



# **Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Nef-Proteins aus HIV**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fakultät III –  
Biologie und vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Jacqueline Schorr aus Illingen / Saar

2001

---

Promotionsgesuch eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

Prüfungsausschuß:

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Kalbitzer

2. Gutachter: Prof. Dr. Modrow

---

**Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:**

Jacqueline Schorr, Roland Kellner, Oliver Fackler, Jens Freund, Jan Konvalinka, Norbert Kienzle, Hans-Georg Kräusslich, Nikolaus Müller-Lantzsch und Hans Robert Kalbitzer (1996), Specific Cleavage Sites of Nef Proteins from Human Immunodeficiency Virus Types 1 and 2 for the Viral Proteases. *Journal of Virology* 70, 9051-9054.

Matthias Geyer, Claudia E. Munte, Jacqueline Schorr, Roland Kellner und Hans Robert Kalbitzer (1999), Structure of the Anchor-Domain of Myristoylated and Non-myristoylated HIV-1 Nef Protein. *Journal of Molecular Biology* 289, 123-138.



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Pandemie AIDS	1
1.2	Morphologie	2
1.3	Replikationszyklus	3
1.4	Genom und Genprodukte	6
1.5	Nef	9
1.6	Zielsetzung der Arbeit	14
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>15</b>
2.1	Geräte	15
2.2	Antikörper und Antiseren	16
2.3	Enzyme	17
2.4	Chemikalien	17
2.5	Zellstämme ( <i>E.coli</i> )	17
2.6	HIV-Isolate	18
2.7	Nef-Konstrukte	18
2.8	Protein-Molekulargewichtsmarker	19
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>19</b>
3.1	Molekularbiologische Techniken	19
3.1.1	Plasmidaufreinigung	19
3.1.2	Konzentrationsbestimmung	19
3.1.3	Agarose-Gel	20
3.1.4	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	20
3.1.5	5' Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	20
3.1.6	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	20
3.1.7	Ligation	20
3.1.8	Synthese von Oligodesoxynukleotiden	21

---

3.1.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	21
3.1.10	DNA-Sequenzierung .....	21
<b>3.2</b>	<b>Bakterienkulturen.....</b>	<b>21</b>
3.2.1	Herstellen kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen .....	21
3.2.2	Transformation.....	21
3.2.3	Aufbewahren von <i>E.coli</i> -Zellen.....	22
3.2.4	Induktion und Fermentation rekombinanter Proteine aus <i>E.coli</i> .....	22
<b>3.3</b>	<b>Biochemische Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.3.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	23
3.3.2	Konzentrierung von Proteinen .....	23
3.3.3	Lyophilisation .....	23
3.3.4	HIV-1 Nef .....	23
3.3.5	HIV-2 Nef .....	25
3.3.6	Proteolyse von HIV-1 Nef mit der HIV-1/-2 Protease .....	26
3.3.7	Aktin .....	26
<b>3.4</b>	<b>Biophysikalische Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.4.1	Sedimentation .....	27
3.4.2	Viskositätsmessung .....	27
3.4.3	Fluoreszenzmessung .....	27
3.4.4	Kinetische Untersuchungen mittels Stopped-Flow.....	28
3.4.5	Mikrokalorimetrie .....	28
3.4.6	Elektronenmikroskopie .....	28
3.4.7	Kernspinresonanz-Spektroskopie .....	29
3.4.8	Kristallisation.....	30
<b>3.5</b>	<b>Proteinnachweistechiken.....</b>	<b>30</b>
3.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	30
3.5.2	Western-Blot .....	31
3.5.3	Protein-Overlay .....	31
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Strukturelle Charakterisierung von HIV-1 Nef.....</b>	<b>32</b>
4.1.1	Chemische Modifizierung.....	32
4.1.2	N15-Markierung .....	33
4.1.3	Renaturierung von Nef.....	35
4.1.4	Kristallisation.....	36
<b>4.2</b>	<b>Nef-Phosphorylierung .....</b>	<b>37</b>
4.2.1	Phosphor-NMR .....	37
4.2.2	Western-Blot .....	38

<b>4.3</b>	<b>Proteolytische Spaltung.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Nef-Aktin Interaktionen.....</b>	<b>42</b>
4.4.1	Sedimentation .....	43
4.4.2	Mikrokalorimetrie .....	44
4.4.3	Einfluß von Nef auf die Aktinpolymerisation .....	46
4.4.4	Fluor-NMR .....	48
4.4.5	Elektronenmikroskopie .....	49
<b>4.5</b>	<b>Rac, Rho und Cdc42 Interaktionen.....</b>	<b>50</b>
<b>4.6</b>	<b>Nef-Myosin Interaktionen.....</b>	<b>51</b>
4.6.1	Qualitative Untersuchung mittels Fluoreszenztitration .....	51
4.6.2	Kinetische Untersuchung mittels Stopped-Flow .....	52
4.6.3	Sedimentation .....	52
4.6.4	Fluor-NMR .....	53
<b>4.7</b>	<b>Nef-Calmodulin Interaktionen .....</b>	<b>53</b>
4.7.1	Protein-Overlay.....	54
4.7.2	Qualitative Untersuchungen mittels Fluoreszenz .....	55
4.7.3	Kinetische Untersuchungen mittels Stopped-Flow.....	57
<b>4.8</b>	<b>Weitere mögliche Interaktionspartner .....</b>	<b>59</b>
<b>4.9</b>	<b>Expression und Reinigung des HIV-2 Nef<sub>HOM</sub> .....</b>	<b>59</b>
<b>4.10</b>	<b>Klonierung und Expression des HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Strukturelle Eigenschaften von HIV-1 Nef .....</b>	<b>65</b>
<b>5.2</b>	<b>Wechselwirkungen und mögliche Funktionen von Nef.....</b>	<b>66</b>
5.2.1	Wechselwirkung mit Aktin.....	66
5.2.2	Wechselwirkungen mit G-Proteinen.....	69
5.2.3	Wechselwirkungen mit Myosin .....	69
5.2.4	Wechselwirkung mit Calmodulin .....	70
5.2.5	Nef ein MARCKS-Protein? .....	71
5.2.6	Wechselwirkungen mit RT und IN.....	72
<b>5.3</b>	<b>Proteolytische Spaltung von Nef.....</b>	<b>72</b>
<b>5.4</b>	<b>HIV-2 Nef.....</b>	<b>73</b>
5.4.1	Expression und Reinigung von HIV-2 Nef <sub>HOM</sub> .....	73
5.4.2	Klonierung und Expression von HIV-2 Nef <sub>ALT</sub> .....	73

---

<b>5.5</b>	<b>Phosphorylierung.....</b>	<b>74</b>
5.5.1	Serinphosphorylierung.....	75
5.5.2	Tyrosinphosphorylierung.....	75
<b>6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>86</b>
<b>8.1</b>	<b>Aminosäuresequenzen von Nef.....</b>	<b>86</b>
8.1.1	Nef aus dem HIV-2-Stamm ALT .....	86
8.1.2	Nef aus dem HIV-2-Stamm HOM.....	86
8.1.3	Nef aus dem HIV-1-Stamm BRU .....	86
<b>8.2</b>	<b>Aminosäuresequenz von Muskelaktin aus Kaninchen.....</b>	<b>87</b>
<b>8.3</b>	<b>Aminosäuresequenz der Motordomäne M761 aus <i>Dictyostelium discoideum</i>. .....</b>	<b>87</b>
<b>8.4</b>	<b>Aminosäuresequenz von Calmodulin aus <i>Dictyostelium discoideum</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>8.5</b>	<b>Die NMR-Struktur von Nef .....</b>	<b>88</b>
<b>8.6</b>	<b>Vektoren .....</b>	<b>89</b>
8.6.1	pET-22 .....	89
8.6.2	pQE-30.....	90
<b>8.7</b>	<b>Sequenzvergleich Nef / MARCKS.....</b>	<b>91</b>

---

## Abkürzungen:

$\mu$	mikro-
$^{15}\text{N}$	Stickstoff-15
$^{19}\text{F}$	Fluor-19
1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
$^{31}\text{P}$	Phosphor-31
AP	Adapter Protein
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
cDNA	copy-DNA
C-Terminus	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
$\text{D}_2\text{O}$	Deuteriumoxid
Da	Dalton
DMAB	Dimethylamino-Boran-Komplex
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSS	4,4-Dimethyl-4-silapentansulfonsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylen glycol-bis(beta-aminoethy ether)-N,N,N',N'-tetraacetic Säure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
G-Aktin	Globuläres Aktin
h	Stunde
$\text{H}_2\text{O}$	Wasser
HIV	Human Immunodeficiency Virus

---

Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
K	Kelvin
kb	Kilobasenpaare
kcal	Kilokalorie
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
LB	Luria Broth
M	molar
mA	Milliampere
mant	N-methylantranioyl-
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
mM	millimolar
mRNA	messenger-RNA
Nef-Anker	Anker-Domäne von Nef
Nef-Core	Zentraldomäne von Nef
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
N-Terminus	Aminoterminal Ende einer Polypeptidkette
OD	Optische Dichte
ori	Plasmidursprung (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFP	4-perfluoro-tert.-butyl-phenyliodoacetamid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	Millionstel Teil (Parts Per Million; $10^{-6}$ )
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase

---

s	Sekunde
SCID	severe combined immunodeficient
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SH2/SH3	Src (-Kinase)-homologe Protein Domäne
TAE	Tris acetic acid
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt bzw. Volumen
Wt	Wildtyp
$\lambda$	Wellenlänge

### **Abkürzungen der Aminosäuren (Ein- und Dreibuchstabencode):**

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## Zusammenfassung

AIDS ist eine neuzeitliche Infektionskrankheit, die seit ihrer Entdeckung vor 20 Jahren noch immer nicht heilbar ist. Die Krankheit wird durch das HIV-Virus verursacht, das aus Patienten in allen Teilen der Welt isoliert werden konnte. Bisher sind zwei HIV-Stämme, HIV-1 und HIV-2, bekannt.

Das HIV-Virus ist ein in hohem Maße optimiertes System, das mit nur wenigen Genen absolut effizient funktioniert. Dabei erfüllt jedes virale Protein *in vivo* eine für das Virus notwendige Funktion und stellt somit einen potentiellen Angriffspunkt im Kampf gegen AIDS dar. Aufgrund seiner Schlüsselfunktion für die Pathogenität von HIV ist besonders das virale Nef-Protein ein attraktives Ziel für antivirale Strategien.

Es war Ziel dieser Arbeit, strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Nef-Proteins aufzuklären und potentielle Interaktionspartner zu identifizieren.

Das Nef-Protein kann strukturell in zwei Domänen eingeteilt werden: die N-terminale Anker-Domäne und daran anschließend die Nef-Core-Domäne. In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl das gesamte HIV-1 Nef als auch das N-terminal um 57 Aminosäuren verkürzte HIV-1 Nef-Core erfolgreich in Minimalmedium  $^{15}\text{N}$ -markiert und im Milligramm-Maßstab mit einer Reinheit von mindestens 95% isoliert werden. Das verwendete Minimalmedium wurde auch für eine  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  Doppelmarkierung optimiert.

Gereinigtes isotoopenmarkiertes Nef-Protein wurde in 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Messungen eingesetzt. In diesen NMR-Spektren waren fast alle Signale des Proteins zu erkennen und somit eine wichtige Voraussetzung für eine Strukturaufklärung gegeben. Das  $^{15}\text{N}$ -markierte Nef-Protein wurde auch unterstützend für die NMR-Strukturaufklärung der N-terminalen Anker-Domäne des Nef-Proteins eingesetzt. Die NMR-Experimente des myristoylierten Ankers zeigen, daß dieser Teil des Nef-Proteins relativ ungefaltet und mit Ausnahme einiger kurzer helikaler Elemente gestreckt vorliegt. Die N-terminale Myristinsäure trägt zu einer Stabilisierung dieser helikalen Elemente bei. Zusätzlich wurde das Nef-Protein erfolgreich in Form einer Acetylierung modifiziert, um eine höhere Proteinkonzentration von mehr als 0,4 mM zu ermöglichen.

Dem Nef-Protein werden distinkte Funktionen zugeschrieben. Die molekularen Mechanismen, die diesen Funktionen zugrunde liegen, sind noch zum Teil unbekannt. Nef verfügt nicht über enzymatische Aktivitäten und ist auf zelluläre Interaktionspartner angewiesen. Zu Beginn dieser Arbeit waren für das Nef-Protein keine Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen bekannt. Deshalb wurde Nef im weiteren Verlauf der Arbeit mit verschiedenen biochemischen und biophysikalischen Methoden auf sein Bindungsverhalten bezüglich potentieller Interaktionspartner untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei neue Bindungspartner für Nef identifiziert: Aktin, Myosin und Calmodulin. Die Auswertungen der unterschiedlichen Meßserien zeigten, daß Nef eine mittelstarke Affinität im Bereich von etwa 10  $\mu\text{M}$  zu F-Aktin besitzt und mit steigender Konzentration die Polymerisation des Aktins verlangsamt.



Für die Wechselwirkung mit Calmodulin wurden Werte im nieder-mikromolaren bis nanomolaren Bereich erhalten, die für eine starke Bindung der beiden Proteine sprechen. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Calmodulin-Bindung Calcium-abhängig ist. Für Myosin ergaben sich in Fluoreszenzmessungen erste Hinweise für eine Wechselwirkung mit Nef. Eine nähere Charakterisierung der Nef-Myosin Interaktion steht noch aus.

Mit diesen neu identifizierten Nef-Interaktionspartnern wird es künftig interessant sein zu klären, ob sie *in vivo* eine oder mehrere biologisch relevante Funktionen vermitteln. Es stellt sich dabei die Frage, ob alle drei Proteine mit Nef zusammen in einem Komplex nur einen Effekt bewirken oder ob Nef mit den Proteinen mehrere von einander unabhängige Funktionen ausübt. Es ist nicht auszuschließen, daß für die ein oder andere Funktion noch ein weiterer wichtiger zellulärer Faktor hinzukommen wird.

Aus früheren Versuchen war bekannt, daß sowohl HIV-1 als auch HIV-2 Nef spezifisch von der viralen Protease in zwei Domänen, die N-terminale Anker-Domäne und die C-terminale Core-Domäne gespalten werden. Da das Nef-Protein in eukaryontischen Zellen myristoyliert vorliegt, wurde der Einfluß dieser Myristoylierung auf die proteolytische Spaltung von HIV-1 Nef durch die HIV-1 Protease untersucht. Die Ergebnisse der Proteolysestudien zeigten, daß die Myristinsäure die proteolytische Spaltung nicht beeinflußt. Ferner zeigte sich, daß HIV-1 Nef auch von der HIV-2 Protease gespalten wird, wenn auch weniger spezifisch.

Für eine Charakterisierung des Nef-Proteins aus HIV-2 wurde innerhalb dieser Arbeit die Expression des Nef-Proteins und der N-terminal verkürzten Nef-Core-Domäne aus dem Stamm HOM in *E.coli* optimiert und eine dreistufige Reinigungsmethode entwickelt. Sowohl HIV-2 Nef<sub>HOM</sub> als auch HIV-2 Nef<sub>HOM</sub>-Core konnten im Milligramm-Maßstab gereinigt und in ersten strukturellen und funktionellen Testmessungen eingesetzt werden. Mittels molekularbiologischer Techniken wurde ferner ein weiteres sehr interessantes HIV-2 Nef, Nef<sub>ALT</sub>, kloniert und in *E.coli* exprimiert.

# 1 Einleitung

## 1.1 Pandemie AIDS

Infektionskrankheiten und Seuchen waren in allen Epochen und Kulturen stetige Begleiter des Menschen. In den letzten Jahrzehnten war jedoch nicht selten die Meinung anzutreffen, daß Infektionskrankheiten ihren Schrecken weitgehend verloren hätten und keine Lebensbedrohung mehr darstellten. Die Gründe für diese Sorglosigkeit lagen in den großen Erfolgen der Impfstoffentwicklung, der Verfügbarkeit von Antibiotika und in den verbesserten Hygieneverhältnissen.

Zu Beginn der achtziger Jahre wurde erstmals ein neues Krankheitsbild beschrieben, das auf keinen der bis dahin bekannten Immundefekte zurückzuführen war (Gottlieb et al., 1981). Die neue Krankheit mit den charakteristischen Kennzeichen eines stark geschwächten Immunsystems und den damit verbundenen opportunistischen Infektionen und Krebserkrankungen, an denen der Patient letztlich stirbt, wurde als „erworbenes Immunschwäche-Syndrom“ (AIDS, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) bezeichnet. In den Jahren 1983 und 1984 konnte von verschiedenen Gruppen als Verursacher von AIDS das menschliche Immundefizienz-Virus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) identifiziert werden (Barré-Sinoussie et al. 1983, Gallo et al., 1984, Popovic et al., 1984). Aufgrund morphologischer und molekularbiologischer Eigenschaften wird das Retrovirus HIV den Lentiviren, eine Subgruppe der Retroviren, zugeordnet. Die Zeitspanne von der HIV-Erstinfektion bis zum Ausbruch der Krankheit kann mehrere Jahre betragen.

Bisher sind zwei HIV-Arten bekannt, HIV-1 und HIV-2. Aber auch Rekombinanten, die genetisches Material von beiden enthalten, wurden gefunden. Haupterreger in Westeuropa sind derzeit verschiedenen Subtypen von HIV-1, während HIV-2 hauptsächlich in Afrika und Indien verbreitet ist.

Weltweit sind heute etwa 36 Millionen Menschen infiziert und die Rate an Neuinfizierten steigt jährlich weiter an. Mehr als 70% aller Infizierten leben in Afrika, südlich der Sahara. Für die Übertragung von HIV sind mehrere Infektionswege bekannt. So sind für die weltweite Verbreitung maßgeblich homo- und heterosexueller Kontakte verantwortlich. Weiterhin treten Infektionen durch den gemeinsamen Gebrauch von Injektionsnadeln bei Drogenkonsumenten, durch Transfusionen mit virusbelasteten Blutkonserven und durch Produkte auf, die der Blutgerinnung dienen. Auch die prä-, peri- oder postnatale Infektion von Kindern durch ihre infizierten Mütter ist bekannt. Verlässliche Impfstoffe sind derzeit nicht verfügbar und befinden sich wegen der hohen Variabilität des HIV-Virus noch immer im Entwicklungsstadium.

Das derzeitige Vorgehen gegen HIV umfaßt zwei Hauptstrategien: zum einen reine Präventionsmaßnahmen („safer sex“, testen von Spenderblut auf HIV-Virusbelastung, Ausgabe von sterilem Heroinbesteck) und zum anderen eine medizinische antiretrovirale Kombinationstherapie. Am effektivsten ist bisher die Dreifach (Triple)-Therapie mit einem HIV-Proteaseinhibitor und zwei nukleosidischen beziehungsweise nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (Mevissen, 2000). Mit dieser Therapieform gelingt es, die Krankheitsprogression nachhaltig aufzuhalten. Man darf jedoch nicht vergessen, daß diese teuren Therapien der großen Masse der Infizierten in den Entwicklungsländern kaum zur Verfügung stehen. Im Gegensatz zu diesen bisher verfügbaren antiretroviralen Arzneistoffen, die die Vermehrung des Virus in der Zelle blockieren, will eine neue Stoffklasse das HIV bereits außerhalb der Zelle angreifen, und so das Eindringen des Virus in seine Zielzellen verhindern. Diese Anti-HIV-Fusionshemmer sind synthetische Peptide, die an das virale Glykoprotein gp41 binden (Root, 2001, Wagner, 2000).

Als hochoptimiertes System funktioniert das HIV-Virus mit nur wenigen Genen absolut effizient. Dazu erfüllt jedes virale Protein *in vivo* eine für das Virus notwendige Funktion und stellt somit ein mögliches Ziel im Kampf gegen AIDS dar. Insbesondere ist das virale Nef-Protein (*negative factor*) aufgrund seiner essentiellen Bedeutung für die Pathogenität von HIV ein attraktives Ziel für antivirale Strategien. Das Wissen über Struktur und potentielle Nef-Interaktionspartner trägt zum besseren Verständnis der Nef-Funktionen bei. Somit ist eine funktionelle und strukturelle Charakterisierung dieses Proteins von großem Interesse und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

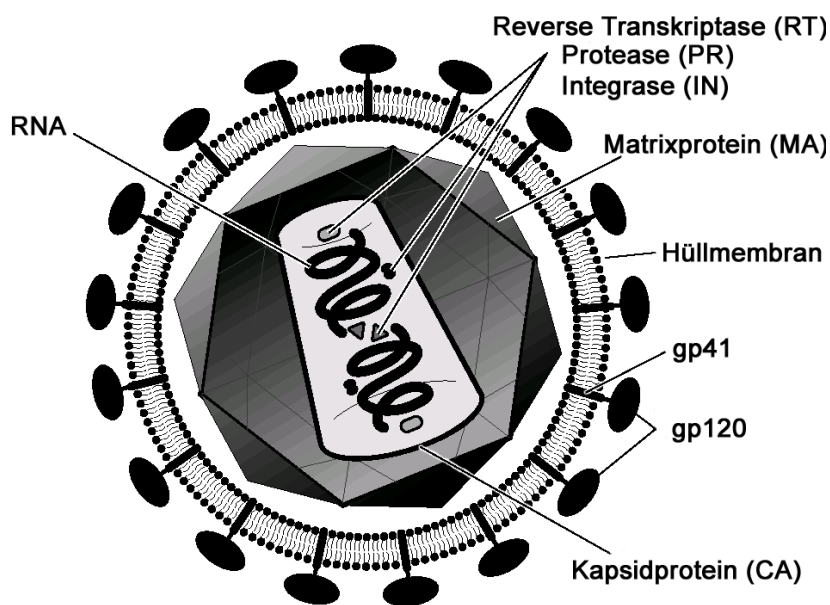
## 1.2 Morphologie

Anhand hochauflösender elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte die morphologische Struktur von HIV aufgeklärt werden (Gelderblom et al., 1987), wobei HIV-1 und HIV-2 einen sehr ähnlichen Aufbau besitzen. Bild 1.1 zeigt den schematischen Aufbau eines HIV-Partikels. Reife HIV-Viren haben einen Durchmesser von ungefähr 100 nm und bestehen aus einem zylindrischen Nukleokapsid, das von einer Lipid-Doppelmembran, der Virushülle, umgeben ist. In diese Virushülle, die infolge des Infektionszyklus von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist, sind die vom *env*-Gen (*envelope*) kodierten Glykoproteine gp41 und gp120 eingelagert.

Das Transmembranprotein gp41 ist über eine Region von etwa 20 Aminosäuren in der Membran verankert und extrazellulär mit dem gp120 Protein nicht-kovalent verbunden. Die Innenseite der Virushülle wird von einer Schicht aus Matrixproteinen (MA, p17) stabilisiert, die über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Innenseite der Virushülle verbunden sind.

Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das Nukleokapsid. Es ist aus Kapsidproteinen (CA, p24) aufgebaut und enthält zwei identische Kopien einzelsträngiger (+)RNA, die mit den RNA-Bindungsproteinen p7 und p9 in Form eines Ribonucleoprotein-

komplexes vorliegen. Die viralen RNA-Moleküle weisen mit ihrer 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryontischen mRNA auf (Modrow und Falke, 1997). Am 5'-Ende der RNA ist ein Molekül tRNA<sup>Lys</sup> hybridisiert, das als Primer für die Reverse Transkriptase fungiert. Als weitere virale Komponenten sind neben Reverser Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) auch regulatorische Proteine wie Nef, Vpu, Vpr und Vif im Virion inkorporiert (Liu et al., 1995, Welker et al., 1996, Karczewski und Strebel, 1996).



*Bild 1.1: Schematische Darstellung eines HIV-Partikels. Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das konische Kapsid, das aus den Kapsidproteinen (CA) besteht und zwei virale RNA-Genome und die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Protease (PR), und Integrase (IN) enthält. Das Kapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, welche die externen und die transmembranen Glykoproteine gp120 und gp41 enthält. Die Innenseite der Membran wird von einer Schicht Matrixprotein (MA) ausgekleidet.*

Immer mehr zelluläre Proteine wie Cyclophilin A, Aktin, zelluläre Kinasen, Ubiquitin, EFI alpha und Aminoazyl-tRNA<sup>Lys</sup>-Synthetase konnten ebenfalls als Bestandteile retroviralen Partikel nachgewiesen werden (Ott et al., 1996, Franke et al., 1994).

### 1.3 Replikationszyklus

Der erste Schritt der Virusinfektion ist das Anheften des Virus an seine Zielzelle. Schon frühzeitig konnten CD4+-T-Lymphozyten und Makrophagen als Zielzellen für HIV identifiziert werden (Gartner et al., 1986, Ho et al., 1986). Dabei weisen T-Lymphozyten die höchste Virusproduktion auf. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß das HIV-Virus je nach Stadium der Infektion unterschiedliche Affinitäten für diskrete Zellpopulationen besitzt. Demnach werden HIV-Isolate in Makrophagen-trope Viren (M-trope) und T-Zell-trope Viren (T-trope) eingeteilt (Tersmette et al., 1988, 1989a, 1989b). Im Spätstadium der Infektion stellen zunehmend CD8+ Lymphozyten

das Reservoir für HIV-Viren dar (Livingstone et al., 1996). Aber auch in weiteren Zellen des hämatopoetischen Systems, im Gehirn oder im Gastrointestinaltrakt konnten Viren nachgewiesen werden (Armstrong et al., 1984, Koenig et al., 1986).

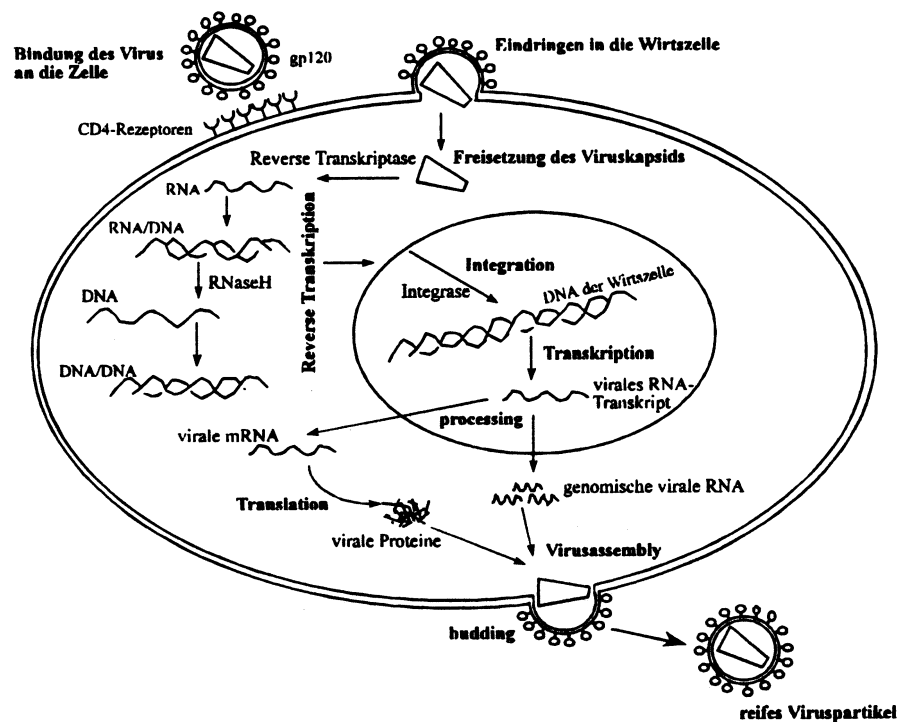
Für HIV ist der CD4-Oberflächenrezeptor der Hauptrezeptor. Aber die *in vivo* Infektion CD4-negativer Zellen ließ auf die Existenz weiterer Rezeptoren schließen. So konnten weitere, wichtige Korezeptoren wie z.B. die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 identifiziert werden, die für die Bindung und das Eindringen der Viren notwendig sind (Lapham et al., 1996, Trkola et al., 1996, Wu et al., 1996). HIV bindet über die konservierte C3 Region des Glykoproteins gp120 mit hoher Affinität an den CD4-Oberflächenrezeptor (Modrow und Falke, 1997). Dadurch kommt es innerhalb des gp120 zu einer Konformationsänderung, die hauptsächlich eine Wechselwirkung der V3 Region des gp120 mit den Korezeptoren ermöglicht (Choe et al., 1996, Bieniasz und Cullen, 1998, Cho et al., 1998, Hoffman und Doms, 1998, Hoffman et al., 1998) und das gp41 zur Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran aktiviert (Wyatt und Sodrosko, 1998). Das vollständige Kapsid gelangt so ins Zellinnere. Aber auch das Eindringen in Zielzellen in Form von Endozytose wurde für HIV berichtet (Fackler und Peterlin, 2000, Schaeffer et al., 2001).

Nachdem virale RNA und Proteine im Zytoplasma freigesetzt werden, kann die Reverse Transkriptase etwa vier bis acht Stunden nach Infektion die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umschreiben. Sie führt dabei nacheinander drei Funktionen aus: Die RNA-abhängige DNA-Synthese, die RNA-Hydrolyse und die DNA-abhängige DNA-Synthese. Als Primer für die DNA-Synthese dient die tRNA<sup>Lys</sup>, die im 5' Bereich des RNA-Genoms gebunden ist. Da die Reverse Transkriptase sehr ungenau arbeitet und keine Korrekturmöglichkeit in Form einer 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt, werden bei der DNA-Synthese mit einer Wahrscheinlichkeit von  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  falsche Basen eingebaut. Dieser Vorgang trägt zu der bei Retroviren beobachteten hohen Mutationsrate bei.

Liegt das Virusgenom als Doppelstrang-DNA vor, wird es zusammen mit viralen Proteinen, dem Matrixprotein, der Reversen Transkriptase, der Integrase, Vpr und eventuell noch weiteren, unbekannten Komponenten (Miller et al., 1997) als sogenannter Präintegrationskomplex in den Kern transportiert. Sowohl Integrase als auch Matrixprotein und Vpr können den Transport in den Kern über unabhängige Transportwege vermitteln (Gallay et al., 1996, Cullen, 1998). Während Integrase und Vpr eine Kernlokalisierungssequenz enthalten, die für den Import des Präintegrationskomplex in den Kern wichtig ist (Bouyac-Bertoia et al., 2001, Popov et al., 1998), wird der vom Matrix-Protein abhängige Transport sowohl über eine Phosphorylierung des Proteins an Tyrosinresten (Gallay et al., 1995), als auch über eine Kernlokalisierungssequenz gesteuert. Im Zellkern ermöglicht die Integrase den Einbau der DNA ins Genom. Sie wirkt dabei zuerst als Endonuklease und anschließend als Ligase. Die Integration ins Genom der Wirtszelle erfolgt an einer willkürlichen Stelle in einem transposonähnlichen Prozeß, auch wenn es Hinweisen zufolge für HIV bevorzugte Einbaustellen, z.B. nach L1- und

Alu-Sequenzen, gibt (Fackler, 1997). Der genaue Mechanismus der Integration ist aber noch weitgehend unbekannt.

Die integrierte DNA-Kopie der viralen RNA wird als Provirus bezeichnet. In dieser Form persistiert HIV lebenslang in der Wirtszelle und kann für das Immunsystem unerkannt bleiben. Wird das Provirus auf noch unbekannte Weise aktiviert, beginnt die RNA-Polymerase II der Wirtszelle die provirale DNA zu transkribieren, wobei in der frühen Phase der Genexpression mehrfach gespleißte mRNAs gebildet werden. Diese mRNAs kodieren für die frühen Proteine Tat, Rev und Nef. Die späte Phase beginnt damit, daß Tat die virale Genexpression verstärkt und Rev die Bildung ungespleißter oder einfach gespleißter mRNAs fördert. Die viralen mRNAs werden nach dem Transport ins Zytoplasma translatiert und posttranslational modifiziert. Die aminoterminal myristoylierten Gag und Gag/Pol-Vorläuferproteine werden mit Hilfe zellulärer Faktoren zur Zellmembran transportiert und beginnen sich mit weiteren Proteinkomponenten zu neuen Viruspartikel zusammenzulagern. In der Folge kommt es zum Abschnüren unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche (Bild 1.2). Die Reifung zu infektiösen Viren erfolgt durch proteolytische Spaltung der Vorläuferprodukte.



**Bild 1.2:** Der Replikationszyklus von HIV (Immendörfer, 1995). Nach dem Anheften des Virus an eine CD4-positive Zelle kommt es zum Verschmelzen von viraler Hülle und Zytoplasmamembran und das Viruskapsid gelangt ins Zellinnere. Nach dem Freisetzen der viralen RNA und der Proteine wird das virale RNA-Genom durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Im Zellkern vermittelt die Integrase den Einbau der Virus-DNA ins Zellgenom. Diese provirale DNA wird anschließend von der zelleigenen RNA-Polymerase II transkribiert und im Zytoplasma translatiert. Sobald sich die viralen Strukturproteine und akzessorischen Proteine sowie das Virusgenom an der Zytoplasmamembran zusammenlagern (Virusassembly), kommt es zur Knospung (budding) unreifer Viruspartikel. Die Reifung zu infektiösen Viren erfolgt über die Spaltung der Vorläuferprodukte.

## 1.4 Genom und Genprodukte

Während das Genom aller infektiöser Retroviren neben den flankierenden *long terminal repeat*-Sequenzen (LTR) nur aus den drei Strukturgenen *gag* (*group specific antigen*), *pol* (*polymerase*), *env* (*envelope*) besteht, weist das komplexe HIV-Genom mindestens noch sechs weitere Gene, nämlich *tat* (*transactivator of transcription*), *rev* (*regulator of expression of virion proteins*), *vif* (*virion infectivity factor*), *vpr* (*viral protein R*), *vpu* (*viral protein U*) und *nef* (*negative factor*) auf (Bild 1.3).

Die LTRs sind identische Sequenzfolgen, die im Verlauf der Reversen Transkription generiert werden. Sie bestehen aus den Regionen U3 („unique“), R („repeat“) und U5, die an den Genomenden in gleicher Orientierung vorliegen. Sie enthalten *cis*-wirkende Sequenzen wie Promoter- und Enhancer-Elemente zur Regulation der viralen Genexpression. In der U3 Region von HIV findet man z.B. Sequenzfolgen, die an NF- $\kappa$ B, ein Transaktivatorprotein, binden. Nach seiner Aktivierung leitet NF- $\kappa$ B die virale Genexpression ein. Neben NF- $\kappa$ B finden sich in der U3-Region auch Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Ap2.

Die Strukturgene *gag*, *pol* und *env* codieren für drei Vorläuferpolyproteine, GagPr55, GagPr160 und EnvPr160, die von der viralen Protease im Verlauf der Virusmorphogenese in einzelne, biologisch aktive Proteine gespalten werden.

**GagPr55** ist ein Polyprotein von 55 kDa, das die HIV-Protease zu den Matrix- (MA bzw. p17), den Kapsid- (CA bzw. p24) und den Nukleokapsidproteinen (NC bzw. p7) prozessiert. Diese Proteine sind für die Bildung der Partikel-Strukturen wichtig, üben darüberhinaus aber noch weitere Funktionen aus. Das phosphorylierte Matrixprotein p17 wird als Bestandteil des Viruspartikel bei der Infektion in die Zelle miteingebracht und fördert über seine Phosphorylierung und Kernlokalisierungssequenz den Transport des sogenannten Präintegrationskomplexes in den Zellkern. Es ermöglicht auch die HIV-Infektion ruhender Zellen. Dies ist eine Besonderheit, die HIV von den anderen Retroviren abhebt, die sich nur in teilungsaktiven Zellen replizieren. Das Kapsidprotein trägt über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus zur effizienten Virusreplikation bei. Das Nukleokapsidprotein enthält Aminosäuresequenzen, die für die Wechselwirkung mit dem RNA-Genom und die damit verbundene Bildung von stabilen RNA-Dimeren wichtig sind. Diese Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen werden durch Domänen vermittelt, die den Zinkfingermotiven der DNA-bindenden Proteine ähneln.

**GagPr160** ist ein Fusionsprotein aus Gag und Pol mit einem Molekulargewicht von 160 kDa. Gag und Pol werden von einer gemeinsamen mRNA translatiert. Das Fusionsprotein entsteht durch eine ribosomale Leseraster-Verschiebung um eine Base, die in etwa 5% der Translationseignisse stattfindet. Durch diese Verschiebung wird das Stopcodon für Gag überlesen und Gag-Pol gebildet. Von GagPr160 ausgehend werden die virale Protease (PR), die Reverse Transkriptase (RT) und die Integrase (IN) gebildet. Die virale Protease ist in ihrer aktiven Form ein Homodimer von etwa 10 kDa. Sie

ist in der Lage, sich autokatalytisch aus ihrem Vorläuferprotein herauszuschneiden. In ihrem aktiven Zentrum befinden sich zwei Asparaginsäurereste, sodaß sie als Aspartat-Protease wirkt. Die  $Mg^{2+}$ -abhängige Reverse Transkriptase vereint drei Aktivitäten in sich: RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität und eine RNaseH-Aktivität. Sie wird als p66 Homodimer gebildet. Eine dieser p66 Untereinheiten wird von der viralen Protease carboxyterminal zu p51 verkürzt, und so entsteht das aktive p66/p51 Heterodimer. Die Integrase ist ebenfalls als Dimer aktiv. Als Bestandteil des Präintegrationskomplexes bindet sie an die Enden des linearen, in DNA übersetzten Virusgenoms und bewirkt seine Integration in das Wirtsgenom. Hierfür besitzt sie sowohl Endonuclease- als auch Ligase-Aktivität.

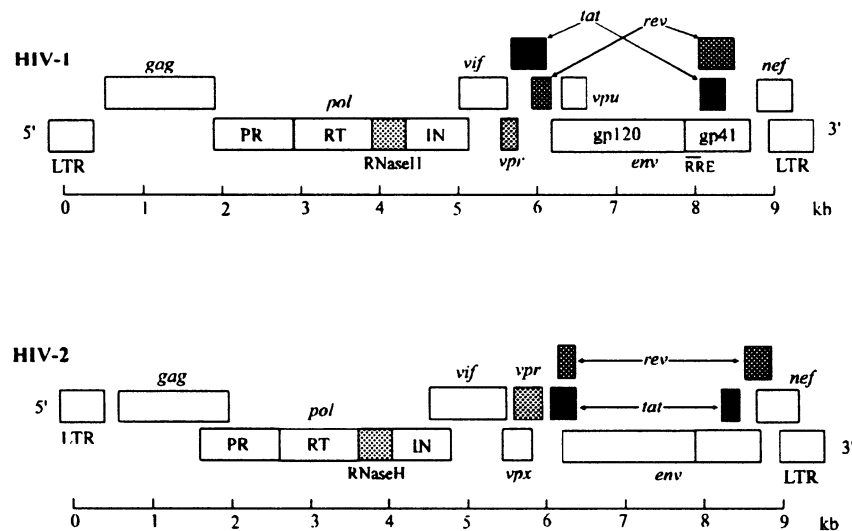


Bild 1.3: Aufbau des viralen Genoms von HIV-1 und HIV-2 (Mitsuya et al., 1990). Jeder Balken steht für ein bestimmtes Gen, das für ein oder mehrere Proteine kodiert. Die drei Ebenen in jedem Genom geben die verschiedenen Leseraster wieder, in denen sich die Gene befinden. **LTR**: "long terminal repeats", **gag**: gruppenspezifische Antigene (Strukturproteine), **pol** (Polymerase): Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) mit RNaseH-Bereich, Integrase (IN); **env** (envelope): Glykoproteine gp120 und gp41; **vif**: viraler Infektiositätsfaktor; **tat**: Transkriptionsaktivator; **nef**: negativer Regulationsfaktor; **rev**: Regulator der viralen Genexpression; **vpr**: virales Protein R; **vpu**: virales Protein U; **vpx**: virales Protein X; **RRE**: rev responsive element, Bindungsbereich (RNA) für rev.

**Env 160** ist das Polyprotein, aus dem die Glykoproteine gp41 und gp120 hervorgehen. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) wird das Vorläufer-Polyprotein stark glykosyliert und anschließend von einer mit dem Golgi-Apparat assoziierten zellulären Protease in das gp41 und gp120 gespalten (Doms und Trono, 2000). Neben der Verankerung von gp120 ist gp41 ein wichtiger Faktor bei der Fusion von Virushülle und Zellmembran, während das gp120 Protein die direkte Bindung des HIV an den zellulären CD4 Rezeptor vermittelt. Das Env-Protein wird von einer bicistronischen mRNA translatiert. In infizierten Zellen trägt es zur Senkung des CD4-Rezeptors auf der Zelloberfläche bei, indem es im ER einen Komplex mit dem CD4-Rezeptor formt und so neu synthetisierten CD4-Rezeptor zurückhält (Crise et al., 1990, Stevenson et al., 1998).



Neben den Strukturproteinen exprimiert HIV weitere Proteine, die als regulatorische und akzessorische Proteine bezeichnet werden. Die regulatorischen Proteine Tat und Rev sind für die Replikation von HIV *in vitro* absolut notwendig während die akzessorischen Proteine Vif, Vpu/Vpx, Vpr und Nef für das Virus nur *in vivo* essentiell sind. Diese Proteine werden nicht von Polyprotein-Vorläufern gebildet, sondern von gespleißten mRNAs translatiert.

**Tat** (*transactivator of transcription*) ist ein kleines Cystein-reiches Protein, das je nach Isolat ein Molekulargewicht von 9 bis 14 kDa aufweist. Bisher wurde Tat nur bei den Lentiviren identifiziert. Es wird als erstes Protein im Zellzyklus synthetisiert und übt seine Funktion im Zellkern aus. Tat stimuliert den viralen LTR-Promoter (Cullen, 1998) und trägt zu einer mehr als hundertfach effektiveren Expression viraler Proteine bei. Seine transaktivierende Wirkung kann das Protein nur durch eine Bindung an das TAR-Element (*trans-activation response*) in den 5'LTR des viralen Genoms vermitteln. Darüber hinaus wird für extrazelluläres Tat, das sehr effizient ins Zellinnere aufgenommen wird, eine Beteiligung an der HIV-vermittelten Apoptose beschrieben (Westendorp et al., 1995).

**Rev** (*regulator of expression of virion proteins*) ist ein Phosphoprotein von etwa 19 kDa, das in Tetrameren oder höheren Aggregaten vorliegt. Es wird in der frühen Phase der Infektion gebildet und reichert sich im Zellkern an. Rev reguliert das Spleißen und den RNA-Export aus dem Kern zugunsten einfach- und ungespleißter RNA-Formen, indem es an ein RNA-Motiv (RRE, *rev response element*) innerhalb der *env*-Region bindet (Cullen, 1998, Malim et al., 1989). Dadurch lagern sich weitere Rev-Moleküle an, so daß das RRE mit Rev-Oligomeren komplexiert ist. Die Oligomere verhindern, daß die viralen mRNAs weiter gespleißt werden und ermöglichen ihren Transport ins Zytoplasma. So wird die Expression der frühen Genprodukte Tat, Rev und Nef abgeschaltet und die Spätphase der Virusreplikation eingeleitet.

**Vif** (*virion infectivity factor*) ist ein 23 kDa Protein, das vor allem im Zytoplasma und in Assoziation mit zellulären Membrankompartimenten, aber auch in Viruspartikeln gefunden wurde (Karczewski und Strebel, 1996). Der Wirkungsmechanismus von Vif ist noch weitgehend unklar. Die einzig bekannte biologische Aktivität von Vif ist eine verstärkte Infektiosität von Viruspartikeln in primären T-Zellen und nicht-permissiven Zelllinien (Gabuzda et al., 1992).

**Vpr** (*viral protein R*) ist ein basisches Protein von etwa 15 kDa, das von allen HIV-1- und einigen SIV-Stämmen gebildet wird. HIV-2 und SIV kodieren für das homologe Vpx Protein. In infizierten Zellen ist Vpr hauptsächlich im Kern, aber auch im Zytoplasma zu finden (Jenkins et al., 2001). Über die Interaktion eines Leucin-reichen Elementes der p6 Region des GagPr55-Polyproteins wird Vpr zu beachtlichen Mengen in die entstehenden Viruspartikel eingebaut (Paxton et al., 1993, Lu et al., 1993). Vpr wird eine wichtige Rolle beim Transport des viralen Präintegrationskomplex in den Kern zugeschrieben (Gallay et al., 1996). In infizierten, proliferierenden Zellen blockiert das

Protein die Zellteilung, indem es die Zellen in der G2/M-Phase arretiert (He et al., 1995, Jowett et al., 1995, Re et al., 1995).

**Vpu** (*viral protein U*) ist ein oligomeres, integrales Membran-Phosphoprotein von 16 kDa das nur bei HIV-1 und dem ihm eng verwandten SIV-Typ der Schimpansen (SIV<sub>cpz</sub>) vorkommt. Das Protein besteht aus zwei strukturell und funktionell unterschiedlichen Domänen. Die N-terminale Transmembran-Domäne erleichtert die Virusfreisetzung an der Oberfläche (Schubert et al., 1996). Die phosphorylierte Zytoplasma-Domäne induziert die selektive Degradation von CD4- und MHC-I- Molekülen im Endoplasmatischen Retikulum (Willey et al., 1992, Margottin et al., 1998).

## 1.5 Nef

Die Bezeichnung Nef für „negative factor“ geht auf frühere Beobachtungen einer negativen Regulierung des Nef-Proteins bei der viralen Transkription und Replikation zurück (Araya et al., 1987, Guy et al., 1987 und 1990, Niederman et al., 1991). Es ist heute unumstritten, daß Nef eine seinem Namen entgegengesetzte Funktion ausübt und *in vivo* für eine effiziente virale Replikation und die Pathogenität von HIV absolut notwendig ist (Kestler et al., 1991). Hinweise hierfür erhielt man aus Untersuchungen mit SIV-infizierten Rhesusaffen. Wurden diese Affen mit Viren infiziert, die einen Defekt im *nef*-Gen aufzeigten, erkrankten sie im Vergleich zu den mit Wildtyp infizierten Affen nicht an AIDS. Die Signifikanz des Nef-Proteins wird auch im SCID-hu Maus Modell gezeigt (Jamieson et al., 1994) und geht weiterhin aus Studien über Langzeitüberlebende hervor, die häufig mit Viren infiziert waren, die einen Defekt im *nef*-Gen zeigten (Kirchhoff et al., 1995, Deacon et al., 1995).

Der für Nef kodierende Genombereich liegt am 3' Ende des viralen Genoms und überlappt zum Teil mit dem *env*-Gen und dem 3' LTR (Bild 1.3). Das Protein wird von einer mehrfach gespleißten mRNA translatiert und somit während der frühen Phase des Replikationszyklus gebildet. Die *nef*-Transkripte machen dabei etwa 80% der frühen, mehrfach gespleißten mRNA aus (Robert-Guroff et al., 1990, Cullen, 1994). Dies führt zu relativ große Mengen an Nef-Protein, im Vergleich zu den ebenfalls früh gebildeten Proteinen Tat und Rev. Das *nef*-Gen wurde bisher im Genom aller Lentiviren von Primaten gefunden.

Nef ist ein kleines, multifunktionelles Protein von 27 kDa bei HIV-1 und 35 kDa bei HIV-2 und SIV<sub>mac</sub>. Die vollständige Aminosäuresequenz des Proteins ist bekannt. Untereinander weisen die Nef-Proteine eine Variabilität von 17% auf. Außerdem zeigten sich bei verschiedenen HIV-Isolaten unterschiedlich große Deletionen oder Insertionen im codierenden Bereich. Trotz dieser Heterogenität konnten konservierte Bereiche identifiziert werden.

In eukaryontischen Zellen wird das Nef-Protein N-terminal über einen Glycinrest myristoyliert (Guy et al., 1987), wodurch es in Verbindung mit zellulären Membran, hauptsächlich der inneren Plasmamembran, und dem Trans-Golgi-Netz gefunden wurde

(Franchini et al., 1986, Kaminchik et al., 1991, Cullen, 1998). Daneben kommt es im Zytoplasma, bevorzugt mit dem Zytoskelett assoziiert, und in geringen Mengen im Zellkern vor (Kaminchik et al., 1994, Niederman et al., 1993, Ranki et al., 1994). Über die N-terminale Myristinsäure wird Nef zu geringen Teilen in neu entstehende Viruspartikel eingebaut (Welker et al., 1996, Pandori et al., 1996). Die Myristoylierung des Proteins ist essentiell für seine Membranlokalisierung, aber myristoyliertes Nef wurde auch frei im Zytoplasma gefunden (Yu und Felsted, 1992, Kaminchik et al., 1994).

Das Nef-Protein kann in mehreren Isoformen vorliegen. So gibt es für HIV-1 Nef, nicht aber für HIV-2/SIV, zwei Konstrukte, p25 und p27. Das p25 ist eine N-terminal verkürzte und somit unmyristoylierte Form, die bei der Translation durch das zweite Startcodon an Position 20 entsteht (Kaminchik et al., 1991). Durch proteolytische Spaltung der HIV Protease wird das Nef-Protein *in vitro* und *in vivo* in zwei Domänen, die aminoterminaler Anker-Domäne und die carboxyterminale Core-Domäne geteilt (Freund et al., 1994, Schorr et al., 1996). Alle Nef-Proteine enthalten zwei konservierte Cysteine, manche Nef-Proteine aus HIV-1 zeigen ein zusätzliches am Carboxyende auf. Mindestens zwei der Cysteine sind zugänglich und ermöglichen es dem Protein, sich zu höheren Oligomeren zusammenzulagern (Kienzle et al., 1993, Schorr, 1994). Auch die Dimerisierung des Nef-Proteins über elektrostatische Wechselwirkung der Aminosäuren R105 und D123 wurde berichtet (Liu et al., 2000). Ebenso zeigt sich für die Nef-Core-Domäne, daß sie in Abhängigkeit der Nef-Konzentration stabile, nicht über Disulfidbrücken verbundene Di- und Trimere bilden kann (Arold et al., 2000).

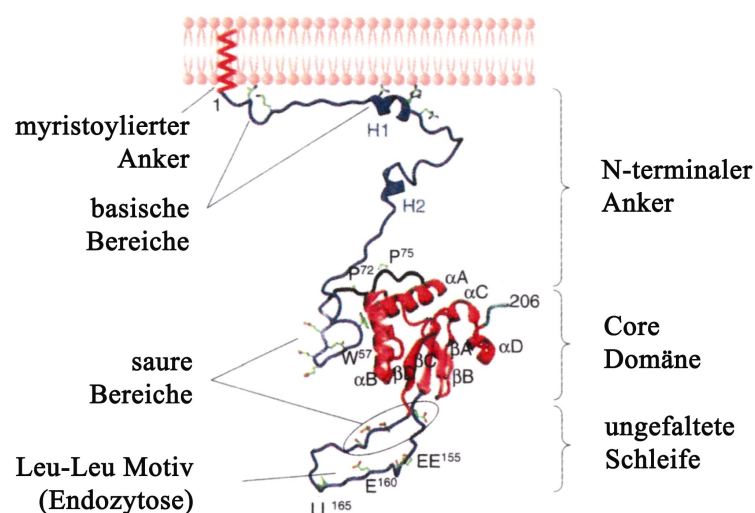


Bild 1.4: Strukturmodell von Nef (aus Arold und Baur, 2001). Das Modell wurde aus Daten der NMR-Struktur des N-terminalen myristylierten Ankers (2-57) und der gefalteten Core-Domäne (56-206) gewonnen (siehe auch Bild 4.4 und Bild 8.1).

Innerhalb der Nef-Proteine treten distinkte Motive auf, die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen vermitteln. Hierzu zählen das PXXP-Motiv, das die Bindung an die SH3 Domäne bestimmter Src-Tyrosin-Kinasen vermittelt und das Di-Arginin-Motiv RR<sup>106</sup>,

das für die Bindung einer Serin/Threonin-Kinase der PAK-Familie (*protein associated kinase*) wichtig ist. Während das PXXP-Motiv in HIV-1 Nef dreifach konserviert ist, liegt es in HIV-2 Nef nur einfach vor. Weiterhin gibt es innerhalb des Nef-Proteins eine Region von 30 Aminosäuren, V148-R178, die gleich drei Bindungsmotive enthält. Alle drei Motive sind in die Internalisierung von Rezeptoren wie CD4 und MHC-I involviert. So interagiert Nef über ein Di-Leuzin-basierendes Motiv, E/D<sup>160</sup>XXXLL<sup>165</sup>, mit sogenannten Adapter Proteinen (AP). Die saure Sequenz EE<sup>155</sup> ist wichtig für das Assoziieren mit  $\beta$ -COP, während die Abfolge der sauren Aminosäuren D174-E178 für die Wechselwirkungen mit AP-Komplexen und der v-ATPase notwendig ist.

Die Struktur der Nef-Core-Domäne aus HIV-1 wurde mittels NMR und Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Grzesiek et al., 1996, Lee et al., 1996). Zusammen mit weiteren NMR-Studien (Geyer et al., 1999) zeigt sich, daß Nef strukturell in zwei Domänen eingeteilt ist. Während der N-terminale flexible Anker (G2-W57) mit Ausnahme einiger kurzer helikaler Elemente in der Region von R35 bis G41 ungefaltet vorliegt, zeigt der C-terminale Bereich, die Core-Domäne (L58-C206), eine überwiegend gut gefaltete, hochgeordnete Tertiärstruktur auf (Bild 1.4, Bild 4.4 und Bild 8.1). Nur im Bereich der Aminosäuren V148-R178 gibt es eine ungefaltete, exponierte Schleife, die wichtige Motive für die Rezeptorinternalisierung enthält.

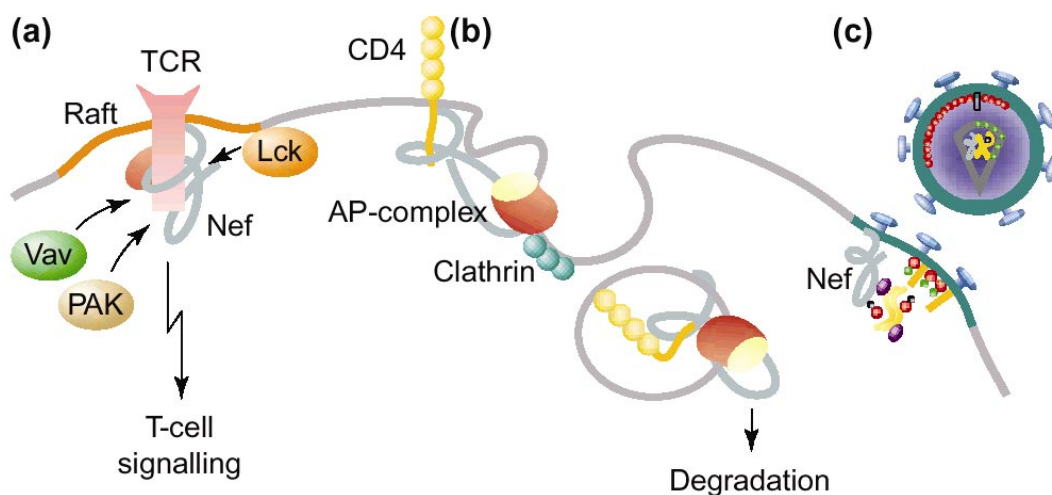


Bild 1.5: Schema der bisher bekannten Nef Funktionen: Nef konzentriert verschiedene Signalproteine (Vav, PAK, Lck) und beeinflusst dadurch die T-Zell-Signalwege (a). Nef stimuliert die Endozytose und den Abbau der Oberflächenrezeptoren CD4 (b) und MHC-I (nicht gezeigt). Dies führt zu einer erhöhten Infektiosität des HI-Virus (c) (aus Arold und Baur, 2001).

Für das Nef-Protein wurden bisher folgende Funktionen *in vitro* beschrieben (Bild 1.5): Nef induziert die Endozytose des CD4-Oberflächenrezeptors und reduziert MHC-I Rezeptoren, Nef erhöht die virale Infektiosität und Nef beeinflusst T-Zell-Signalwege. Die molekularen Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen und ihr Beitrag zur Pathogenese sind zum Teil noch nicht vollständig verstanden.

**Nef senkt die Expression des CD4-Oberflächenrezeptors** und verringert den zellulären Spiegel an CD4, indem es die Endozytose und nachfolgende Degradation in den Lysosomen beschleunigt (Bild 1.5). Dazu bindet Nef sowohl an den ins Zytoplasma ragenden Teil des CD4-Rezeptors als auch an das Protein AP-2 (Bild 1.6), eine Komponente der sogenannten „Clathrin-coated pits“, und induziert die Bildung CD4-spezifischer endozytotischer Vesikel (Schwartz et al., 1995, Foti et al., 1997, Mangasarian et al., 1997). Nef fungiert dabei als Bindeglied zwischen CD4 und AP-2. Für die Bindung an AP-2 ist ein charakteristisches Motiv aus zwei aufeinanderfolgenden Leucinen von Nef, LL<sup>165</sup>, verantwortlich. Nach der Internalisierung verhindert Nef das Wiederauftauchen der CD4-Rezeptoren, indem es in den frühen Endosomen über einen möglichen Kofaktor an  $\beta$ -COP, die  $\beta$ -Unterheit des COP-I Coatomer (*coat protein-1 coatomer*), bindet, wodurch der Transport des CD4 zu den Lysosomen vermittelt wird (Bild 1.6, Piguet et al., 1999). COP-I bedeckte Vesikel sind in den zellulären Transport von Proteinen eingebunden. Sie vermitteln den Transport von Proteinen sowohl zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi als auch zwischen den frühen und späten Endosomen. Für diese Nef- $\beta$ -COP Interaktion ist das saure Dipeptid EE<sup>155</sup> von Nef verantwortlich. Durch die Internalisierung des CD4-Rezeptors verhindert Nef eine Superinfektion bereits infizierter Zellen und erleichtert ein vermehrtes Freisetzen von viralen Partikeln.

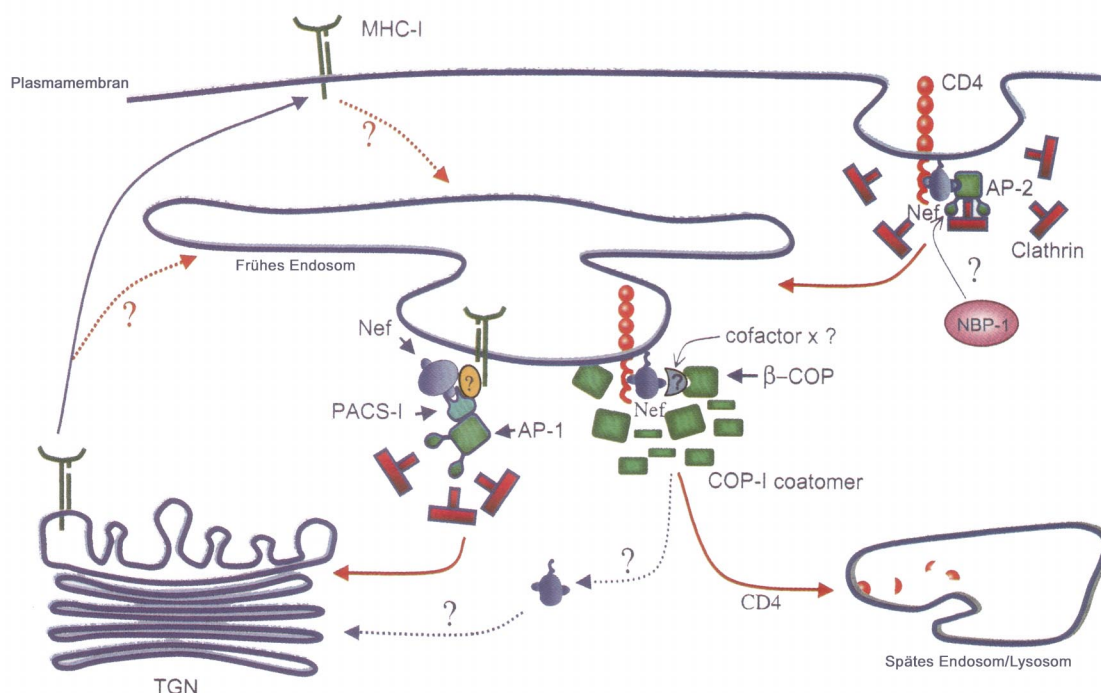


Bild 1.6: Modell für die Wirkung von Nef auf den CD4- (rechts) und MHC-I Rezeptor( links) (aus Trono et al., 2000). Erläuterungen im Text.

Auch MHC-I Rezeptoren stellen einen Angriffspunkt für Nef dar (Schwartz et al., 1996, Le Gall et al., 1998). Überraschenderweise sind hierfür andere Nef-Bereiche und Mechanismen im Vergleich zum CD4-Rezeptor verantwortlich (Bild 1.6). Die Internalisie-

rung der MHC-I Moleküle ist noch nicht vollständig verstanden, aber Nef scheint über einen Bereich von sauren Aminosäuren, EEEE<sup>65</sup>, mit dem AP-1 Protein zu interagieren und so den Komplex von den frühen Endosomen in das Trans-Golgi-Netz (TGN) zu dirigieren (Piguet et al., 2000, Doms und Trono, 2000). In diesen Mechanismus ist auch das PACS-1 Protein involviert (Wan et al., 1998, Piguet et al., 2000). PACS-1 Proteine (*phosphofurin acidic cluster sorting protein-1*) regeln den Transport von Furin und Mannose-Phosphat-Rezeptoren vom Endosom zum Golgi. Neueren Ergebnissen zufolge ist für das Nef-induzierte Senken der MHC-I Moleküle keine Endozytose erforderlich, sondern Nef verhindert den Transport der MHC-I Moleküle zur Zelloberfläche (Swann et al., 2001). Durch den Verlust der MHC-I Moleküle trägt Nef dazu bei, daß HIV infizierte T-Zellen von der zytotoxischen T-Zellantwort unerkannt bleiben.

**Nef erhöht die virale Infektiösität** auf einem sowohl CD4-abhängigen als auch CD4-unabhängigen Weg (Spina et al., 1994). Durch das Reduzieren der CD4-Rezeptoren auf der Zelloberfläche verhindert Nef, daß der CD4-Rezeptor mit der Freisetzung viraler Partikel interferieren kann (Bour et al., 1999, Lama et al., 1999, Ross et al., 1999). Darüberhinaus stimuliert Nef die Synthese proviraler DNA (Aiken & Trono, 1995, Schwartz et al., 1995), ein Effekt, der ebenfalls zu einer verstärkten viralen Infektiösität beiträgt. Nef ist auch in der Lage, die Phosphorylierung des MA durch eine zelluläre Serinkinase zu erleichtern, was für eine optimale virale Infektiösität notwendig ist (Swingler et al., 1997, Wiskerchen et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, daß nur myristoyliertes Nef dazu in der Lage ist, und daß die proteolytische Spaltung des Proteins durch die HIV-Protease die Infektiösität nicht erhöht (Chen et al., 1998).

**Nef beeinflusst die Signaltransduktion in T-Zellen** (Bild 1.5). Schon seit längerem ist bekannt, daß Nef mit T-Zell-Signalwegen interagiert (Baur et al., 1994, Luria et al., 1991). Doch es gibt keinen klaren Konsensus darüber, welche Signalwege davon betroffen sind, und abhängig von seiner zellulären Lokalisation wirkt Nef aktivierend oder inhibierend auf diese Signalwege. So interagiert Nef mit verschiedenen zellulären Kinasen und ist sowohl Substrat von Kinasen als auch Modulator von Kinaseaktivitäten (Baur et al., 1997, Greenway et al., 1996, Harris et al., 1999).

*In vitro* Versuche zeigten, daß Nef spezifisch über sein PXXP-Motiv an die SH3-Domäne von Hck und Lyn bindet (Saksela et al., 1995). Diese beiden Proteine gehören zu den zytoplasmatischen Tyrosin-Kinasen der Src-Familie. Eine definierte Zuordnung der Src-Kinase zu einem bestimmten Signalweg hat sich als schwierig erwiesen, da sie in mehrere Signalwege eingebunden sind. Ebenso wie Nef sind sie über eine Myristinsäure mit der Plasmamembran verankert. Auch Interaktionen mit der SH3-Domäne von Lck, Fyn und Src sind bekannt. Während Nef die Aktivität von Hck steigert, hat es keinen Einfluß auf Lyn und Src und die Aktivität von Lck und Fyn wird verringert (Briggs et al., 2000).

Nef interagiert auch mit der SH3-Domäne des Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktors Vav (Renkema und Saksela, 2000) und womöglich mit den SH3-Domänen anderer Proteine. Weitere Studien zeigen, daß Nef ebenfalls mit den Kinasen PAK (Manninen et

al., 1998) und PKC (Rankema und Saksela, 2000), mit TCR $\zeta$  (Xu et al., 1999) und der Thioesterase (Liu et al., 2000) interagiert.

Trotz mehrerer Interaktionspartner und Funktionen ist die biologisch relevante Funktion von Nef weiterhin unklar. Die Vielzahl seiner phenotypischen Effekte *in vitro* zeigt, daß Nef ein multifunktionelles Protein ist und wahrscheinlich in verschiedenen Phasen des „HIV-Lebenszyklus“ wichtig ist. Nef selbst besitzt bisher keine nachweisbaren enzymatischen Eigenschaften. Um seine Funktionen zu erfüllen, muß es mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten.

Ein Schlüssel zum besseren Verständniss der Funktionsweise von Nef liegt in der Identifizierung und Charakterisierung neuer zellulärer Interaktionspartner. Diese sind von großer Bedeutung für die Aufklärung des Phänomen AIDS und die Entwicklung neuer Therapieformen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Nef-Protein spielt *in vivo* eine entscheidende Rolle in der Pathogenität des HIV-Virus. Seine essentielle Funktion für das „Überleben“ des Virus macht dieses Protein zu einem attraktiven und vielversprechenden Ziel für therapeutische Interventionen. Eine Voraussetzung für die gezielte Entwicklung eines Chemotherapeutikums ist das umfassende Verständnis des zellulären Geschehens, in das der Wirkstoff eingreifen soll.

Ziel dieser Arbeit war es, wichtige strukturelle und funktionelle Aspekte des Nef-Proteins aufzuklären. Mit diesen Kenntnissen erhält man Einblicke in mögliche Nef-induzierte Abläufe und ihre Regulation auf zellulärer Ebene. Das Wissen, das aus diesen Daten resultiert, kann bei einer zukünftigen Entwicklung potentieller AIDS-Therapeutika hilfreich sein.

Für das Nef-Protein sind bisher folgende Funktionen beschrieben und näher charakterisiert worden: Nef induziert die Endozytose des CD4-Oberflächenrezeptors und reduziert MHC-I Rezeptoren, es erhöht die Infektiosität von viralen Partikeln und beeinflusst T-Zell-Signalwege. Die molekularen Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen und ihr Beitrag zur Pathogenese sind noch nicht vollständig verstanden.

Da Nef über keine enzymatische Aktivität verfügt, muß es seine Wirkung mit oder durch andere Proteine vermitteln. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine zellulären Interaktionspartner des Nef-Proteins bekannt. Somit war die Identifizierung potentieller Interaktionspartner *in vitro* von Interesse und ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Die Wechselwirkungen von Nef mit zellulären Proteinen tragen zum besseren Verständnis der noch immer unvollständig geklärten Funktion des Nef-Proteins bei und stellen ebenfalls einen potentiellen Ansatzpunkt für antivirale Strategien dar.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

NMR-Spektrometer:	AMX-500, DRX-800, Bruker (Rheinstetten)
French-Press:	French Pressure Cell Press, AMINCO (Urbana, IL., USA)
Zentrifugen:	Sorvall RC5, Dupont de Nemours (Bad Nauheim) Biofuge A, Heraeus-Christ (Osterode) J-6B, Beckman (München) SpeedVac Concentrator, Bachofer (Reutlingen)  Ultrazentrifuge Optima L 70, Beckman (München) Tischultrazentrifuge TLX 100, Beckman (München)
Rotoren:	GSA, Dupont de Nemours (Bad Nauheim) SS34, Dupont de Nemours (Bad Nauheim) J-6, Beckman (München)  Ti 70 Rotor, Beckman (München) TLA 100 Rotor, Beckman (München) F2402 Rotor, Beckman (München)
Fermenter:	Biostat 50 D, B. Braun AG (Melsungen)
Schüttelinkubatoren:	Certomat® R, Braun AG (Melsungen) Certomat® HK, Braun AG (Melsungen)
Lyophilisator:	GT2, Leybold-Heraeus (Hanau)
FPLC-Anlage:	P500, GP500, Frac100, Rec102, Uvicord SII, Pharmacia (Freiburg) Waters 650, Waters-Millipore (Eschborn)
Mikrokalorimetrie:	MCS ITC, MicroCal (Northampton, USA)
Fluoreszenzspektrometer:	Fluoromax, Spex Industries (Edison, USA)
Stopped-Flow Apparatur:	Power Controlled Lamp Supply 620, bpb Spectra Kinetic Monochromator 05-109, Sequentiel Stopped-Flow Sample Handling Unit 13-110, Photomultiplier 13-177, Applied Photophysics (Leatherhead, UK)
pH-Meter:	pH-Meter 765 Calimatic, Knick (Berlin)



UV-Spektrometer:	DU 650, Beckman (München) UV-260, Shimadzu (Duisburg)
Western-Blot-Apparatur:	Semi-Phor TE70, Hoefer (San Francisco, USA)
Elektrophorese:	Mini Protean II Gelkammer, BioRad (München)

## 2.2 Antikörper und Antiseren

Zu jedem Antikörper sind die im Western-Blot (WB) eingesetzten Verdünnungen angegeben.

Anti-Nef-1:	polyklonales anti-Nef-1 Kaninchenserum, WB 1:250
Anti-Nef-1-Core:	polyklonales Kaninchenserum gegen HIV-1 Nef-Core (L56-C206), WB 1:250
Anti-Nef-1-Anker:	polyklonales Kaninchenserum gegen HIV-1 Nef-Anker (G2-57), WB 1:100
Anti-Nef-2 <sub>HOM</sub> :	Gemisch aus den monoklonaler Ratten-Antikörpern 1A3 und 4B5 gegen Nef-2 <sub>HOM</sub> , zur Verfügung gestellt von Dr. Fackler, Inst. für Virologie, Uni des Saarlandes (Homburg), WB 1:10
Anti-Nef-2 <sub>ALT</sub> :	monoklonaler Maus-Antikörper gegen Nef-2 <sub>ALT</sub> , zur Verfügung gestellt von Dr. Adamski, Bayer AG (Wuppertal), WB 1:500  Polyklonales Kaninchenserum gegen Nef-2 <sub>D194</sub> , zur Verfügung gestellt von Dr. Adamski, Bayer AG (Wuppertal), WB 1:500
Anti-CaM:	polyklonales Kaninchenserum gegen Calmodulin aus <i>Dictyostellium discoideum</i> , zur Verfügung gestellt von Dr. Ulbrecht, Max-Planck-Institut für med. Forschung (Heidelberg), WB 1:1000
Anti-Threonin:	monoklonaler Phosphothreonin-Antikörper aus Maus, Klon PTR-8, Sigma (München), WB 1:50  monoklonaler Phosphothreonin-Antikörper aus Maus (IgG <sub>1</sub> ), Klon 1E11, Biomol (Hamburg), WB 1:25
Anti-Serin:	monoklonaler Phosphoserin-Antikörper aus Maus, Klon PSR-45, Sigma (München), WB 1:500
Anti-Tyrosin:	monoklonaler Phosphotyrosin-Antikörper aus Maus, Klon IG2, Amersham (Braunschweig), WB 1:500
Anti-Thio <sup>TM</sup> :	monoklonaler Maus-IgG <sub>1κ</sub> -Antikörper gegen Thioredoxin, Invitrogen (Leek), Niederlande, WB 1:1000
Anti-GST:	monoklonaler Anti-Glutathion-S-Transferase-Antikörper aus Maus, Klon GST-2, Sigma (München), WB 1:1000

Sekundär-Antikörper: Ziege-anti-Kaninchen, IgG, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, BioRad (München), WB 1:1000,

Ziege-anti-Maus, IgG, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, BioRad (München), WB 1:1000

Kaninchen-anti-Ratte, IgG, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, Sigma (München), WB 1:1000.

## 2.3 Enzyme

Restriktionsnukleasen und DNA-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Bad Schwalbach), Boehringer Mannheim, AGS (Heidelberg) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

## 2.4 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in höchstmöglicher Reinheit von folgenden Firmen bezogen: Aldrich (Steinheim), Boehringer Mannheim, Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München).

## 2.5 Zellstämme (*E.coli*)

TG1	Genetische Marker: K12, $\Delta$ (lac-pro), supE, hsd $\Delta$ 5 thi /F <sup>+</sup> traD36, proAB <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> , lacZ $\Delta$ M15. Herkunft: Amersham (Braunschweig)
XL1-Blue	Genetische Marker: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lacI <sup>q</sup> [F <sup>+</sup> proAB, laqI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, Tnl0 (tet <sup>r</sup> )]. Herkunft: Stratagene (Heidelberg)
M15	Herkunft: Qiagen (Hilden)
SG13009	Herkunft: Qiagen (Hilden)
CK600K	Genetische Marker: e14-(mcrA), supE, thi-1, hsdM <sup>+</sup> hsdR <sup>-</sup> . Herkunft: Sammlung von E.coli-Stämmen der Abt. Biophysik, Max-Planck-Institut für med. Forschung (Heidelberg)
W3110	Genetische Marker: F <sup>-</sup> , hsdR <sup>-</sup> , hsdM <sup>+</sup> . Herkunft: Sammlung von <i>E.coli</i> -Stämmen der Abt. Biophysik, Max-Planck-Institut für med. Forschung (Heidelberg)
BL21	Genetische Marker: F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm. Herkunft: Novagen (Schwalbach)
BL21 (DE3)	Genetische Marker: F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3). Herkunft: Novagen (Schwalbach)

BL21 (DE3) pLysS	Genetische Marker: F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) pLysS. Herkunft: Novagen (Schwalbach)
GI724	Genetische Marker: F <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , lacI <sup>q</sup> , lacPL8, ampC::P <sub>trp</sub> cI. Herkunft: Invitrogen (Leek, Niederlande)
GI698	Genetische Marker: F <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , lacI <sup>q</sup> , lacPL8, ampC::P <sub>trp</sub> cI. Herkunft: Invitrogen (Leek, Niederlande)

## 2.6 HIV-Isolate

Nef aus folgenden HIV-Isolaten wurde verwendet:

HIV-1-BRU	Die Sequenz stammt aus dem LAV-Subklon pNL4-3, in dem 2 Aminosäuren geändert wurden (T15→A15; T51→N51) und der später als BRU bezeichnet wurde (Adachi et al., 1986).
HIV-1-LAI	Dieser Stamm wurde aus dem Patienten LAI isoliert (Chang et al., 1993). Die infizierten, myristoyliertes Nef exprimierenden Insektenzellen wurden von Prof. Müller-Lantsch, Inst. für Virologie, Uni des Saarlandes (Homburg), zur Verfügung gestellt.
HIV-2-HOM	Dieser Stamm wurde 1991 von der Arbeitsgruppe Müller-Lantsch aus einem asymptomatischen Patienten isoliert (Nick et al., 1993). Die für Nef codierende DNA wurde von Dr. Fackler, Inst. für Virologie, Uni des Saarlandes (Homburg), zur Verfügung gestellt.
HIV-2-ALT	Dieser Stamm wurde aus einer Patientin aus Ghana isoliert (Kühnel et al., 1989) mit der ursprünglichen Bezeichnung HIV-2 <sub>D205</sub> . Die für Nef codierende DNA wurde von Dr. Adamski, Bayer AG (Wuppertal), zur Verfügung gestellt.

## 2.7 Nef-Konstrukte

Nef-Konstrukte, die in *E.coli* exprimiert wurden:

### HIV-1 Nef aus dem Stamm BRU

Nef	Aminosäuren G2-C206, ptac-Vektor
Nef-Core	Aminosäuren W56-C206, ptac-Vektor

### HIV-2 Nef aus dem Stamm HOM

Nef	Aminosäuren G2-S255, pQE30-Vektor
Nef-Core	Aminosäuren L40-S255, pQE30-Vektor

HIV-2 Nef aus dem Stamm ALT

Nef Aminosäuren G2- D240 im pQE30-Vektor

Nef-Core Aminosäuren D70-D240im pQE30-Vektor

## 2.8 Protein-Molekulargewichtsmarker

LMW-Marker (low molecular weight), Pharmacia (Freiburg)

Phosphorylase B	94 kDa
Kälberserumalbumin	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Trypsininhibitor	20,1 kDa
Lactalbumin	14,1 kDa

# 3 Methoden

## 3.1 Molekularbiologische Techniken

### 3.1.1 Plasmidaufreinigung

Von einer Einzelkolonie ausgehend wurde eine Bakterien-Übernachtskultur für die Plasmidpräparation angezogen. Die Reinigung und Isolierung der Plasmid-DNA wurden nach dem Prinzip der Anionenaustauschchromatographie über Qiagen-Säulen im Mini- oder Maxi-Maßstab nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in TE-Puffer oder Wasser aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0

### 3.1.2 Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden photometrisch bei einer OD von 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvetten der Schichtdicke von 1 cm bestimmt. Als Faustregel für doppelsträngige DNA gilt:

$1 \text{ OD}_{260} \cong 50 \mu\text{g/ml}$ .

Der Quotient aus  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

### 3.1.3 Agarose-Gel

Zum Nachweis und Isolieren der DNA wurden je nach Fragmentgröße 0,8% bis 2% Agarose-Gele verwendet. Die DNA wurde in Probenpuffer aufgenommen. Die Gelelektrophorese erfolgte in Flachbettgelen bei einer konstanten Spannung von 5-10 V/cm in TAE-Puffer. Das Gel wurde in einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/l H<sub>2</sub>O) angefärbt und die DNA-Banden unter UV Licht sichtbar gemacht.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA

Probenpuffer: 30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanolblau

### 3.1.4 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung der DNA erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen. Für die Ansätze wurden 1-2 U Enzym/μg DNA eingesetzt.

### 3.1.5 5' Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung der 5'-Enden der DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestinal phosphatase*, CIP) dient dazu, die Religation eines DNA-Fragmentes mit sich selbst zu verhindern. Etwa 100 ng geschnittene DNA wurden mit 1-2 U CIP 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz 15 min bei 75°C inkubiert.

### 3.1.6 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Die DNA wurde zuerst, wie unter 3.1.3 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Sichtbarmachen der DNA-Banden unter UV-Licht wurde direkt unter- und oberhalb der zu eluierenden Bande mit dem Skalpell eingeschnitten. In diese Einschnitte wurde jeweils ein ca. 0,5 x 1 cm<sup>2</sup> großes Stück DEAE-Cellulose-Papier eingebracht. Anschließend wurde die Elektrophorese für 10-15 min fortgesetzt, bis die zu eluierende DNA-Bande auf das Papier gelaufen war. Das DEAE-Papier wurde kurz in TE-Puffer und Ethanol gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß mit einem Loch im Boden gegeben. Das kleine Eppendorfgefäß wurde in ein größeres gestellt. Auf das DEAE-Papier wurden 60 μl 1,5 M LiCl in TE-Puffer pipettiert, 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert, wobei das Eluat im größeren Eppendorfgefäß aufgefangen wurde. Nach Wiederholung der Prozedur wurde das Eluat mit dem gleichen Volumen H<sub>2</sub>O bidest versetzt und die DNA mit Ethanol gefällt.

### 3.1.7 Ligation

Im allgemeinen wurden 30-50 ng geschnittene Vektor-DNA mit dem zwei- bis fünffachen molaren Überschuß des kleineren DNA-Fragments ligiert. Die Ligation erfolgte im zugehörigen Puffer des Herstellers mit 1U T4-DNA-Ligase in einem 10 μl Ansatz bei 16°C über Nacht oder 2 h bei Raumtemperatur.

### 3.1.8 Synthese von Oligodesoxynukleotiden

Die als PCR-Primer verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) nach Vorgabe synthetisiert.

### 3.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki et al., 1985) ist ein *in vitro* Verfahren zum selektiven Anreichern von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuren. In den durchgeführten PCR-Ansätzen wurde der DNA-Doppelstrang bei 94°C in die beiden Einzelstränge getrennt, damit sich beim Abkühlen auf 50-56°C die synthetisch hergestellten Oligonukleotide, die die beiden Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz definieren, an die DNA anlagern konnten. Diese doppelsträngigen Bereiche dienen als Startpunkt für die bei 72°C arbeitende Pfu-DNA-Polymerase, welche in Gegenwart der d`NTPs die Einzelstränge zum Doppelstrang auffüllt. Durch Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte DNA-Denaturierung, Anhybridisieren der Oligonukleotide und Auffüllreaktion erhält man eine Anreicherung der gewünschten DNA-Sequenz. Die PCR wurde in einem 50 µl Ansatz mit 25 Zyklen in dem PCR-Gerät Hybaid (Om-nigene, Heidelberg) durchgeführt.

#### 3.1.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der klonierten *nef*-Konstrukte wurden von der Firma Medigeno-mix (Martinsried) durchgeführt. Die DNA hierfür wurde über eine Plasmid-Maxi-Präparation isoliert.

## 3.2 Bakterienkulturen

### 3.2.1 Herstellen kompetenter *E.coli*-Zellen

Die Methode orientiert sich an der von Mandel und Higa (1970). 100 ml LB-Medium wurden mit einer *E.coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 geschüttelt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden die Zellen zu je 50 ml schonend 5 min bei 4000 rpm und 4°C im SS 34 Rotor zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und erneut pelletiert. Dieser letzte Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Die Pellets wurden anschließend in je 2 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15% Glycerin aufgenommen, zu 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Das Auftauen kompetenter Zellen erfolgte immer auf Eis.

CaCl<sub>2</sub>-Lösung: 100 mM, sterilfiltriert

### 3.2.2 Transformation

100 µl kompetente Zellen wurden mit Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1,5 min bei 42°C einem

Hitzeschock unterzogen. Nach Zugabe von 0,5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurde 30-60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf einer LB-Platte mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.2.3 Aufbewahren von *E.coli*-Zellen

Zum Aufbewahren und Erhalten eines Klonen wurde eine 10 ml Übernachtskultur angeimpft. 3 ml der dichtgewachsenen Kultur wurden mit 1 ml Glycerin vermischt und in sterilen Plastikgefäßen mit Schraubverschluß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerinkulturen wurden bei –80°C aufbewahrt.

### 3.2.4 Induktion und Fermentation rekombinanter Proteine aus *E.coli*

Von einer Einzelkolonie wurden 5-10 ml Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Für analytische Untersuchungen wurde die Kultur am nächsten Tag 1:100 in frisches Medium umgesetzt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>590</sub> von 0,5-0,8 geschüttelt. Sobald die gewünschte OD erreicht wurde, konnte die Expression der Proteine durch Zugabe einer sterilfiltrierten IPTG-Lösung für ca. 6-12 h, je nach Protein, induziert werden. Die Expression wurde auf SDS-Gelen kontrolliert.

LB-Medium: 10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 5 mM NaOH, pH 7,5

Tabelle 3.1: Zusätze zur Induktion und Fermentation.

Zusätze	Stammlösung	Endkonzentration
Carbenicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 mg/l
Kanamycin	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O	25 mg/l
IPTG	500 mM in H <sub>2</sub> O	0,5 mM

Für präparative Zwecke wurden Fermentationen in einem 50 l-Fermenter (Biostat U 50 D, Braun Melsungen) durchgeführt. Zuerst wurden die Zutaten für 50 l LB-Medium in den Fermenter gegeben, mit *aqua dest.* auf 50 l aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf 37°C wurden 300 mg/l MgSO<sub>4</sub>, Antibiotikum, 200 ml 2 M KHCO<sub>3</sub>, 30 ml Antischaum und 900 ml Glycerin zugegeben (nicht bei Minimalmedien). Mit 3 l Übernachtskultur wurde angeimpft. Während des gesamten Fermenterlaufs wurde der pH mit 5 M NaOH konstant auf pH 7,5 gehalten. Um Wachstum und Zeitpunkt der Induktion zu kontrollieren, wurde alle 2 h die Extinktion bei 590 nm gemessen.

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Nachweisreagenz des BioRad Protein Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard wurde eine BSA-Lösung von 1 mg/ml ( $OD_{280} = 0,66$ ) verwendet.

Für die Konzentrationsbestimmung von Aktin wurde der aus der Aminosäurezusammensetzung errechnete Extinktionskoeffizient von Aktin verwendet.

$$\text{Aktin } \epsilon_{280\text{nm}} = 26450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

#### 3.3.2 Konzentrierung von Proteinen

Das Konzentrieren von Proteinlösungen wurde in einer Ultrafiltrationskammer von 50 ml Fassungsvermögen bei einem Überdruck von etwa 3 bar durchgeführt. Als Filter wurde eine Amicon-Diaflo-Flachmembran der YM Typenreihe mit einer Ausschlußgrenze von 10 kDa (= YM 10) verwendet. Für kleinere Volumina wurden Centriprep-Einheiten der Firma Millipore nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

#### 3.3.3 Lyophilisation

Die Proteinlösung wurde in einen mit *aqua bidest.* gespülten, getrockneten und gewogenen Glaskolben mit Schliff gefüllt und in flüssigem  $N_2$  schockgefroren. Das gefüllte Gefäß wurde für 24 h an die Gefriertrocknungsanlage (Lyophylle) angehängt.

Puffer: 50 mM  $NH_4HCO_3$ , 10  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### 3.3.4 HIV-1 Nef

##### 3.3.4.1 Reinigung

Die Reinigung des Nef-Proteins aus dem Stamm BRU orientierte sich an der Vorschrift von Wolber et al. (1992) und wurde in drei Schritten über Pseudoaffinitätschromatographie, Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltrations-Chromatographie durchgeführt.

Die Reinigung des N-terminal um 57 Aminosäuren verkürzten Nef-Proteins Nef-Core, L58-C206, erfolgte über Anionenaustausch-Chromatographie, Ammoniumsulfat-fällung und Gelfiltrations-Chromatographie (Schorr, 1994).

Der N-terminale Nef-Anker (G2-W57) mit und ohne N-terminale Myristinsäure wurde von Dr. R. Kellner, Merck KgaA, Darmstadt nach der Fmoc/HOBt- Methode synthetisiert.

Gereinigtes HIV-1 Nef und HIV-1 Nef-Core wurden für die Bindungsstudien mit Aktin, Myosin und Calmodulin sowie für NMR-Experimente eingesetzt. Synthetisierter Nef-Anker wurde für NMR-Spektroskopie verwendet.



### 3.3.4.2 Chemische Modifizierungen

Um die Löslichkeit des Nef-Proteins zu erhöhen, wurden die Oberflächenladungen mittels chemischer Modifizierungen verändert. Folgende Modifizierungen wurden am Nef-Protein vorgenommen:

#### **Acetylierung**

Die Acetylierung des Proteins wurde mit Acetanhydrid durchgeführt. Zu einer 40  $\mu\text{M}$  Nef-Lösung in 1 M Tris-HCl pH 8,0 wurden 0,5 Äquivalent Acetanhydrid unter Rühren bei 4°C pipetiert. Das Acetanhydrid wurde binnen einer Stunde in 5 Schritten langsam zur Proteinlösung zugegeben und das Reaktionsgemisch nach vollständiger Zugabe für weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

#### **Methylierung**

Für die Methylierung wurden Dimethylamino-Boran-Komplex (DMAB) und Formaldehyd eingesetzt. Eine 40  $\mu\text{M}$  Nef-Lösung in 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 wurde pro freie Aminogruppe mit einer äquimolaren Menge an DMAB und einem zweifachen Überschuß an Formaldehyd bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. DMAB und Formaldehyd wurden im Wechsel in drei Schritten zu der Proteinlösung gegeben. Nach jeder Zugabe wurden zwei Stunden inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde nach vollständiger Zugabe für weitere 18 h inkubiert.

#### **Carboxymethylierung**

Nef, gelöst in 1 M Tris pH 9,0, wurde pro freie Aminogruppe mit einem fünffachen Überschuß an Jodacetamid (IAA) titriert. Das Jodacetamid wurde unter leichtem Rühren lichtgeschützt bei Raumtemperatur in drei Schritten zugegeben und für weitere 15-30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

#### **Succinylierung**

Die Succinylierung erfolgte mit Bernsteinsäure. Eine 40  $\mu\text{M}$  Nef-Lösung in 1 M Tris-HCl pH 9,0 wurden bei 4°C in 5 Schritten mit dem zweifachen Überschuß pro Aminogruppe an Bernsteinsäure versetzt.

Die modifizierten Nef-Proben wurden über Gelfiltrations-Chromatographie (Sephadex G-25) von überschüssigem Reagenz gereinigt und anschließend mit Millipore-Konzentratoren aufkonzentriert. Die Proben wurden in NMR-Messungen auf ihre Löslichkeit hin getestet und für Kristallisationsansätze verwendet.

### 3.3.4.3 Weitere Modifizierungen

#### **Fluormarkierung**

Eine 30  $\mu\text{M}$  Nef-Probe, in 10 mM Tris pH 8,0, wurde pro Cystein mit dem dreifachen Überschuß an 4-perfluoro-tert.-butyl-phenyliodoacetamid (PFP, gelöst in DMF) versetzt, 18 h bei Raumtemperatur in Alufolie lichtgeschützt inkubiert und anschließend über eine Sephadex G-25-Säule gereinigt. Diese Probe wurde für  $^{19}\text{F}$ -NMR-Messungen eingesetzt.

Äquilibrierungspuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM DTE

### Umsetzung mit N-Pyrenyl-Maleinimid

Eine 30-40  $\mu$ M Nef-Lösung, in 10 mM Tris pH 7,5, wurde mit einem zweifachen Überschuß an N-Pyrenyl-Maleinimid (gelöst in DMF) 1 h auf Eis inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde mittels einer Sephadex G25-Säule abgetrennt. Das markierte Nef-Protein wurde für Fluoreszenzmessungen mit Aktin, Myosin und Calmodulin eingesetzt. Das Protein wird im folgenden als Pyrenyl-Nef bezeichnet.

Äquilibrierungspuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM DTE

### Isptopenmarkierung

Ausgehend von einer Nef exprimierenden Übernachtskultur in LB-Medium, wurde das Minimalmedium 1:100 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD<sub>590</sub> von 0,6-0,8 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG für 12 h induziert. Nef wurde bei 30°C und Nef-Core bei 23°C inkubiert. Die Reinigung erfolgte wie unter 3.3.4.1 angegeben.

1 l Minimalmedium: 7,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g NaCl, 0,25 g MgSO<sub>4</sub>, 0,014 g CaCl<sub>2</sub>, 1 g Glucose, 0,5 g NH<sub>4</sub>Cl, 10 ml Spurenelemente

1 l Spurenelemente: 0,1 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,03 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,3 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,2 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,22 g NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,9 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,02 g Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

Einzusetzende Konzentration: 2 ml Spuren pro 1 l Minimalmedium

### 3.3.5 HIV-2 Nef

Die Reinigung beider HIV-2 Nef-Konstrukte, Nef<sub>HOM</sub> und Nef<sub>HOM</sub>-Core, wurde jeweils in drei Schritten über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie, Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltrations-Chromatographie durchgeführt. Es wurde auf Eis oder bei 4°C gearbeitet.

Etwa 100 g Zellen wurden in 400 ml Nef-Puffer und 1 ml 200 mM PMSF suspendiert und mittels French Press bei 800-1000 Psi aufgebrochen. Der Rohextrakt (V = 400 ml) wurde 40 min bei 18000 rpm in einem SS 34 Rotor zentrifugiert und der klare Überstand wurde auf die mit Nef-Puffer äquilibrierte Ni<sup>2+</sup>-Agarose Säule (V = 20 ml) aufgetragen. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit dem fünffachen Säulenvolumen an Nef-Puffer gewaschen. Das Nef-Protein wurde mit einem linearen Imidazolgradienten von 20 mM bis 1000 mM Imidazol in Nef-Puffer eluiert. Aus den Nef-haltigen Fraktionen wurde das Protein mit einer 40% Ammoniumsulfatfällung (0,243 g/ml) aufkonzentriert und über eine Superdex G-75 Gelfiltrationssäule (V = 120 ml) weiter aufgereinigt. Das gereinigte Nef wurde gegen 10 mM Tris pH 8,0, 2 mM DTE dialysiert und bei – 80°C aufbewahrt.

Nef-Puffer: 60 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM Imidazol, 100 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

Gelfiltrationspuffer: 60 mM Tris-HCl pH 8,0, 400 mM NaCl, 2 mM DTE

### 3.3.6 Proteolyse von HIV-1 Nef mit der HIV-1/-2 Protease

#### 3.3.6.1 HIV-1 Nef aus *E.coli*

11  $\mu$ M gereinigtes Nef in physiologischem Puffer pH 6,0 wurden mit 0,2  $\mu$ M HIV-1 Protease bzw. HIV-2 Protease bei Raumtemperatur für 12 h inkubiert und auf einem SDS-Gel oder Western-Blot analysiert.

16  $\mu$ M Nef wurden in physiologischem Puffer gelöst und mit 0,2  $\mu$ M HIV-2 Protease bei Raumtemperatur inkubiert. Der zeitliche Verlauf von 0-720 min wurde auf einem SDS-Gel analysiert.

Physiologischer Puffer: 55 mM KAc, 29,3 mM  $K_2HPO_4$ , 18,7 mM  $KH_2PO_4$ , 8 mM  $NaHCO_3$ , 7 mM  $K_2SO_4$ , 2 mM  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 2 mM KCl, pH mit KOH auf 7,2 einstellen

#### 3.3.6.2 HIV-1 Nef<sub>LAI</sub> aus Insektenzellen

Etwa 40  $\mu$ l Zell-Lysat wurden in physiologischem Puffer aufgenommen und mit 0,2  $\mu$ M HIV-1 Protease bzw HIV-2 Protease für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die proteolytische Spaltung wurde im Western-Blot analysiert.

### 3.3.7 Aktin

#### 3.3.7.1 Präparation von Aktin aus Aceton-Trockenpulver

Das aus Kaninchenmuskel präparierte Aceton-Trockenpulver ist eine Zwischenstufe der Aktinpräparation, die bei  $-20^\circ\text{C}$  haltbar ist. Aceton-Trockenpulver wurde freundlicherweise von Dr. H. Kany, Max-Planck-Institut für med. Forschung (Heidelberg), zur Verfügung gestellt.

2 g Trockenpulver wurden in 40 ml eisgekühltem bidest.  $H_2O$  suspendiert und 15 min im Eisbad gerührt. Der Extrakt wurde über einen Büchnertrichter in eine gekühlte Waschflasche abgesaugt und der Rückstand für weitere 15 min mit 25 ml  $H_2O$  extrahiert. Das gesamte Filtrat wurde 30 min bei 20000 rpm in einem Ti 70 Rotor zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand durch Zugabe von 0,7 mM  $MgCl_2$  und 2 mM Tris-HCl pH 8,0 zu F-Aktin polymerisiert. Nach 90 min bei Raumtemperatur wurde die gelartige Lösung im Ti 70-Rotor mit 54000 rpm für 60 min bei  $10^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die F-Aktin Pellets wurden dann mit kaltem G-Aktinpuffer im Glas-Potter homogenisiert und gegen 2 l dieses Puffers über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde durch Zentrifugation wie oben von nicht depolymerisiertem F-Aktin befreit. Das erhaltene G-Aktin wurde im SDS-Gel auf Reinheit kontrolliert und für die Nef-Interaktionsversuche eingesetzt.

Ca-G-Aktin:	2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1 mM NaN <sub>3</sub>
Mg-G-Aktin:	2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 mM EGTA, 0,1 mM NaN <sub>3</sub>

#### 3.3.7.2 Umsetzung mit N-Pyrenyl-Maleinimid

Die zur Derivatisierung meistgenutzte Stelle im G-Aktin ist das zugängliche Cystein an Position 374.

Die zu markierende Menge an Aktin wurde auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> 1 h bei Raumtemperatur polymerisiert. Das so erhaltene F-Aktin wurde mit äquimolaren Mengen an N-Pyrenyl-Maleinimid, gelöst in DMF, 18 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 h bei 100000 rpm in einem F 2402 Rotor zentrifugiert. Die F-Aktin Pellets wurden wie unter 3.3.3 weiterbehandelt. Das markierte Aktin wird im folgenden als <sup>374</sup>Pyrenyl-Aktin bezeichnet.

### 3.4 Biophysikalische Methoden

#### 3.4.1 Sedimentation

Äquimolare Mengen an F-Aktin und Nef (in F-Aktinpuffer) wurden zusammen gegeben, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 100000 rpm in einem TLA 100 Rotor 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet im gleichen Ausgangsvolumen an bidest. H<sub>2</sub>O gelöst und depolymerisiert. Mittels SDS-Gel wurden Überstand und Pellet miteinander verglichen.

F-Aktinpuffer: G-Aktinpuffer + 1 mM MgCl<sub>2</sub>

#### 3.4.2 Viskositätsmessung

Die Versuche wurden in einem Ostwald-Kapillarviskosimeter bei Raumtemperatur mit jeweils 600 µl Probenvolumen durchgeführt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 1 mM MgCl<sub>2</sub> in die im Viskosimeter befindliche Lösung gestartet und in gleichbleibenden Zeitabständen die Durchlaufzeit bestimmt. Die relative Viskosität  $\eta$  ergab sich aus der Durchflußzeit  $t_0$  für G-Aktin und der Zeit  $t_{\text{probe}}$  für die Aktinlösung mit  $\eta = t_{\text{probe}} / t_0$ . Für die Aktin-Polymerisation in Gegenwart von Nef wurden Aktin und Nef bzw. Nef-Core vor Polymerisationsstart 15 min vorinkubiert.

#### 3.4.3 Fluoreszenzmessung

Die Messungen wurden in einem Fluoromax, der Firma Spex Industries (Edison, USA) durchgeführt. Von der fluoreszenzmarkierten Proteinprobe wurde jeweils eine 0,5-1 µM Lösung in einer Quarzküvette vorgelegt und das Emissionsspektrum aufgenommen. Die Probe wurde dann mit dem unmarkierten Bindungspartner titriert und der Fluoreszenzverlauf gemessen.

Tabelle 3.2: *Verwendete Anregungs- und Emissionswellenlängen der verschiedenen Fluoreszenzgruppen.*

Fluoreszenzmarker	Anregungswellenlänge	Emissionsspektrum
N-Pyrenyl-Maleinimid	344 nm	360 nm bis 450 nm
Dansyl-Gruppe	340 nm	450 nm bis 550 nm
Mant-Gruppe	366 nm	390 nm bis 550 nm

#### 3.4.4 Kinetische Untersuchungen mittels Stopped-Flow

Die Messungen wurden in einem Stopped-Flow Gerät der Firma Applied Photophysics (Leatherhead, England) durchgeführt.

Um die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation  $k_{\text{on}}$  zu bestimmen, wurde im allgemeinen eine 1  $\mu\text{M}$  Lösung der fluoreszenzmarkierten Probe in die eine Spritze der Stopped-Flow-Apparatur und die unmarkierte Proteinelösung mit steigenden Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 40  $\mu\text{M}$  bzw. 90  $\mu\text{M}$  in die andere Spritze eingefüllt. Nach Injektion beider Lösungen in die Meßkammern wurde der Fluoreszenzanstieg verfolgt und mit einer an die Daten angepaßten exponentiellen Kurve die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  ermittelt. Das Auftragen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten gegen die Proteinkonzentration in der Mischkammer resultiert in einer Gerade mit der Steigung  $k_{\text{on}}$  und dem Achsenabschnitt  $k_{\text{off}}$ .

Die Anregungswellenlänge für die Pyrenyl-markierte Probe war 344 nm, die Emission wurde mit einem Kantenfilter bei Wellenlängen über 370 nm gemessen.

Die Anregungswellenlänge für Dansyl war bei 340 nm und die Emission wurde mit einem Kantenfilter bei Wellenlängen über 389 nm gemessen.

#### 3.4.5 Mikrokalorimetrie

Die Messungen wurden in einem MCS ITC-Gerät der Firma MicroCal (Northampton, USA) durchgeführt.

Zur Bestimmung der Reaktionsenthalpien zwischen Nef und Aktin wurde eine 30-40  $\mu\text{M}$  Aktinlösung in der Meßzelle vorgelegt und die Nef-Lösung mit einer Konzentration von etwa 300-400  $\mu\text{M}$  in die Injektionsspritze aufgezogen. Die Injektionsspritze wurde in die Meßzelle eingeführt und nach Erreichen einer gleichmäßigen Basislinie wurde die Messung gestartet. Die Nef-Lösung wurde in etwa 25 Schritten zugegeben, bis sie im zwei- bis dreifachen Überschuß über Aktin vorlag. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Origin (MicroCal Software, Northampton, USA).

#### 3.4.6 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Elektronenmikroskop der Firma Zeiss, Typ 902 A, durchgeführt (Vergrößerung ca. 100000-fach).

Aktin wurde entweder direkt in Anwesenheit äquimolarer Mengen an Nef bzw. Nef-Core polymerisiert oder zuerst polymerisiert und dann in bestimmten Zeitabständen mit Nef oder Nef-Core inkubiert.

Von einer 50-100  $\mu\text{M}$  Proteinlösung aus Aktin und Nef bzw. Nef-Core ausgehend, wurden verschiedene Verdünnungen der Proteinlösung auf ein kohlenstoffbeschichtetes Gitter aufgebracht und kurze Zeit adsorbiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Filterpapier abgezogen. Zur sogenannten Negativkontrastierung wurde anschließend mit einer konzentrierten Uranylacetat-Lösung gewaschen.

### 3.4.7 Kernspinresonanz-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden mit hochauflösenden AMX-500 und DRX-800 NMR-Spektrometern der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgenommen. Standardmäßig wurden 32 k komplexe Datenpunkte aufgenommen und auf 32 k reelle Datenpunkte Fouriertransformiert. Pro Messung wurden zwischen 32 bis 8192 Spektren akkumuliert. Alle NMR-Proben wurden mit 5-10%  $\text{D}_2\text{O}$  versetzt.

#### 3.4.7.1 $^1\text{H}$ -NMR

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden mit einem Protonen-Probenkopf mit 5 mm Durchmesser bei 500 MHz Resonanzfrequenz aufgenommen. Das Probenvolumen betrug 0,5 ml bei Standard-Probenröhrchen bzw. 0,3 ml bei Verwendung von Shigemi-NMR-Röhrchen. Als interner Standard für die  $^1\text{H}$ -Spektren diente Natrium-4,4-Dimethyl-4-silapent-1-sulfonat (DSS). Die Messungen wurden bei 293 K und 303 K durchgeführt.

#### 3.4.7.2 $^{19}\text{F}$ -NMR

Die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren wurden ebenfalls mit einem Protonen-Probenkopf mit 5 mm Durchmesser bei 470 MHz Resonanzfrequenz aufgenommen. Als interner Standard wurde Trifluoressigsäure (TFA) verwendet. Die Meßtemperatur lag bei 303 K. Das Probenvolumen betrug 0,5 ml.

#### 3.4.7.3 $^{31}\text{P}$ -NMR

Die Messung erfolgte mit einem direkten Phosphor-Probenkopf mit 10 mm Durchmesser bei einer Resonanzfrequenz von 202 MHz. Für Volumina von 800  $\mu\text{l}$  wurden Shigemiröhrchen mit 8 mm Durchmesser verwendet. Die Messungen wurden bei 298 K durchgeführt. Als externer Standard für die  $^{31}\text{P}$ -Spektren wurde Phosphorsäure in einer Kugel verwendet (Maurer und Kalbitzer, 1996).

#### 3.4.7.4 $^{15}\text{N}$ -NMR

Die Spektren wurden mit einem Tripelresonanz-Probenkopf bei 800 MHz Resonanzfrequenz in 5 mm Shigemi-Röhrchen aufgenommen. Die indirekte Eichung der  $^{15}\text{N}$ -Spektren erfolgte auf DSS (Wishart et al., 1995). Es wurden 2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren (Bax et al., 1990) und 3D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOESY-HMQC Spektren (Marion et al., 1989) von

vollständig  $^{15}\text{N}$ -markierten HIV-1 Nef bzw. Nef-Core aufgenommen. Das Probenvolumen betrug jeweils 0,3 ml.

### 3.4.8 Kristallisation

Die Kristallisation wurde nach der „hanging drop“-Methode mit dem „Crystal Screen I und II“ von Hampton Research und weiteren Präzipitantien durchgeführt. Die Ränder der Vertiefungen einer „Linbro-multi-well“-Zellkulturplatte wurden mit Silikonöl eingefettet. Pro Vertiefung wurde 1 ml eines Konzentrationsansatzes als Reservoirlösung gegeben. 1  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Reservoirlösung wurde zu 1  $\mu\text{l}$  Nef-Stammlösung (10 mg/ml) in die Mitte eines silikonisierten Deckgläschens pipettiert und gemischt, so daß ein Tropfen entsteht. Das Gläschen wurde mit dem Tropfen zur Reservoirlösung hin auf die eingefettete Öffnung gelegt. Dadurch entsteht ein geschlossenes System mit einem Gradienten von der Reservoir- zur Proteinlösung. Zum Kristallisieren wurde die Platte bei RT und 18°C aufbewahrt. Zwischen Protein- und Reservoirlösung stellt sich ein Gleichgewicht ein und sobald die Löslichkeitsgrenze des Proteins überschritten ist, präzipitiert oder kristallisiert das Protein.

## 3.5 Proteinnachweistechiken

### 3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Zum Nachweis der Proteine und zur Reinheitskontrolle wurde die denaturierende Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) durchgeführt.

Monomerlösung:	30% Acrylamid/ 0,8 Bisacrylamid
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer:	1 M Tris-HCl pH 6,8
SDS-Lösung:	10% (w/v) SDS-Lösung
Initiator:	10% (w/v) Ammoniumpersulfat
TEMED:	100%, Fertiglösung
Färbelösung:	45% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250
Entfärbelösung:	45% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure
5x Probenpuffer:	165 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol, 5% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

### 3.5.2 Western-Blot

Die mittels SDS-Page getrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose Membran übertragen und immunologisch mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte innerhalb 1h bei 100 mA im Semidry-Verfahren. Anschließend wurde die Membran mit 5 % Milchpulver bzw. BSA (Fraktion V) in TBST 1 h bei 37°C abgesättigt und nach dreimaligem Waschen zu je 5 min mit TBST 1 h bei 37°C mit dem Erstantikörper inkubiert. Nach Waschen analog oben wurde die Membran mit dem Zweitantikörper ebenfalls 1h bei 37°C inkubiert. Die Protein-Antikörperkomplexe wurden mit einer 3,3'-Diaminobenzidin-Lösung entsprechend den Angaben des Herstellers nachgewiesen.

Transferpuffer: 150 mM Glycin, 20 mM Tris, 0,01% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

TBST: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween20

### 3.5.3 Protein-Overlay

Der Protein-Overlay wurde zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt. Die zu untersuchenden, gereinigten Proteine wurden direkt auf die Nitrocellulose-Membran aufgetropft. Für Nef wurden 1 µg und 2 µg eingesetzt. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Membran 1 h bei RT in 5% Milchpulver in TBST abgesättigt und anschließend 3-mal 5 min mit TBST gewaschen. Die Membran wurde dann mit dem möglichen Bindungspartner z.B. Calmodulin (5-10 µg/ml), 2 h bei RT inkubiert. Im weiteren wurde die Membran wie bei einem Western-Blot behandelt, wobei der Erstantikörper gegen den möglichen Bindungspartner gerichtet wurde.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Strukturelle Charakterisierung von HIV-1 Nef

Dreidimensionale Proteinstrukturen leisten einen wertvollen Beitrag in der Erforschung von Proteinen und tragen zum besseren Verständnis zwischen molekularer Struktur und physiologischer Funktion bei. Proteinstrukturen liefern darüberhinaus wichtige Daten für eine strukturbasierende Wirkstoffentwicklung.

Da zu Beginn dieser Arbeit weder die Nef-Struktur noch die genaue Nef-Funktion bekannt waren, standen eine strukturelle und funktionelle Charakterisierung dieses Proteins im Vordergrund dieser Arbeit.

#### 4.1.1 Chemische Modifizierung

Für die Proteinstrukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie sind Proteinkonzentrationen von 1 mM oder mehr wünschenswert. In früheren Versuchen (Freund, 1994) konnte in NMR-Messungen gezeigt werden, daß Nef bis maximal 0,4 mM monomer in Lösung bleibt. Wird diese Konzentration überschritten, aggregiert das Protein und macht eine Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie unmöglich. Das N-terminal um 57 Aminosäuren verkürzte Nef-Fragment, Nef-Core, zeigte das gleiche Verhalten. Deshalb wurde mit chemischen Modifizierungen wie Acetylierung, Methylierung, Succinylierung und Carboxymethylierung versucht, die Oberflächenladung der Seitenketten so zu verändern, daß die Konzentration an monomerem Nef erhöht werden konnte.

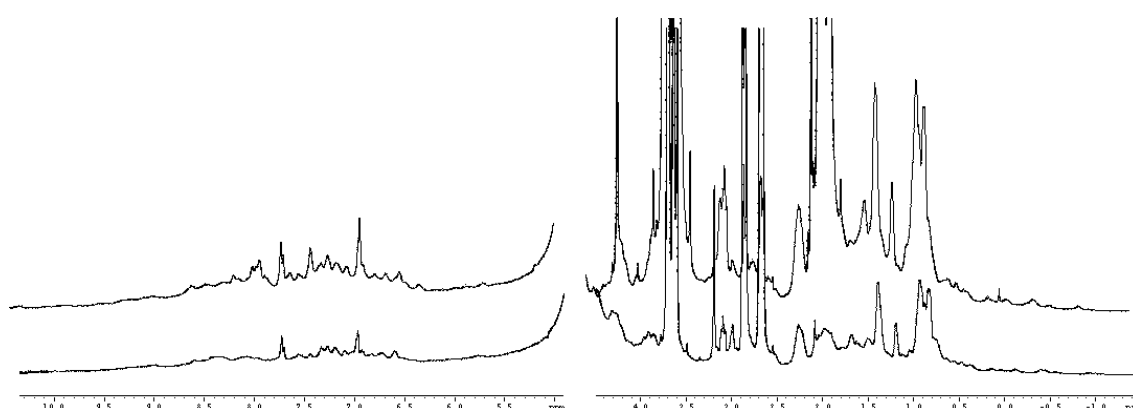


Bild 4.1: 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von HIV-1 Nef (unten) und acetyliertem HIV-1 Nef (oben), pH 7,2, 298 K, 500,13 MHz, NS 1024. Erläuterung im Text.

Das 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von HIV-1 Nef zeigt, daß das Protein eine definierte Tertiärstruktur besitzt, was z.B. an den Resonanzen der hochfeldverschobenen Methylgruppen im Bereich von 0,6 ppm bis -2,0 ppm zu erkennen ist (Bild 4.1). Zwischen 11 ppm

und 6 ppm liegen die Signale der NH-Protonen des Proteinrückgrats und der NH<sub>2</sub>-Seitenketten von Asparagin und Glutamin, zwischen 7,5 ppm und 6,5 ppm die der Aromatenprotonen. Von 5,5 ppm bis 3,5 ppm sind die Signale der H<sup>α</sup>-Protonen zu erkennen. Rechts davon liegen die Signale der Seitenketten sowie die Signale von Methylgruppen.

Die Acetylierung stellte sich als beste Modifizierung für das Nef-Protein heraus. Das 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Bild 4.1) zeigt, daß die chemische Modifizierung keine Denaturierung bewirkte und das Nef-Protein strukturell intakt ist. Man erhält das bekannte Nef Spektrum mit einer leichten Verstärkung der Signale im NH-Bereich zwischen 7,5 ppm und 8,5 ppm. In dem Spektrum ist keine Linienverbreiterung sichtbar, die auf Oligomerisierung oder/und Aggregation hinweist. Das acetylierte Nef blieb auch bei Raumtemperatur über mehrere Tage stabil, während methyliertes Nef zum Teil schon beim Konzentrieren an der Membran verloren ging und im NMR-Röhrchen nach 12 h eine zunehmende Eintrübung zeigte, die auf ausgefallenes Protein zurückging. Ebenso wie die Methylierung war auch die Succinylierung für Nef weniger geeignet. Das 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von succinyliertem Nef zeigte wenig Dispersion und das Protein schien aggregiert zu sein. Mit der Carboxymethylierung konnte ebenfalls keine Verbesserung erzielt werden.

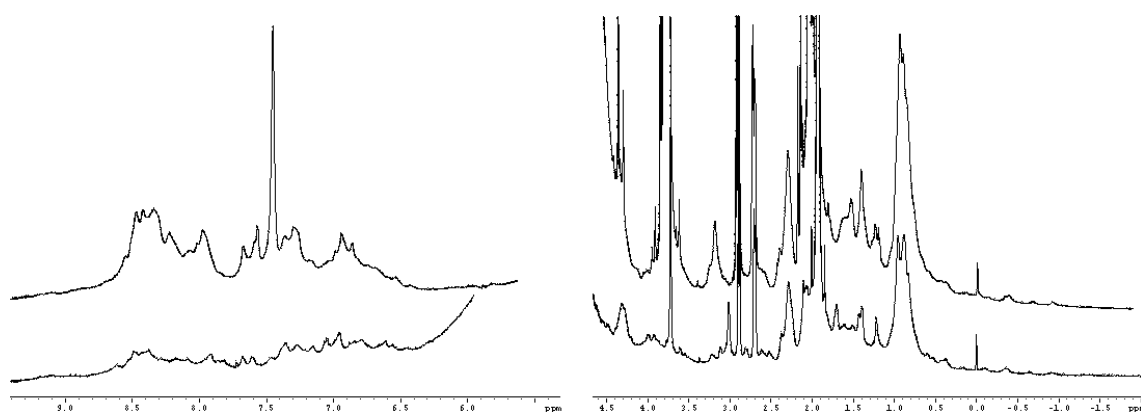


Bild 4.2: 1D <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von HIV-1 Nef-Core (unten) und acetyliertem Nef-Core (oben), pH 7,2; 298 K, 500,13 MHz, NS 1024.

Bei der Modifizierung von Nef-Core zeigte sich ein ähnliches Bild. Die acetylierte Probe ließ im 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum Verbesserungen zum Ausgangsspektrum erkennen und konnte stärker aufkonzentriert werden ohne zu aggregieren (Bild 4.2).

#### 4.1.2 N15-Markierung

Bei Proteinen mit mehr als 150 Aminosäuren ist im allgemeinen eine <sup>15</sup>N-Markierung aller Stickstoffatome des Proteins für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie notwendig. Sowohl Nef als auch Nef-Core konnten in dem unter Kapitel 4.1.2 aufgeführten Minimalmedium <sup>15</sup>N markiert werden. Dieses Minimalmedium war auch für eine <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C Doppelmarkierung optimiert, wodurch eine noch bessere Auflösung überlappender Signale in den Spektren ermöglicht wird.

Die Ausbeute an  $^{15}\text{N}$ -Nef und  $^{15}\text{N}$ -Nef-Core war im Vergleich zu unmarkiertem, in LB-Medium exprimiertem Nef geringer und betrug etwa nur ein Fünftel. Die Reinigung erfolgte wie unter 3.3.4.1 angegeben.

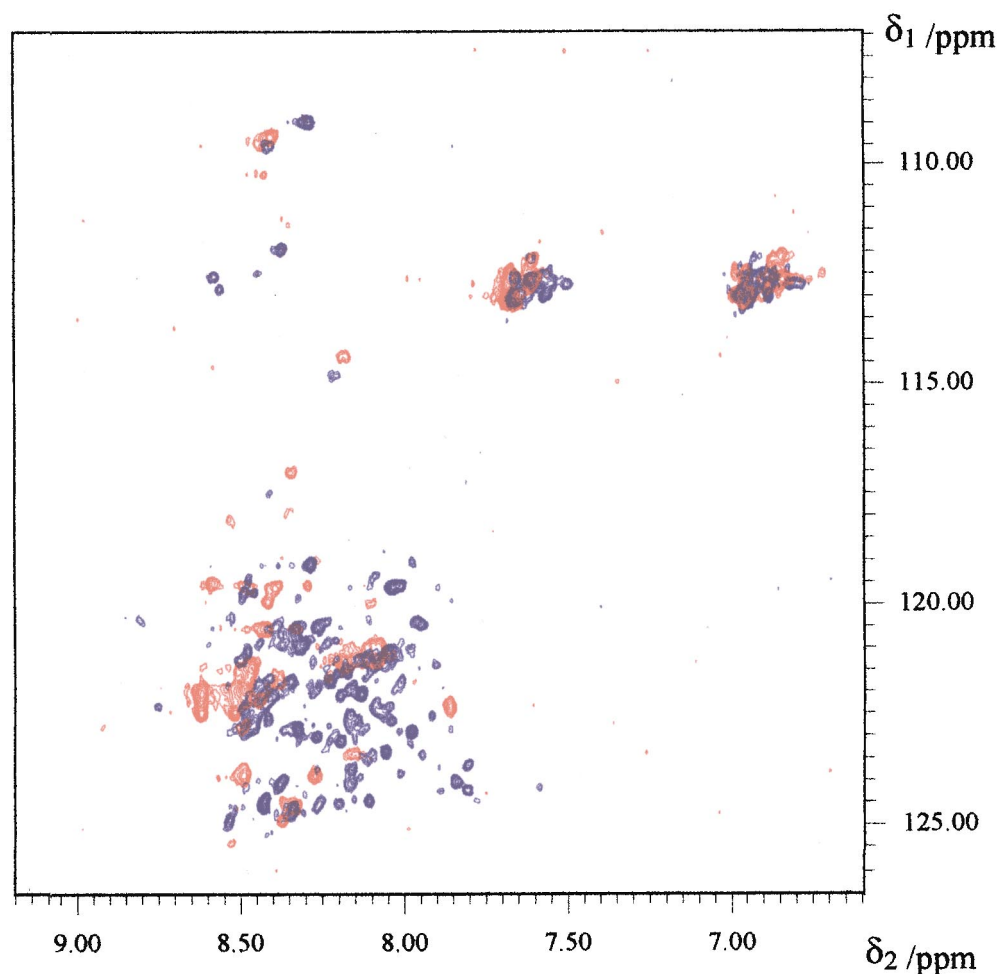


Bild 4.3:  $2\text{D-}^1\text{H-}^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektrum von markiertem Nef (2-206, blau) und Nef-Core (58-206, rot) in physiologischem Puffer, pH 7,1, 298 K, 800,13 MHz, NS 32, TD 4096\*512.

In Bild 4.3 ist ein Ausschnitt aus dem  $2\text{D-}^1\text{H-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum (Heteronuclear Single Quantum Coherence) der erfolgreichen  $^{15}\text{N}$ -Markierung von Nef und Nef-Core gezeigt. Jedes im HSQC-Spektrum auftretende Signal repräsentiert ein an ein  $^{15}\text{N}$ -Atom gebundenes Proton. Das vollständige Spektrum besteht somit im Wesentlichen aus den Signalen der  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen des Proteinrückgrats, und weiterhin aus den Signalen der  $\text{NH}_2$ -Gruppen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin (bei 6,8 und 7,6 ppm) bzw. der aromatischen  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen von Tryptophan und Histidin (10,3 ppm). Das Nef-Protein (blau) mit seinen 206 Aminosäuren zeigt wie zu erwarten mehr Signale als das um 57 Aminosäuren kürzere Nef-Core (rot). Die größere Linienbreite der Nef-Core Signale deutet auf eine verstärkte Aggregation des Core-Proteins hin.

Um die noch vorhandenen Signalüberlagerungen im Bereich von 8,0-8,5 ppm aufzulösen, wurden zusätzliche dreidimensionale  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ -NOESY-HMQC (Nuclear Overhauser

Effect Spectroscopy, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Experiment) Spektren aufgenommen. Damit konnten einzelne Aminosäuren zugeordnet werden. Aufgrund der guten  $^{15}\text{N}$ -Dispersion der Signale ist mit einer doppelmarkierten Probe, d.h.  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$ , eine Zuordnung der meisten Aminosäuren möglich.

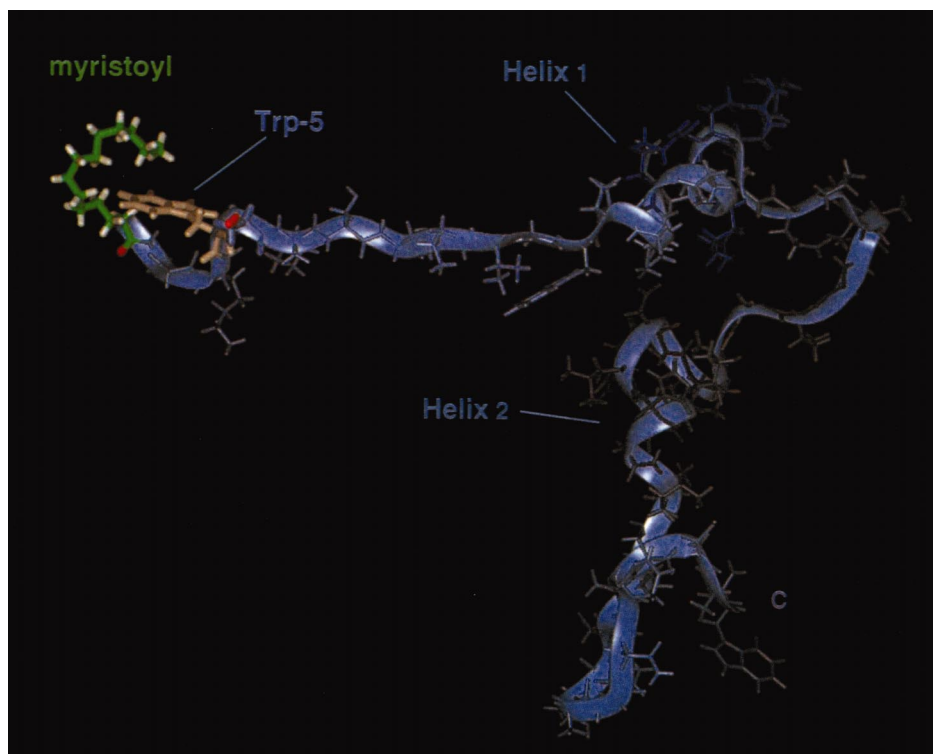


Bild 4.4: NMR-Struktur der myristoylierten HIV-1 Nef-Anker-Domäne (aus Geyer et al., 1999).

Unter Zuhilfenahme des  $^{15}\text{N}$ -markierten Nef-Proteins erfolgte die Strukturaufklärung der N-terminalen Anker-Domäne des Nef-Proteins. Die NMR-Experimente der Anker-Domäne zeigten, daß der Anker relativ ungefaltet und mit Ausnahme einiger kurzer helikaler Elemente in der Region von R17 bis R22 (Helix1, H1) und R35 bis G41 (Helix2, H2) gestreckt vorliegt (Geyer et al., 1999). Die NMR-Studien ergaben weiterhin, daß die Myristinsäure zu einer Stabilisierung der beiden helikalen Elemente H1 und H2 beiträgt (Bild 4.4).

#### 4.1.3 Renaturierung von Nef

Da ersten Expressionsversuchen zufolge eine Reinigung von HIV-2 Nef unter denaturierenden Bedingungen wahrscheinlich schien, wurden anhand von gereinigtem HIV-1 Nef die Auswirkungen einer De- und Renaturierung auf die Nef-Struktur untersucht. Zur Denaturierung wurde gereinigtes Nef mit 8 M Harnstoff inkubiert. Das 1D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Bild 4.5) des denaturierten Nefs zeigt die Merkmale von denaturierten Proteinen: Die meisten hochfeldverschobenen Methylgruppen sind nicht mehr zu beobachten (0,6 ppm bis -2,0 ppm) und die Linienbreite der NMR-Signale ist im Vergleich zu nativem Nef deutlich verringert. Wie das Spektrum des denaturierten Nef in Bild 4.5

zeigt, ist die Denaturierung nicht vollständig, da z.B. bei 0,6 ppm noch ein hochfeldverschobenes Signal zu erkennen ist. Dieser Effekt der unvollständigen Denaturierung mit Harnstoff ist auch bei anderen Proteinen bekannt und deutet auf eine vorhandene Tertiärstruktur des nativen Nef-Proteins hin.

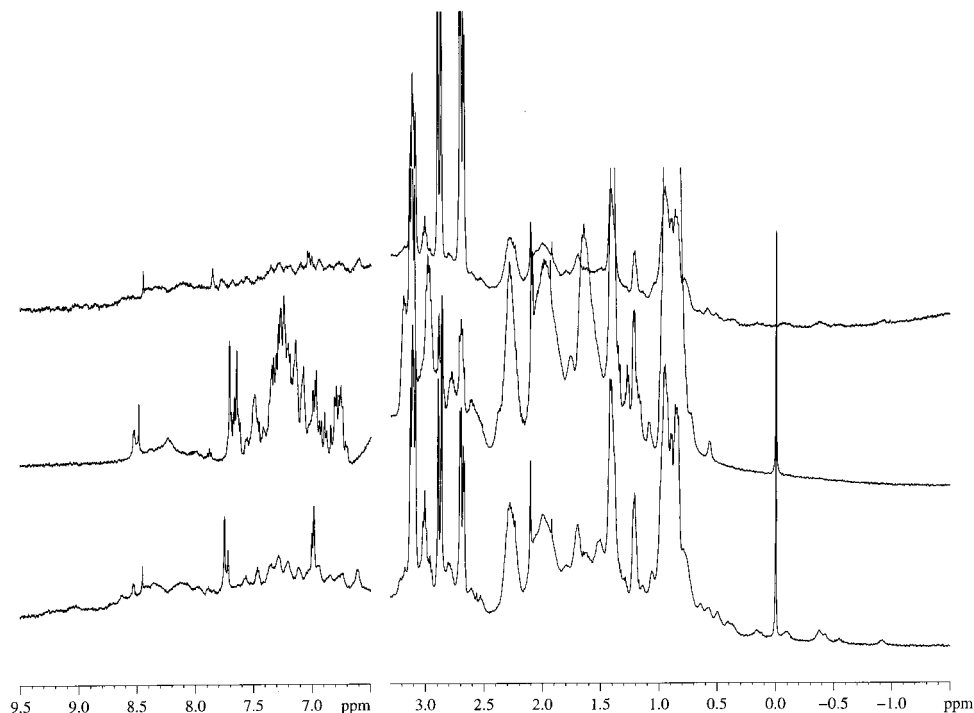


Bild 4.5: 1D  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 0,17 mM HIV-1 Nef nativ (unten), in 8 M Harnstoff denaturiert (mitte) und renaturiert (oben). Im mittleren Spektrum des denaturierten Nef ist noch bei 0,6 ppm ein hochfeldverschobenes Signal zu erkennen. 500,13 MHz, 298 K, NS 1024.

Anschließend wurde der Harnstoff schrittweise über Dialyse entfernt. Der Vergleich der NMR-Spektren von nativem Nef mit renaturiertem Nef zeigt keine wesentlichen Unterschiede, d.h. in 8 M Harnstoff denaturiertes Nef ist bezüglich seiner Tertiärstruktur vollständig renaturierbar. Da die renaturierte Protein-Probe durch die Dialyse verdünnt wurde, sind die Signale in den Vergleichsspektren stärker.

#### 4.1.4 Kristallisation

Parallel zu einer strukturellen Charakterisierung des Nef-Proteins mittels NMR-Spektroskopie wurde versucht, Nef für eine mögliche Röntgenstrukturanalyse zu kristallisieren. Die Kristallisation des Nef-Proteins wurde, wie in Kapitel 3.4.8 beschrieben, sowohl mit modifiziertem als auch mit nicht-modifiziertem Nef durchgeführt. Bei nicht-modifiziertem Nef war eine Kristallisationstendenz vorhanden, aber in ersten Ansätzen konnte kein zur Röntgenstrukturbestimmung geeigneter Kristall gezüchtet werden. Da während dieser Experimente die Nef-Kristallstruktur von Lee et al. (1996) veröffentlicht worden ist, wurde die Kristallisation des Nef-Proteins nicht fortgesetzt.

## 4.2 Nef-Phosphorylierung

Phosphorylierungen durch zelluläre Kinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proteinen. Sie können sowohl aktivierend als auch inhibierend auf ihr Zielprotein wirken. Für das Nef-Protein wurden mehrfach Wechselwirkungen mit zellulären Kinasen beschrieben. (Saksela et al., 1995, Sawai et al., 1996, Nunn und Marsh, 1996, Lu et al., 1996, Moarefi et al., 1997, Baur et al., 1997, Fackler et al., 2000). Dabei ist Nef sowohl mit Serinkinasen als auch mit Mitgliedern der Src-Kinase Familie assoziiert. Mittels Phosphor-NMR-Spektroskopie, Western-Blot-Analyse und Protein-Sequenzierung wurde exprimiertes Nef-Protein auf eine Phosphorylierung nach Koexpression mit der Src-Kinase Lck hin untersucht.

Für die Durchführung der Versuche wurde in Insektenzellen exprimiertes HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> eingesetzt. Das gereinigte Protein wurde von Dr. Adamski, Bayer AG (Wuppertal) zur Verfügung gestellt.

### 4.2.1 Phosphor-NMR

Die Phosphor-NMR-Spektroskopie ist eine sehr sensitive Methode um Protein-Phosphorylierungen nachzuweisen. Die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen wurden mit einem direkten Phosphorkopf bei 298°K und 202 MHz durchgeführt.

Das 1D- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> zeigt bei 3,9 ppm ein deutliches Phosphorsignal, das auf ein phosphoryliertes Serin (pSer) und/oder phosphoryliertes Threonin (pThr) zurückzuführen ist (Bild 4.6). Eine genaue Unterscheidung zwischen pSer oder pThr ist wegen der Überlappung der Signale für beide Aminosäuren bei nativem Nef nicht möglich. Erst durch eine Denaturierung des Nef-Protein hätten die Phosphorsignale eindeutig zugeordnet werden können. Wegen der geringen Menge, die an Nef-Protein zur Verfügung stand, wurde auf eine Denaturierung verzichtet.

Wurde das Nef-Protein mit der Tyrosinkinase Lck koexprimiert, zeigt sich eine neu hinzukommende Phosphorylierung an einem Tyrosinrest (−1 ppm). Durch Zugabe von anorganischem Phosphat ( $\text{P}_i$ , 2,1 ppm) wurde sichergestellt, daß die Signale bei 3,9 ppm und −1 ppm von einer Phosphorylierung am Protein und nicht von einer Verunreinigung herrühren. Guanosindiphosphat (GDP, −6,5 ppm und −10,9 ppm) wurde als interner Intensitätsstandard eingesetzt. Unter der Annahme, daß nur Serin und Tyrosin (Bild 4.7) phosphoryliert vorliegen, zeigt der Vergleich der Integrale der pSer- und pTyr-Signale, daß Tyrosin nur etwa zur Hälfte phosphoryliert vorliegt. Als Vergleich wurden in *E.coli* exprimiertes und gereinigtes HIV-2 Nef<sub>HOM</sub> (Kapitel 3.3.5) und HIV-1 Nef gemessen und zeigten wie erwartet keine Phosphorylierung in der  $^{31}\text{P}$ -NMR (o. Bild).

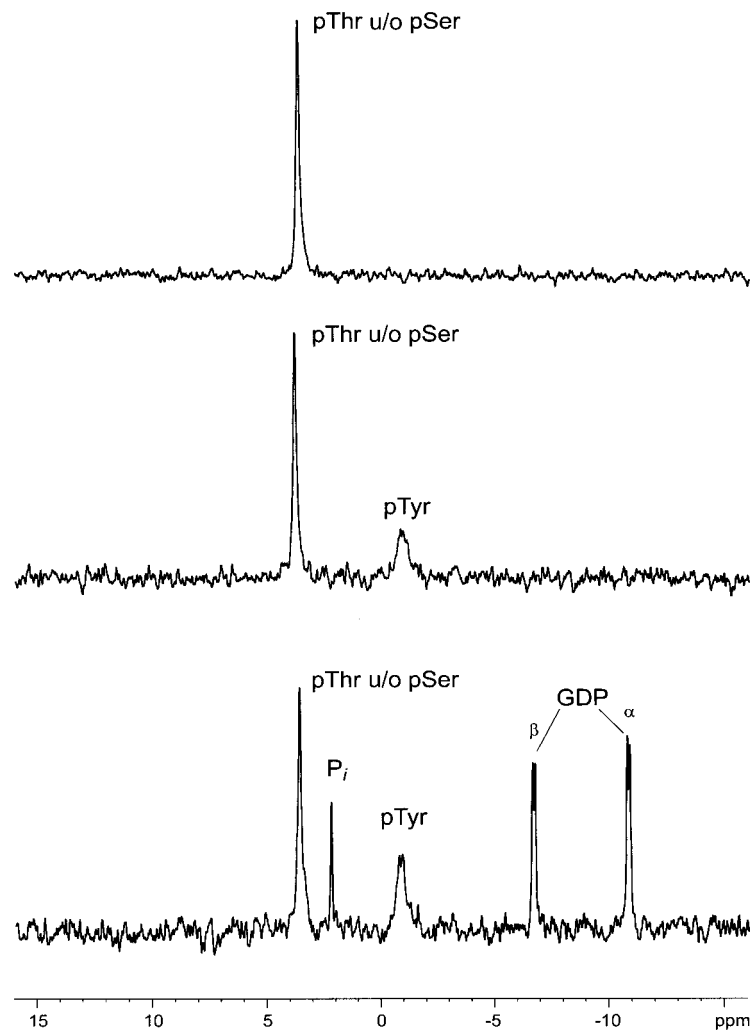


Bild 4.6:  $1D\text{-}^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von 0,3 mM gereinigtem HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> (oben), mit Lck koexprimiert (mitte) und GDP als Intensitätsstandard (unten), in  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 8,4, 298 K, 202 MHz, NS 8192, direkter Phosphorkopf (10 mm). Die Phosphorresonanzsignale der spezifisch phosphorylierten Aminosäuren Serin (pSer), Threonin (pThr) und Tyrosin (pTyr) sind zu erkennen. Die beiden Resonanzsignale von Guanosindiphosphat (GDP, -6,5 ppm und -10,9 ppm) wurden als interner Intensitätsstandard verwendet.

#### 4.2.2 Western-Blot

Die Phosphorylierung des HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> wurde auch im Western-Blot mit Antikörpern untersucht, die spezifisch die phosphorylierten Aminosäuren Serin (pSer), Threonin (pThr) und Tyrosin (pTyr) erkennen.

Dazu wurden HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> und HIV-1 Nef im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert (Bild 4.7). Mit dem anti-Serin Antikörper konnte im Western-Blot eindeutig ein phosphoryliertes Serin detektiert werden. Weiterhin zeigte sich im Blot ebenso wie in der NMR-Spektroskopie eine Phosphorylierung an einem Tyrosinrest, wenn Nef mit Lck koexprimiert vorliegt. Im Vergleich dazu wurde in *E.coli* exprimiertes HIV-1 Nef

von den Antikörpern pSer und pTyr nicht erkannt. Für Threonin wurden zwei unterschiedliche Antikörper getestet. Der pThr-Antikörper von Biomol zeigte keine Phosphorylierung während der pThr-Antikörper von Sigma sowohl bei der HIV-1 Nef Negativ-Kontrolle als auch bei HIV-2 Nef detektiert werden konnte.

Mittels Sequenzierungen, die von Dr. R. Kellner, Merck KgaA (Darmstadt), durchgeführt wurden, konnten ebenfalls ein phosphoryliertes Serin und Tyrosin nachgewiesen werden. Bei der Sequenzierung wurde kein phosphoryliertes Threonin detektiert.

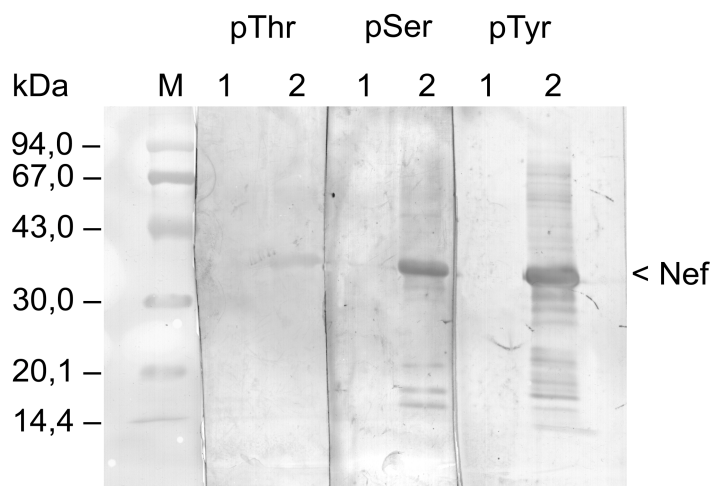


Bild 4.7: Western-Blot von HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> nach Koexpression mit Lck (Spur 2), mit den anti-Phospho-Serin, -Threonin und -Tyrosin Antikörpern. Als Kontrolle wurde in *E.coli* exprimiertes HIV-1 Nef aufgetragen (Spur 1).

Die Auswertung aller drei Methoden zeigt, daß in Insektenzellen exprimiertes HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> an einem Serin phosphoryliert vorliegt und nach Koexpression mit der Tyrosinkinase Lck auch ein Tyrosin phosphoryliert wird.

### 4.3 Proteolytische Spaltung

In eukaryontischen Zellen kommt Nef gewöhnlich N-terminal myristoyliert vor. Diese Myristoylierung ist für alle bisher beschriebenen Funktionen des Nef-Proteins essentiell (Doms und Trono, 2000). Um den Einfluß dieser Myristoylierung auf die proteolytische Spaltung von HIV-1 Nef durch die HIV-1 Protease zu untersuchen, wurde in Insektenzellen exprimiertes, myristoyliertes Nef mit 0,2 µM HIV-1 Protease für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Wie der Western-Blot zeigt, wird das myristoylierte Nef in ein etwa 18 kDa großes Fragment gespalten, das der Nef-Core-Domäne (L58-C206) des nicht myristoylierten Nef entspricht (Bild 4.8). Somit werden myristoyliertes und nicht myristoyliertes Nef gleichermaßen gespalten und die Myristoylierung hat auf die proteolytische Spaltung keinen Einfluß. In diesem Ansatz wurde auch die Spezifität der HIV-Proteasen getestet.



Dazu wurde das myristoylierte HIV-1 Nef mit der HIV-2 Protease inkubiert. Nach 12 h Inkubation bei Raumtemperatur resultierte ein gleich großes Nef-Fragment wie bei der HIV-1 Protease (Bild 4.8).

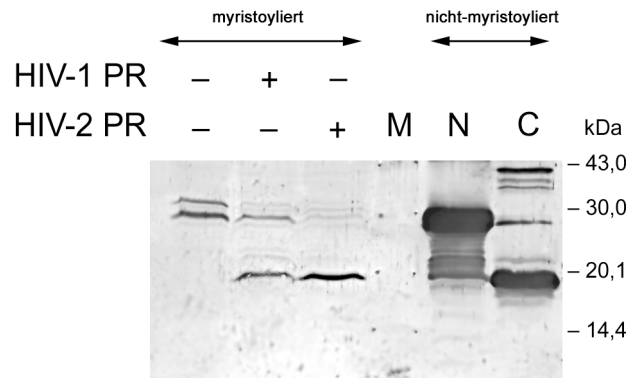


Bild 4.8: Western-Blot des proteolytischen Verdaus von myristoyliertem HIV-1 Nef aus Insektenzellen mit 0,2  $\mu$ M HIV-1 und HIV-2 Protease (PR), 12 h bei Raumtemperatur, pH 6,6. Die linke Spur zeigt ungespaltenes Nef-Protein. Als Vergleich wurden nicht myristoyliertes HIV-1 Nef (N) und Nef-Core (C) aus *E.coli* aufgetragen.

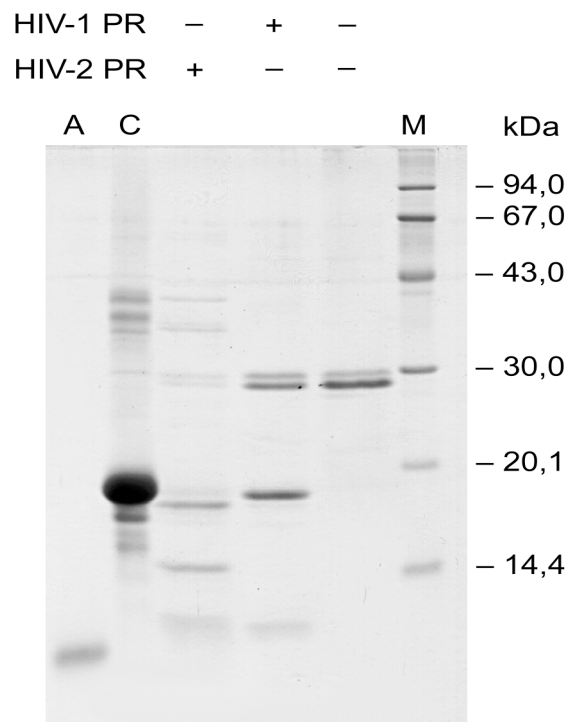


Bild 4.9: SDS-Gel der proteolytischen Spaltung von 11  $\mu$ M gereinigtem HIV-1 Nef aus *E.coli* mit 0,2  $\mu$ M HIV-1 und HIV-2 Protease, 12 h bei Raumtemperatur, pH 6,0. Gereinigtes Nef-Core (C) und synthetisierter Nef-Anker (A) sind als Kontrolle aufgetragen.

In einem weiteren Experiment wurde in *E.coli* exprimiertes und somit nicht myristoyliertes, gereinigtes HIV-1 Nef ebenfalls mit der HIV-1 und HIV-2 Protease inkubiert.

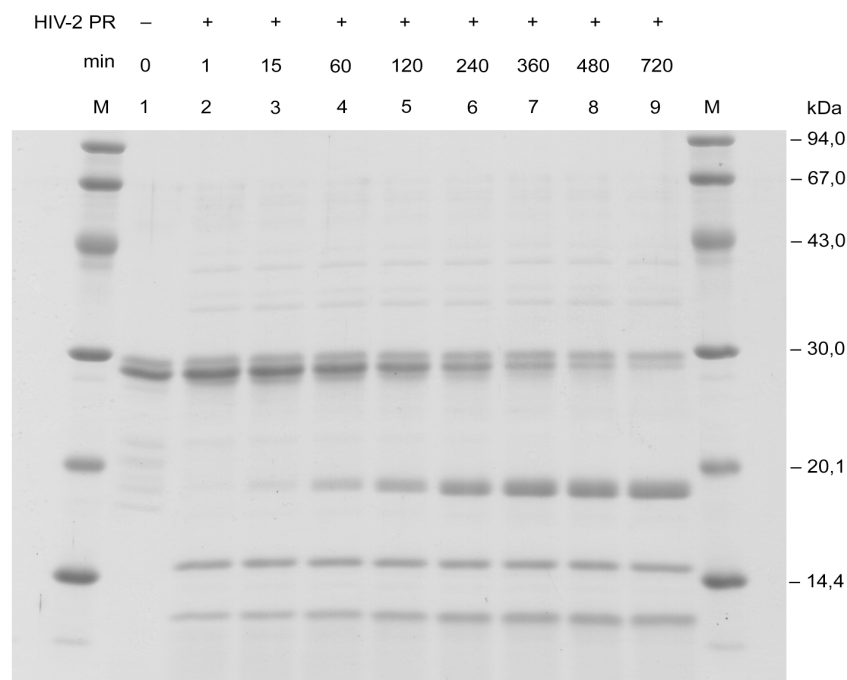


Bild 4.10: SDS-Gel der proteolytischen Spaltung von 16  $\mu$ M gereinigtem HIV-1 Nef aus *E.coli* mit 0,2  $\mu$ M HIV-2 Protease im zeitlichen Verlauf von 0 – 720 min (Spur 1-9), bei Raumtemperatur, in physiologischem Puffer, pH 6,0.

Wie erwartet zeigte das SDS-Gel (Bild 4.9) eine Nef-Anker- und eine Nef-Core-Domäne, wobei die Nef-Core-Domäne bei Inkubation von Nef mit der HIV-2 Protease im SDS-Gel ein kleineres Molekulargewicht aufweist. Aus dem zeitlichen Verlauf in Bild 4.10 wird deutlich, daß die HIV-2 Protease zuerst das erwartete 18 kDa große Fragment und im weiteren Verlauf noch zwei kleinere Fragmente im Bereich von 18 kDa prozessiert. Die Sequenzierung der drei Fragmente ergab die N-terminalen Sequenzen LEAQE, QEEEE und EEVGF. Somit spaltet die HIV-2 Protease das HIV-1 Nef-Protein jeweils um drei Aminosäuren versetzt zwischen den Aminosäuren W57 und L58, A60 und Q61 und E63 und E64. Neu hinzukommend ist ein 14 kDa Fragment, das N-terminal die Sequenz LIHSQR hat und durch Spaltung des Nef-Proteins zwischen G98 und L99 entsteht.

Die Nef-Fragmente wurden auch mit drei spezifischen Antikörpern identifiziert, die gegen den N-terminalen Nef-Anker, gegen die Nef-Core-Domäne und gegen das gesamte Nef-Protein gerichtet waren (Bild 4.11). Während der anti-Anker Antikörper das gesamte Nef-Protein und den synthetisierten Anker erkennt, werden mit dem anti-Core Antikörper das gesamte Nef-Protein und die Core-Domäne identifiziert. Nur der anti-Nef Antikörper ist in der Lage alle drei Fragmente, Nef-Anker, Nef-Core und das gesamte Nef-Protein, zu detektieren.

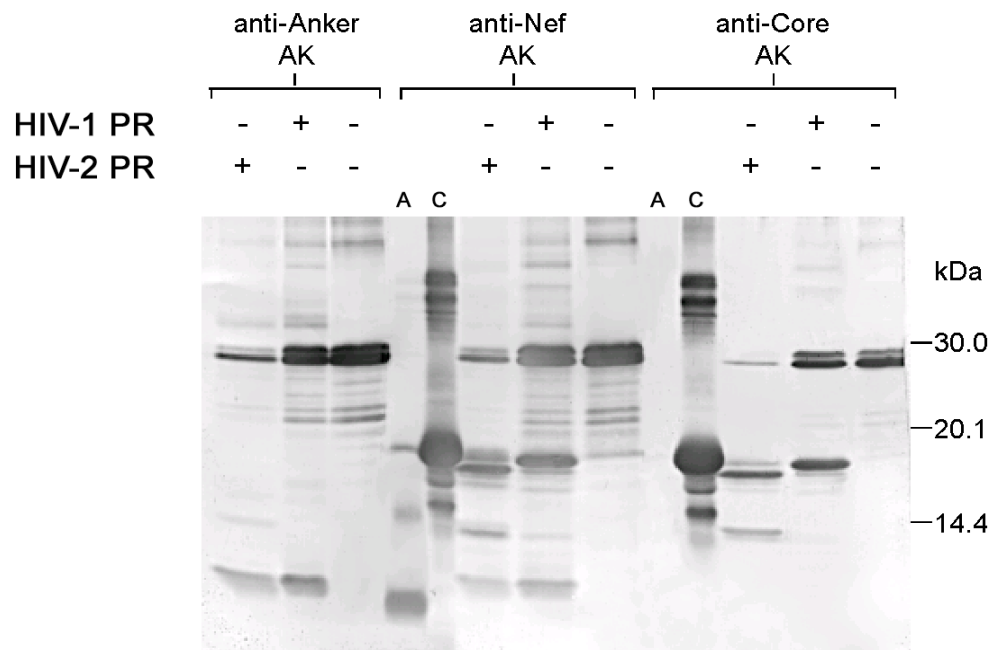


Bild 4.11: Western-Blot des proteolytischen Verdaus von 11  $\mu$ M gereinigtem HIV-1 Nef aus *E.coli* mit 0,2  $\mu$ M HIV-1 und HIV-2 Protease, 12 h bei Raumtemperatur, in physiologischem Puffer, pH 6,0, mit drei verschiedenen Antikörpern, gerichtet gegen den N-terminalen Nef-Anker (anti-Anker), gegen die Nef-Core-Domäne (anti-Core) und gegen das gesamte Nef-Protein (anti-Nef). Synthetisierter Nef-Anker (A) und gereinigtes Nef-Core (C) wurden als Kontrolle aufgetragen.

#### 4.4 Nef-Aktin Interaktionen

Das Nef-Protein ist ein multifunktionelles Protein, das für das HIV-Virus *in vivo* absolut notwendig ist. Trotz mehrerer Interaktionspartner und definierter Funktionen ist die biologisch relevante Funktion dieses Proteins weiterhin unklar. Das Nef-Protein besitzt keine nachweisbare enzymatische Aktivität. Es muß seine Funktionen daher mit oder über zelluläre Interaktionspartner vermitteln.

Zellulärem Aktin kommt bei viralen Prozessen eine gewisse Bedeutung zu. So wurde im Zusammenhang mit HIV gezeigt, daß Aktin in die HIV-Morphogenese involviert ist (Ott et al., 1996, Damsky et al., 1977) und auch bei der Bildung und dem Abschnüren neuer Viren von der Zelloberfläche infizierter Zellen beteiligt ist (Arthur et al., 1992). Das Nef-Protein erhöht die Infektiosität viraler Partikel und könnte z.B durch eine vermehrte Freisetzung viraler Partikel dazu beitragen.

Mit Hilfe biochemischen und biophysikalischen Methoden, die im folgenden in Kapitel 4.4.1 bis 4.4.5 dargestellt werden, wurde untersucht, ob Nef und Aktin *in vitro* direkt miteinander wechselwirken. Dazu wurden sowohl  $Mg^{2+}$ - als auch  $Ca^{2+}$ -Aktin eingesetzt.  $Mg^{2+}$ -Aktin zeigt im Gegensatz zu  $Ca^{2+}$ -Aktin eine hochmobile N-terminale Domäne. Da die Ergebnisse von  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Aktin identisch waren, wird im folgenden auf eine Unterscheidung verzichtet.

#### 4.4.1 Sedimentation

Aktin kommt in Zellen in zwei Formen vor. Aus der monomeren Form, dem globulären G-Aktin, geht das filamentöse F-Aktin durch Erhöhung der Ionenstärke hervor. Dieses F-Aktin kann im Gegensatz zu G-Aktin bei hoher g-Zahl sedimentiert werden. Eine Eigenschaft, die man sich bei dem Sedimentationsversuch zunutze macht.

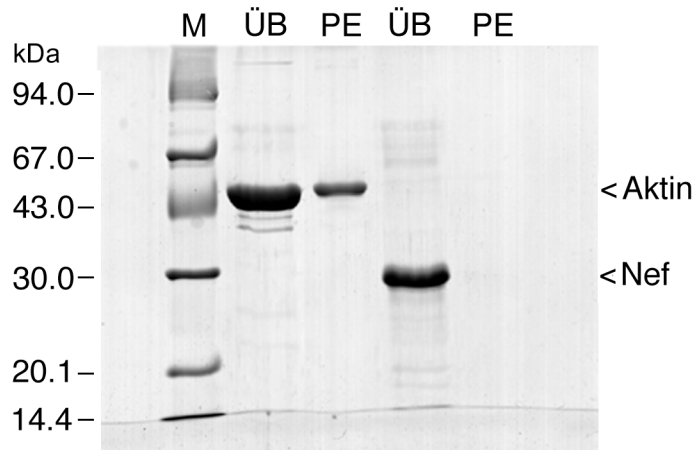


Bild 4.12: SDS-Gel von G-Aktin und HIV-1 Nef in G-Aktin Puffer, pH 7,8, nach Sedimentation bei 100000 rpm, TLA-Rotor, bei 4°C. Überstand (ÜB) und sedimentiertes Pellet (PE) der Proteinproben nach Zentrifugation sind nebeneinander aufgetragen.

In einem Vorversuch wurden G-Aktin und Nef auf ihr Sedimentationsverhalten hin untersucht (Bild 4.12). Wie zu erwarten sind beide Proteine im Vergleich zu F-Aktin nicht sedimentierbar und verbleiben beim Zentrifugieren im Überstand. Kleinere Reste nicht depolymerisierten F-Aktins, die bei der G-Aktin-Probe noch vorhanden waren, sind als sedimentierbares Pellet nachweisbar (Bild 4.12, Spur PE bei Aktin).

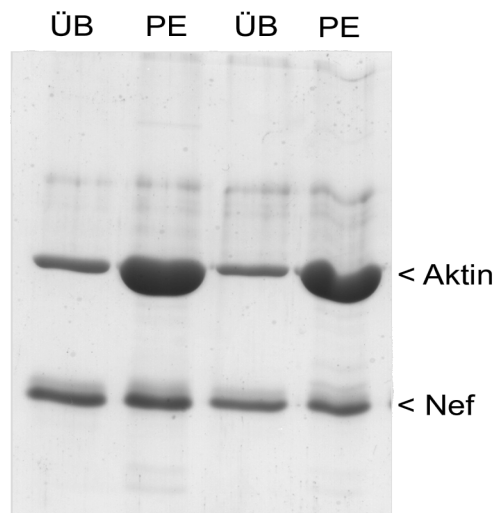


Bild 4.13: SDS-Gel der Sedimentation von F-Aktin in Gegenwart von HIV-1 Nef bei 100000 rpm, TLA-Rotor, bei 4°C. Überstand (ÜB) und sedimentiertes Pellet (PE) der Proteinproben nach Zentrifugation sind nebeneinander aufgetragen.

Wurde Nef mit F-Aktin inkubiert und anschließend bei 100000 rpm zentrifugiert, waren sowohl Nef als auch F-Aktin im sedimentierten Pellet zu finden (Bild 4.13). Rinderse-  
rumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) hingegen verblieb bei gleicher Vorgehens-  
weise im Überstand (o. Bild). Das veränderte Sedimentationsverhalten von Nef in An-  
wesenheit von F-Aktin läßt auf eine Wechselwirkung mit F-Aktin schließen.

Für Nef-Core und F-Aktin wurden die gleichen Sedimentationsergebnisse erzielt (Bild 4.14). Somit muß die für die Nef-Aktin verantwortliche Bindungsstelle im Bereich der Core-Domäne, also zwischen L58 und C206 des Nef-Proteins lokalisiert sein. Diese direkte Nef-Aktin Interaktion wurde im Hefe-II-Hybrid-System bestätigt (Fackler et al., 1997b).

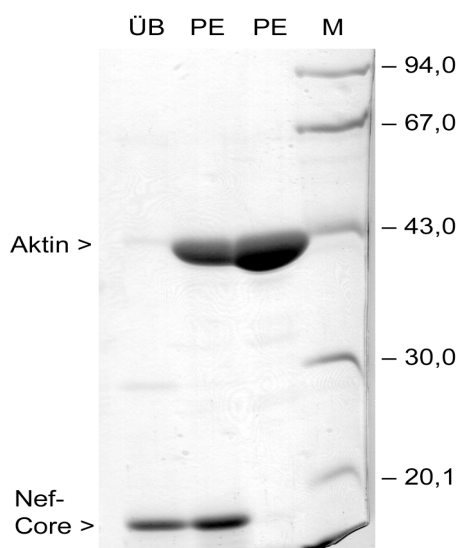


Bild 4.14: SDS-Gel der Sedimentation von F-Aktin in Gegenwart von HIV-1 Nef-Core bei 100000 rpm, TLA-Rotor, bei 4°C. Überstand (ÜB) und sedimentiertes Pellet (PE) sind nebeneinander aufgetragen, zusätzlich sedimentiertes Pellet von F-Aktin ohne Nef-Core.

Guy et al. (1987) und Wolber (1994) konnten für das Nef-Protein sowohl eine Nukleotidbindung als auch eine GTPase- bzw. ATPase-Aktivität nachgewiesen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Sedimentationsversuche der Einfluß von ATP bzw. ADP (0,5 bis 5 mM) auf die Aktin-Nef Wechselwirkung untersucht. Die Zugabe der Nukleotide führte nicht zu einer signifikanten Änderung der Wechselwirkung zwischen Nef und Aktin, was darauf hinweist, daß die Nef-Aktin Interaktion weder ATP noch ADP abhängig ist.

#### 4.4.2 Mikrokalorimetrie

Die Mikrokalorimetrie ist eine thermodynamische Technik mit der sich feststellen läßt wie z.B. Proteine miteinander wechselwirken. Wenn Proteine aneinander binden, entsteht entweder Wärme oder Wärme wird aufgenommen. Die Messungen dieser Wärmedifferenz erlauben eine gute Bestimmung von Bindungskonstanten, Reaktionsstöchiometrien und Reaktionsenthalpien (Jelesarov und Bosshard, 1999).

Um die Nef-Aktin-Interaktion näher zu charakterisieren, wurden mikrokolorimetrischen Messungen wie unter 3.4.5 beschrieben durchgeführt. Eine 35  $\mu\text{M}$  Aktinlösung wurde in der Meßküvette vorgelegt und mit Nef titriert.

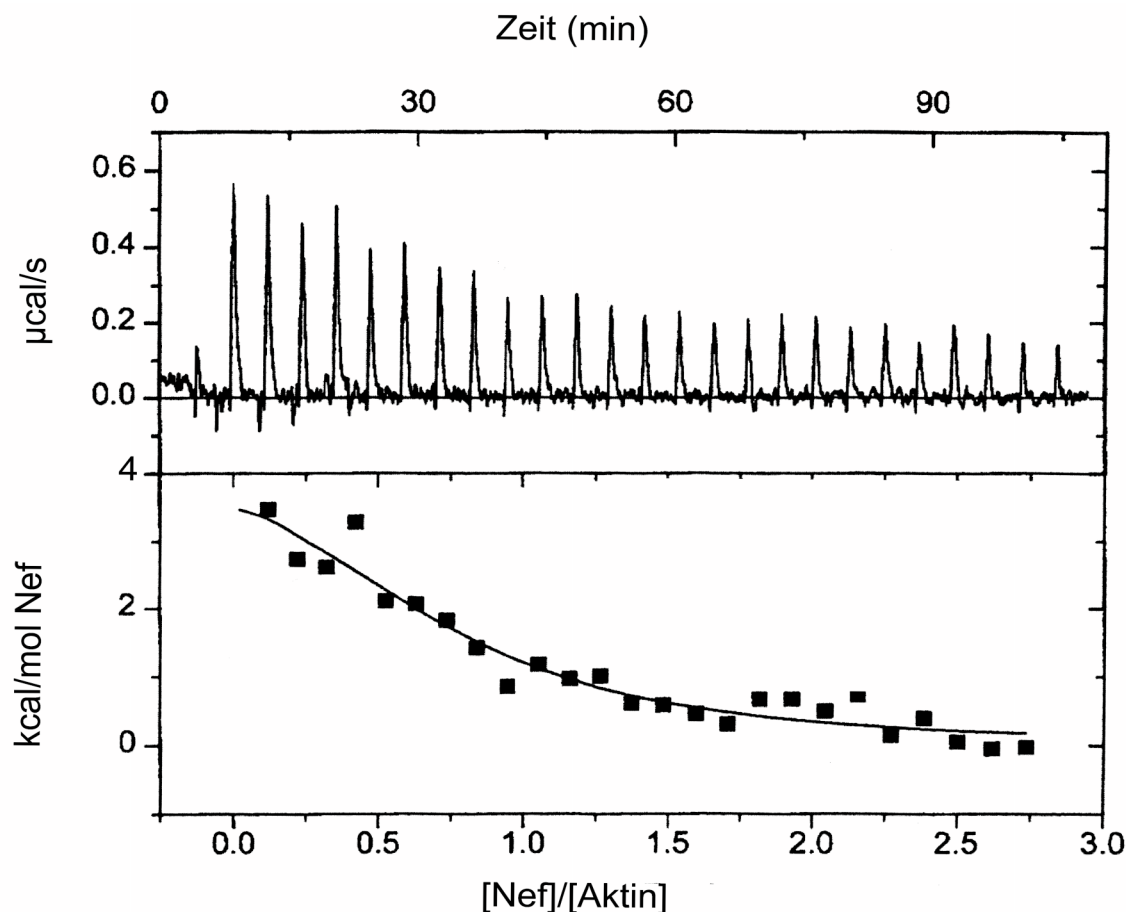


Bild 4.15: Endothermer Verlauf der Isothermischen Titration von 35  $\mu\text{M}$  F-Aktin mit 400  $\mu\text{M}$  HIV-1 Nef in F-Aktin Puffer, pH 7,8, Temperatur 27°C, Rührgeschwindigkeit 400 rpm (obere Hälfte). Auswertung der erhaltenen Daten mit dem Programm Origin, MicroCal Software, Northampton, USA (untere Hälfte).

Tabelle 4.1 Ergebnisse der Mikrokolorimetrischen Messungen von F-Aktin und Nef bei 25°C und 17,5°C (Auswertung mit dem Programm Origin, MicroCal Software, Northampton, USA.)

	Titration bei 27°C	Titration bei 17,5°C
$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	10,3	12,5
$\Delta H$ (kJ/mol)	4,9	5,7
N (Aktin vorgelegt)	0,72	0,36

Bild 4.15 zeigt den endothermen Verlauf der Isothermischen Titration von F-Aktin mit Nef bei 27°C. Die Auswertung der Daten ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Wurde die Meßtemperatur der Aktin-Nef Titration auf 17,5°C erniedrigt, verlief die Messung zu Be-

ginn endotherm und wurde im Verlauf der weiteren Titration exotherm (Bild 4.16). Bei den Titrationen von Aktin mit Aktin-Puffer und Aktin-Puffer mit Nef blieb die Reaktionswärme (= Verdünnungswärme) konstant exotherm (o.Bild).

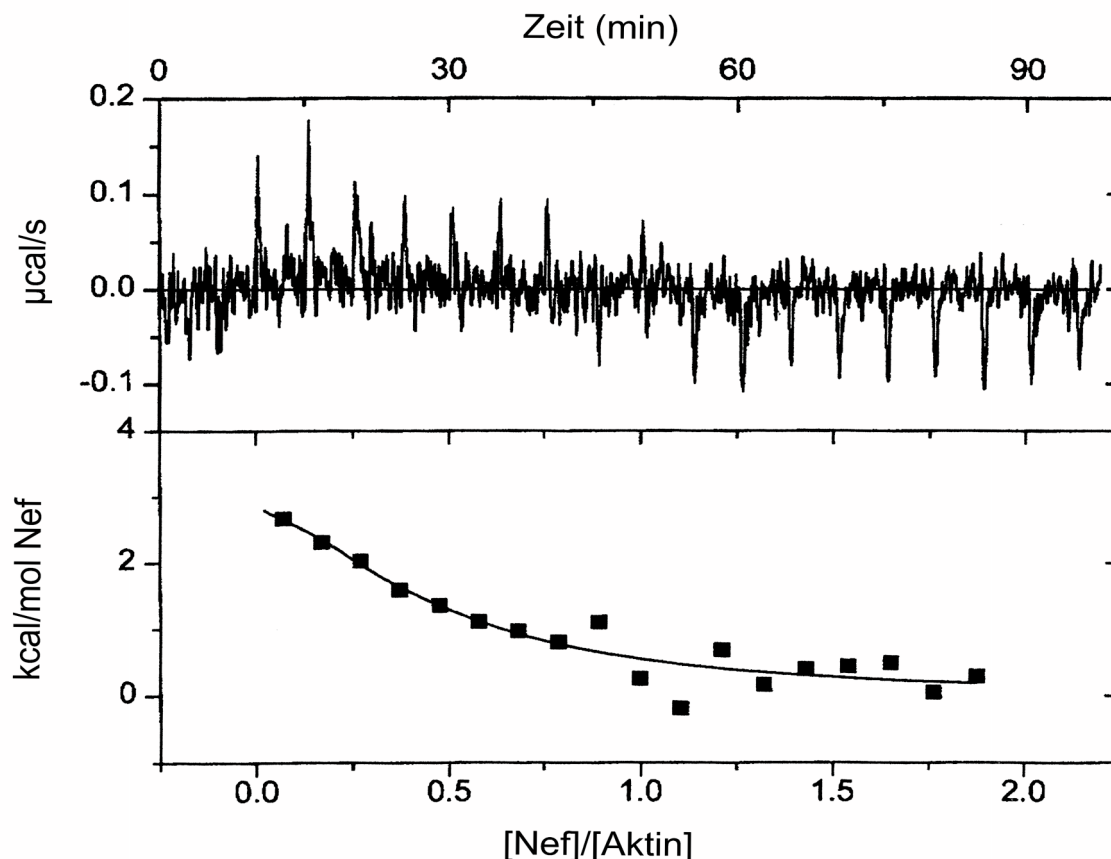


Bild 4.16: Isothermische Titration von 35  $\mu\text{M}$  F-Aktin mit 400  $\mu\text{M}$  HIV-1 Nef in F-Aktin Puffer, pH 7,8, Temperatur 17,5°C, Rührgeschwindigkeit 400 rpm (obere Hälfte) und Auswertung (untere Hälfte).

Bei der Titration mit F-Aktin wurden für Nef-Core analoge Ergebnisse erzielt (o. Bild). Die mikrokalorimetrischen Messungen von G-Aktin und Nef bzw. Nef-Core ließen keine eindeutige Aussage über eine Bindung zu.

#### 4.4.3 Einfluß von Nef auf die Aktinpolymerisation

G-Aktin wird durch Erhöhung der Ionenstärke zu F-Aktin polymerisiert. In eukaryontischen Zellen kann Aktin trotz hoher Ionenstärke durch Komplexierung mit monomerbindenden Proteinen wie Profilin in seiner monomeren Form vorliegen.

Ein möglicher Einfluß von Nef auf die Aktinpolymerisation wurde sowohl im Viskosimeter als auch mit Hilfe von  $^{374}\text{Pyrenyl}$ -Aktin im Fluoreszenzgerät durchgeführt. Bei Fluoreszenzmessungen werden die bei Viskositätsmessungen auftretenden Scherkräfte vermieden, welche die Polymerisation stören können.

Wie aus Bild 4.17 hervorgeht, zeigte Aktin in Gegenwart von äquimolaren Mengen an Nef eine verlangsamte Polymerisation mit einem etwas niedrigeren  $\eta$ -Wert im Plateau, welcher ein Maß für die Menge des polymerisierten Aktins ist. Für Nef-Core wurde ebenfalls eine verlangsamte Polymerisation beobachtet.

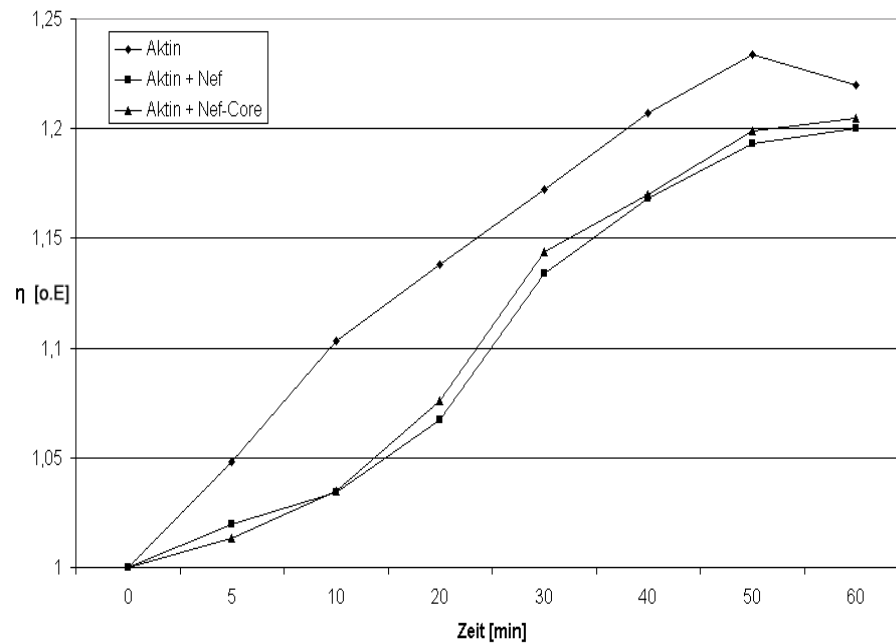


Bild 4.17: Polymerisationsverlauf von ca.  $57 \mu\text{M}$  Aktin in Gegenwart äquimolarer Mengen an Nef bzw. Nef-Core, verfolgt über Kapillarviskosimetrie bei Raumtemperatur im zeitlichen Verlauf von 0-60 Minuten.

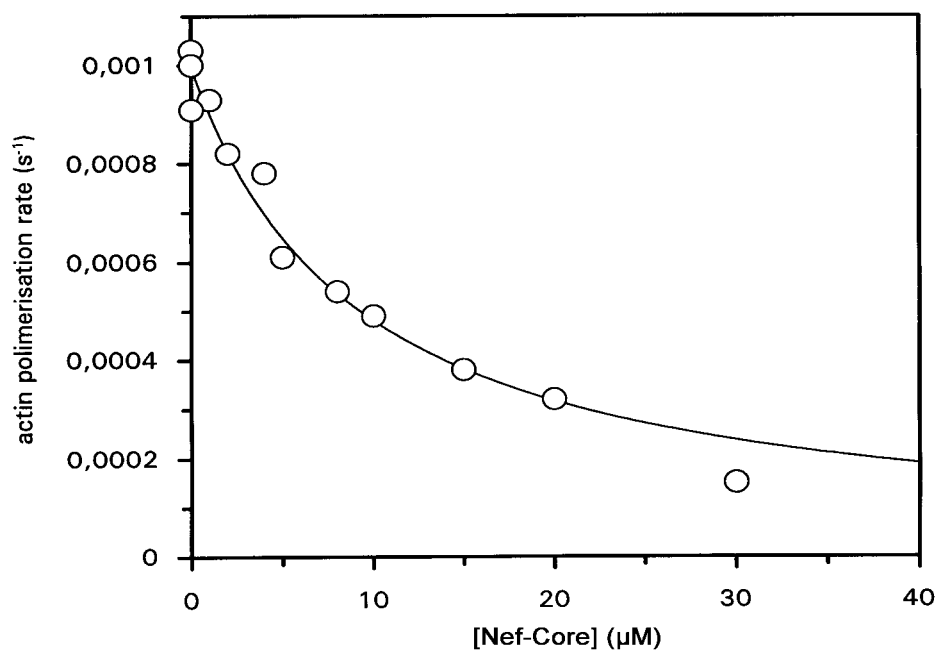


Bild 4.18: Polymerisation von  $^{374}\text{Pyrenyl}$ -Aktin in Abhängigkeit steigender Nef-Core Konzentrationen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GraFit (Erithacus Software, Ltd., Staines, UK).



In Fluoreszenzmessungen mit  $^{374}$ Pyrenyl-Aktin wurde das im Viskosimeter erhaltene Ergebnis bestätigt, daß Nef die Polymerisation von Aktin verlangsamt. Es zeigte sich zusätzlich mit steigender Nef bzw. Nef-Core Konzentration eine abnehmende Aktinpolymerisation (Bild 4.18).

Die Auswertung der Fluoreszenzmessungen mittels Kurvenanpassung an eine Reaktion erster Ordnung ergab eine Dissoziationskonstante von etwa  $9,3 \mu\text{M}$  und zeigt damit einen ähnlichen Wert wie die mikrokalorimetrischen Messungen.

#### 4.4.4 Fluor-NMR

Für weitere Bindungsstudien mit Aktin wurde Nef an frei zugänglichen Cysteinresten mit 4-perfluoro-tert.-butyl-phenyliodoacetamid markiert (Kalbitzer et al., 1991) und mittels Fluor-NMR-Spektroskopie gemessen. In den gemessenen  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren ließen sich bereits bei einer  $40 \mu\text{M}$  Nef-Probe zwei deutliche Signale bei  $49,03 \text{ ppm}$  und  $48,77 \text{ ppm}$  erkennen. Da Nef mindestens zwei zugängliche Cysteine enthält (Schorr, 1994), sind auch zwei Signale zu erwarten. Aufgrund der Tertiärstruktur des Nef-Proteins (Grzesiek et al., 1996) ist die Fluormarkierung der Cysteine an Position 55 und 206 anzunehmen.

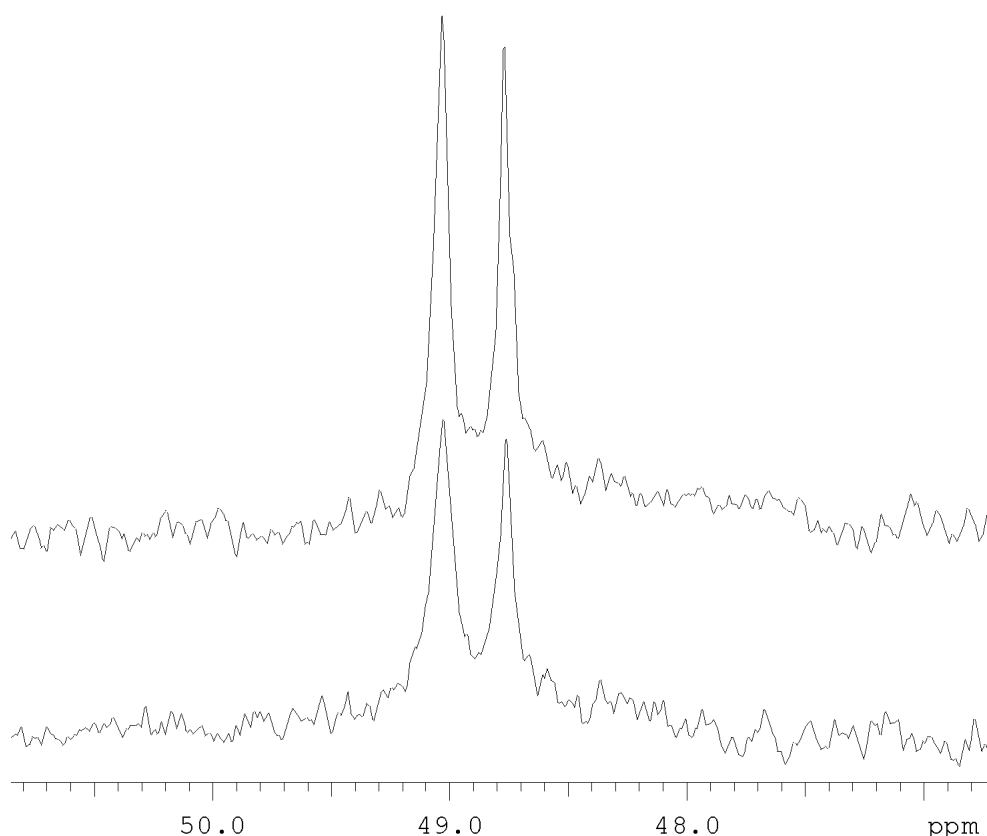
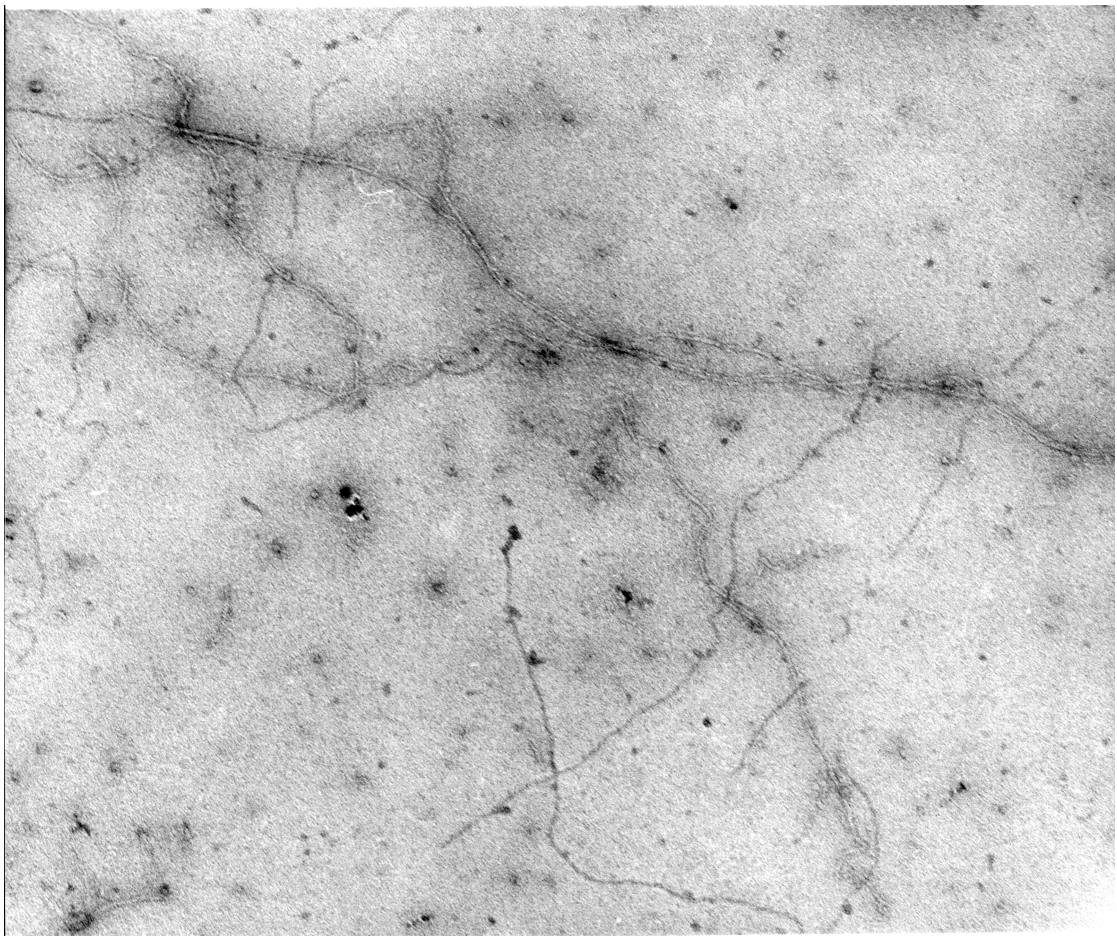


Bild 4.19: 1D- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von Fluor-markiertem Nef (unten, Probe verdünnt) in Anwesenheit von Aktin (oben), 303 K, Aktinpuffer pH 7,8, 470 MHz, Protonen-Probenkopf (5 mm), interner Standard Trifluoressigsäure (TFA). Bei  $49,03 \text{ ppm}$  und  $48,77 \text{ ppm}$  sind die Fluorsignale der markierten Cysteine C55 und C206 des Nef-Proteins zu erkennen.

Das markierte Nef wurde mit F-Aktin titriert. Bei einer Bindung der beiden Proteine im Bereich der Fluormarkierung würde man eine Signaländerung erwarten. Im Vergleich zu dem  $^{19}\text{F}$ -NMR-Ausgangsspektrum war jedoch nach Zugabe von Aktin keine Signaländerung zu erkennen, die auf eine Bindung von Aktin im Bereich der Cysteine C55 oder C206 des Nef-Proteins schließen läßt.

#### 4.4.5 Elektronenmikroskopie

Aktin-bindende Proteine können wie z.B. Gelsolin können Aktin-Filamente destabilisieren und zerstören. In verschiedenen Ansätzen wurde elektronenmikroskopisch untersucht, ob Nef bzw. Nef-Core F-Aktin fragmentieren können.



*Bild 4.20: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Aktinfilamenten in Anwesenheit von äquimolaren Mengen an Nef im Negativ-Kontrast.*

Aktin-Filamente erscheinen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als gleichförmige, ungefähr 8 nm dünne Fäden. In Bild 4.20 und Bild 4.21 sind exemplarisch elektronenmikroskopische Aufnahmen von F-Aktin in Gegenwart von Nef und Nef-Core gezeigt. Die langen, regelmäßigen Aktinfilamente sind deutlich zu erkennen. Im Vergleich zu Ansätzen, die nur Aktin alleine enthielten, konnten mittels Elektronenmikroskopie



keine signifikanten Veränderungen des F-Aktins sichtbar gemacht werden, die auf eine Fragmentierung der Aktin-Filamente hinweisen.

Weiterhin ließen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen aufgrund der geringen Größe von Nef keine eindeutigen Aussagen zu, ob Nef F-Aktin dekoriert, wie es von Myosin her bekannt ist.

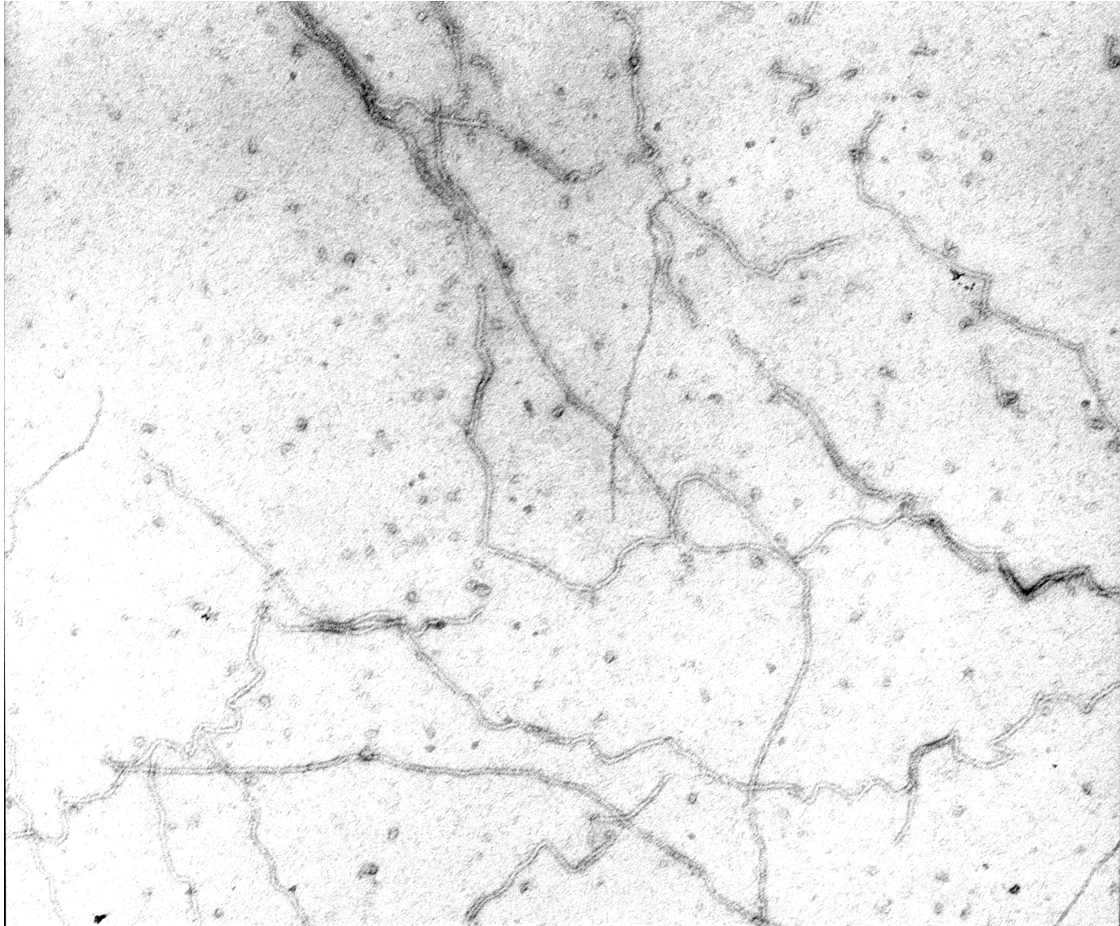


Bild 4.21: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Aktinfilamenten in Anwesenheit von äquimolaren Mengen an Nef-Core im Negativ-Kontrast.

## 4.5 Rac, Rho und Cdc42 Interaktionen

Kleine GTP-bindende Proteine der sogenannten Rho Familie bewirken durch Anregung äußerer Signale eine Umgruppierung der F-Aktin-Sruktur (Hall, 1994, Machesky und Hall, 1996, Zigmond, 1996). Mitglieder dieser Familie sind z.B. Rac, Rho und Cdc42.

Mit unterschiedlichen Methoden wie Kalorimetrie, und mant-Fluoreszenz wurde untersucht, ob Nef mit einem dieser Proteine interagiert und so auf Aktin und seine Organisation in der Zelle wirken kann. Für keines der drei Proteine konnte *in vitro* eine direkte Wechselwirkung mit Nef nachgewiesen werden.

Die Proteine wurden freundlicherweise von der AG Wittinghofer, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie (Dortmund), zur Verfügung gestellt.

## 4.6 Nef-Myosin Interaktionen

Neben Aktin ist auch Myosin eine Hauptkomponente in Muskel- und Nicht-Muskelzellen. Es ist immer dort vorhanden, wo Aktin-Filamente vorkommen. Myosine bestehen aus einem langen  $\alpha$ -helikalen Schwanzteil, einem Halsteil und zwei globulären Köpfen (Motordomäne), die neben den Bindungsstellen der leichten Ketten auch die von ATP und Aktin enthalten. Diese Myosinköpfe lassen sich mit voller katalytischer und aktinbindender Aktivität durch begrenzte Proteolyse des Gesamtmoleküls erzeugen.

Den Ergebnissen von Sasaki et al. (1995) zufolge ist die Myosin-Aktin-Interaktion bei der Freisetzung viraler HIV-Partikel von großer Bedeutung. Da für Nef eine Wechselwirkung mit Aktin nachgewiesen wurde (Kapitel 4.4), stellte sich die Frage, ob auch Myosin oder der Aktomyosin-Komplex mit Nef interagieren.

Für die Nef-Myosin-Bindungsstudien wurden folgende Myosin-Fragmente verwendet: Myosin Motordomäne aus Kaninchen (Subfragment-1, S1), Motordomäne M761 (DH12) aus *Dictyostelium discoideum* und die mutierte Motordomäne M761 (DH13) aus *Dictyostelium discoideum* der N-terminal 80 Aminosäuren entfernt wurden und somit die Bindungsstelle für Aktin fehlt. Die in *Dictyostelium discoideum* exprimierte Motordomäne M761 (die N-terminalen 761 Aminosäuren) besitzt eine verkürzte Halsregion und kann im Gegensatz zu Myosin S1 keine leichten Ketten mehr binden. Die Proteine wurden freundlicherweise von G. Helmig und Dr. S. Fujita-Becker, Max-Planck-Institut für med. Forschung (Heidelberg), zur Verfügung gestellt.

### 4.6.1 Qualitative Untersuchung mittels Fluoreszenztitration

Zur Untersuchung der Nef-Myosin-Bindung wurden Fluoreszenz-Emissionsspektren von Pyrenyl-Nef bzw. Pyrenyl-Nef-Core bei Zugabe der unterschiedlichen Myosine gemessen. Bild 4.22 zeigt das Spektrum von 0,5  $\mu$ M Pyrenyl-Nef-Core. Bei der Titration von Nef-Core mit der verkürzten Motordomäne M761 (DH13) aus *Dictyostelium discoideum* kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz. Nach äquimolarer Zugabe der Motordomäne zu Nef-Core ist nahezu eine Sättigung erreicht. Dieser Effekt konnte mit dem DH12-Wildtyp aus *Dictyostelium discoideum* nicht erzielt werden. Hier kam es zu einer leichten Fluoreszenzabnahme, die auf das Mischen und die Verdünnung zurückzuführen ist.

In einem weiteren Ansatz wurde Pyrenyl-markiertes S1 aus Kaninchen in der Meßküvette vorgelegt und mit Nef-Core titriert. Auch hier war keine Fluoreszenzänderung meßbar.

Die Fluoreszenzmessungen zeigen, daß nur die N-terminal verkürzte Motordomäne M761 (DH13) aus *Dictyostelium discoideum* in der Lage ist, mit dem Nef-Protein zu interagieren.

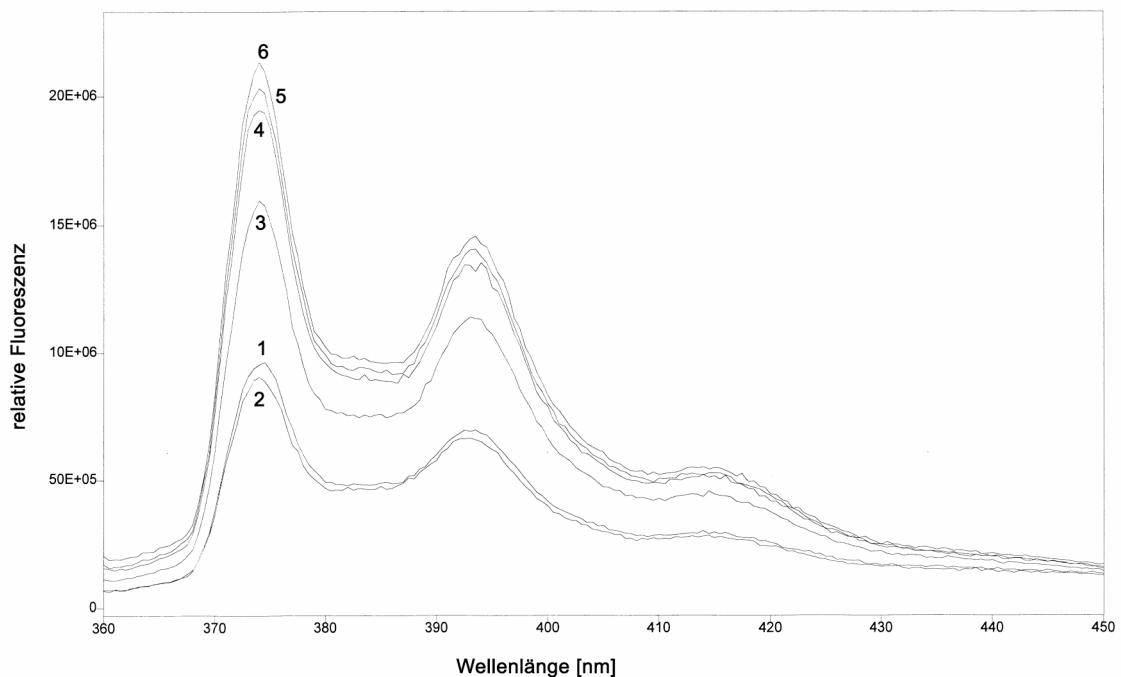


Bild 4.22: Fluoreszenz-Emissionsspektren von 0,5  $\mu\text{M}$  Pyrenyl-Nef-Core (1), nach einmaligem Mischen (2), titriert in vier Schritten mit jeweils 0,25  $\mu\text{M}$  Motordomäne DH13 aus *Dictyostelium discoideum* (3-6), Anregungswellenlänge 344 nm, Temperatur 25°C. Nach äquimolarer Zugabe der Motordomäne ist nahezu eine Sättigung erreicht.

#### 4.6.2 Kinetische Untersuchung mittels Stopped-Flow

Zur weiteren Charakterisierung wurden kinetische Untersuchungen mittels Stopped-Flow durchgeführt. In diesen Messungen konnte sowohl für Nef als auch für Nef-Core eine Fluoreszenzzunahme bei der Titration mit der Motordomäne M761 (DH13) aus *Dictyostelium discoideum* verfolgt werden. Da sich die gemessenen Werte weder an eine Exponentialfunktion erster noch zweiter Ordnung anpassen ließen, ist eine Auswertung der Daten sowie eine eindeutige Aussage über eine direkte Bindung nicht möglich. Die Fluoreszenzänderung in dieser Meßreihe könnte auf eine unspezifische Bindung oder auch Aggregation des Nef-Proteins hinweisen.

Für den Wildtyp M761 (DH12) aus *Dictyostelium discoideum* und das S1 aus Kaninchen war kein Effekt bzw. eine leichte Fluoreszenzabnahmen in den kinetischen Untersuchungen zu beobachten.

#### 4.6.3 Sedimentation

Aus F-Aktin und Myosin S1 aus Kaninchen wurde der sogenannte ATP-freie Rigor-komplex, Aktomyosin, gebildet. Dieser Komplex wurde mit Nef bzw. BSA als Kontrolle inkubiert und anschließend bei 100000 rpm zentrifugiert.

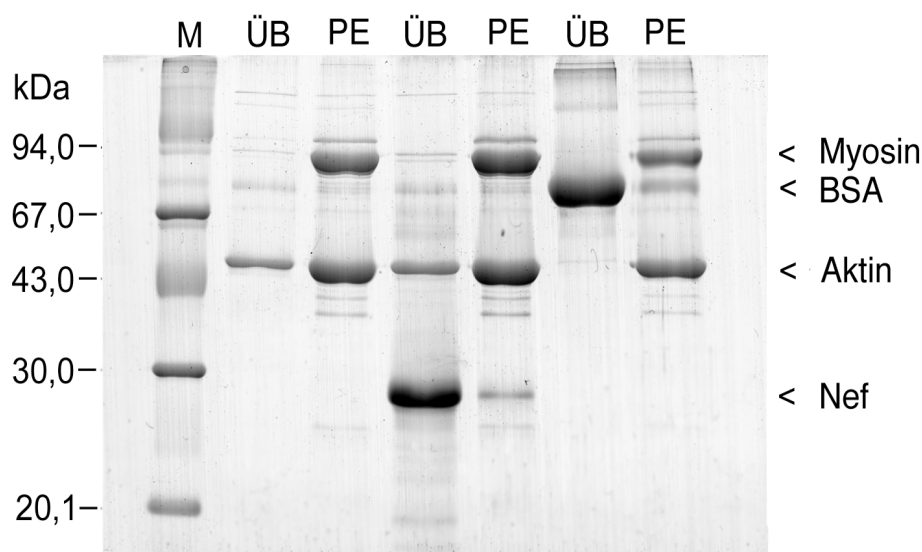


Bild 4.23: SDS-Gel der Sedimentation von Aktomyosin in Gegenwart von Nef bzw. BSA bei 100000 rpm, TLA-Rotor, bei 4°C. Überstand (ÜB) und Pellet (PE) des jeweiligen Ansatzes sind nebeneinander aufgetragen.

Das SDS-Gel zeigt, daß der Komplex aus Aktin und Myosin wie erwartet sedimentiert, während Nef ebenso wie BSA fast vollständig im Überstand verbleibt. In Anwesenheit von Myosin kann Nef nicht an Aktin binden. Dieser Effekt läßt die Vermutung zu, daß Nef und Myosin um die gleiche Bindungsstelle am Aktin konkurrieren. Eine direkte Wechselwirkung zwischen Myosin S1 und Nef kann ebenfalls ausgeschlossen werden.

#### 4.6.4 Fluor-NMR

Wie schon für Aktin wurde versucht, eine mögliche Nef-Myosin Interaktion mittels PFP-markiertem Nef nachzuweisen. In Bild 4.24 ist das Ausgangsspektrum des markierten Nef mit den zwei Fluorsignalen bei 49,03 ppm und 48,77 ppm gezeigt. Wird Myosin S1 zu Nef titriert, zeigen sich keine Änderungen der Signale im Bereich der Fluor-Markierung, die auf eine Interaktion zwischen S1 und Nef in diesem Bereich zurückzuführen sind.

### 4.7 Nef-Calmodulin Interaktionen

Calmodulin oder Calmodulin-ähnliche Proteine bilden die leichten Ketten unkonventioneller Myosine. Sie regulieren die Aktivierung der Myosin-Kopfregion. Calmodulin ist ferner am Aufbau des Zytoskeletts und an der Zellmotilität beteiligt. Aus diesem Grund war es von Interesse, ob Calmodulin ebenfalls ein möglicher Interaktionspartner für Nef ist.

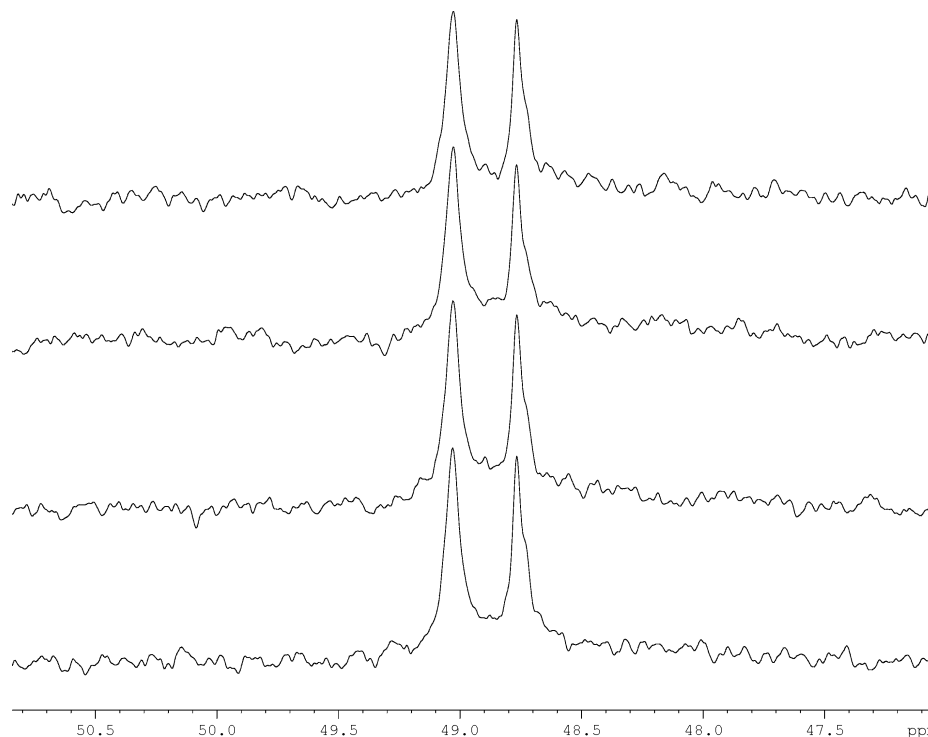


Bild 4.24:  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von  $40\ \mu\text{M}$  Fluor-markiertem Nef (C55 und C206) in Anwesenheit von 1 Äquivalent S1, 2 Äquivalent S1 sowie nach weiterer Inkubation von 30 min (von unten nach oben), 470 MHz, 303 K, pH 7,5, Protonen-Probenkopf (5 mm), interner Standard Trifluoressigsäure (TFA). Bei 49,03 ppm und 48,77 ppm sind die zwei Fluosignale der markierten Cysteine C55 und C206 zu erkennen.

Gereinigtes Calmodulin (CaM) aus *Dictyostelium discoideum* und der zugehörige anti-Calmodulin-Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. B. Ulbrecht, Max-Planck-Institut für medizinische Forschung (Heidelberg), zur Verfügung gestellt. Dansyl-markiertes Calmodulin aus Rinderhirn wurde von der Firma Sigma, München bezogen.

#### 4.7.1 Protein-Overlay

Mit dem Protein-Overlay kann man in einem Vorversuch ohne großen technischen Aufwand Protein-Protein-Wechselwirkungen nachweisen. Dazu wurde Nef auf eine Nitrozellulosemembran getropft und die Membran anschließend mit einer Calmodulinlösung inkubiert. Eine mögliche Bindung von Calmodulin an Nef wurde mittels anti-Calmodulin Antikörper nachgewiesen. Bild 4.25 zeigt, daß Calmodulin in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Nef bindet und von dem anti-Calmodulin Antikörper spezifisch erkannt wird. In Gegenwart von EGTA, das  $\text{Ca}^{2+}$  komplexiert, wird die Bindung der beiden Proteine verhindert. Eine unspezifische Bindung des anti-Calmodulin Antikörpers kann ausgeschlossen werden, da in den Kontroll-Ansätzen ohne Calmodulin kein Antikörper detektiert werden konnte.

Für das Nef-Core wurde ebenfalls eine Wechselwirkung mit Calmodulin nachgewiesen, die auf dem Blot nur schwach zu erkennen ist.



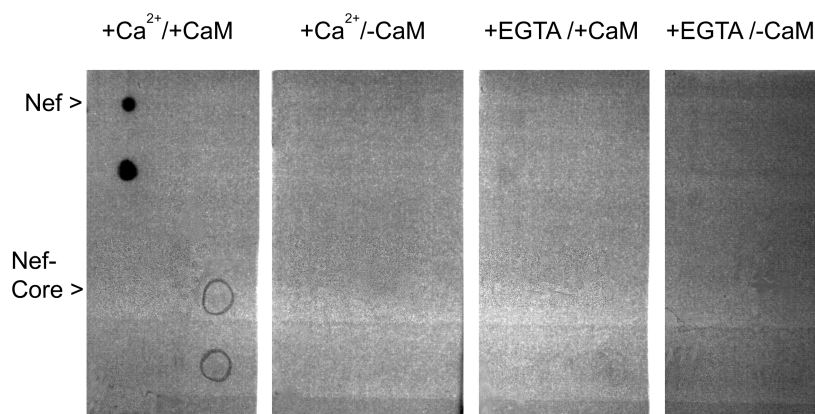


Bild 4.25: Protein-Overlay von Nef bzw. Nef-Core mit Calmodulin (CaM). 1  $\mu$ g und 2  $\mu$ g Nef wurden auf Nitrocellulose getropft und anschließend mit einer 0,3  $\mu$ M CaM-Lösung in Anwesenheit von 1 mM Ca<sup>2+</sup> oder 5 mM EGTA 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. An Nef bzw. Nef-Core gebundenes CaM wurde mit anti-CaM Antikörper detektiert. In Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> zeigt sich eine Nef-CaM-Bindung. Bei Nef-Core sind die Signale wesentlich schwächer.

#### 4.7.2 Qualitative Untersuchungen mittels Fluoreszenz

Zur qualitativen Untersuchung der Nef-Calmodulin Bindung wurden Fluoreszenz-Emissionsspektren von Pyrenyl-Nef bzw. Nef-Core in Gegenwart von Calmodulin gemessen. In Bild 4.26 ist das Emissionsspektrum von 1  $\mu$ M Pyrenyl-Nef gezeigt. Bei Zugabe von Calmodulin kam es zu einer Fluoreszenzzunahme, die durch EGTA wieder aufgehoben werden konnte. Wurden in umgekehrter Reihenfolge zuerst EGTA und dann Calmodulin zu Nef titriert, gab es keine Fluoreszenzänderung. Diese Meßergebnisse sprechen für eine Nef-Calmodulin Wechselwirkung, die wie die Zugabe von EGTA verdeutlicht Calcium-abhängig ist.

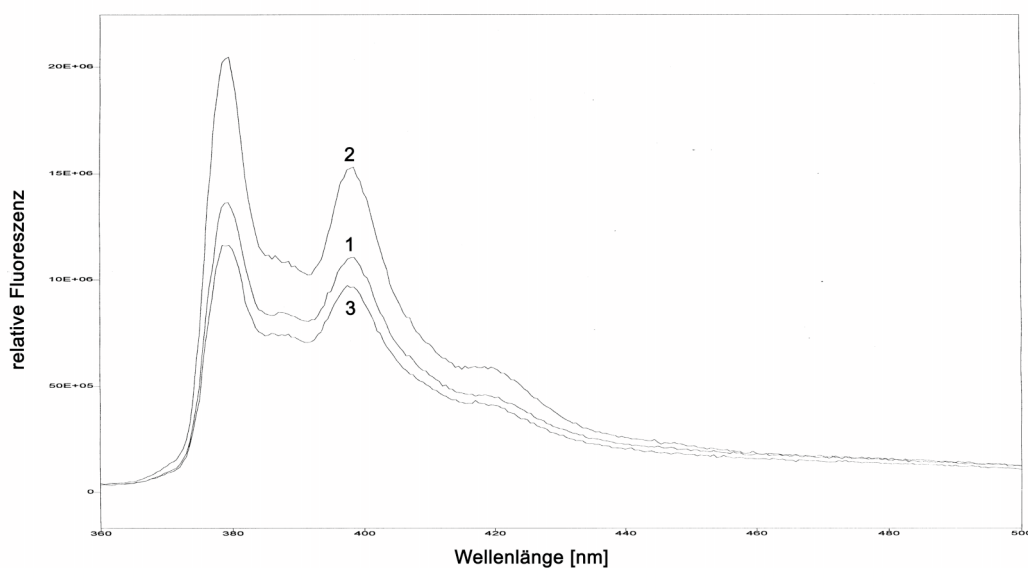


Bild 4.26: Fluoreszenz-Emissionsspektren von 0,5  $\mu$ M Pyrenyl-Nef (1) mit 0,5  $\mu$ M CaM (2) und 5  $\mu$ M EGTA (3), Anregungswellenlänge 344 nm, Temperatur 25°C.



In einem weiteren Versuch wurde Dansyl-markiertes Calmodulin aus Rinderhirn eingesetzt (Bild 4.27). Auch hier zeigte sich in Gegenwart von Nef eine Fluoreszenzzunahme, und das Maximum des Spektrums verschob sich von 510 nm nach 495 nm (Blau-shift).

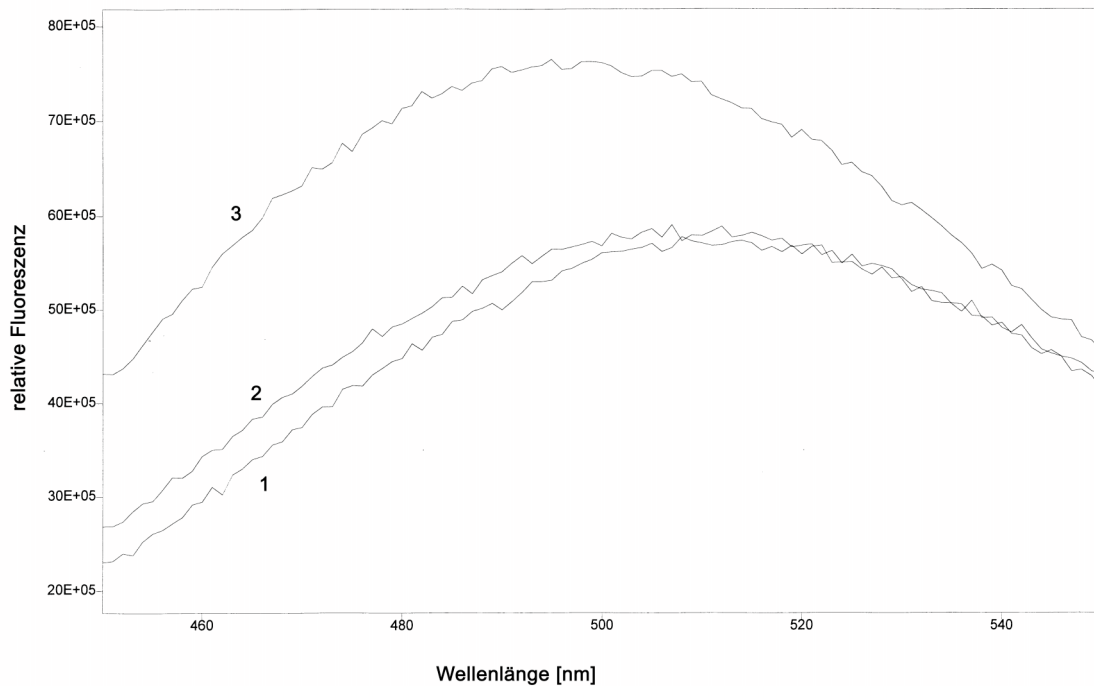


Bild 4.27: Fluoreszenz- Emissionsspektrum von  $1\ \mu\text{M}$  dansyliertem CaM (1 und 2) mit  $2\ \mu\text{M}$  Nef (3), Anregungswellenlänge  $340\ \text{nm}$ , Temperatur  $25^\circ\text{C}$ .

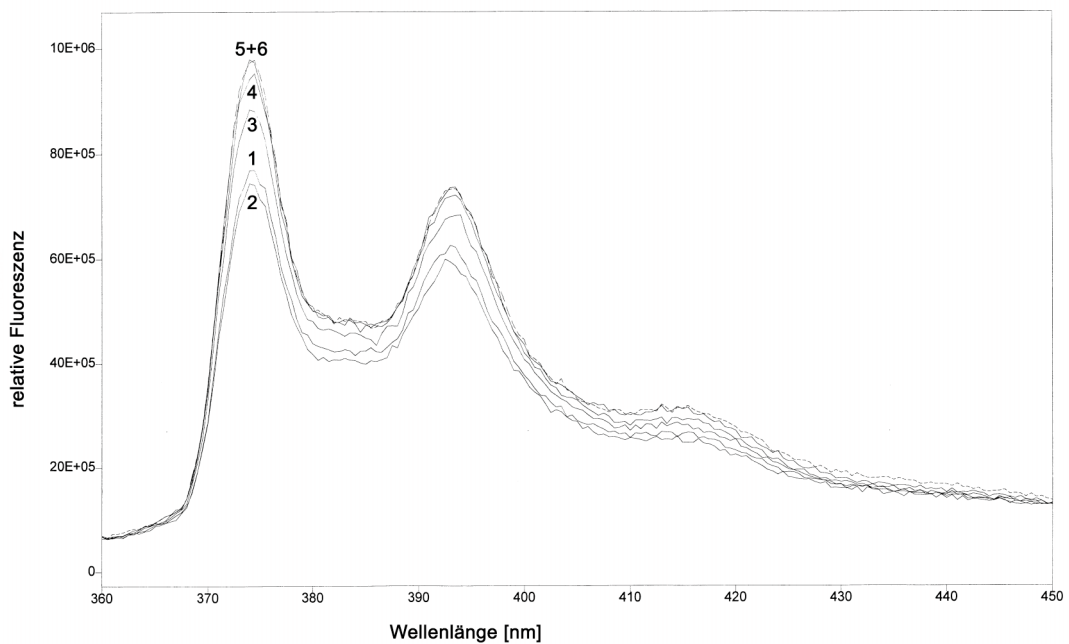


Bild 4.28: Fluoreszenz-Emissionsspektren der Titration von  $0,5\ \mu\text{M}$  Pyrenyl-Nef-Core (1, 2) in vier Schritten mit jeweils  $0,5\ \mu\text{M}$  CaM (3, 4, 5, 6), Anregungswellenlänge  $344\ \text{nm}$ , Temperatur  $25^\circ\text{C}$ . Nach dreifachem Überschuß an CaM ist eine Sättigung erreicht.

Unabhängig von der Herkunft des Calmodulins (*Dictyostelium discoideum* oder Rinderhirn) und der Art der Markierung zeigte sich in den Fluoreszenzmessungen eine deutliche Nef-Calmodulin Wechselwirkung.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Pyrenyl-Nef-Core und Calmodulin erzielt. Bei der Titration von Pyrenyl-Core mit Calmodulin kam es ebenfalls zu einer Zunahme der Fluoreszenz (Bild 4.28). Die Wechselwirkungen konnten mit EGTA gehemmt werden, was ebenso wie bei Nef für eine Calcium-abhängige Reaktion spricht.

Die Zugabe von Ionen wie  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  oder einem nicht bindenden Protein wie BSA zu Nef-Core (Bild 4.29) zeigte diesen Effekt nicht. Leichte Abnahmen in der Fluoreszenz wurden durch das Mischen der Probe nach jeder Zugabe und durch Verdünnungen verursacht.

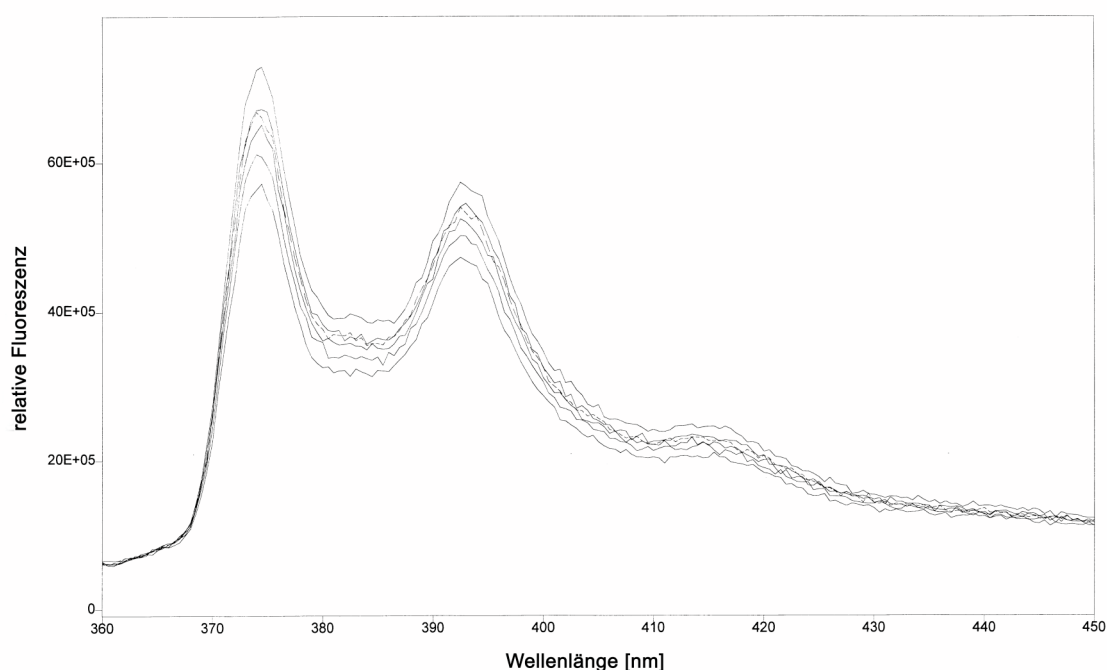


Bild 4.29: Fluoreszenz-Emissionsspektren von  $0,5 \mu M$  Pyrenyl-Nef-Core, zweimaliges Mischen, Zugabe von zweimal je  $5 mM$   $MgCl_2$  und einmal  $0,5 \mu M$  BSA (von oben nach unten), Anregungswellenlänge  $344 nm$ , Temperatur  $25^\circ C$ .

### 4.7.3 Kinetische Untersuchungen mittels Stopped-Flow

#### 4.7.3.1 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten $k_{on}$ der Assoziation

Um die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  zu ermitteln, wurde der Fluoreszenzanstieg der Titrationen von Pyrenyl-Nef bzw. Pyrenyl-Nef-Core mit Calmodulin verfolgt und die gemessenen Daten an eine exponentielle Kurve angepaßt. Das Auftragen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  gegen die Proteinkonzentration in der Mischkammer resultiert in einer Geraden mit der Steigung  $k_{on}$  und dem Achsenabschnitt  $k_{off}$ .

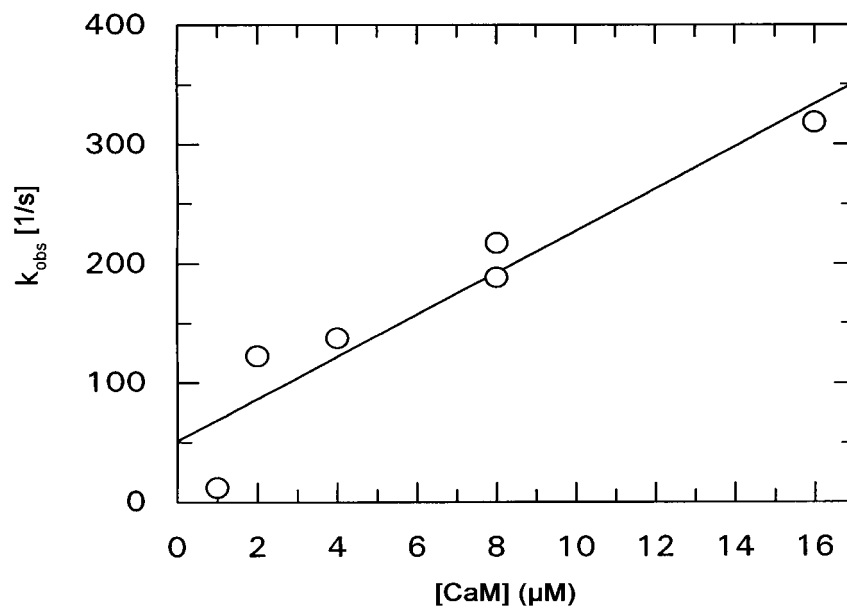


Bild 4.30: Auftragung der erhaltenen Werte für  $k_{obs}$  der Assoziation von  $1 \mu M$  Nef mit steigender Calmodulin Konzentration, bei  $25^\circ C$ , Anregungswellenlänge  $344 \text{ nm}$ . Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GraFit (Erithacus Software, Ltd., Staines, UK).

Das Auftragen der gemessenen Werte von  $k_{obs}$  gegen die eingesetzten Konzentrationen an Calmodulin wird in Bild 4.30 und Bild 4.31 gezeigt. Durch lineare Regression der gemessenen Werte erhielt man Geradengleichungen mit der Steigung  $k_{on}$  und dem Ordinatenabschnitt  $k_{off}$ . Aus diesen Daten kann die Dissoziationskonstante als Quotient von  $k_{off}$  durch  $k_{on}$  berechnet werden (Tabelle 4.2).

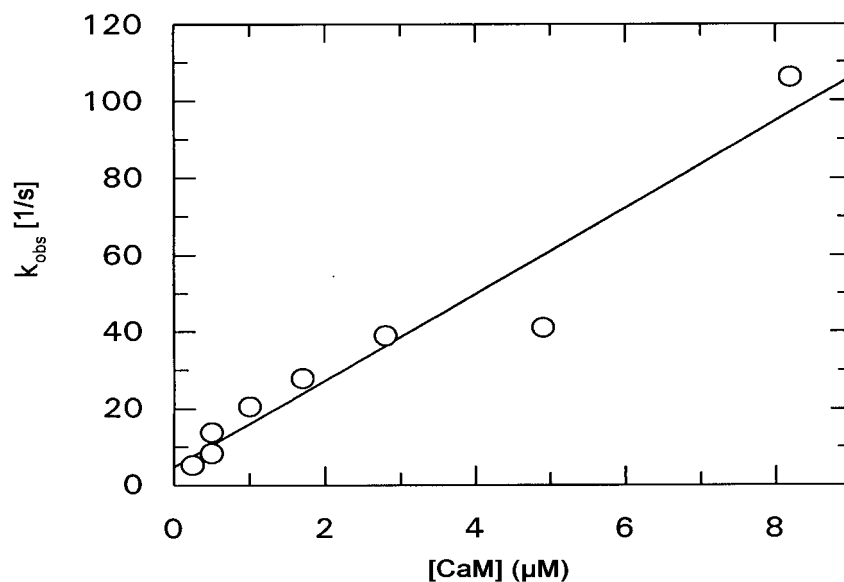


Bild 4.31: Auftragung der erhaltenen Werte für  $k_{obs}$  der Assoziation von  $1 \mu M$  Nef-Core mit steigender Calmodulin Konzentration, bei  $25^\circ C$ , Anregungswellenlänge  $344 \text{ nm}$ . Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GraFit (Erithacus Software, Ltd., Staines, UK).

Tabelle 4.2: Ermittelte  $k_{on}$  und  $k_{off}$  Werte der Bindung von  $1\ \mu\text{M}$  Nef bzw. Nef-Core mit steigender CaM-Konzentration bei  $25^\circ\text{C}$ , Anregungswellenlänge  $344\ \text{nm}$ .

	Nef	Nef-Core
$k_{on}$	$18\ \text{s}^{-1}\ \mu\text{M}^{-1}$	$11\ \text{s}^{-1}\ \mu\text{M}^{-1}$
$k_{off}$	$51\ \text{s}^{-1}$	$5\ \text{s}^{-1}$
$K_D$	$2,8\ \mu\text{M}$	$0,45\ \mu\text{M}$

In Messungen mit Dansyl-markiertem Calmodulin aus Rinderhirn und steigender Nef- bzw. Nef-Core-Konzentration konnten ebenfalls  $K_D$ -Werte ermittelt werden, die für Nef bei  $0,3\ \mu\text{M}$  und für Nef-Core bei etwa  $10\ \mu\text{M}$  lagen. Diese zu den vorherigen Messungen abweichende Werte sind auf den unterschiedlichen Label oder das unterschiedliche Calmodulin zurückzuführen.

#### 4.8 Weitere mögliche Interaktionspartner

Bei der Infektion von Zellen mit *nef*-defizienten Viren zeigte sich eine deutliche Verringerung der RT-Produkte (Miller et al., 1995). In Zusammenarbeit mit Dr. B. Wöhlrl, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie (Dortmund), wurde ein möglicher Effekt von Nef auf die Reversen Transkriptase (RT) untersucht. Als weiterer Interaktionspartner wurden in Zusammenarbeit mit Dr. R. Puras-Lutzke, Netherlands Cancer Institute (Niederlande) die Integrase (IN) für Bindungsstudien mit Nef eingesetzt.

Mit keinem der beiden Proteine konnte eine direkte Wechselwirkung mit Nef detektiert werden (persönliche Mitteilungen).

#### 4.9 Expression und Reinigung des HIV-2 Nef<sub>HOM</sub>

Um eine strukturelle und funktionelle Charakterisierung des HIV-2 Nefs zu ermöglichen, mußte das Protein in einem ersten Schritt hergestellt werden. Als Nef-Klon wurde das HIV-2 Nef<sub>HOM</sub> verwendet. Die DNA, die für HIV-2 Nef<sub>HOM</sub> und die um 39 Aminosäuren verkürzte Core-Domäne (L40-C255) kodiert, wurde in das pQE-30 Plasmid von Qiagen mit N-terminaler Fusion von 6 Histidinen kloniert. Die Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. O. Fackler, Inst. für Virologie, Uni des Saarlandes (Homburg), zur Verfügung gestellt.

Diese Plasmide wurden in verschiedene *E.coli* Stämme transformiert und bezüglich ihrer Expression getestet und optimiert. Die beste Expression konnte mit *E.coli* Stämmen M15[pREP4] und SG von Quiagen erreicht werden. Die Expression wurde bei einer OD<sub>590</sub> von etwa 0,7 mit 0,04 mM IPTG für 12 h bei  $30^\circ\text{C}$  induziert.

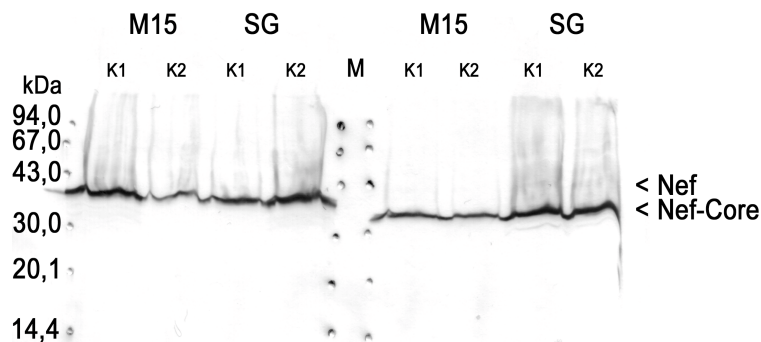


Bild 4.32: Western-Blot von exprimiertem HIV-2 Nef<sub>HOM</sub> und Nef-Core, induziert bei 30°C. In *E. coli*-Zellen (M15 und SG) exprimiertes Nef bzw. Nef-Core wurde im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit anti-HIV-2 Nef Antikörper detektiert. Es wurden 2 Klone (K1 und K2) im Vergleich getestet.

Im Vergleich zu HIV-1 Nef war die Expression von HIV-2 Nef<sub>HOM</sub> deutlich geringer, was eine Detektion mittels Antikörper notwendig machte. Um eine ausreichende Zellmenge für Reinigungen im mg-Maßstab zu erhalten, wurden Fermenterläufe durchgeführt. Aus 50 l LB-Medium konnten etwa 400 g Nef-exprimierend Zellen geerntet werden.

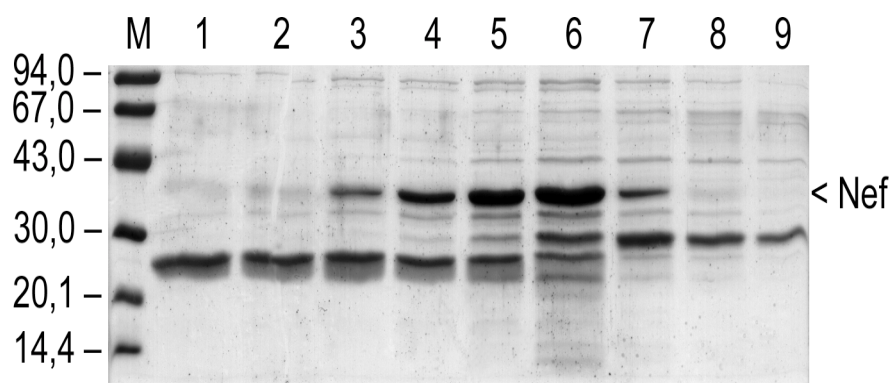


Bild 4.33: SDS-Gel von angereinigtem HIV-2 Nef<sub>HOM</sub>. Spur 1 bis 9 zeigen die mit einem linearen Imidazolgradienten von 0,02 bis 1 M Imidazol in Nef-Puffer, pH 8,0 eluierten Nef-haltigen Fraktionen der Ni<sup>2+</sup>-Affinitäts-Chromatographie.

Die Reinigung des exprimierten Nef-Proteins erfolgte in drei Schritten über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie, 40% Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltrations-Chromatographie. Das SDS-Gel in Bild 4.33 zeigt eluiertes Nef nach der Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie. Das Protein wurde mit einem linearen Imidazolgradienten von 0,02 bis 1 M in Nef-Puffer eluiert.

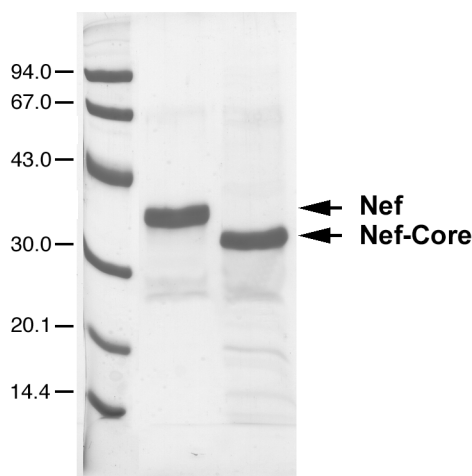


Bild 4.34: SDS-Gel von gereinigtem Nef bzw. Nef-Core.

Weitere Verunreinigungen konnten über eine 40% Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Gelfiltrations-Chromatographie über eine Superdex G-75 Säule entfernt werden. Die Proteine erwiesen sich im SDS-Gel als sauber. Ausgehend von 100 g Zellen konnten etwa 20 mg Nef-Protein gereinigt werden. Bild 4.34 zeigt die gereinigten Endprodukte, Nef und Nef-Core.

#### 4.10 Klonierung und Expression des HIV-2 Nef<sub>ALT</sub>

In einem früheren Versuch zeigte in Insektenzellen exprimiertes und gereinigtes HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> trotz seiner Größe von 240 Aminosäuren gute 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren. Um dieses Protein in größeren Mengen sowohl homo- als auch heteronuklear in *E.coli* herzustellen, wurde die für HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> und HIV-2 Nef<sub>ALT</sub>-Core codierende DNA in die *E.coli*-spezifischen Vektoren ptrc99a, ptrc99c, ptac und pQE-12 kloniert. Die klonierten und sequenzierten Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Adamski, Bayer AG (Wuppertal), zur Verfügung gestellt.

Um die Plasmid-gesteuerte Expression zu testen, wurden die *nef*-Konstrukte in verschiedene *E.coli* Stämme transformiert. Trotz unterschiedlicher Expressionsansätze konnte bei keinem der Plasmide im SDS-Gel oder Western-Blot eine Nef-Expression detektiert werden. Diese Ergebnisse wurde von Dr. Adamski bestätigt, die in parallel dazu laufenden Experimenten ebenfalls keine Expression induzieren konnte.

Von diesen Plasmiden ausgehend wurde die für Nef bzw. Nef-Core codierende DNA in andere Vektoren kloniert.

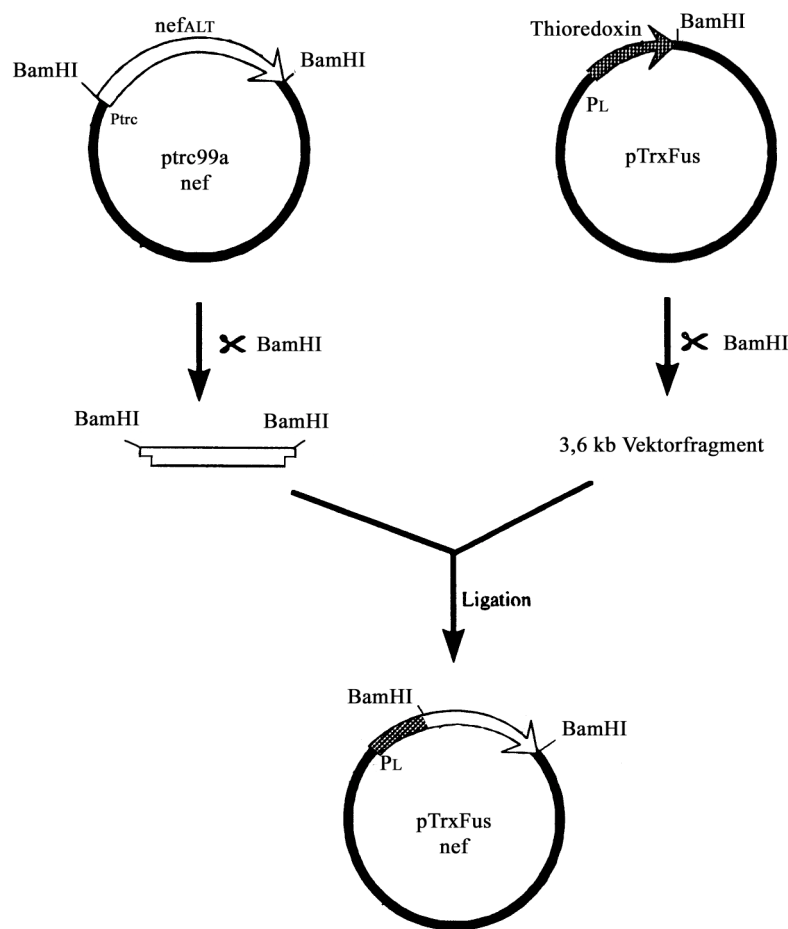


Bild 4.35: Klonierungsstrategie von HIV-2 Nef mit N-terminaler Fusion von Thioredoxin. Die für HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> codierende DNA wurde über eine BamHI Restriktionsstelle in den pTrxFus-Vektor kloniert.

Um die Stabilität von Nef in E.coli-Zellen zu erhöhen und einen möglichen proteolytischen Abbau zu verhindern, wurde Nef als Fusionsprotein kloniert. Mittels PCR wurde ein *nef<sub>ALT</sub>-core* Fragment synthetisiert, das über Xma/PstI in den pTrxFus-Vektor von Invitrogen mit N-terminaler Fusion von Thioredoxin kloniert wurde (Bild 4.36). Die für Nef<sub>ALT</sub> codierende DNA wurde über einen Restriktionsverdau mit BamHI aus ptrc99a isoliert und über die gleiche Restriktionsseite in pTrxFus ligiert. (Bild 4.35). Beide *nef*-Konstrukte wurden zur Expression in die E.coli Zellen GI724 (Expression oberhalb 30°C) und GI698 (Expression unterhalb 30°C) transformiert. Im SDS-Gel und Western-Blot zeigte der Vergleich von Tryptophan-induzierten Kulturen und nicht induzierten Kontrollkulturen keine sichtbare Synthese des rekombinanten Fusionsproteins.

Auch mit N-terminaler Fusion von Glutathion-S-Transferase GST konnte keine Expression erzielt werden. Dazu wurden *nef* und *nef-core* über die Restriktionsstellen EcoRI/Sal in den pGEX-5x-1 Vektor von Pharmacia kloniert.

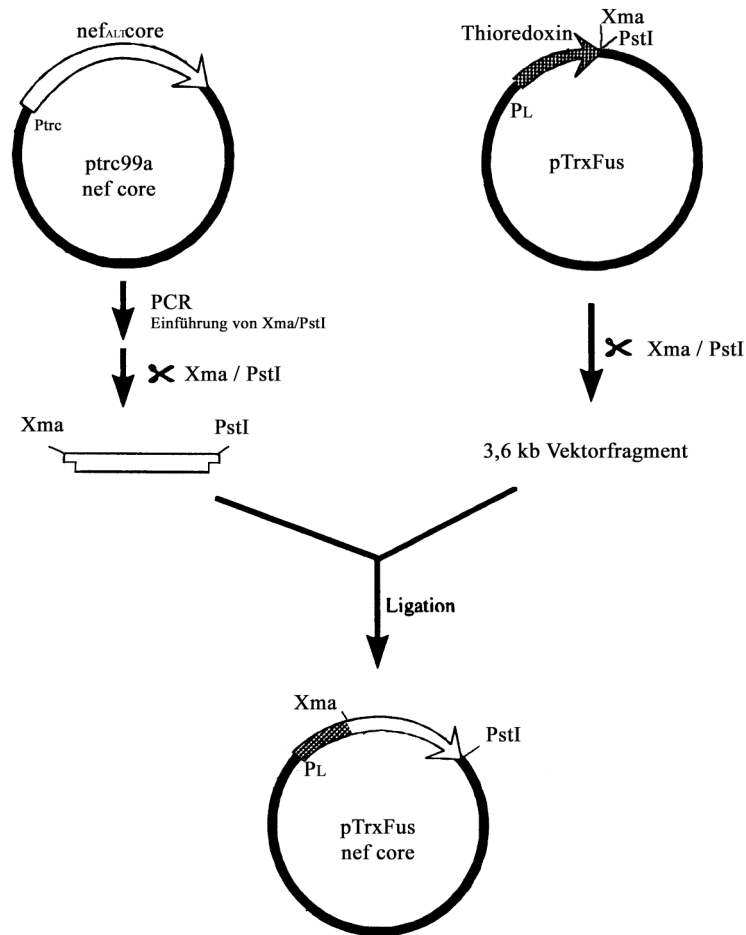


Bild 4.36: Klonierung von HIV-2 Nef-Core mit N-terminaler Fusion von Thioredoxin. Die für HIV-2 Nef<sub>ALT</sub>-Core codierende DNA wurde mittels PCR synthetisiert und über eine Xma und Pst Restriktionsstelle in den pTrxFus-Vektor kloniert.

Der T7 Promoter vermittelt eine sehr hohe Transkriptionseffizienz und kann in Kombination mit pLysS- und pLysE-Plasmiden reprimiert werden. Dieses System ist besonders für toxische Proteine geeignet. Für die Expressionsversuche wurden pET-Vektoren von Novagen verwendet. *nef<sub>ALT</sub>* und *nef<sub>ALT</sub>-Core* wurden über einen BamHI Restriktionsverdau aus ptrc99c isoliert und in den mit BamHI geschnittenen pET-14b Vektor mit N-terminaler Fusion von 6 Histidinen kloniert. Die Expression erfolgte in BL 21(DE3) und BL 21(DE3) pLysS Zellen bei 20°C, 30°C und 37°C.

Alternativ wurde der pET-22b Vektor verwendet. Dieser Vektor enthält eine N-terminale Signalsequenz, pelB-Sequenz, die eine Sekretion exprimierter Proteine ins Periplasma ermöglicht. Die DNA für Nef<sub>ALT</sub> und Nef<sub>ALT</sub>-core wurde aus dem ptacnef Vektor über EcoRI/HindIII isoliert, in den EcoRI/HindIII verdauten pET-22b Vektor kloniert und in BL 21(DE3) und BL 21(DE3) pLysS Zellen exprimiert. Alle *nef*-Konstrukte in pET-Vektoren wurden nochmals ansequenziert, um sicher zu gehen, daß Sequenz und Klonierung korrekt waren und das Protein im richtigen Leserahmen kloniert vorlag.



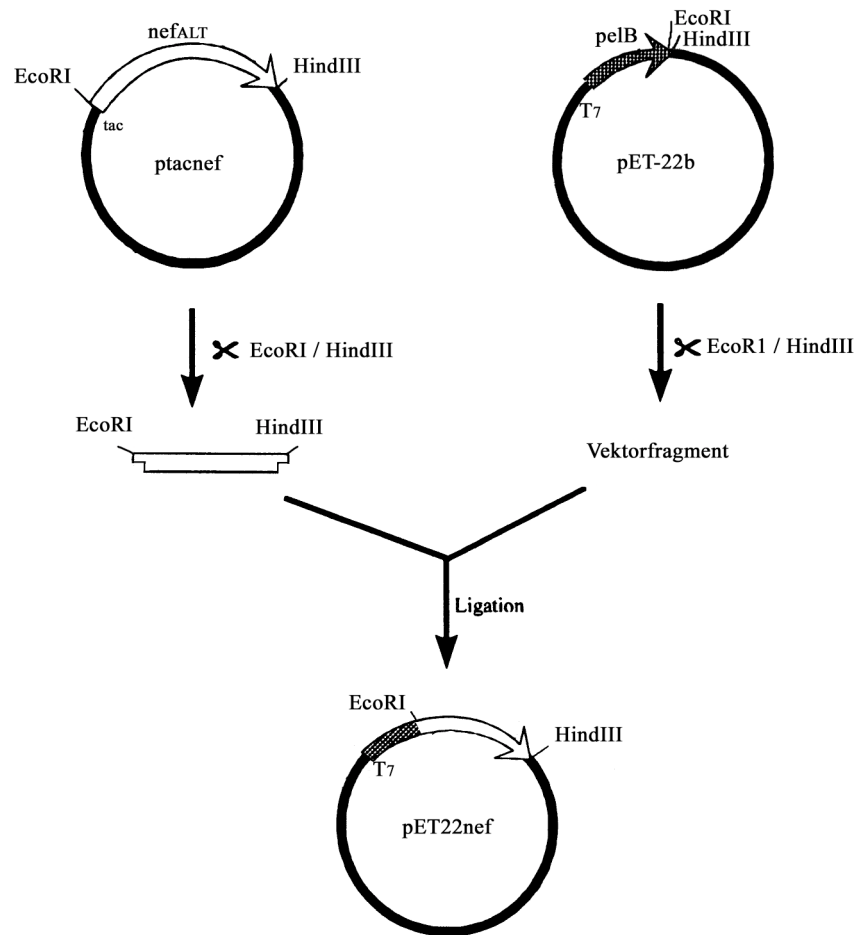


Bild 4.37: Schema der Umklonierung von HIV-2 Nef in den pET-22b Vektor.

Bei der Expression von pET-22b-nef wurde im Vergleich zu nicht induzierten Kontrollkulturen im SDS-Gel bei etwa 35 kDa eine Proteinbande sichtbar. Die Proteinprobe wurde von Dr. R. Kellner, Merck KgaA, (Darmstadt) ansequenziert. Als N-terminale Sequenz konnten die Aminosäuren MKYLLP des Signalpeptids *pelB* identifiziert werden. Unmittelbar anschließend an diese *pelB*-Sequenz wurde *nef* kloniert, sodaß die 35 kDa Bande dem Nef-Protein mit N-terminalem Signalpeptid entspricht.

## 5 Diskussion

### 5.1 Strukturelle Eigenschaften von HIV-1 Nef

Dreidimensionale Proteinstrukturen spielen eine große Rolle in der biologischen und biomedizinischen Forschung. Sie geben Auskunft über den Zusammenhang zwischen der molekularen und der physiologischen Struktur und können auch als Basis für Wirkstoffentwicklung und Protein-Engineering dienen. Ein entscheidender Faktor zur Lösung dreidimensionaler Strukturen ist die Löslichkeit des zu messenden Proteins. Proteine, die unspezifisch aggregieren und/oder oligomerisieren, können nur unvollständig strukturell analysiert werden. Chemische Modifizierung können bei diesem Problem weiterhelfen wie das Beispiel Lysozym zeigt (Rypniewski et al., 1993).

Das Nef-Protein aus HIV-1 bleibt bis maximal 0,4 mM monomer in Lösung. Wird diese Konzentration überschritten, aggregiert das Protein und macht eine detaillierte Auswertung von NMR-Messungen nahezu unmöglich. Das N-terminal um 57 Aminosäuren verkürzte Fragment, Nef-Core, zeigte bezüglich der Löslichkeit ein ähnliches Verhalten. Um dennoch auswertbare Spektren zu erhalten und einer Strukturaufklärung näher zu kommen, mußte die Konzentration an monomerem Nef erhöht werden. Mit chemischen Modifizierungen der Proteinseitenketten wurde versucht, die Löslichkeit zu erhöhen bzw. unspezifische Aggregationen zu verhindern. Unter den ausgewählten Modifizierungen wurde mit der Acetylierung das beste Ergebnis erzielt. Durch die Acetylierung werden freie Aminogruppen entladen und die Oligomerisierung kann eingeschränkt werden. Wie die 1D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren zeigten, blieb die definierte Tertiärstruktur des Nef-Proteins nach erfolgreicher Acetylierung erhalten, was bei den anderen Modifizierungen nicht immer der Fall war. Ebenso konnte das acetylierte Nef stärker aufkonzentriert werden als unmodifiziertes Nef, ohne unspezifisch zu aggregieren.

Auch aufgrund seiner Größe erschwert das HIV-1 Nef NMR-Messungen. Bei 206 Aminosäuren ist wegen starker Überlappung der Resonanzen auf jeden Fall eine  $^{15}\text{N}$ -Markierung notwendig. Die  $^{15}\text{N}$ -Markierung wurde sowohl für Nef als auch für Nef-Core erfolgreich durchgeführt und ergab schon bei einer Proteinkonzentration von 0,2 bis 0,3 mM auswertbare zweidimensionale NMR-Spektren. Auch für  $^{13}\text{C}$ -Markierungen wurde das Minimalmedium optimiert. Mit einer Kombination aus  $^1\text{H}$ -Spektren von modifiziertem Nef und  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Spektren von isopenmarkiertem und acetyliertem Nef-Protein wäre ein Nef-Strukturbestimmung mittels NMR möglich gewesen. Während dieser vorbereitenden Experimente konnte von Grzesiek et al. (1996) die Struktur des HIV-1 Nef-Core-Proteins gelöst werden. Auch Grzesiek verwendete für die Nef-Strukturbestimmung isopenmarkiertes Protein. Zusätzlich wurde das Nef-Protein vollständig deuteriert und enthielt zwei Deletionen sowohl im N-terminalen Bereich der Aminosäuren G2 bis K39, als auch im Bereich der flexiblen Schleife der Aminosäuren

G159 bis M173. Diese Deletionen tragen dazu bei, das unspezifische Aggregieren des Proteins zu verhindern. Die Struktur zeigt, daß die Core-Domäne des Nef-Proteins gut gefaltet vorliegt. Obwohl es keinerlei Sequenzhomologie gibt, erinnert die Gesamtstruktur von Nef an die der Helix-Turn-Helix-Transkriptionsfaktoren (Grzesiek et al., 1996). Nach dieser Veröffentlichung wurden die teuren und aufwendigen Markierungs- und Modifizierungsversuche mit Nef bzw. Nef-Core nicht mehr weitergeführt.

Das vorhandene  $^{15}\text{N}$ -markierte Nef-Protein wurde unterstützend für die noch ausstehende Strukturaufklärung der N-terminalen Anker-Domäne des Nef-Proteins eingesetzt. Mit Ausnahme der helikalen Elemente H1 und H2 liegt die Anker-Domäne relativ ungefaltet vor. Die NMR-Studien zeigen ferner, daß die Myristinsäure zu einer Stabilisierung der helikalen Elemente H1 und H2 beiträgt. Diese unstrukturierte Region des Nef-Proteins stellt ebenso wie die exponierte Schleife (V148-R178) einen Bereich dar, der gut zugänglich und für Interaktionen mit zellulären Proteinen besonders geeignet ist. Für die Wechselwirkung zweier Proteine sind im allgemeinen nur wenige Aminosäuren notwendig. Somit ist es dem Nef-Protein mit seiner gestreckt vorliegenden Anker-Domäne (57 Aminosäuren) möglich, gleichzeitig mit mehreren Proteinen zu interagieren und einen Multi-Protein-Komplex zu bilden, wie es von Baur et al. (1997) für Nef beschrieben wurde.

## 5.2 Wechselwirkungen und mögliche Funktionen von Nef

Drei distinkte Funktionen werden dem viralen Nef-Protein zugeschrieben: Senkung der CD4- und MHC-I-Moleküle, Erhöhung der Infektiosität und Beeinflußung von Signalwegen. Die molekularen Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen, sind zum Teil noch nicht geklärt. Da das Nef-Protein bisherigen Forschungsergebnissen zufolge nicht über enzymatische Aktivitäten verfügt, muß es seine Funktionen über „Vermittler“-Proteine ausüben oder selbst Vermittler sein. Somit sind Proteine, die mit Nef interagieren, von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das Nef-Protein drei neue Interaktionspartner, Aktin, Myosin M761 (DH13) und Calmodulin identifiziert.

### 5.2.1 Wechselwirkung mit Aktin

Schon seit längerem wird Aktin bei viralen Prozessen eine immer größer werdende Bedeutung zugeschrieben. So konnte für einige Viren infolge einer viralen Infektion eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts in der Wirtszelle beobachtet werden. Arif (*actin rearrangement inducing factor*), ein frühes Protein des Baculovirus, löst zum Beispiel eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts nach erfolgreicher Infektion aus (Roncarati und Knebel-Mörsdorf, 1997). Die Rolle des Zytoskeletts während viraler Infektionen ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Befunde am Vacciniavirus unterstützen die These, daß Viren das Aktin-Zytoskelett dazu benutzen, um an die Zelloberfläche zu wandern und sich auf Nachbarzellen auszubreiten (Cudmore et al., 1995). Im Zusam-

menhanng mit HIV konnte Aktin in Viruspartikeln nachgewiesen werden (Ott et al., 1996, Arthur et al., 1992). Es gibt auch mehrere Hinweise dafür, daß Aktin in die HIV-Morphogenese involviert ist (Ott et al., 1996, Damsky et al., 1977).

Aktin ist eine Hauptkomponenten in Muskel- und Nichtmuskelzellen. In den Nichtmuskelzellen kann Aktin entweder in der Form des als G-Aktin bezeichneten globulären Monomers im Komplex mit aktinbindenden Proteinen oder als filamentöses F-Aktin vorliegen. In unterschiedlichen biochemischen Untersuchungen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Nef eine direkte Bindung mit Aktin nachgewiesen. Sowohl Nef als auch Nef-Core waren in der Lage an Aktin zu binden. Dies weist auf eine Interaktionsstelle im Bereich der Core-Domäne hin. Die Bereiche um das Cystein 55 und 206 können dabei als Interaktionsstelle ausgeschlossen werden, wie die Ergebnisse der  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie zeigen. Die Wechselwirkung konnte sicher für F-Aktin gezeigt werden, aber auch G-Aktin zeigte in ersten Tests eine Affinität.

Diese direkte Nef-Aktin Interaktion wurde im Hefe-II-Hybrid-System bestätigt (Fackler et al., 1997a und 1997b) und es konnte gezeigt werden, daß Nef für eine stabile Aktin-Bindung myristoyliert sein muß. Die Abhängigkeit dieser Bindung von der Myristinsäure spricht für eine biologische Funktion der Nef-Aktin Interaktion, da die Myristinsäure für die Funktionen des Nef-Proteins essentiell ist (Doms und Trono, 2000). Das für die biochemischen Experimente verwendete Nef wurde in *E.coli* und somit ohne Myristinsäure exprimiert. Trotz fehlender Myristinsäure zeigte Nef eine mittlere Affinität für Aktin im Bereich von 10  $\mu\text{M}$ .

Durch seine Myristinsäure wird Nef in der Membran verankert. Myristoyliertes Nef, das in der Zelle im Komplex mit Aktin vorliegt, kann auch im Zytosol vorkommen, wie es von Franchini et al. (1986) beschrieben wurde. Aktin könnte für Nef die Verbindung zum Zytoskeletts darstellen und die subzelluläre zytoplasmatische Lokalisation von myristoyliertem Nef vermitteln. So würde Aktin zu einer von der Membranlokalisierung unabhängigen Nef-Funktion beitragen. Wie Baur et al. (1994) zeigen konnten, ist die zelluläre Lokalisation des Nef-Proteins für seine biologische Aktivitäten von großer Bedeutung.

Aktinfilamente bilden zusammen mit Mikrotubuli und Intermediärfilamenten das Zytoskelett der Zelle. Direkt unter der Plasmamembran befindet sich der Cortex, eine Region mit der höchsten Dichte an Aktin-Filamenten. Beim Eindringen von HIV in die Zelle muß diese F-Aktinschicht durchbrochen werden. Der Mechanismus hierfür ist noch unbekannt. Eine Möglichkeit die Zytoskelett-Barriere zu überwinden, ist die proteolytische Spaltung einzelner Komponenten dieser Struktur. Für die HIV-Protease konnte gezeigt werden, daß sie *in vitro* zytoskelettäre Proteine wie Vimentin, Desmin und anderer Proteine proteolytisch angreift (Shoeman et al., 1990, Konvalinka et al., 1995). Das Nef-Protein wird in neu entstehende Viruspartikel eingebaut und ist beim Infizieren von Zellen als funktionsfähiges Protein vorhanden. Durch seine Bindung an Aktin, vornehmlich an F-Aktin, könnte auch Nef auf das Zytoskelett einwirken. Eine Fragmentierung des Aktins wie sie zum Beispiel Gelsolin bewirkt, konnte für Nef je-

doch nicht nachgewiesen werden. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit zeigten, daß sich in Gegenwart von Nef Aktinfilamente bilden und auch nach längerer Inkubation mit Nef erhalten bleiben. Im Zusammenwirken mit einem oder mehreren weiteren, vielleicht noch unbekannten Proteinen könnte eine Nef-Interaktion mit Aktin jedoch das Zytoskelett lokal so verändern, daß das Eindringen des viralen Kapsids erleichtert würde. Dagegen sprechen jedoch Ergebnisse von Aiken und Trono (1995), denen zufolge Nef-defekte Viren genauso effizient in Zellen eindringen wie Wildtyp-Viren.

Eine Nef-Funktion im Zusammenhang mit Aktin wäre auch bei dem Bilden und Abschnüren neuer Viren von der Zelloberfläche infizierter Zellen denkbar. Arthur et al. (1992) konnten zeigen, daß Aktin in solche Prozesse involviert ist, auch dem Nef-Protein wird eine Funktion beim Freisetzen viraler Partikel zugeschrieben (Collette und Olive, 1999, Fackler et al., 2000, Renkema und Saksela, 2000). Die Freisetzung von HIV ist unter bestimmten Bedingungen sehr polar (Kräusslich, 1996), was durch eine Veränderung des Zytoskeletts zustande kommt. Über seine Myristinsäure wird Nef in der Plasmamembran verankert. Sobald sich die Strukturproteine und alle weiteren viralen Komponenten an der Plasmamembran zusammen gefunden haben, könnte Nef dazu aktiviert werden, das Aktinzytoskelett derart zu verändern, daß das Abschnüren neuer Viren erleichtert wird.

Das zelluläre Aktinzytoskelett ist ein dynamisches Gebilde, das sich permanent im Umbau befindet. Dabei wechseln Aktinpolymerisation und -depolymerisation ständig. Für Nef konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß es *in vitro* die Polymerisation von Aktin verlangsamt. Mit dieser Eigenschaft könnte Nef die Stabilität der Plasmamembran herabsetzen und direkt an der Virusfreisetzung beteiligt sein und so zu einer erhöhten viralen Infektiosität beitragen. Da Nef meist im Komplex mit mehreren Proteinen interagiert, ist ein Zusammenwirken mit weiteren Proteinen denkbar, um das Zytoskelett zu verändern. Neuere Ergebnisse im Zusammenhang mit Aktin zeigen, daß Nef den Guanidin-Nukleotidaustauschfaktor Vav über dessen SH3 Domäne bindet. Diese Interaktion führt zur Aktivierung von Vav, wodurch eine Umorganisation des Zytoskeletts induziert wird. Es bilden sich Lamellipodien und Membrankräuselungen (*membran ruffles*) aus. In diese Interaktion ist auch PAK1 eingebunden. Wird zusätzlich PAK1 von Nef aktiviert, kommt es zur Zerstörung von „actin stress fibers“ und zu einer von Nef und Vav induzierten Bildung von Trichopodien (Fackler et al., 2000).

In eukaryontischen Zellen exprimiertes Nef wurde mehrfach im Komplex mit zwei oder mehreren zellulären Proteinen gefunden (Baur et al., 1997), wobei nicht alle Partner identifiziert werden konnten. Im Zusammenwirken von Nef und Aktin wurde z.B. ein 150-300 kDa Komplex isoliert, der außer Nef und Aktin noch weitere Proteine aufzeigte (Fackler et al., 1997b). Dabei handelte es sich nicht um bisher bekannte Interaktionspartner wie Kinasen, Thioesterasen, oder  $\beta$ -COP, sodaß auch Proteine, die mit oder auf Aktin wirken, von Interesse sind.

### 5.2.2 Wechselwirkungen mit G-Proteinen

Kleine G-Proteine wie Rac, Rho und Cdc42, die zur Rho-Subfamilie gehören, sind maßgeblich in die Reorganisation des Aktinzytoskeletts eingebunden (Zigmond, 1996). Sie stellen für Nef einen Angriffspunkt dar, um auf Aktin zu wirken. In den durchgeführten biochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Interaktionen zwischen Nef und einem dieser Proteine nachgewiesen werden. Neueren Ergebnissen zufolge sind diese Proteine jedoch indirekt in die durch Nef induzierte Umorganisation des Zytoskeletts involviert (Fackler et al., 2000).

### 5.2.3 Wechselwirkungen mit Myosin

Myosin ist in Verbindung mit Aktin der Antriebsmotor für die Beweglichkeit der Zelle. Es konnte gezeigt werden, daß der Myosin-Aktin Interaktion bei der Freisetzung viraler HIV-Partikel von infizierten Zellen eine wichtige Rolle zukommt (Sasaki et al., 1995). In Zellen wurden bisher 15 Myosine nachgewiesen, wobei sieben dieser Myosine auch in Vertebraten vorkommen. Myosin besteht aus zwei identischen schweren und zwei Paaren von leichten Ketten, die ein Molekül mit einem Gewicht von 520 kDa bilden (Lowey et al., 1969). Am besten charakterisiert ist das konventionelle Myosin II, das auch in Muskelzellen vorliegt, gefolgt von den unkonventionellen Myosinen I und V. Während zelluläres Myosin-II z.B. für die Zytokinese und Zellmotilität wichtig ist, sind Myosin-I und -V an Wechselwirkungen zwischen Zytoskelett und Membran beteiligt.

Eine Interaktion von Myosin und Nef könnte eine indirekte Wirkung auf das zelluläre Aktin vermitteln oder das Zusammenwirken von Myosin und Aktin stören. In ersten Fluoreszenzmessungen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Motordomänen des konventionellen Myosin-II aus Kaninchen und *Dictyostelium discoideum* auf ihr Bindungsverhalten bezüglich des Nef-Proteins untersucht. Bei der Titration von Nef mit der Motordomäne M761 aus *Dictyostelium discoideum* wurde eine Fluoreszenzzunahme detektiert, die für eine Interaktion spricht. Die in kinetischen Untersuchungen gemessenen Daten ließen keine eindeutige Aussage über eine direkte Bindung zu. Inwieweit es sich bei der Nef-Myosin Interaktion um eine relevante oder unspezifische Bindung oder gar Aggregation handelte, konnte innerhalb dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden. Zu dieser Nef-Myosin Interaktion war nur die mutierte Myosin-Mutante M761 in der Lage, der N-terminal die ersten 80 Aminosäuren und somit die Fähigkeit der Aktin-Bindung fehlten. Aufgrund dieser Deletion ist eine strukturelle Änderungen in der Myosin Motordomäne wahrscheinlich. Dadurch könnte eine neue Bindungsstelle für Nef entstehen, die im Wildtyp nicht vorhanden ist oder verdeckt vorliegt. Weitere Ergebnisse im Zusammenhang mit Myosin aus Kaninchenmuskel zeigten, daß Nef nicht mehr in der Lage war, an Aktin zu binden, sofern dieses im Komplex mit Myosin S1 vorlag. Nef und Myosin konkurrieren möglicherweise um die gleiche Bindungsstelle am Aktin-Molekül, wobei der natürliche Bindungspartner Myosin eine stärkere Affinität zeigt.

In einer einzelnen Zelle kommen mehrere Myosine gleichzeitig vor. Die biologisch relevante Bindung mit Nef kann anstelle des Myosin-II auch ein unkonventionelles, viel-

leicht noch nicht identifiziertes Myosin vermitteln. Ein wirkungsvoller Bindungspartner wäre z.B. ein unkonventionelles Myosin der Klasse IX oder X (Hasson und Mooseker, 1996). In den letzten Jahren wurden mehrere solcher Myosine identifiziert. Sie zeigen einen ähnlichen Aufbau wie alle Myosine, aber in ihrer Schwanzregion finden sich z.B. eine Pleckstrin-homologe (PH-) Domäne oder eine GTPase-aktivierende (GAP-) Domäne. Aufgrund dieser Domänen vermitteln sie als einzige bisher bekannte Myosine die Verbindung zu Rho-abhängigen Signalwegen. Ein Vertreter der Klasse IX ist Myr 5 (*fifth unconventional myosin from rat*, Reinhard et al., 1995). Dieses Protein zeigt eine hohe Affinität zu Rho und führt bei Überexpression in Hela-Zellen zu einer Veränderung des Zytoskeletts (Müller et al., 1997). Myr 5 kann über seine Zink-GAP-Domäne die GTPase-Aktivität verschiedener Mitglieder der Rho-Subfamilie stimulieren. Myosine der Klasse X sind ebenfalls mit dem G-Protein Signalweg assoziiert. Solche Bindungspartner würden Nef einen indirekten aber sehr effektiven Zugang zum Aktinzytoskelett verschaffen.

#### 5.2.4 Wechselwirkung mit Calmodulin

Calmodulin und Calmodulin-ähnliche Proteine bilden die leichten Ketten unkonventioneller Myosine und regulieren die Aktivierung der Myosin-Kopfregion. Calmodulin ist ferner am Aufbau des Zytoskeletts und an der Zellmotilität beteiligt. In seiner an Myosin gebundenen Form könnte Calmodulin ein stabilisierendes oder aktivierendes Bindeglied in der Nef-Aktin-Myosin Interaktion darstellen. Calmodulin ist weiterhin in verschiedene zelluläre Prozesse involviert. So ist auch eine von Aktin und/oder Myosin unabhängige Nef-Funktion denkbar, die direkt in Calmodulin-abhängige Prozesse und Signalkaskaden eingreift. Zumal für Nef sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte auf verschiedene Signalwege beschrieben wurden.

Innerhalb dieser Arbeit wurde *in vitro* eine eindeutige Interaktion zwischen Nef bzw. Nef-Core und Calmodulin nachgewiesen. Die ermittelten  $K_D$ -Werte der Nef-Calmodulin-Bindung liegen im nieder-mikromolaren bis nanomolaren Bereich und weisen auf eine starke Bindung hin. Durch die Zugabe von EGTA konnte diese Bindung gehemmt und eine bereits erfolgte Bindung zwischen Nef und Calmodulin wieder aufgelöst werden. Dieser Effekt zeigt, daß die Nef-Calmodulin-Interaktion Calcium-abhängig ist. Da Calmodulin in den meisten Fällen erst in der  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Form mit dem Zielprotein assoziiert (Klee und Vanaman, 1982), ist die Nef-Calmodulin-Bindung mit hoher Wahrscheinlichkeit biologisch relevant.

Calmodulin, ein zytosolisches Calcium-bindendes Protein von etwa 17 kD ist als wichtigster Calcium-Sensor ganz maßgeblich in fast alle "second messenger" Kaskaden der Zelle eingebunden. Calmodulin kommt in allen eukaryontischen Zellen vor (Klee und Vanaman, 1982, Burgess et al., 1983), so auch in B- und T-Lymphozyten und ist in zelluläre Signalwege wie Zellaktivierung, Proliferation und Signaltransduktion involviert. Calmodulin dient dabei als Mediator und Auslöser von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen durch Assoziation mit entsprechenden Kinasen und Phospha-

tasen oder aber als Katalysator bei der Autophosphorylierung von Proteinen. Bei HIV infizierten Patienten konnte gezeigt werden, daß genau solche Calmodulin-abhängige Prozesse wie Aktivierung und Proliferation in Lymphozyten gestört sind und sie eine Dysfunktion bei den Zytokinen aufzeigen (Miller et al., 1993). So wird Interleukin 2 (IL-2), das Hauptproliferationssignal für viele Lymphozyten, in weit aus geringeren Mengen gebildet. Die HIV Infektion geht auch einher mit Defekten bei der Bildung von Interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), ein weiteres Lymphokin, das essentiell für die Immunproliferationskaskade ist. Sowohl die IL-2- als auch die INF- $\gamma$ -Produktion sind Calmodulin-abhängige Prozesse.

In Jurkat T-Zelllinien wurden IL-2 und INF- $\gamma$  durch intrazelluläres Nef-Protein reduziert (Collette et al., 1996b). Nef könnte dabei als Antagonist wirken und Calmodulin abhängige Proteine oder Prozesse inhibieren. Für extrazelluläres Nef konnten diese Effekte nicht gezeigt werden. Hier induzierte Nef die Produktion der mRNA für IL-10 (Brigino et al., 1997). Es wird angenommen, daß der Calmodulin-abhängige Phosphodiesterase-Weg involviert ist. IL-10 ist ein starker Suppressor der Zell-vermittelten Immunität und inhibiert indirekt T-Zell Proliferation. Diese beiden Nef-Effekte scheinen sich zu widersprechen sich, auch wenn sie ein ähnliches Resultat liefern. Während intrazelluläres Nef hemmend auf Calmodulin-abhängige Prozesse wirkt, induziert extrazelluläres Nef eine vermehrte mRNA Bildung für IL-10, was auf eine Aktivierung hinweist. Wissenschaftliche Resultate zeigen aber, daß extra- und intrazelluläres Nef unterschiedliche Effekte bewirken. Dennoch verdeutlichen diese Ergebnisse, daß Calmodulin und Nef in gleiche Prozesse eingebunden sind. Sie zeigen ferner, daß Calmodulin eine aktive und essentielle Rolle bei Immunprozessen einnimmt und einen wichtigen Angriffspunkt für einen Virus wie HIV darstellt, der Immunsuppression verursacht.

Calmodulin spielt auch eine Rolle bei der DNA-Replikation (Charp und Regan, 1985) und bei der DNA-Reparatur (Serrataro et al., 1988). Für Nef konnte gezeigt werden, daß es die Synthese proviraler DNA stimuliert (Aiken & Trono, 1995, Schwartz et al., 1995), ein Effekt, der zu einer verstärkten viralen Infektiosität beiträgt. Ein Zusammenwirken von Nef und Calmodulin auf der DNA-Ebene wäre auch denkbar.

Mit diesen neu identifizierten Interaktionspartnern stellt sich nun die Frage, ob sie auch *in vivo* eine biologisch relevante Funktion vermitteln und ob alle drei Proteine mit Nef zusammen in einem Komplex nur einen Effekt bewirken oder ob Nef mit den Proteinen mehrere von einander unabhängige Funktionen ausübt. Es ist nicht auszuschließen, daß für die ein oder andere Funktion noch ein wichtiger zellulärer Faktor hinzukommt.

### 5.2.5 Nef ein MARCKS-Protein?

Durch seine Bindung an Aktin und Calmodulin erinnert Nef an sogenannte MARCKS-Proteine (Myristoyliertes, Alanin-reiches C-Kinase Substrat). Diese Proteine sind wie Nef saure Proteine, die einen hohen Anteil der Aminosäuren Alanin, Glycin, Prolin und Glutaminsäure aufweisen. Ebenso ist ihnen mit Nef die N-terminale Myristoylierung gemeinsam, die die Assoziation mit Membranen vermittelt. MARCKS-Proteine werden



über eine basische Effektdomäne reguliert, in der sich die Bindungsstellen für Aktin,  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin und die Proteinkinase C befinden (Hartwig et al., 1992, Graff et al., 1995, Arbuzova et al., 1997). Ein erster Sequenzvergleich zwischen Nef und den MARCKS-Proteinen zeigt, daß auch Nef im Bereich der Aminosäuren T71-K94 über eine den MARCKS-Proteinen ähnliche und zum Teil homologe Region verfügt (siehe 8.7). In diesem Bereich von Nef könnte somit auch die Bindungsstellen für Aktin und Calmodulin liegen. Für Aktin wurde nachgewiesen (Fackler et al., 1997), daß das genau in diesem Sequenzbereich liegende  $\text{YKA}^{86}$ -Motiv für die Aktin-Bindung essentiell ist.

Weiterhin ist Nef und den MARCKS-Proteinen die Interaktion mit der Proteinkinase C (PKC) gemeinsam. Seykora et al. (1996) zeigten, daß PKC die MARCKS-Proteine an Serinresten ihrer basische Effektdomäne phosphoryliert und so ihre Translokation von der Membran ins Zytosol bewirkt. Das Gleiche könnte für Nef zutreffen, da es auch frei im Zytoplasma vorkommend gefunden wurde (Yu und Felsted, 1992).

### 5.2.6 Wechselwirkungen mit RT und IN

Miller et al. (1995) konnten zeigen, daß bei der Infektion von Zellen mit *nef*-defizienten Viren eine deutliche Verringerung der RT-Produkte zu verzeichnen war. Deshalb wurde Nef auf eine mögliche Interaktion mit der RT hin untersucht. In einer Zusammenarbeit mit Dr. B. Wöhrl, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie (Dortmund), konnte jedoch keine direkte Bindung zwischen Nef und der Reversen Transkriptase nachgewiesen werden. Auch mit der Integrase zeigte Nef keine Wechselwirkung wie die Zusammenarbeit mit Dr. R. Puras-Lutzke, Netherlands Cancer Institute, (Niederlande) ergab.

## 5.3 Proteolytische Spaltung von Nef

*In vitro* und *in vivo* werden sowohl HIV-1 als auch HIV-2 Nef spezifisch von der viralen Protease in zwei Domänen, die N-terminale Anker-Domäne und die C-terminale Core-Domäne gespalten (Freund et al., 1994, Schorr, 1994). Dabei konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß sowohl myristoyliertes als auch nicht myristoyliertes Nef gleichermaßen gespalten werden und die Myristoylierung keinen Einfluß auf die proteolytische Spaltung ausübt.

HIV-1 Nef konnte auch von der HIV-2 Protease gespalten werden, jedoch weniger spezifisch. Die HIV-2 Protease prozessiert zuerst das erwartete 18 kDa große Nef-Fragment und im weiteren Verlauf noch zwei weitere 18 kDa Fragmente, jedoch um jeweils drei Aminosäuren verkürzt. Neu hinzukommend ist ein 14 kDa Fragment, das durch Spaltung des Nef-Proteins zwischen G98 und L99 entsteht.

Die biologische Funktion dieser Spaltung durch die HIV Protease ist bisher nicht bekannt. Die HIV Protease ist generell für das Prozessieren der Vorläuferpolyproteine essentiell. Wird Nef in neu entstehende Viren eingebaut, kommt es im Verlauf der Virusreifung auch zu einer proteolytischen Spaltung des Nef-Proteins in die zwei bekannten Nef-Domänen (Pandori et al., 1996, Welker et al., 1996, Schorr et al., 1996, Miller

et al., 1997b). Die Fragmente entsprechen den *in vitro* gefundenen Nef-Anker- und Nef-Core-Domänen. Das Verhältnis von gespaltenem zu ungespaltenem Nef variiert je nach Zelllinie, die zur Produktion der Viren verwendet wird. Etwa 50 bis 70% der inkorporierten Nef-Moleküle werden von der HIV-Protease prozessiert. Dieses Ergebnis unterstützt die Ansicht, daß der proteolytischen Spaltung eine biologische Funktion zukommt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Spaltung von Nef nicht mit der Fähigkeit die Infektiosität zu erhöhen korreliert (Chen et al., 1998). Lokalisation ebenso wie Funktion des Nef-Proteins sind von der N-terminalen Myristinsäure abhängig. Membrangebundenes Nef bindet in seiner Core-Domäne sowohl eine Serinkinase (RR-Motiv) als auch verschiedene Tyrosinkinasen der Src-Familie (PXXP Motiv). Virion-assoziiertes Nef könnte eine dieser Kinasen oder auch ein anderes Protein wie z.B. Calmodulin gebunden haben. Nach der proteolytischen Spaltung innerhalb des Viruspartikel würden Membrananker und Core-Domäne, die mit einer Kinase oder anderem Protein assoziiert ist, voneinander getrennt werden. Beim Eindringen in neu infizierte Zellen könnte der nun „aktive“ Nef-Core-Komplex eine spezielle Funktion ausüben.

Von Renkema und Saksela (2000) wurde gezeigt, daß die Expression von Nef den Einbau einer zellulären Serinkinase ins Virion erhöht. Diese Serinkinase könnte für die von Nef abhängige verstärkte Phosphorylierung des Matrix-Protein verantwortlich sein (Swingler et al., 1997). Neben anderen zellulären Proteinen konnte auch Aktin als Bestandteil viraler Partikel identifiziert werden. Innerhalb dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Nef an Aktin bindet. In dieser an Nef gebundenen Form kann das Aktin ins Virion eingebracht werden.

## 5.4 HIV-2 Nef

### 5.4.1 Expression und Reinigung von HIV-2 Nef<sub>HOM</sub>

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das HIV-2 Nef<sub>HOM</sub> und HIV-2 Nef<sub>HOM</sub>-Core erstmals in *E.coli* exprimiert und erfolgreich im Milligramm-Maßstab über Nickel-Affinitätschromatographie, Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt. Dieses Nef-Protein induzierte in ersten Polymerisationsexperimenten mit Aktin ebenso wie HIV-1 Nef eine verlangsamte Aktinpolymerisation, was für die biologische Relevanz dieser Bindung spricht.

### 5.4.2 Klonierung und Expression von HIV-2 Nef<sub>ALT</sub>

In Insektenzellen exprimiertes und gereinigtes HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> zeigte trotz einer Größe von 240 Aminosäuren eine hervorragende Löslichkeit und gute 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren. Um dieses Protein in größeren Mengen und <sup>15</sup>N bzw. <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C markiert zur Verfügung zu haben, wurde versucht, das Protein in *E.coli* zu exprimieren.

Dazu wurde das *nef*-Gen unter Kontrolle der prokaryontischen Promotoren *tac* und *trc* in *E.coli* transformiert. Trotz unterschiedlicher Expressionsbedingungen und verschiedener *E.coli*-Stämmen war keine Expression im SDS-Gel detektierbar. Aufgrund eines unspezifischen Nef-Antikörpers war der Nachweis des Proteins auch im Western-Blot nicht möglich. Solche Probleme sind beim Expressieren von Proteine in *E.coli* nicht vorhersehbar, und es gibt bis heute kein Patentrezept für eine erfolgreiche und effiziente Expression. Um eine mögliche Degradation des Nef-Proteins durch *E.coli*-Proteasen während des Kultivierens zu verringern, wurden proteasedefiziente Wirtsstämme verwendet. Zur Stabilisierung in der Zelle wurde das Nef-Protein mit Proteinen wie Thiredoxin oder Glutathion-S-Transferase fusioniert.

Die biologische Halbwertszeit von Proteinen wird auch durch ihre aminoterminalen Aminosäuren mitbestimmt (N-end-rule). Während Aminosäuren wie Arginin, Leucin, Asparagin Lysin und Phenylalanin zu einem gesteigerten Abbau führen können, wirken die Aminosäuren Methionin, Serin, Alanin, Threonin, Valin und Cystein stabilisierend. Die Sequenz des HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> besitzt N-terminal jedoch keine destabilisierenden Aminosäuren, die eine Expression des Proteins hätten verhindern können. Innerhalb der codierenden Sequenz wurden auch keine für *E.coli* seltene oder untypische Codons verwendet, die für die Expression des Proteins problematisch gewesen wären.

Proteine, die im Zytoplasma von *E.coli* toxisch wirken oder nicht richtig gefaltet werden, können ins Periplasma sezerniert und auf diese Weise erfolgreich überexprimiert werden. Um das Nef-Protein ins Periplasma zu schleusen, wurde der pET-22b Vektor verwendet. Dieser Vektor enthält eine N-terminale Signalsequenz (pelB-Sequenz), die eine Sekretion exprimierter Proteine ins Periplasma ermöglichen kann. Mit diesem Vektor und BL 21(DE3)-Zellen wurde ein Protein mit einem dem Nef-Protein entsprechenden Molekulargewicht von etwa 35 kDa exprimiert. Die N-terminale Sequenzierung des Proteins ergab die Aminosäuren MKYLLP der N-terminalen pelB-Sequenz. Bei der Sekretion des Nef-Proteins ins Periplasma sollte diese Sequenz abgespalten werden. Da die Spaltung nicht erfolgte, liegt Nef im Zytoplasma exprimiert vor.

## 5.5 Phosphorylierung

Proteine, die in Insektenzellen unter Verwendung von Baculo-Vektoren exprimiert werden, zeigen posttranslationale Modifizierungen wie sie auch in eukaryontischen Systemen vorkommen. Zu diesen Modifizierungen gehört die Phosphorylierung. Phosphorylierungen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proteinen. Sie können sowohl aktivierend als auch inhibierend auf ihr Zielprotein wirken. In der Zelle werden Phosphorylierungen von sogenannten Kinasen vermittelt. Unter den definierten Bindungspartner des Nef-Proteins sind mehrfach Kinasen zu finden. Dabei handelt es sich sowohl um Serinkinasen als auch Src-Tyrosinkinasen. Noch nicht geklärt ist, ob Nef selbst aktiviert wird oder aktivierend wirkt.

### 5.5.1 Serinphosphorylierung

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde mittels NMR-Spektroskopie, Western-Blot-Analyse und Protein-Sequenzierung eindeutig eine Serinphosphorylierung für das in Insektenzellen exprimierte HIV-2 Nef<sub>ALT</sub> nachgewiesen. Die genaue Position dieser Serinphosphorylierung im Nef-Protein ist noch nicht ermittelt.

Es ist bekannt, daß Nef an Serinresten phosphoryliert werden kann. Die Serinphosphorylierung des Nef-Proteins wird von Bandres et al. (1994) und Luo et al. (1997) als mögliche Regulation der Nef-Aktivität diskutiert. Wie der Vergleich mit MARCKS-Proteinen zeigt, kann die Phosphorylierung auch eine zytoplasmatische Lokalisation bewirken. Sawai et al. beschrieben 1994 eine Serinkinase, die mit Nef koimmunpräzipitierte und als Nef assoziierte Kinase (NAK) bezeichnet wurde. Später gab es Hinweise darauf, daß NAK zur Familie der p21-aktivierten Kinasen gehört (PAK). Inzwischen ist diese Serinkinase als PAK2 identifiziert. Für diese PAK2-Bindung sind sowohl das Di-Arginin-Motiv RR als auch das PXXP-Motiv des Nef-Proteins notwendig. Mitglieder der PAK Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von der Plasmamembran zum Nukleus, was zur der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Weiterhin üben PAKs einen direkten Einfluß auf das Zytoskelett aus. Auch andere Nef assoziierte Serin-Kinasen wie die Proteinkinase C (PKC) und die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) wurden identifiziert.

### 5.5.2 Tyrosinphosphorylierung

NMR-Spektroskopie, Western-Blot-Analyse und Protein-Sequenzierung zeigten ferner, daß die Koexpression von Nef mit der Src-Kinase Lck zu einer zusätzlichen Phosphorylierung an einem Tyrosinrest führte. Für mindestens drei Mitglieder der Src-Kinase Familie wie Hck, Lyn und Lck ist beschrieben, daß sie mit Nef interagieren (Saksela et al., 1995, Greenway et al., 1996, Collette et al., 1996a, Baur et al., 1997). So bindet HIV-1 Nef mit seinem PXXP-Motiv an Hck und erhöht dessen Aktivität (Lee et al., 1995, 1996, Moarefi et al., 1997, Saksela et al., 1995). Auch die Nef-Lck Interaktion ist in der Literatur beschrieben, wird aber noch immer sehr kontrovers diskutiert:

Moarefi et al. (1997) und Saksela et al. (1995) konnten keine Interaktion zwischen Nef und Lck nachweisen, während Greenway et al. (1996) und Collette et al. (1996a) beschreiben, daß Nef über sein PXXP-Motiv direkt an Lck bindet. Für diese Bindung ist jedoch eine bereits vorhandene Tyrosinphosphorylierung des Nef-Proteins Voraussetzung. Durch die Interaktion mit Nef wird die Aktivität von Lck verringert.

Im Gegensatz dazu beobachtete Baur et al. (1997), daß die Nef-Lck-Bindung von einer Serinkinase stabilisiert wird. Die Bindungsstelle für beide Kinasen wurde im N-Terminus von Nef lokalisiert. Diese Serinkinase ist eine von PAK unterschiedliche Kinase, die sowohl Nef als auch Lck *in vitro* an einem Serinrest phosphoryliert. Nef selbst wird in diesem Komplex nicht von Lck an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Baur et al. berichtet ferner, daß Nef in T-Zellen an Tyrosinresten hyperphosphoryliert vorliegt, in COS-Zellen ist diese Phosphorylierung nicht nachweisbar.

Cheng et al. (1999) konnten zeigen, daß sowohl HIV-1 Nef als auch SIV-Nef unabhängig von ihrem PXXP-Motiv an Lck binden. Nur membranständiges Nef ist dazu in der Lage. Durch die Lck-Bindung wird SIV-Nef an einem Tyrosin phosphoryliert, nicht aber HIV-1 Nef.

Diese Ergebnisse zeigen, daß weder die Lck-Nef-Bindung noch die Tyrosinphosphorylierung bisher eindeutig geklärt sind. Die Phosphorylierung scheint von der verwendeten Zelllinie abhängig zu sein und davon, ob HIV-1 Nef, HIV-2 Nef oder SIV Nef verwendet werden.

## 6 Ausblick

Auch 20 Jahre nach der Entdeckung von HIV als Erreger der Immunschwächekrankheit AIDS gibt es noch keine Möglichkeiten der Heilung. Das HIV ist ein optimiertes, sehr effizientes System, das mit nur wenigen Genen auskommt. Eine wichtige Stellung nimmt dabei das virale Nef-Protein ein, was es zu einem wichtigen Ziel antiviraler Strategien macht. Mehrere Interaktionspartner und distinkte Funktionen konnten dem Protein bisher zugeordnet werden. Doch bleibt das zelluläre Zusammenwirken dieser Komponente zum Teil unklar.

Innerhalb dieser Arbeit wurden für das Nef-Protein Aktin, die Motordomäne aus Myosin II und Calmodulin als neue Bindungspartner identifiziert.

Inwieweit diese Proteine mit Nef in einem Multi-Protein-Komplex wirken oder einzeln verschiedene Funktionen des Nef-Proteins bewirken wird eine interessante Fragestellung für zukünftige Forschungsarbeiten sein.

Die genaue Bindungsstelle der Nef-Aktin Wechselwirkung ist nicht vollständig geklärt. Durch Titration von Aktin mit  $^{15}\text{N}$ -markiertem Nef könnten aus HSQC-NMR-Spektren die an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren des Nef-Proteins bestimmt werden.

Für die weitere Charakterisierung der Nef-Myosin Interaktion wäre es interessant, in zukünftigen Experimenten ein unkonventionelles Myosin zu verwenden. Z.B. ein Myosin der Klasse IX oder X, das sowohl mit dem Zytoskelett als auch mit Signalwegen interagiert. Ebenfalls wäre der Einsatz eines unkonventionellen Myosins sinnvoll, das Calmodulin als leichte Kette gebunden hat. Wie für Aktin kann auch für Myosin mittels NMR-Spektroskopie die Bindungsstelle im Nef-Protein bestimmt werden.

Da Calmodulin in verschiedene Signalwege eingreift, wird es eine Herausforderung sein, diese Bindung auf zellulärer Ebene zu charakterisieren. Co-Lokalisierungsversuche in infizierten, Nef-exprimierenden Zellen wären dabei ein erster Schritt. Auch Co-Immunpräzipitationsversuche könnten hilfreich sein. In diese Versuche sollten auch Aktin und Myosin miteinbezogen sein.

Um die biologische Relevanz zu bestätigen, sollte auch HIV-2 Nef mit den neu identifizierten Bindungspartnern Aktin, Myosin und Calmodulin auf eine Interaktionen untersucht werden.

## 7 Literatur

- Adachi, A., Gendelmann H., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. und Martin, M.A. (1986), *J. Viol.* 59, 284-291.
- Aiken, C. und Trono, D. (1995), *J. Virol.* 69, 5048-5056.
- Araya, S.K. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5429-5433.
- Arbuzova, A., Wang, J., Murray, D., Jacob, J., Cafiso, D.S. und McLaughlin, S. (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 27167-27177.
- Arold, S., Hoh, F., Domergue, S., Birck, C., Delsuc, M.A., Jullien, M. und Dumas, C. (2000), *Protein Sci.* 6, 1137-1148.
- Arthur, L.O., Bess, J.W. Jr., Sowder, RC II, Benveniste, R.E., Mann, D.L., Chermann, J.C. und Henderson, L.E. (1992), *Science* 258, 1935-1938.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozembaum, W. und Montagnier, L. (1983), *Science* 220, 868-871.
- Bieniasz, P.D. und Cullen, B.R. (1998), *Front. Biosci.* 3, 44-58.
- Bouyac-Bertoia, M., Dvorin, J.D., Fouchier, R.A.M., Jenkins, Y., Meyer, B.E., Wu, L.I., Emerman, M. und Malim, M.H. (2001), *Mol. Cell* 7, 1025-1035.
- Burgess W.H., Schleicher, M., Van Eldik, L.J. und Waterson, D.M. (1983) In W.Y.(Cheung, Ed.) (ed.), Academic Press, New York, Vol.4, pp. 209-261.
- Baur, A.S., Sawai, E.T., Dazin, P., Fantl, W., Cheng-Mayer, C. und Peterlin, M.B. (1994), *Immunity* 1, 373-384.
- Baur, A.S., Sass, G., Laffert, B., Willbold, C., Cheng-Mayer, C. und Peterlin, M.B. (1997), *Immunity* 6, 283-291.
- Bodeus, M., Marie-Cardine, A., Bougeret, C., Ramos-Morales, F. und Benarous, R. (1995), *J. Gen. Virol.* 76, 1337-1344.
- Bradford, M. (1976), *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Briggs, S.D., Lerner, E.C. und Smithgall, T.E. (2000), *Biochemistry* 39, 489-495.
- Brigino, E., Haraguchi, S., Koutsonikolis, A., Cianciolo, G.J., Owens, U., Good, R.A. und Day, N.K. (1997), *Proc. Natl. Sci. USA* 94, 3178-3182.
- Charp, P.A. und Regan, J.O. (1985), *Biochem. Biophys. Acta* 824, 34.
- Chen, Y.L., Trono, D. und Camaur, D. (1998), *J. Virol.* 72, 3178-3184.
- Cheng, H., Hoxie, J. und Parks, W.P. (1999), *Virology* 264, 5-15.

- Cho, M.W., Lee, M.K., Carney, M.C., Berson, J.F., Doms, R.W. und Martin, M.A. (1998), *J. Virol.* 72, 2509-2515.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., Sodroski, J. (1996), *Cell* 85, 1135-1148.
- Collette, Y., Dutartre, H., Benziene, A., Ramos-Morales, F., Benarous, R., Harris, M. und Olive, D. (1996a), *J. Biol. Chem.* 271, 6333-6341.
- Collette, Y., Chang, H.L., Cerdan, C., Chambost, H., Algarte, M., Mawas, C., Imbert, J., Burny, A. und Olive, D. (1996b), *J. Immunol.* 156, 360-370.
- Collette, Y. und Olive, D. (1999), *Virology* 265, 173-177.
- Crise, B., Buonocore, L. und Rose, J.K., (1990), *J. Virol.* 64, 5448-5456.
- Cullen, B.R. (1994), *Virology* 205, 1-6.
- Cullen, B.R. (1998), *Cell* 93, 685-692.
- Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G. und Way, M. (1995), *Nature* 378, 636-638.
- Damsky, C.H., Sheffield, J.B., Tuszynski, G.P. und Warren, L. (1977), *J. Cell Biol.* 75, 593-605.
- 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. et al. (1995), *Science*, 270, 988-991.
- Doms, R.W. und Trono, D. (2000), *Genes Dev.* 14, 2677-2688.
- Fackler, O.T. (1997a), Dissertation, Universität Saarbrücken
- Fackler, O.T., und Perterlin, M.B. (2000), *Curr. Biol* 10, 1005-1008.
- Fackler, O.T., Kienzle, N., Kremmer, E., Boese, A., Schramm, B., Klimkait, T., Kücherer, C. und Mueller-Lantzsch, N. (1997b), *Eur. J. Biochem.* 247, 843-851.
- Fackler, O.T., Lu, X., Frost, J.A., Geyer, M., Jiang, B., Luo, W., Abo, A., Alberts, A.S. und Perterlin, M.B. (2000), *Mol. Cell. Biol.* 20, 2619-2627.
- Foti, M., Mangasarian, A., Piguet, V., Lew, D., Krause, K., Trono, D. und Carpentier, J.-L. (1997), *J. Cell. Biol.* 139, 37-47.
- Franchini, G., Robert-Guroff, M., Ghayeb, J., Chang, N. und Wong-Staal, F. (1986), *Virology* 155, 593-599.
- Franke, E.K., Yuan, H.E. und Luban, L. (1994), *Nature* 372, 359-362.
- Freund, J., Kellner, R., Konvalinka, J., Wolber, V., Kräusslich, H.-G. und Kalbitzer, H.R. (1994), *Eur. J. Biochem.* 223, 589-593.
- Freund, J. (1994), Dissertation, Universität Tübingen.



- Gabuzda, D.H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwillinger, E., Dorfman, T., Haseltine, W.A. und Sodroski, J. (1992), *J. Virol.* 66, 6489-6495.
- Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C. und Trono, D. (1995), *Cell* 80, 379-388.
- Gallay, P., Stitt, V., Mundy, C., Oettinger, M. und Trono, D. (1996), *J. Virol.* 70, 1027-1032.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safal, B., White, G., Foster, P. und Markham, P.D. (1984), *Science* 224, 500-503.
- Gartner, S., Markovits, P., Markovits, D.M., Kaplan, M.H., Gallo, R.C. und Popovic, M. (1986), *Science* 233, 215-219.
- Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H.S., Ozel, M., Pauli, G. und Koch, M.A. (1987), *Virology* 156, 171-176.
- Geyer, M., Munte, C.E., Schorr, J., Kellner, R. und Kalbitzer, H.R. (1999), *J. Mol. Biol.* 289, 123-138.
- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A. und Saxon, A. (1981), *New Engl. J. Med.* 305, 1426-1431.
- Graff, J.M., Young, T.N., Johnson, J.D. und Blackshear, P.J. (1989), *J. Biol. Chem.* 264, 21818-21823.
- Greenway, A., Azad, A., Mills, J. und McPhee, D. (1996), *J. Virol.* 70, 6701-6708.
- Grzesiek, S., Bax, A., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Hu, J.S., Kaufman, J., Palmer, I., Stahl, S.J. und Wingfield, P.T. (1996), *Nat. Struct. Biol.* 3, 340-345.
- Guy, B., Kieny, M.P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girad, M., Montagnier, L. und Lecocq, J.P. (1987), *Nature* 330, 266-269.
- Guy, B., Riviere, Y., Dott, K., Regnault, A. und Kieny, M.P. (1990), *Virology* 176, 413-425.
- Hall, A. (1994), *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10, 31-54.
- Harris, M. (1999), *Curr. Biol.* 9, R459-R461.
- Hartwig, J.H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P.A., Nairn, A.C. und Aderem, A. (1992), *Nature* 356, 618-622.
- Hasson, T. und Mooseker, M.S. (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 16431-16434.
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O. und Landau, N.R. (1995), *J. Virol.* 69, 6705-6711.
- Ho, A.K., Shang, K. und Duffield, R. (1986) *Mechanisms of Ageing & Development.* 36(2), 143-54.
- Hoffman, T.L. und Doms, R.W. (1998), *AIDS* 12, S17-S26.

- Hoffman, T.L., Stephens, E., Narayan, O. und Doms, R.W. (1998), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95, 11360-11365.
- Immendorfer, U.(1995), Dissertation, Universität Berlin.
- Jamieson, B.D., Aldrovandi, G.M., Planelles, V., Jowett, J.B.M., Gao, L., Bloch, L.M., Chen, I.S.Y. und Zack, J. (1994), *J. Virol.* 68, 3478-3485.
- Jenkins, Y., Sanchez, P.A., Meyer, B.E. und Malim, M.H. (2001), *J. Virol.* 75, 8348-8352.
- Jelesarov. I. und Bosshard, H.R. (1999), *J. Mol. Recognition* 12, 3-18.
- Jowett, J.B.M., Planelles, V., Poon,B., Shah, N.P., Chen, M.-L. und Chen, I.S.Y. (1995), *J. Virol.* 69, 6304-6313.
- Kalbitzer, H.R., Rohr,G., Nowak, E., Goody, R.S., Kuhn, W. und Zimmermann, H. (1991), *Biomedicine* 5, 347-350.
- Kaminchik, J., Bashan, N., Itach, A., Sarver, N., Gorecki, M. und Panet, A. (1991), *J. Virol.* 65, 583-588.
- Kaminchik J., Margalit, R., Yaish, S., Drummer, H., Amit, B., Sarver, N., Gorecki, M. und Panet, A. (1994), *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1003-1010.
- Karczewski, M.K. und Strebel,K. (1996), *J.Virol.* 70, 494-507.
- Kienzle, N., Freund, J., Kalbitzer, H.R. und Mueller-Lantzsch, N. (1993), *Eur. J. Biochem.* 214, 451-457.
- Kirchhoff, F., Greenough, T.C., Brettler, D.B., Sullivan, J.L. und Desrosiers (1995), *N. Engl. J. Med.* 332, 228-232.
- Klee, C.B. und Vanaman, T.C. (1982), *Adv. Protein Chem.* 35, 213-321.
- Kräusslich, H.-G. (1996), *Morphogenesis and Maturation of Retroviruses*. Springer Verlag.
- Konvalinka, J., Litterst, M. A., Welker, R., Kottler, H., Rippmann, F., Heuser, A. M. und Kräusslich, H. G. (1995), *J. Virol.* 69, 7180-7186.
- Kühnel, H., von Briesen, H., Dietrich, U., Adamski, M., Mix, D., Biesert, L., Kreutz, R., Immelmann, A., Henco, K. und Meichsner C. (1989), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86, 2383-2387.
- Lama, J., Mangasarian, A. und Trono, D. (1999), *Curr. Biol.* 9, 622-631.
- Lämml, U.K. (1970), *Nature* 227, 680-685.
- Lapham, C.K., Ouyang, J., Chandrasekhar, B., Nguyen, N.Y., Dimitrov, D.S. und Golding, H. (1996), *Science* 274, 602-605.
- Lee, C.H., Saksela, K., Mirza, U.A., Chait, B.T. und Kuriyan J. (1996), *Cell* 85, 931-942.

- Le Gall, S., Erdtmann, L., Benichou, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L., Benarous, R., Heard, J.-M. und Schwartz, O (1998), *Immunity* 8, 483-495.
- Lu, Y.-L., Spearman, P. und Ratner, L. (1993), *J. Virol.* 67, 6542-6550.
- Lu, X., Wu, X., Plemenitas, A., Yu, H., Sawai, E.T., Abo, A. und Peterlin, B.M. (1996) *Current Biology*. 6(12), 1677-84.
- Liu, H., Wu, X., Newman, M., Shaw, G.S., Hahn, B.H. und Kappes, J.C. (1995), *J. Virol.* 69, 7630-7638.
- Liu, L.X., Heveker, N., Fackler, O.T., Arold, S., Le Gall, S., Janvier, K., Peterlin, B.M., Dumas, C., Schwartz, O., Benichou, S. und Benarous, R. (2000), *J. Virol.* 74, 5310-5319.
- Livingstone, W.J., Moore, M., Innes, D., Bel, J.E., Simmonds, P., und the Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group (1996), *Lancet* 348, 649-657.
- Lee C.H., Saksela K., Mirza U.A., Chait B.T. und Kuriyan J. (1996), *Cell* 85, 931-942.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. Bioanalytik, Spektrum Verlag.
- Lowey, S., Slayter, H.S., Weeds, A.G. und Baker, H. (1969), *J. Mol. Biol.* 42, 1-8.
- Luria, S., Chambers, I. und Berg, P. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5326-5330.
- Luo, T., Downing, J.R. und Garcia, J.V. (1997), *J. Virol.* 71, 2535-2539.
- Machesky, L.M. und Hall, A. (1996), *Trends Cell Biol.* 6, 304-310.
- Magottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V. et al. (1998), *Mol. Cell* 1, 565-574.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.-Y., Maizel, J.V. und Cullen, B.R. (1989), *Nature* 338, 254-257.
- Mandel, M. und Higa, A. (1970), *J. Mol. Biol.* 53, 159-162.
- Mangasarian, A., Foti, M., Aiken, C., Chin, D., Carpentier, J.-L. und Trono, D. (1997), *Immunity* 6, 67-77.
- Manninen, A., Hiipakka M. Vihinen M. Lu WG. Mayer BJ. Saksela K (1998), *Virology* 250, 273-282.
- Maurer, T. und Kalbitzer, H.R. (1996), *J. Magn. Reson. B* 113, 177-178.
- Mevissen, G. (2000), *Pharmazeutische Zeitung* 23.
- Miller, M.A., Mietzner, T.A., Cloyd, M.W., Robey, G. und Montelaro, R.C. (1993), *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 9, 1057-1066.
- Miller, M., Warmerdam, M., Page, K., Feinberg, M. und Greene W. (1995), *J. Virol.* 69, 579-584.
- Miller, M.D., Farnet, C.M. und Bushman, F.D. (1997a), *J. Virol.* 71, 5382-5390.

- Miller, M.D., Warmerdam, M.T., Ferrell, S.S., Benitz, R. und Greene W.C. (1997b), *Virology* 234, 215-225.
- Modrow, S. und Falke, D. (1997), *Molekulare Virologie*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C.H., Kuriyan, J. und Miller, W.T. (1997), *Nature* 385, 650-653.
- Müller, R.T., Honnert, U. Reinhard, J. und Bähler, M. (1997), *Mol. Cell. Biol.* 8, 2039-2053.
- Niederman, T.M. J., Hu, W. und Ratner, L. (1991), *J.Virol.* 65, 3538-3546.
- Niederman, T.M., Hastings, W.R. und Ratner, L. (1993), *Virology* 197, 420-425.
- Nick, S., Häfner, Y., Diniz, C.A. und Jahn, G. (1993) *AIFO* 6, 307-309.
- Nick, S., Diniz, C.A., Born, G., Sauter, M., Pees, H.W., Mueller-Lantzsch, N. und Jahn, G. (1993), *Virus Res.* 29, 267-279.
- Nunn, M.F. und Marsh, J.W. (1996), *J.Virol.* 65, 3538-3546.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Kane, B. P., Busch, L. K., Johnson, D. G., Sowder II, R. C., Chertova, E. N., Arthur, L. O. und Henderson, L. E. (1996), *J. Virol.* 70, 7734-7743.
- Pandori, M.W., Fitch, N.J.S., Graig, H.M., Richman, D.D., Spina, C.A. und Guatelli, J.C. (1996), *J. Virol.* 70, 4283-4290.
- Paxton, W., Connor, R.I. und Landau, N.R. (1993), *J.Virol.* 67, 7229-7237.
- Piguet, V., Gu, F., Foti, M., Demareux, N., Gruenberg, J., Carpentier, J.-L. und Trono, D. (1999), *Cell* 97, 63-73.
- Piguet, V., Wan, L., Borel, C., Mangasarian, A., Demareux, N., Thomas, G. und Trono, D. (2000), *Nature Cell Biol.* 2, 163-167.
- Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.-A., Ratner, L., Lane, C.M., Moore, M.S., Blobel, G. und Bukrinsky, M. (1998), *EMBO J.* 17, 909-917.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., und Gallo, R.C. (1984), *Science* 224, 497-500.
- Ranki, A., Lagerstedt, A., Ovod, A., Aavik, E. und Krohn, K.J. (1994), *Arch. Virol.* 139, 365-378.
- Re, F., Braaten, D., Franke, E.K. und Luban, J. (1995), *J. Virol.* 69, 6859-6864.
- Reinhard, J., Scheel, A.A., Diekmann, D., Hall, A., Ruppert, C. und Bähler, M. (1995), *EMBO J.* 14, 697-704.
- Renkema, H.G. und Saksela, K. (2000), *Front. Biosci.* 5, D268-D283.
- Robert-Guroff, M., Popovic, M., Gartner, S., Markham, P. Gallo, R.C. und Reitz, M.S. (1990), *J. Virol.* 64, 3391-3398.

- Roncarati, R. und Knebel-Mörsdorf, D. (1997), *J. Virol.* 71, 7933-7941.
- Root, M.J., Kay, M.S. und Kim P.S. (2001), *Science* 291, 884-888.
- Rypniewski, W.R., Holden, H.M. und Rayment, I. (1993), *Biochemistry* 32, 9851-9858.
- Saiki, R.K., Chang, C.A., Levenson, C.H., Warren, T.C., Boehm, C.D., Kazazian, H.H. und Erlich, H.A. (1988), *N. Engl. J. Med.* 319, 537-541.
- Saksela, K., Cheng G.H. Baltimore D. (1995), *EMBO J.* 14, 484-491.
- Sawai, E.T., Khan, I.H., Montbriand, P.M., Peterlin, B.M., Cheng-Mayer, C. und Luciw, P.A. (1996), *Current Biology.* 6(11), 1519-27.
- Sasaki, H., Nakamura, M., Ohno, T., Matsuda, Y., Yuda, Y. und Nonomura, Y. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2026-2030.
- Serratara, J., Ypujel, M.J., Becks, D. und Carafoli, E. (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 1162.
- Schaeffer, E., Geleziunas, R. und Greene, W.C. (2001), *J. Virol.* 75, 2993-3000.
- Schorr, J. (1994), Diplomarbeit, Universität Heidelberg.
- Schorr, J., Kellner, R., Fackler, O., Freund, J., Konvalinka, J., Kienzle, N., Kräusslich, H-G., Müller-Lantzsch, N. und Kalbitzer, H.R. (1996), *J. Virol.* 70, 9051-9054
- Schubert, U., Ferrer-Montiel, A.V., Oblatt-Montal, M., Henklein, P., Strebel, K. und Montal, M. (1996), *FEBS-Lett.* 398, 12-18.
- Schwartz, O., Dautry-Varsat, A., Goud, B., Maréchal, V., Subtil, A., Heard, J.M. und Danos, O. (1995a), *J. Virol.* 69, 528-533.
- Schwartz, O., Maréchal, V., Danos, O. und Heard, J.M. (1995b), *J. Virol.* 69, 4053-4059.
- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. und Heard, J.M. (1996), *Nat. Med.* 2, 338-342.
- Shoeman, R.L., Hörner, B., Stoller, T.J., Kesselmeier, C., Miedel, M.C., Traub, P. und Graves, M.C. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6336-6340.
- Shugars, D.C., Smith, M.S., Glueck, D.H., Nantermet, P.V., Seillier-Moiseiwitsch, F. und Swanstrom, R. (1993), *J. Virol.* 67, 4639-4650.
- Spina, C.A., Kwoh, T.J., Chowes, .M.Y., Guatelli, J.C. und Richman, D.D. (1994), *J. Exp. Med.* 179, 115-123.
- Stevenson, M., Meier, C., Mann, A.M., Chapman, N. und Wasiak, A. (1998), *Cell* 53, 483-496.
- Swingler, S., Gallay, P., Camaur, J., Song, J., Abo, A. und Trono D. (1997), *J. Virol.* 71, 4372-4377.

- Trkola, A., Drajić, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Alaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.C. und Moore, J.P. (1996), *Nature* 384, 184-187.
- Wan, L., Molloy, S.S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S.L. und Thomas, G. (1998), *Cell* 94, 205-216.
- Wagner, U., (2000), *Pharmazeutische Zeitung*, 48.
- Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H.R. und Kräusslich, H.G. (1996), *Virology* 219, 228-236.
- Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M. und Krammer, P.H. (1995), *Nature* 375, 497-500.
- Wiley, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A. und Strebel, K. (1992), *J. Virol.* 66, 7193-7200.
- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L. und Sykes, B.D. (1995), *J. Biomol. NMR* 6, 135-140.
- Wiskerchen, M. und Cheng-Mayer, C. (1996), *Virology* 224, 292-301.
- Wolber, V., Rensland, H., Brandmeier, B., Sagemann, M., Hoffmann, R., Kalbitzer, H.R. und Wittinghofer, A. (1992), *Eur. J. Biochem.* 205, 1115-1121.
- Wolber, V., (1994), Dissertation, Universität Heidelberg.
- Wu, L.J., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., Sodroski, J. (1996), *Nature* 384, 179-183.
- Wyatt, R. und Sodroski, J. (1998), *Science* 280, 1884-1888.
- Xu, X.N., Laffert, B., Screaton, G.R., Kraft, M., Wolf, D., Kolanus, W., Mongkolsapay, J., McMichael, A.J., Baur, A.S. (1999), *J. Exp. Med.* 189, 1489-1496.
- Yu, G. und Felsted, R.L. (1992), *Virology* 187, 46-55.
- Zigmond, S.H. (1996), *Curr. Opinion in Cell Biol.* 8, 66-73.

## 8 Anhang

### 8.1 Aminosäuresequenzen von Nef

#### 8.1.1 Nef aus dem HIV-2-Stamm ALT

MGSAGSKKRS ERQQGLREKL LRVPERPYGR LSGERREQSS RSPGESDKDL  
NSPSCSEQNA RGAEGGGQQD ADESDDEDDEV GAICKTPIVP LRPMTYKLAV  
DMSHFIKEQG GLEGMYYSER RHRILDITYFE NEEGIVSGWQ NYTHGPGIRY  
PKYFGWLWKL VPVEVPAATR EEEETHCLMH PAQISSWDDI HGETLIWQFD  
SLLAYDYVAF NRPPEEFGYQ SGLPEEEWKA RLKARGIPTD

#### 8.1.2 Nef aus dem HIV-2-Stamm HOM

MGASGSKKPS KPSRGLRERL LQTPGETSGG HWHRLGGESL QSQEGSGREQ  
DSPSCEGRRY QQGDFMNTPW RAPAEKGDL YKQQNMDDVD SDDDNLIEVP  
VTPRTQLRVM TFRRLARDMSH LIKDKGGLEG MYYSERRHRI LDMYLEKEEG  
IVPDWQNYTH GPGVRYPMFF GWLWKLVPVD NPQEEEESDT SCLMHPAQIS  
RHDDPHGETL IWRFDPTLAY SYEAFIRHPE EFGHKSGMPE EEWKARLKAR  
GIPHS

#### 8.1.3 Nef aus dem HIV-1-Stamm BRU

MGGKWSKSSV VGWPTVRERM RRAEPAADGV GAASRDLEKH GAITSSNTAA  
TNAACAWLEA QEEEEVGFPV TPQVPLRPMT YKAAVDLSHF LKEKGGLEGL  
IHSQRRQDIL DLWIYHTQGY FPDWQNYTPG PGVRYPLTFG WCYKLVPVEP  
DKVEEANKGE NTSLLHPVSL HGMDDPEREV LEWRFD SRLA FHHVARELHP  
EYFKNC

## 8.2 Aminosäuresequenz von Muskelaktin aus Kaninchen

XDEDETTALV CDNGSGLVKA GFAGDDAPRA VFPSIVGRPR HQGVMVGMGQ  
 KDSYVGDEAQ SKRGILTLKY PIEHGIITNW DDMEKIWHHT FYNELRVAP  
 EHPTLLTEAP LNPKANREKM TQIMFETFNV PAMYVAIQAV LSLYASGRIT  
 GIVLDSGDGV THNVPIYEGY ALPHAIMRLD LAGRDLTDDL MKILTERGYS  
 FVTTAEREIV RDIKEKLCYV ALDFENEMAT AASSSSLEKS YELPDGQVIT  
 IGNERFRCPE TLFQPSFIGM ESAGIHETTY NSIMKCDIDI RKDLYANNVM  
 SGGTTMYPGI ADRMQKEITA LAPSTMKIKI IAPPERKYSV WIGGSILASL  
 STFQQMWITK QEYDEAGPSI VHR

## 8.3 Aminosäuresequenz der Motordomäne M761 aus *Dictyostelium discoideum*

MNPIHDRTSD YHKYLKVKQG DSDLFKLTVS DKRYIWYNPD PKERDSYECG  
 EIVSETSDSF TFKTVDGQDR QVKKDDANQR NPIKFDGVED MSELSTLNEP  
 AVFHNLRVRY NQDLIYTYSG LFLVAVNPFK RIPIYTQEMV DIFKGRRRNE  
 VAPHIFAISD VAYRSMDDR QNQSLITGE SGAGKTENTK KVIQYLASVA  
 GRNQANGSGV LEQQILQANP ILEAFGNAKT TRNNNSSRFG KFIEIQFNSA  
 GFISGASIQS YLLEKSRVVF QSETERNYHI FYQLLAGATA EEKALHLAG  
 PESFNYLNQS GCVDIKGVSD SEEFKITRQA MDIVGFSQEE QMSIFKIIAG  
 ILHLGNIKFE KGAGEGAVLK DKTALNAAST VFGVNPSVLE KALMEPRILA  
 GRDLVAQHLN VEKSSSSRDA LVKALYGRLE LWLVKKINNV LCQERKAYFI  
 GVLDISGFEI FKVNSFEQLC INYTNEKLQQ FFNHMHFKLE QEEYLKEKIN  
 WTFIDFGLDS QATIDLIDGR QPPGILALLD EQSVFPNATD NTLITKLHSH  
 FSKKNAKYEE PRFSKTEFGV THYAGQVMEY IQDWLEKNKD PLQQDLELCF  
 KDSSDNVVTM LFNDPNIASR AKKGANFIV AAQYKEQLAS LMATLETTNP  
 HFVRCIIPNN KQLPAKLEDK VVLDQLRCNG VLEGIRITRK GFFPNRIIYAD  
 FVKRYLLAP NVPRDAEDSQ KATDAVLKHL NIDPEQYRFG ITKIFFRAGQ  
 LARILGSTRD AL



#### 8.4 Aminosäuresequenz von Calmodulin aus *Dictyostelium discoideum*

MASQESLTEE QIAEFKEAFS LFDKDGSGSI TTKELGTVMR SLGQNPTEAE  
LQDMINEVDA DGNGNIDFPE FLTMMARKMQ DTDTEEEIRE AFKVFDKDG  
GYISAAELRH VMTSLGEKLT NEEVDEMIRE ADLDGDGQVN YDEFVKMMIV  
RN

#### 8.5 Die NMR-Struktur von Nef

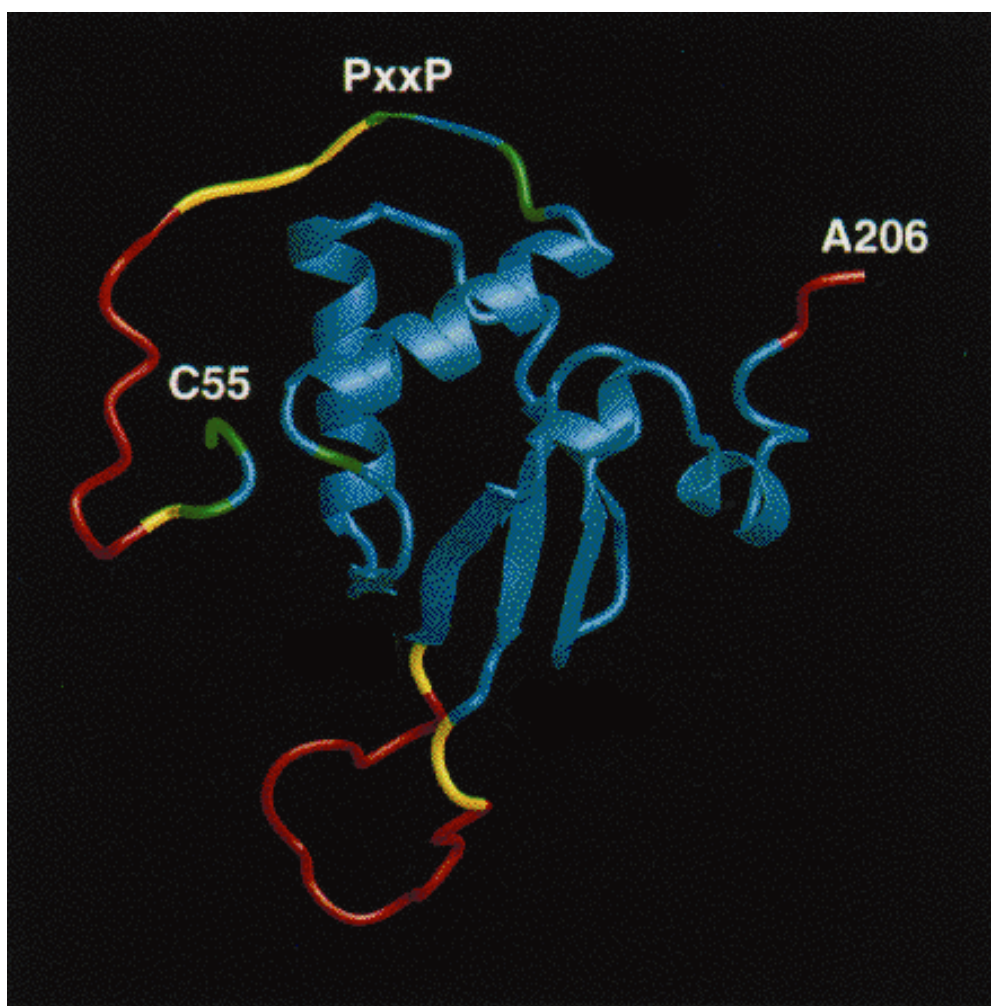
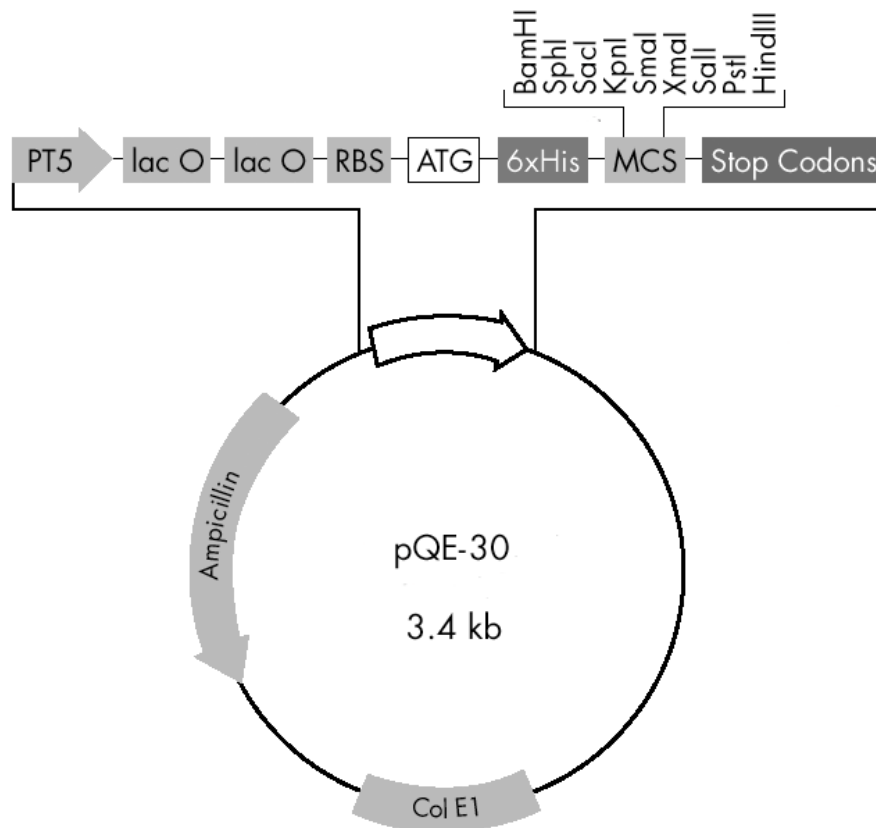


Bild 8.1: NMR-Struktur der HIV-1 NEF<sup>Delta2-39,Delta159-173</sup>-Core Domäne. (aus Grzesiek et al., 1997).



### 8.6.2 pQE-30

Der pQE-30 Vektor wurde die Expression von HIV-2 Nef<sub>HOM</sub> (G2-S255) und HIV-2 Nef<sub>HOM</sub>-Core (L40-S255) mit N-terminaler Fusion von 6 Histidinen eingesetzt. Die *nef*-Konstrukte wurden über BglII/Xho verdaut und in die BamHI/SalI Stelle von pQE-30 kloniert.



#### pQE-30

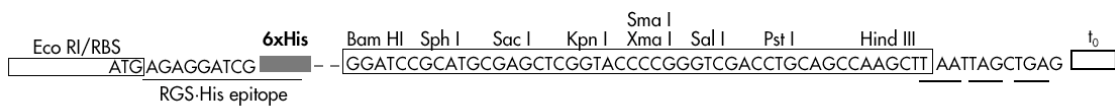


Bild 8.3: Der pQE-30 Vektor (oben) und seine „multiple cloning site“ (unten).

## 8.7 Sequenzvergleich Nef / MARCKS

Tabelle 8.1: CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Alignment. Sequence format is EMBL/Swiss-Prot. Sequence 1: NEF\_HV1BR 206 aa. Sequence 2: MACS\_HUMAN 331 aa. "\*" = identical or conserved residues in all sequences in the alignment. ":" = indicates conserved substitutions. "." = indicates semi-conserved substitutions. (ClustalW WWW Service at the European Bioinformatics Institute; <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>).

```

NEF  MGGKWSKSSVVGWPTVRER----- 19
MACS -GAQFSKTAAKGEEAERPGEAAVASSPSKANGQENGHVKVNGDASPAAAESGAKEELQA 59
      *.:***:.. * ..:..

NEF  -----MRRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFP----- 69
MACS NGSAPAADKEEPAAAGSGAASPSSAEKGEPAAAAAPEAGASPVEKEAPEAGEAAEPGSAT 119
      : **** * **** . ::* ::: :. :.*: . ** * *.. *

NEF  -----VTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEK----- 94
MACS AAEGEAASAASSTSSPKAEDGATPSPSNETPKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEAGE 179
      **:      : :*: :..** * :*

NEF  GGLEGLIHSQRRQDILD---LWIYHTQGYFPDWQNYTPG-----PGVRYPL 137
MACS GGEAEAPAAEGGKDEAAGGAAAAAAEAGAASGEQAAAPGEEAAAGEEGAAGGDPQEAKPQ 239
      **      :: :*          * .. * :**          * *

NEF  TFGWCYKLVFV-----EPDKVEEANKGEN---TSLHHPVSLHGMDPEREVLEWRF 185
MACS EAAVAPEKPPASDETKAAEEPSKVEEKKAEAEAGASAAACEAPSAAGPGAPPEQEAPAE 299
      . . : *.          **.**** : *      : : * :      ***:. .

NEF  DSRLAFHHVARELHPEYFKNC----- 206
MACS PAAAAASSACAAPSQEAQPECSPEAPPAAEAE 331
      : *      ..      * :*
```

---

Herzlichen Dank an alle, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren. Im besonderen möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die gute wissenschaftliche Betreuung, die stete Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen und die Fülle neuer Ideen und Anregungen und seine angenehme Art und Weise,

Frau Prof. Dr. Susanne Modrow für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Kenneth C. Holmes für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Biophysik des Max-Planck-Instituts für medizinische Forschung Heidelberg,

Herrn Prof. Dr. Alfred Wittinghofer für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie Dortmund,

Herrn Dr. Christian Herrmann für die tolle Einführung und großartige Unterstützung bei allen mikrokalometrischen und kinetischen Messungen und seine liebe Art,

Herrn Dr. Oliver Till Fackler und Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit rund um die Nef-Aktin Wechselwirkung,

Herrn Dr. Rasmus Schröder für die engagierte und gute Einführung und Hilfe am Elektronenmikroskop,

Herrn Dr. Roland Kellner für die Sequenzierungsarbeiten,

den Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Dr. H. Faulstich für die enge Zusammenarbeit., wobei mein Dank besonders Dr. Daniela Heinz gilt,

Frau Dr. Michalina Adamski für die tolle Zusammenarbeit und Hilfen rund um HIV-2 Nef, allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für medizinische Forschung für Ihre technische Unterstützung und Hilfe bei allen Fragestellungen, insbesondere Gisela Helmig, Sabine Zimmermann, Susanne Heinz und Anke Hennemann.

Ein besonderes Dankeschön an Klaus Schefzeck, Andreas Becker und Anna Scherer für die Starthilfe in die Proteinkristallisation., an Peter Lang für die Unterstützung bei den Fermenterläufen, an Matthias Geyer für seine Hilfe bei allen NMR-Fragestellungen, sowie an Harry Kany für die nette Zeit im Labor.

Ich möchte mich auch bei allen meinen ehemaligen Kollegen in der NMR-Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung für die tolle Zeit und für viele Anregungen, Diskussionen und den gemeinsamen Spaß bedanken. Ein besonderes Dankeschön an Christof Antz, Adrian Görler, Werner Kremer, Wolfram Gronwald, Jones Wolf, Klaus Lienhardt, Marika Hahmann, Anja Schulte, Joerg Bomke, Manfred Müller, Jens Freund und Rudi Füchsel für eine unvergessliche Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber Markus Schott, einfach für alles, sowie meiner Mutter und meinen Geschwistern für Ihre wunderbare Unterstützung.

