

# 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<sub>B6</sub>) 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<sub>3B6</sub>-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<sub>3B6</sub> 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.