (2006) Nef-Mediated Suppression of T Cell Activation Was Lost in a Lentiviral Lineage that Gave Rise to HIV-1. *Cell* **125**, 1055-1067.
- Schwartz O., Marechal V., LeGall S., Lemonnier F. and Heard J. M. (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine* **2**, 338-342.
- Shin J., Doyle C., Yang Z., Kappes D. and Strominger J. L. (1990) Structural features of the cytoplasmic region of CD4 required for internalization. *EMBO J* **9**, 425-34.
- Shin J., Dunbrack R. L., Jr., Lee S. and Strominger J. L. (1991) Phosphorylation-dependent down-modulation of CD4 requires a specific structure within the cytoplasmic domain of CD4. *J Biol Chem* **266**, 10658-65.
- Silva F. A. d., Santa-Marta M., Freitas-Vieira A., Mascarenhas P., Barahona I., Moniz-Pereira J., Gabuzda D. and Goncalves J. (2004) Camelized Rabbit-derived VH Single-domain Intrabodies Against Vif Strongly Neutralize HIV-1 Infectivity. *Journal of Molecular Biology* **340**, 525-542.
- Simoes E. A., Babu P. G., John T. J., Nirmala S., Solomon S., Lakshminarayana C. S. and Quinn T. C. (1987) Evidence for HTLV-III infection in prostitutes in Tamil Nadu (India). *Indian J Med Res* **85**, 335-8.
- Simon F., Mauclore P., Roques P., Loussert-Ajaka I., Muller-Trutwin M. C., Saragosti S., Georges-Courbot M. C., Barre-Sinoussi F. and Brun-Vezinet F. (1998) Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **4**, 1032-7.
- Singh R. K., Lau D., Noviello C. M., Ghosh P. and Guatelli J. C. (2009) An MHC-I Cytoplasmic Domain/HIV-1 Nef Fusion Protein Binds Directly to the mu Subunit of the AP-1 Endosomal Coat Complex. *PLoS One* **4**.
- Sodroski J., Goh W. C., Rosen C., Tartar A., Portetelle D., Burny A. and Haseltine W. (1986) Replicative and Cytopathic Potential of Htlv-ii/Lav with Sor Gene Deletions. *Science* **231**, 1549-1553.
- Sodroski J., Patarca R., Rosen C., Wongstaal F. and Haseltine W. (1985) Location of the Trans-Activating Region on the Genome of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-ii. *Science* **229**, 74-77.
- Spinelli S., Desmyter A., Frenken L., Verrips T., Tegoni M. and Cambillau C. (2004) Domain swapping of a llama VHH domain builds a crystal-wide beta-sheet structure. *FEBS Lett* **564**, 35-40.
- Srivastava K. K., Fernandez-Larsson R., Zinkus D. M. and Robinson H. L. (1991) Human immunodeficiency virus type 1 NL4-3 replication in four T-cell lines: rate and efficiency of entry, a major determinant of permissiveness. *J Virol* **65**, 3900-2.
- Strebel K., Daugherty D., Clouse K., Cohen D., Folks T. and Martin M. A. (1987) The Hiv a (Sor) Gene-Product Is Essential for Virus Infectivity. *Nature* **328**, 728-730.
- Strebel K., Klimkait T. and Martin M. A. (1988) A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* **241**, 1221-3.
- Sun G., Sharma A. K. and Budde R. J. (1998) Autophosphorylation of Src and Yes blocks their inactivation by Csk phosphorylation. *Oncogene* **17**, 1587-95.
- Superti-Furga G. (1995) Regulation of the Src protein tyrosine kinase. *FEBS Lett* **369**, 62-6.
- Swigut T., Greenberg M. and Skowronski J. (2003) Cooperative Interactions of Simian Immunodeficiency Virus Nef, AP-2, and CD3- Mediate the Selective Induction of T-Cell Receptor-CD3 Endocytosis. *Journal of Virology* **77**, 8116-8126.

- ter Haar E., Harrison S. C. and Kirchhausen T. (2000) Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1096-100.
- Thanos C. D., Randal M. and Wells J. A. (2003) Potent small-molecule binding to a dynamic hot spot on IL-2. *J Am Chem Soc* **125**, 15280-1.
- Thomas S. M. and Brugge J. S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 513-609.
- Toki H., Okabe K., Kimura Y., Moriwaki S., Ikegami N., Tsuchie H., Kurimura T., Fujishita M. and Miyoshi I. (1986) Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in a Japanese haemophiliac: report of a case. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi* **49**, 991-4.
- Tsai C. J., Lin S. L., Wolfson H. J. and Nussinov R. (1997) Studies of protein-protein interfaces: A statistical analysis of the hydrophobic effect. *Protein Science* **6**, 53-64.
- Unanue E. R., Ungewickell E. and Branton D. (1981) The binding of clathrin triskelions to membranes from coated vesicles. *Cell* **26**, 439-46.
- Ungewickell E. and Branton D. (1981) Assembly units of clathrin coats. *Nature* **289**, 420-2.
- Ungur-Waron H., Elias E., Gluckman A. and Trainin Z. (1987) Dromedary IgG: purification, characterization and quantitation in sera of dams and newborns. *Isr. J. Vet. Med* **43**, 198-203.
- Valkov E., Sharpe T., Marsh M., Greive S. and Hyvonen M. (2012) Targeting protein-protein interactions and fragment-based drug discovery. *Top Curr Chem* **317**, 145-79.
- Vallari A., Holzmayer V., Harris B., Yamaguchi J., Ngansop C., Makamche F., Mbanya D., Kaptue L., Ndembi N., Gurtler L., Devare S. and Brennan C. A. (2011) Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol* **85**, 1403-7.
- Veillette A., Bookman M. A., Horak E. M. and Bolen J. B. (1988) The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**, 301-8.
- Veillette A., Bookman M. A., Horak E. M., Samelson L. E. and Bolen J. B. (1989) Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature* **338**, 257-9.
- Vu K. B., Ghahroudi M. A., Wyns L. and Muyldermans S. (1997) Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol* **34**, 1121-31.
- Walsh M. B. and Calabrese L. H. (1992) Rapid progression of HIV-1 infection to AIDS. *Cleve Clin J Med* **59**, 637-9.
- Wang Y. J., Wang J., Sun H. Q., Martinez M., Sun Y. X., Macia E., Kirchhausen T., Albanesi J. P., Roth M. G. and Yin H. L. (2003) Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299-310.
- Ward E. S., Gussow D., Griffiths A. D., Jones P. T. and Winter G. (1989) Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from Escherichia-Coli. *Nature* **341**, 544-546.
- Weiss A. and Littman D. R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263-74.
- Wells J. A. (1991) Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces. *Methods Enzymol* **202**, 390-411.
- Wertheim J. O. and Worobey M. (2009) Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS Comput Biol* **5**, e1000377.
- Whitmore L. and Wallace B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, W668-73.
- Williams M., Roeth J. F., Kasper M. R., Filzen T. M. and Collins K. L. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Nef domains required for disruption of major histocompatibility complex class I trafficking are also necessary for coprecipitation of Nef with HLA-A2. *J Virol* **79**, 632-6.
- Wimley W. C. and White S. H. (1996) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol* **3**, 842-8.
- Winn M. D., Ballard C. C., Cowtan K. D., Dodson E. J., Emsley P., Evans P. R., Keegan R. M., Krissinel E. B., Leslie A. G., McCoy A., McNicholas S. J., Murshudov G. N., Pannu N. S., Potterton E. A., Powell H. R., Read R. J., Vagin A. and Wilson K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 235-42.
- Winter G., Griffiths A. D., Hawkins R. E. and Hoogenboom H. R. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* **12**, 433-55.
- Wiskerchen M. and Cheng-Mayer C. (1996) HIV-1 Nef association with cellular serine kinase correlates with enhanced virion infectivity and efficient proviral DNA synthesis. *Virology* **224**, 292-301.

- Wolf D., Giese S. I., Witte V., Krautkrämer E., Trapp S., Sass G., Haller C., Blume K., Fackler O. T. and Baur A. S. (2008) Novel (n)PKC kinases phosphorylate Nef for increased HIV transcription, replication and perinuclear targeting. *Virology* **370**, 45-54.
- Wonderlich E. R., Williams M. and Collins K. L. (2007) The Tyrosine Binding Pocket in the Adaptor Protein 1 (AP-1) 1 Subunit Is Necessary for Nef to Recruit AP-1 to the Major Histocompatibility Complex Class I Cytoplasmic Tail. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 3011-3022.
- Woolley D. W. and Merrifield R. B. (1963) Anomalies of the structural specificity of peptides. *Ann N Y Acad Sci* **104**, 161-71.
- Worobey M., Telfer P., Souquiere S., Hunter M., Coleman C. A., Metzger M. J., Reed P., Makuwa M., Hearn G., Honarvar S., Roques P., Apetrei C., Kazanji M. and Marx P. A. (2010) Island biogeography reveals the deep history of SIV. *Science* **329**, 1487.
- Wucherpennig K. W., Gagnon E., Call M. J., Huseby E. S. and Call M. E. (2010) Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a005140.
- Yamamoto T., Miyoshi H., Yamamoto N., Inoue J. and Tsunetsugu-Yokota Y. (2006) Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages. *Blood* **108**, 3305-12.
- Ye H. H., Choi H. J., Poe J. and Smithgall T. E. (2004) Oligomerization is required for HIV-1 nef-induced activation of the Src family protein-tyrosine kinase, Hck. *Biochemistry* **43**, 15775-15784.
- Yu H., Chen J. K., Feng S., Dalgarno D. C., Brauer A. W. and Schreiber S. L. (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**, 933-45.
- Zhang J., Adrián F. J., Jahnke W., Cowan-Jacob S. W., Li A. G., Iacob R. E., Sim T., Powers J., Dierks C., Sun F., Guo G.-R., Ding Q., Okram B., Choi Y., Wojciechowski A., Deng X., Liu G., Fendrich G., Strauss A., Vajpai N., Grzesiek S., Tuntland T., Liu Y., Bursulaya B., Azam M., Manley P. W., Engen J. R., Daley G. Q., Warmuth M. and Gray N. S. (2010) Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature* **463**, 501-506.
- Zheng Y. Y. (1988) [First case of AIDS diagnosed in China]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **68**, 5-6.
- Zhou H., Xu M., Huang Q., Gates A. T., Zhang X. D., Castle J. C., Stec E., Ferrer M., Strulovici B., Hazuda D. J. and Espeseth A. S. (2008) Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* **4**, 495-504.
- Zhu T., Korber B. T., Nahmias A. J., Hooper E., Sharp P. M. and Ho D. D. (1998) An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594-7.

Ich danke.....

PD Dr. Matthias Geyer für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation, indem er stets für Anregungen und Diskussionen offen war und mit Begeisterung für das bearbeitete Forschungsgebiet den Fortschritt der Arbeit mit Interesse verfolgte.

Prof. Dr. Martin Engelhard für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens.

Prof. Dr. Roger Goody für die Aufnahme in seine Abteilung.

Prof. Dr. Roland Winter für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Ingrid Vetter für die große Hilfsbereitschaft bei Problemen in der Proteinkristallographie.

Georg Holtermann und allen Mitgliedern der Kristallographie-Gemeinschaft der Max-Planck-Institute Dortmund und Heidelberg für die Aufnahme der Datensätze am Synchrotron und für die Hilfsbereitschaft.

Bernhard Griewel für die Betreuung der NMR-Spektrometer und der Aufnahme der HSQC-Spektren dieser Dissertation.

Karin Vogel-Bachmayr für die exzellente Klonierung zahlreicher Konstrukte.

Sascha Gentz für die hervorragende Synthese von Peptiden.

Meinen Arbeitsgruppenkollegen Ann Katrin, Christian, Conny, Dana, Diana, Florian, Friederike, Janna, Kanchan, Karl-Heinz, Nadine, Santiago und Sonja für die nette Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Unterstützung im Laboralltag und für eine sehr schöne Zeit in der AG Geyer.

Meinen europäischen Kooperationspartnern innerhalb des früheren iNEF-Konsortiums, und darin besonders Prof. Dr. Bruno Verhasselt (Universität Gent, Belgien) für die Organisation des Konsortiums und der HIV Konferenz in Rom sowie Prof. Serge Benichou (Institut Cochin, Paris), Dr Jérôme Bouchet (Institut Pasteur, Paris), Prof. Dr. Kalle Saksela und Annika Järviluoma (beide Universität Helsinki) für die Kooperation im sdAb19/Neffin-Projekt.

Der gesamten Abteilung III für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sowie Franziska Tesche (Abt. II) für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

Der Fakultät für Chemie für die Möglichkeit der Promotion an der TU Dortmund.

Meinen Eltern und Nadja für die uneingeschränkte Unterstützung, den Rückhalt und die Geduld und meiner ersten Biologielehrerin Frau Kurtz, die in mir das Interesse an den Naturwissenschaften geweckt hat.

Eidesstattliche Erklärung

Die selbstständige und eigenhändige Anfertigung dieser Dissertation versichere ich an Eides statt.

X

S. Lülff

Sebastian Lülff