

Neue Strategien für die Bekämpfung von HIV:

# Der Aktivität des Nef-Proteins auf der Spur

OLIVER T. FACKLER, MATTHIAS GEYER

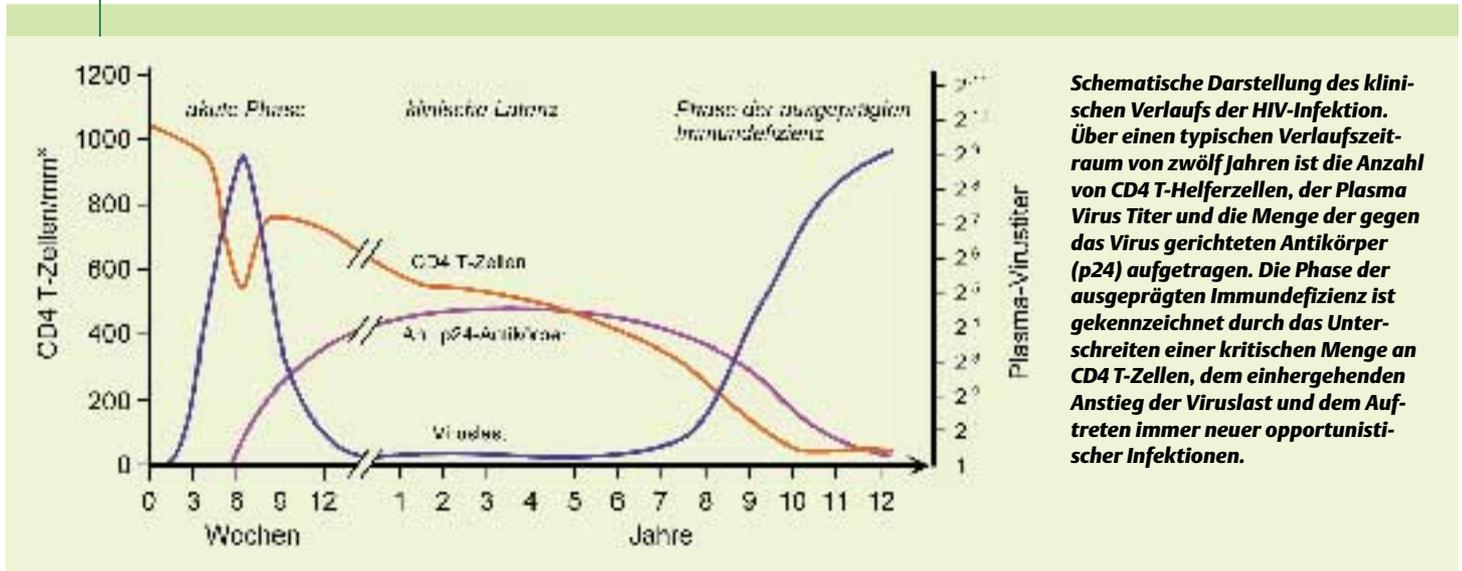
*Die HIV-Pandemie hat bislang weltweit geschätzte 24,8 Millionen Todesopfer gefordert. Trotz intensiver Forschungen ist es bislang nicht gelungen, erfolgreiche Heilungs- und Impfstrategien zu entwickeln. Nur ein detailliertes Verständnis der molekularen Vorgänge dieser Virusinfektion wird es ermöglichen, diese Ziele zu erreichen. Die zunehmend interdisziplinären Untersuchungen liefern nicht nur Informationen über das HI-Virus, sondern auch über die Funktionsweise eukaryoter Zellen und des menschlichen Immunsystems.*

1981 wurden erstmals Patienten mit Symptomen beschrieben, die später unter dem Krankheitsbild der erworbenen Immunschwäche (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) zusammengefasst wurden. Schon zwei Jahre später, Ende 1983, wurde ein Virus als Verursacher dieser Krankheit identifiziert, das heute als Humanes Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1) bekannt ist. Nach Schätzungen der WHO sind bislang weltweit 24,8 Millionen Menschen der Infektion mit HIV-1 oder dem verwandten HIV-2 Virus zum Opfer gefallen, circa 40 Millionen Menschen leben mit einer HIV-Infektion (Abbildung 1), davon 2,7 Millionen Kinder unter 15 Jahren, und jährlich infizieren sich circa fünf Millionen Menschen neu mit dem tödlichen Virus (Stand Dezember 2001). Besonders betroffen sind dabei Südost-Asien sowie die südliche Hälfte des afrikanischen Kontinentes, wo sich das Virus nach der heute vorherrschenden Meinung vom Affen auf den Menschen übertragen und dann weltweit verbreitet hat. Diese Ausbreitung hält bis heute an und ist vor allem auf ungeschützte Sexualkontakte sowie auf den gemeinsamen Gebrauch von Injektionsna-



ABB. 1 Geschätzte Anzahl der HIV-infizierten Menschen in der Welt. Die Zahlen basieren auf einer Schätzung der WHO/UNAIDS vom Dezember 2001.

ABB. 2 | VERLAUF DER HIV-INFEKTION



**Schematische Darstellung des klinischen Verlaufs der HIV-Infektion. Über einen typischen Verlaufszeitraum von zwölf Jahren ist die Anzahl von CD4 T-Helferzellen, der Plasma Virus Titer und die Menge der gegen das Virus gerichteten Antikörper (p24) aufgetragen. Die Phase der ausgeprägten Immundefizienz ist gekennzeichnet durch das Unterschreiten einer kritischen Menge an CD4 T-Zellen, dem einhergehenden Anstieg der Viruslast und dem Auftreten immer neuer opportunistischer Infektionen.**

deln bei Drogenkonsumenten zurückzuführen. In Deutschland ist die Situation mit geschätzten 60.000 HIV-Infizierten zwar weniger dramatisch, stellt aber dennoch ein ernsthaftes Gesundheitsproblem dar.

### Der schleichende Verlauf der HIV-Infektion

Eine Tücke der Infektion mit HIV besteht darin, dass sie in den seltensten Fällen vom Patienten bemerkt wird. Dies liegt daran, dass die Symptome, die mit der initialen Infektion einhergehen, eher an eine leichte Erkältung erinnern und nicht mit HIV in Verbindung gebracht werden. Auf diese Phase folgt eine bis zu zehn Jahre lange Ruhepause ohne Beschwerden, in der das Virus sich zwar ständig vermehrt, aber vom menschlichen Immunsystem in Schach gehalten wird und nur mit sensitivsten Methoden direkt nachweisbar ist. Deutlichere Spuren hinterlässt die Infektion hingegen im Immunsystem, dessen Aktivität durch Antikörper im Blut des Patienten widerspiegelt wird, die gegen das Virus gerichtet sind. Mit der Zeit nimmt die Menge an CD4 T-Helferzellen, den Hauptzielzellen des Virus, langsam ab, bis das Immunsystem schließlich nicht mehr in der Lage ist, eine für einen Gesunden harmlose Infektion durch andere Krankheitserreger zu kontrollieren (Abbildung 2). Das Auftreten dieser Sekundärinfektionen definiert den Ausbruch der Krankheit AIDS, die durch das Auftreten immer neuer Infektionen, den Verlust an T-Helferzellen und die zunehmende Schwächung des Patienten gekennzeichnet ist und in der Regel tödlich verläuft.

Obwohl HIV vor nahezu 20 Jahren als Erreger von AIDS identifiziert wurde, ist es trotz weltweiter intensiver Forschung bisher nicht gelungen, HIV-Patienten zu heilen oder einen wirkungsvollen Impfstoff zu entwickeln. Dies ist unter anderem auf das mangelnde Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Krankheitsentstehung und der Reaktionen des Immunsystems zurückzuführen. Während

der Verlust der CD4 T-Helferzellen als Ursache für das Auftreten von AIDS unumstritten ist, bleibt die Frage nach dem Mechanismus, über den HIV die Depletion dieses Zelltyps auslöst, weitgehend unklar. Sowohl das Absterben infizierter als auch nicht infizierter Zellen als Antwort auf die HIV-Infektion wird diskutiert. Ähnlich ungeklärt bleibt, warum die durchaus vorhandene Immunantwort der Patienten nicht ausreicht, um die Infektion zu kontrollieren und über welchen Weg man Immunität, also den immunologischen Schutz vor der HIV-Infektion, herstellen kann. Bevor diese äußerst komplexen Sachverhalte eindeutig geklärt werden können, ist es unumgänglich, den Vermehrungszyklus von HIV auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

### Wie das virale Genom organisiert ist

Der AIDS-Erreger, das HI-Virus, ist ein Mitglied der Familie der Retroviren. Das Genom von HIV kodiert für insgesamt neun Gene (Abbildung 3), die durch flankierende Sequenzen ergänzt werden (LTRs), die wiederum für die Transkription des Genoms sowie dessen Replikation notwendig sind. HIV kodiert für die drei sogenannten Strukturproteine Gag (gruppenspezifisches Antigen), Pol (Polymerase) und Env (envelope, Hüllprotein), die jeweils als zusammenhängende Vorläuferproteine synthetisiert werden, um anschließend in kleinere funktionelle Proteine gespalten zu werden. Dabei werden die Gag- und Pol-Vorläuferproteine von der viralen Protease gespalten, während das Env-Protein von der zellulären Protease Furin prozessiert wird. Aus dem Gag-Vorläufer entstehen so die Proteine Matrix (MA), Capsid (CA), Nukleocapsid (NC) und p6-Protein (p6), die für die Ausbildung von HIV-Partikeln strukturgebend sind. Die Hüllproteine gp120 (externes Glykoprotein) und gp41 (transmembranes Glykoprotein) werden in die Virushülle eingebaut und vermitteln den Eintritt in eine neue Zielzelle. Die Funktionalität der Partikel wird durch die Inkorpora-

tion der viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) sichergestellt. Dieser Grundbaustein an Genen wird durch solche ergänzt, die für die regulatorischen Proteine Transaktivator der Transkription (Tat) und posttranskriptioneller Transaktivator (Rev) kodieren. Als Besonderheit des HI-Virus im Vergleich zu anderen Retroviren enthält das HIV-Genom noch Gene für die akzessorischen Proteine Virion-Infektionsfaktor (Vif), Virion-assoziiertes Protein R (Vpr), Virales Protein U (Vpu) und Negativ Factor (Nef), deren Existenz wahrscheinlich die Komplexität der HIV-Pathogenese erklären.

Die zeitlich regulierte Expression all dieser Gene resultiert in der Ausbildung typischer HIV-Partikel mit sphärischer bis konischer Struktur und einen Durchmesser von 80 - 130 nm [1]. Bei der Betrachtung durch das Elektronenmikroskop fällt insbesondere das zylindrisch geformte Kapsid des Partikels auf, das die genetische Information des Virus umhüllt (Abbildung 3). In jedem Partikel sind zwei Kopien des einzelsträngigen RNS-Genoms enthalten, das mit zahlreichen Kopien des Nukleokapsidproteins (NC) behaftet ist. Desweiteren sind in das Kapsid (bestehend aus Kapsidprotein, CA) Kopien der viralen Enzyme Protease

(PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) sowie des Strukturproteins p6 und der akzessorischen Proteine Nef und Vpr inkorporiert. Das Kapsid wiederum ist von einer Lipid-Doppelmembran umhüllt, die der letzten Wirtszelle des Virus entstammt und die viralen Hüllproteine enthält. Diese Hülle ist an der Innenseite mit Matrixprotein (MA) ausgekleidet.

### Der Replikationszyklus des HI-Virus

Wie alle Viren ist auch HIV darauf angewiesen, Zellen zu infizieren, um sich mit deren Hilfe vermehren zu können (Abbildung 4) [2]. In diesem viralen Replikationszyklus bindet zuerst das Hüllprotein Env des Virus an Rezeptormoleküle an der Oberfläche der neuen Wirtszelle (1), fusioniert dann mit der Zelle (2) und setzt so das Virus-Kapsid ins Zellinnere frei (3). Dabei interagiert Env sowohl mit dem primären CD4 Rezeptor als auch mit einem zusätzlichen Molekül, dem sogenannten Korezeptor. Diese Interaktion induziert im Env Protein eine aktive Konformation, die die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran vermittelt. Nun erfolgt ein ungewöhnlicher Schritt, der für die Familie der Retroviren namensgebend war: die Reverse Transkription

ABB. 3 | HIV-1-GENOM UND HIV-PARTIKEL

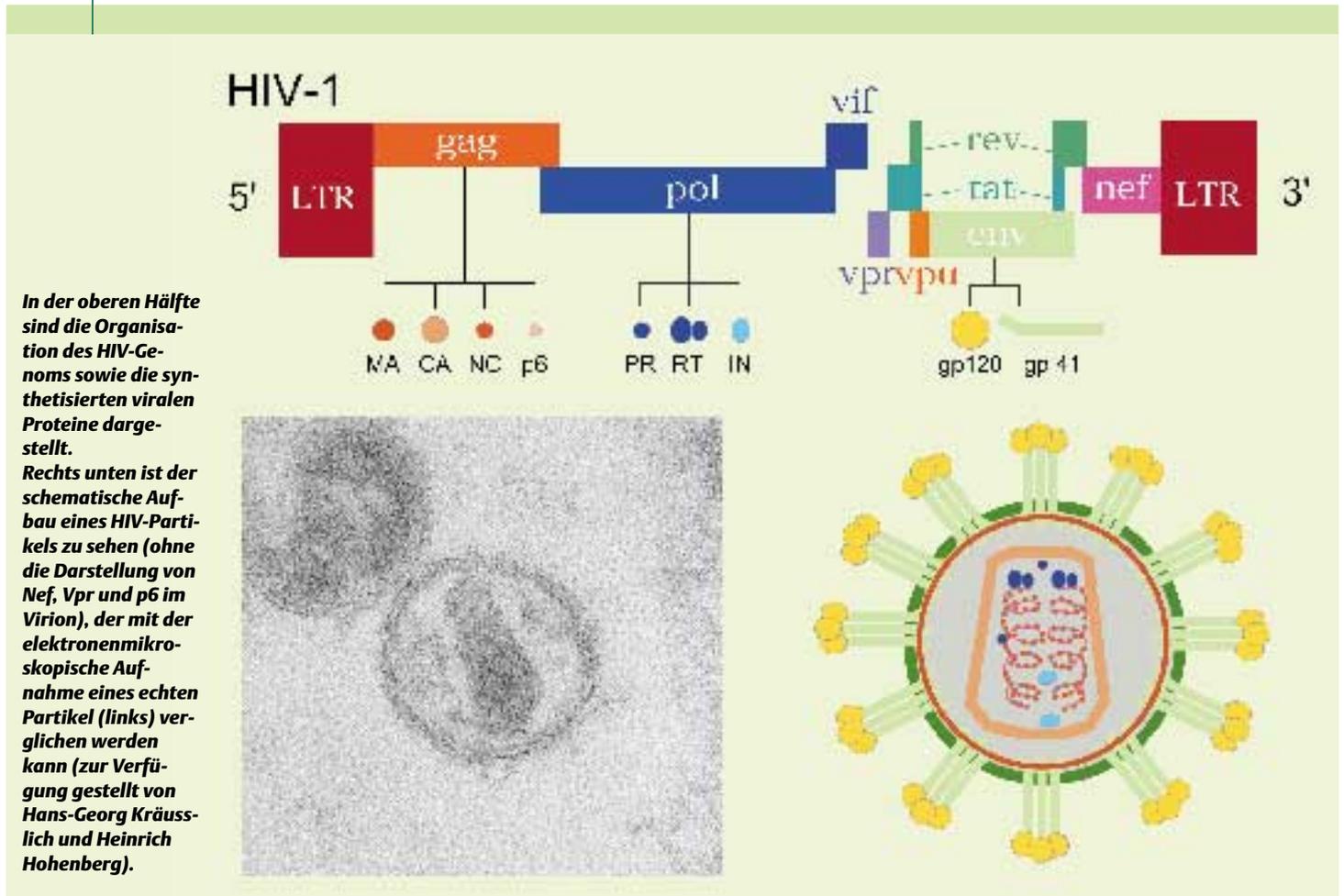
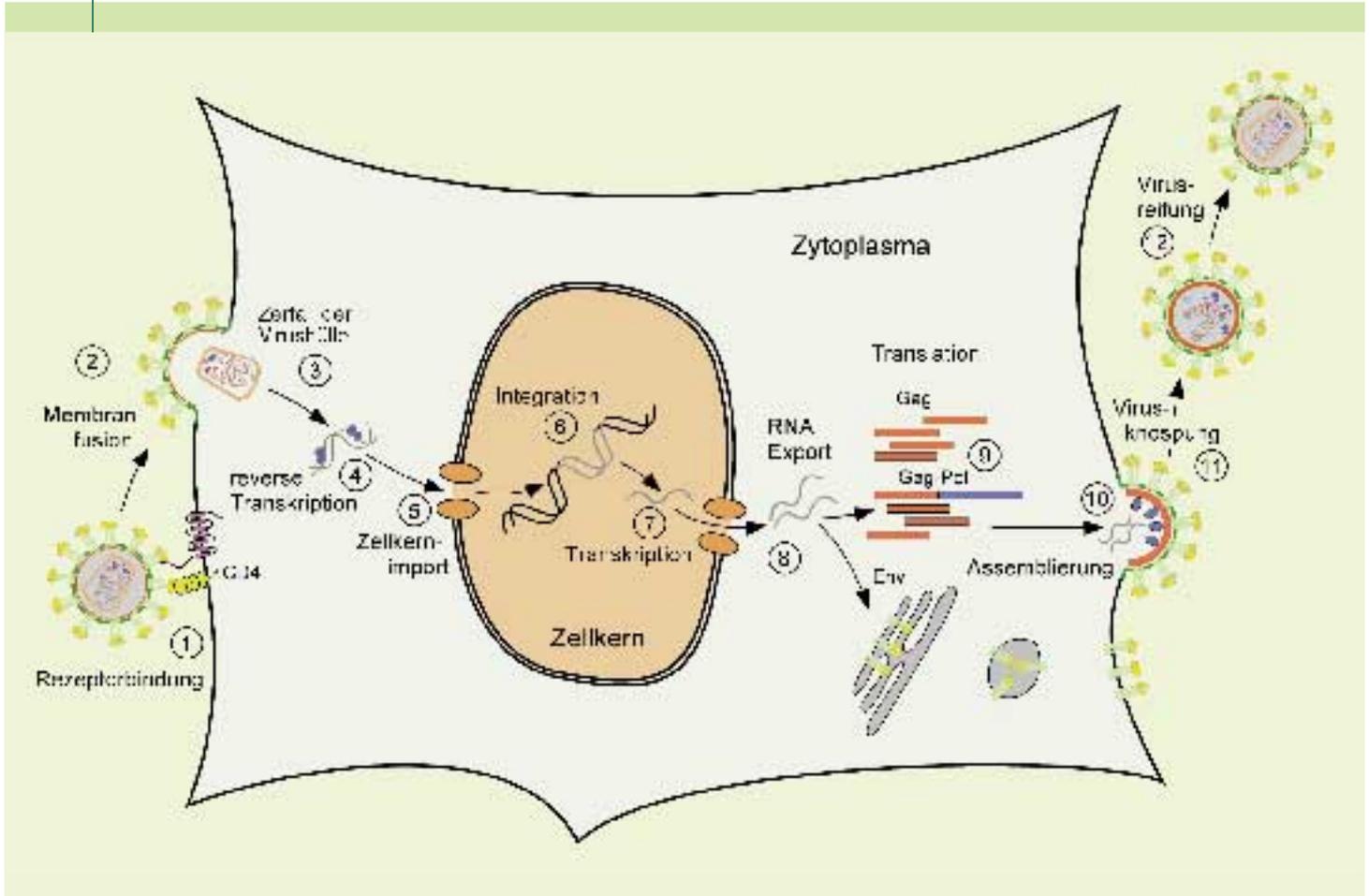


ABB. 4 | SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES REPLIKATIONSZYKLUS DES HI-VIRUS



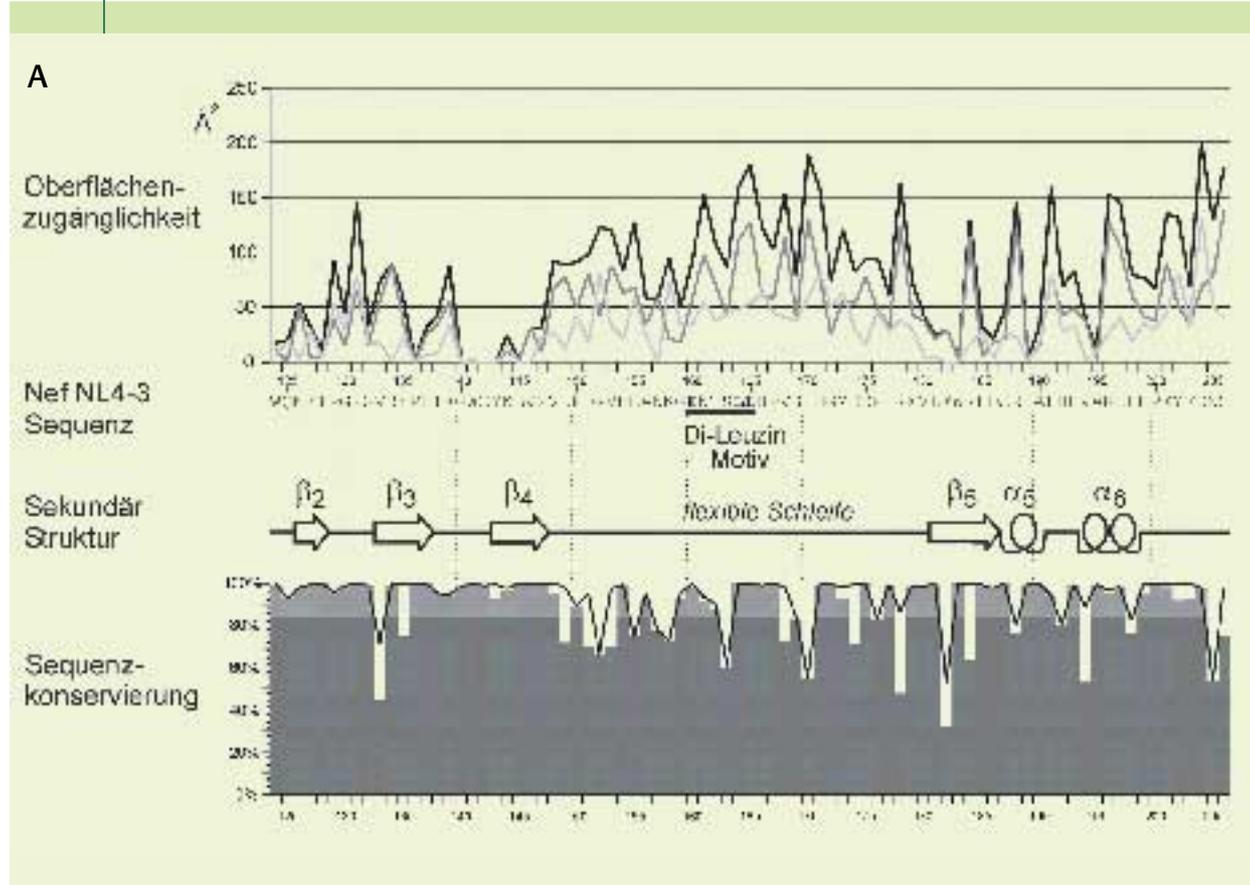
(4). Dabei wird mit Hilfe eines speziellen viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase, die einzelsträngige virale RNS in einen DNS Doppelstrang umgeschrieben, der dann in den Kern der Wirtszelle importiert wird (5). Das DNS Genom wird anschließend aufgrund der Aktivität eines weiteren viralen Enzyms, der Integrase, in das Genom der Wirtszelle integriert (6) und daher auch bei Zellteilung mitvererbt. Um als sogenanntes Provirus neue Viruspartikel zu erzeugen, muss die virale DNS transkribiert werden (7). Dieser Vorgang wird durch die Aktivität des viralen Transaktivators Tat dramatisch verstärkt [3]. Die viralen RNS-Transkripte werden unter der aktiven Beteiligung des viralen Rev-Proteins aus dem Kern ins Zytoplasma der Wirtszelle transportiert (8), wo sie zu Proteinen translatiert werden (9) und an der Zellmembran assemblieren (10). Dort bilden sie neue, unreife Viruspartikel (11), die schließlich als reife, infektiöse HIV-Partikel freigesetzt werden (12). Diese Virusreifung hängt strikt von der Aktivität des dritten viralen Enzyms, der Protease, ab. Die HIV-Protease spaltet die großen Vorläufermoleküle der viralen Strukturproteine in kleinere funktionelle Einheiten, die sich dann zu fertigen HIV-Partikeln zusammenfinden.

### Angriffspunkte im viralen Lebenszyklus

Jeder einzelne Schritt in diesem Replikationszyklus ist ein potentielles Ziel für Therapien gegen die HIV-Infektion [2]. Bislang am erfolgreichsten waren Versuche, die Aktivität der viralen Enzyme zu hemmen. Im Vordergrund stehen dabei Inhibitoren der Reversen Transkriptase und der Protease. Die aktuelle Therapie einer HIV-Infektion verwendet eine Mischung von bis zu fünf gegen je eines dieser Enzyme gerichteten Präparaten (sogenannte Kombinationstherapie oder HAART). Inhibitoren gegen die virale Integrase werden derzeit klinisch getestet. Diese Therapie verläuft in den meisten Fällen zunächst relativ erfolgreich und senkt die HI-Viruslast deutlich, führt aber dennoch nicht zur vollständigen Eliminierung des Virus in den Patienten. Dies liegt neben den teilweise erheblichen Nebenwirkungen der Therapie vor allem an der Bildung resistenter HIV-Varianten.

Die Reverse Transkription von HIV ist mit einer hohen Fehlerrate behaftet, so dass bei der Replikation der Virus-RNS ständig neue genetische Varianten produziert werden, von denen sich (in weiteren Replikationsrunden) die therapieresistenten Genotypen durchsetzen. Zudem sind die

ABB. 5 | STRUKTUR-FUNKTIONSBEZIEHUNG AN EINEM BEISPIEL

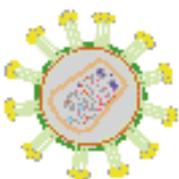


**Struktur-Funktionsbeziehung des HIV-1 Nef-Proteins am Beispiel der flexiblen Schleife mit dem zentralen Di-Leuzin Motiv.**

**(A) Korrelation der Oberflächenzugänglichkeit einzelner Aminosäuren mit der Sekundärstruktur und dem Grad der Sequenzkonservierung.**

**(B) Darstellung der Sequenzkonservierung auf der Oberflächenstruktur von Nef. Die durchschnittliche Konservierung (84 Prozent, siehe A) ist weiß dargestellt, Bereiche höherer Konservierung sind blau eingefärbt, Bereiche größerer Variabilität orange.**

**(C) Struktur der Kerndomäne von Nef und Modell einer Konformation der flexiblen Schleife (AS 148-180). Die drei Aminosäureseitenketten des Di-Leuzin Motivs (ExxxLL) im Zentrum der Schleife sind eingezeichnet. (D) Darstellung des elektrostatischen Potentials auf der Oberfläche von Nef. Positive Ladungszentren sind blau dargestellt, negative Ladungszentren rot.**



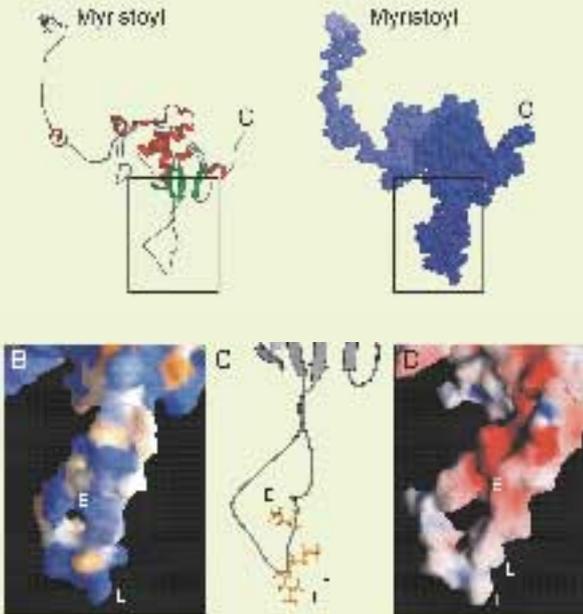
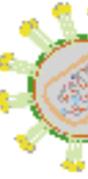
Kosten einer solchen Therapie enorm, wodurch sie schwächer entwickelten Ländern nicht zugänglich ist. Aus diesen Gründen wird konstant an neuen Therapieansätzen geforscht. Ein derzeitiger Schwerpunkt liegt in Versuchen, den Viruseintritt in die Zelle durch Blockieren der Rezeptormoleküle zu verhindern. Auch alle anderen Schritte des viralen Lebenszyklus stellen potentielle Angriffspunkte dar.

Da das Virus sich zu seiner Replikation ausschließlich vorhandener zellulärer Vorgänge bedient, sind zelluläre und virale Prozesse auch auf molekularer Ebene eng miteinander verknüpft. Die meisten dieser zellulären Prozesse sind nur oberflächlich verstanden, deshalb dienen Viren seit langem als wertvolle Studienobjekte zellbiologischer Forschung. Durch die Erforschung solcher Wechselwirkungen haben wir in den letzten Jahren unser Verständnis für die molekularen Vorgänge in eukaryoten Zellen entschei-

dend erweitert. Ein faszinierendes Beispiel funktioneller Interaktion zwischen Virus und Wirtszelle ist das Nef-Protein von HIV. Nef besitzt keine enzymatische Aktivität und übt seine Funktionen ausschließlich über Wechselwirkungen mit Proteinen der Wirtszelle aus, ist aber dennoch ein Schlüsselfaktor für die Pathogenese von HIV. Somit stellt Nef ein vielversprechendes Ziel für neue Therapiestrategien dar; zu deren Entwicklung müssen jedoch zunächst die molekularen Wirkmechanismen von Nef verstanden werden. Anhand dieses Beispiels wollen wir das Zusammenspiel verschiedener naturwissenschaftlicher Disziplinen in der Erforschung eines solchen Problems verdeutlichen.

### Die Langzeitüberlebenden aus Australien

Nef ist eine Abkürzung für „negative factor“, ein Name, der dem viralen Protein fälschlicherweise nach anfänglichen



Untersuchungen in Zellkultur (*in vitro*) gegeben wurde, in denen der Verlust des *nef*-Genes keinen oder sogar einen positiven Einfluss auf die Replikation von HIV hatte. Der Irrtum dieser Namensgebung wurde deutlich, als man *nef*-deletierte Viren *in vivo*, also im Verlaufe der Infektion im natürlichen Wirtsorganismus, beobachtete. Diese Studien zeigten zunächst für das dem HIV nahe verwandte Affen-Virus SIV, aber später auch in humanen Patienten für HIV, dass die Funktion von Nef darin besteht, die Virusreplikation im physiologischen Kontext zu steigern [4-6]. Dieser Effekt ist so bedeutend, dass Viren ohne funktionelles Nef-Protein über kein pathogenes Potential verfügen und von der Immunantwort kontrolliert werden [7]. So wurde 1995 bei einer australischen Gruppe von sieben sogenannten Langzeitüberlebenden, die Anfang bis Mitte der 80er Jahre mit HIV infiziert wurden aber keinen Rückgang ihrer CD4 T-Helferzellen zeigten, umfangreiche Deletionen im *nef*-Gen entdeckt [6]. Die dadurch erzeugte Immunität regte intensive Diskussionen darüber an, ob man Viren, die in *nef* und anderen akzessorischen Genen deletiert sind, als Impfstoff einsetzen könnte. Diese Überlegungen wurden jedoch aufgrund des pathogenen Potentials dieser Viren in Neugeborenen (man denke an Übertragung von Mutter auf Kind) sowie der Fähigkeit von HIV, genetische Defekte zu reparieren und vollständig pathogene Viren zu produzieren, verworfen. Bis heute ist unklar, über welchen molekularen Mechanismus Nef diese wichtige Funktion ausübt, eine Frage, die vor der Entwicklung eines Inhibitors gegen Nef steht.

*In vitro* wurden mehrere Funktionen von Nef identifiziert: Nef reduziert die Menge an CD4 und MHC Klasse I

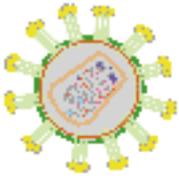
Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen [8, 9]. Beide Mechanismen verlängern wahrscheinlich die Lebensdauer infizierter Zellen und steigern dadurch die Virusproduktion. Während die Beeinflussung des viralen Rezeptors CD4 die oftmals für die Zelle tödliche Mehrfachinfektion (sogenannte Superinfektion) verhindern könnte, sorgt Nef durch die Effekte auf MHC I für eine wenig effiziente Erkennung durch die zelluläre Immunantwort (CTL response) des Wirtes, die ansonsten die Zerstörung der Zelle nach sich ziehen würde. Weiterhin steigert Nef die Infektiosität von HIV-Partikeln, was sich direkt positiv auf die Replikationseffizienz des Virus auswirken könnte [10]. Diese Effekte erzielt das Nef-Protein durch die Beeinflussung des intrazellulären Proteintransports.

Daneben verfügt Nef über die Fähigkeit, bestimmte Signaltransduktionswege in Zielzellen von HIV zu aktivieren [11]. Im menschlichen Körper ist der Normalzustand der meisten Immunzellen eine Wartestellung, in der sie nicht besonders teilungsaktiv sind. Erst in Gegenwart hochspezifischer Stimuli, wie beispielsweise bakteriellen Infektionen, werden diese Zellen aktiviert. Der Übergang von ruhendem zu aktiviertem Zustand wird stufenweise durch ausgeklügelte Signaltransduktionsmechanismen erzielt. Da HIV *in vivo* zumeist ruhende, nicht aktivierte Zellen infiziert (die mit Abstand die größte für das Virus erreichbare Zellpopulation darstellen), zur effizienten Replikation je-

### STRUKTUR-FUNKTIONSANALYSE

Bei einer Struktur-Funktionsanalyse werden die Eigenschaften der dreidimensionalen Proteinstruktur mit der Funktion und der Lokalisierung des Proteins in Beziehung gesetzt. Die erste strukturelle Information ergibt sich bereits aus einem Vergleich der Proteinsequenzen aus unterschiedlichen Spezies oder Organismen. Der so ermittelte Grad der Sequenzkonservierung lässt erkennen, welche Bereiche (sogenannte Domänen) und welche Aminosäuren innerhalb eines Proteins besonders gut erhalten sind. Für HIV-Proteine ist diese Analyse besonders aufschlussreich, da durch die verschiedenen Subtypen und die häufigen Replikationszyklen des Virus viele unterschiedliche Varianten eines Proteins ausgebildet werden. Diese Information kann auf die räumliche Struktur des Proteins übertragen werden. Dabei zeigt sich oft, dass viele der sehr gut konservierten Aminosäuren – häufig solche mit großen, hydrophoben Seitenketten – im Inneren der Struktur liegen, die so das tertiäre Gerüst der Proteinstruktur bilden. Bereiche hoher Konservierung auf der Oberfläche des Proteins zeigen dagegen an, dass diese Aminosäuren für die Interaktion mit einem Bindungspartner wichtig sein könnten. Die Darstellung der Oberflächenladung ist dabei ein weiteres Mittel, um strukturelle und funktionale Eigenschaften zu korrelieren. Ausgehend von der zellulären Funktion können so mögliche Interaktionsbereiche ermittelt oder Rückschlüsse auf die Funktion gezogen werden.

Insbesondere für enzymatische Proteine und Proteine mit einem aktiven Zentrum ist die Analyse der Position und Konservierung der für den Mechanismus relevanten Aminosäuren wichtig. Vielfach kann so die Wirkungsweise von Mutationen mit gleichem Phänotyp, beispielsweise onkogene Mutationen, im Protein erklärt werden. Auch ist es manchmal möglich, durch Mutationen sogenannte "dominant negative" Formen eines Proteins zu schaffen, die eine gegebene Proteinfunktion nicht mehr ausführen oder umgekehrt "konstant aktive" Isoformen zu erzeugen, die fortwährend diese Funktion ausführen. Die Struktur-Funktionsanalyse ist somit ein wichtiges Werkzeug für das Verständnis eines Proteins.



doch zumindest teilweise aktivierte Zellen benötigt, könnte die Expression von Nef diesen Zustand induzieren und somit über diese Funktion direkt zur gesteigerten Virusvermehrung beitragen. Welches Gewicht diese einzelnen Funktionen von Nef jedoch für die Pathogenität des Virus *in vivo* haben, ist noch immer unklar.

Diese Vielfalt an Funktionen erschwert unser Verständnis der Wirkungsweise von Nef und wird zudem durch die Identifizierung einer erstaunlichen Vielzahl an zellulären Interaktionspartnern begleitet, die an der Vermittlung dieser Funktionen beteiligt sein könnten [12]. Anhand einer Struktur-Funktionsanalyse können diese Informationen übersichtlich zusammengefasst werden. Dabei werden auch die Probleme deutlich, die bei der Suche eines spezifischen und potenten Inhibitors für die verschiedenen Funktionen von Nef entstehen.

### Struktur-Funktionsbeziehung des Nef-Proteins

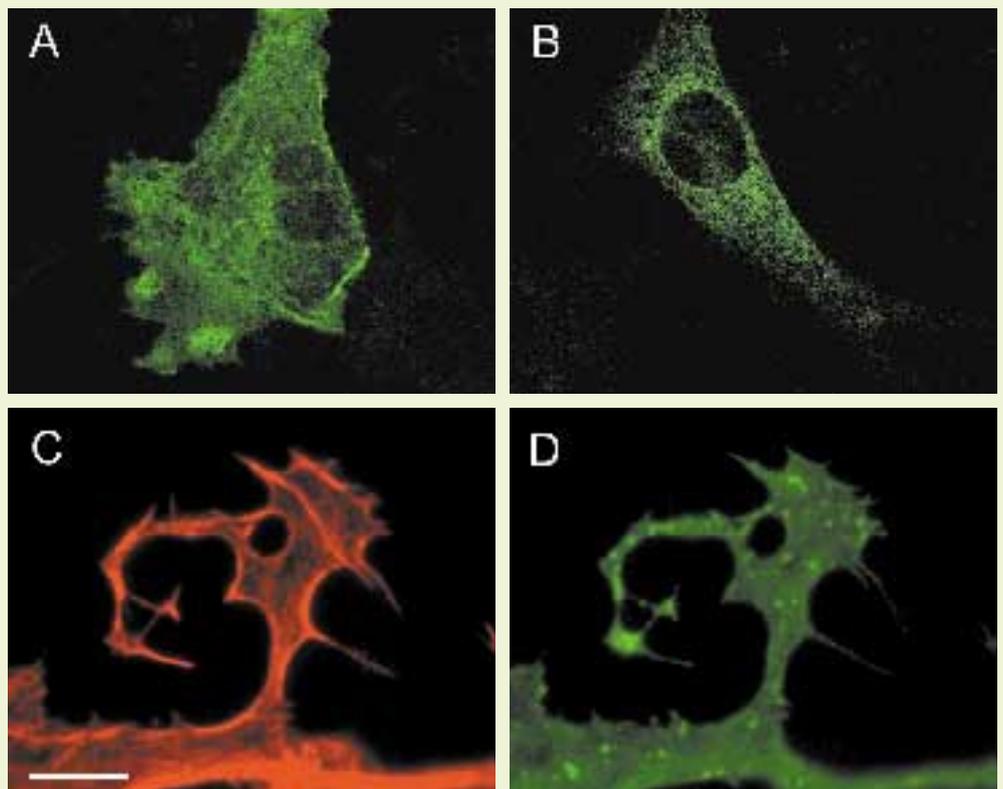
Die Strukturaufklärung des Nef-Proteins zeigte, dass dieses Protein von etwa 206 Aminosäuren Länge nur einen geringen Anteil wohldefinierter Strukturelemente ( $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter) besitzt, während weite Teile des Moleküls flexibel sind [13-15]. Der gut strukturierte Teil des Nef-Proteins umfasst nur etwa 93 Aminosäuren, welche die Kern-domäne von Nef bilden, während eine N-terminale Mem-

bran-Verankerungsdomäne von variabler Länge und eine Schleife am C-Terminus von 33 Aminosäuren Länge die konformationell flexiblen Bereiche von Nef bilden. Obwohl Nef aufgrund seiner pathogenen Eigenschaften ein Ziel für eine antivirale Therapie darstellt, ist das Molekül durch diese strukturellen Eigenschaften schwer zu fassen. Der geringe Grad an definierter Struktur führt einerseits zu einer großen Moleküloberfläche, die eine Reihe von Interaktionen mit verschiedenen Proteinen ermöglicht, andererseits verliert das Protein dadurch an Spezifität in der Erkennung von Molekülen. Zugleich gewinnt das Protein aber auch mehr Variabilität in seiner Aminosäuresequenz, da weniger strukturbedingte Konservierungen erforderlich sind. Eine Struktur-Funktionsanalyse verdeutlicht das am Beispiel für die flexible Schleife von Nef (Abbildung 5).

Eine Analyse der Aminosäuresequenzen aus 186 unterschiedlichen HIV-1 Nef-Allelen zeigt, dass drei Sequenzmotive in Nef besonders hoch konserviert sind und praktisch keiner Variation in den verschiedenen HIV-1 Subtypen und Krankheitsstadien unterliegen. Das ist zuerst das N-terminale Myristoylierungsmotiv, das zur Membranverankerung des Proteins führt, dann das PxxP-Motiv, das eine Erkennungssequenz für Moleküle darstellt, die häufig in der Signaltransduktion involviert sind, und schließlich das Di-Leuzin (LL-) Motiv, das im vesikulären Zelltransport die Inter-

## ABB. 6 | LOKALISIERUNG UND AKTIVITÄT DES NEF-PROTEINS IN ZELLEN

**A und B zeigen konfokale Mikroskopieaufnahmen (Schnitte durch einzelne Zellen) von menschlichen Fibroblasten, die mit CD8 (A) oder CD8-Nef (B) Expressionskonstrukten transfiziert und mit einem fluoreszenzmarkiertem Antikörper gegen CD8 angefärbt wurden. Die veränderte subzelluläre Lokalisierung in der Gegenwart von Nef ist Ausdruck der Fähigkeit von Nef, über das LL-Motiv mit der zellulären Transportmaschinerie zu interagieren. C und D zeigen starke Vergrößerungen menschlicher Fibroblasten, in die Expressionskonstrukte für die Proteine Nef und Vav mikroinjiziert wurden. In C wurden die Aktinfilamente der Zelle angefärbt, in D ist die Fluoreszenz des an Nef gekoppelten GFP Anteils gezeigt. Die Ausbildung der dargestellten Trichopodien an der Oberfläche der Zelle reflektiert die Aktivierung von Signaltransduktion durch Nef via das PxxP-Motiv. Der weiße Balken entspricht 5  $\mu$ m. Aufnahmen aus *Molecular Cell*, Vol 3, 1999, Seiten 729–739. Entnommen mit Genehmigung von Elsevier Science.**



nalisation eines Moleküls steuert. Diese funktionalen Motive sind auch aus anderen Proteinen bekannt, allerdings ist die Kombination eines PxxP-Motives für die Signalvermittlung mit einem LL-Motiv für den Zelltransport einzigartig. Zudem ist Nef das einzige nicht-transmembrane Protein, dessen Zelltransport durch ein Di-Leuzin Motiv gesteuert wird. Dieses Motiv ist von besonderer Wichtigkeit für die von Nef vermittelte Internalisierung der CD4 T-Zellrezeptoren und dient daher einer Schlüsselfunktion von Nef [16].

Die beiden hoch konservierten Leuzine liegen im Zentrum der 33 Aminosäure langen C-terminalen Schleife und sind so exponiert für Interaktionen leicht zugänglich (Abbildung 5). Die Darstellung der Oberflächenladung zeigt zudem, dass sie umgeben werden von einer Ansammlung negativ geladener Aminosäuren (Asp und Glu), die in dieser Eigenschaft auch höher konserviert sind als andere Aminosäuren in der Schleife. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Proteine identifiziert, die durch die Bindung an die flexible Schleife den Komplex aus Nef und CD4 von der Zellmembran internalisieren und so die CD4-Rezeptoren zur Degradation im Lysosom transportieren [12]. Die Lokalisierung dieses wichtigen Motivs in einem strukturell flexiblen Bereich erschwert daher die Suche nach einem Wirkstoff, der gegen die CD4-Regulierung durch Nef gerichtet ist.

### Transportweg durch die Plasmamembran

Beispiele für die zellbiologisch wichtigen Funktionen von Nef lassen sich durch die Mikroskopie von Zellen beobachten (Abbildung 6). In A und B ist die subzelluläre Verteilung von CD8 alleine beziehungsweise eines CD8-Nef-Fusionsproteins zu sehen. Das CD8-Konstrukt besteht nur aus der extrazellulären und transmembranen Domäne und präsentiert somit keinerlei Motive im Zytoplasma, die zur Internalisierung von der Plasmamembran führen könnten. Deshalb lässt die Anfärbung dieses Proteins deutlich die Umrisse der Zelle und ihre gesamte Oberfläche erkennen. Durch die Fusion von CD8 mit Nef wird Nef inklusive seines LL-Internalisierungsmotives an der Plasmamembran exprimiert. Dadurch verändert sich die Lokalisierung des Proteins dramatisch und resultiert in einer Verteilung über das gesamte Zytoplasma hinweg in kleinen vesikulären Strukturen; der Zellkern hingegen enthält kein CD8-Nef-Protein. Diese Verteilung spiegelt die Fähigkeit des LL-Motivs in Nef wider, mit der Transportmaschinerie der Zelle zu interagieren und von der Plasmamembran internalisiert zu werden. Somit befindet sich nur ein geringer Prozentsatz aller Nef-Moleküle pro Zeitpunkt an der Plasmamembran (die Zellumrisse sind nur zur errahnen), der Lokalisierung mit der größten biologischen Bedeutung für Nef. Aufgrund der Beeinflussung der Lokalisierung zellulärer Liganden wie CD4 und MHC I durch Nef und dessen LL-Motivs sind die noch nicht vollständig verstandenen von Nef verwendeten Transportwege auch für Zellbiologen von großem Interesse.

### Eingriff in die zellulären Signalwege

Die Effekte von Nef auf die Signaltransduktion von Zellen lassen sich ebenso bildlich darstellen, da viele dieser Vorgänge direkte Auswirkungen auf strukturgebende Faktoren der Zelle, dem Zytoskelett, haben. Das Zytoskelett setzt sich im Wesentlichen aus den Aktin- und Tubulin-Filamenten sowie Intermediärfilamenten zusammen. Die Signalwege, in die Nef eingreift, beeinflussen hauptsächlich die Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts. In Abbildung 6 C und D ist in einer starken Vergrößerung der Oberfläche von Zellen beispielhaft gezeigt, wie sich die Aktivierung von Zellen durch die Interaktion des PxxP-Motives von Nef und seinem Liganden Vav auf die Zytoskelettarchitektur auswirkt [17]. Dabei kommt es zur Auflösung von Aktinfilamenten (rote Färbung) und zur Ausbildung der hier dargestellten verzweigten Zellfortsätze, den Trichopodien. Diese Veränderungen sind die Folge der durch Nef und Vav vermittelten Aktivierung der Pak-Kinase und ähneln denen bei der physiologischen Aktivierung von Zellen. In diesen Fortsätzen kann man das Nef-Protein in kleinen vesikelartigen Strukturen erkennen (grüne Färbung), was nahelegt, dass

### SEQUENZMOTIVE

*Die Funktionsweise von Proteinen wird oftmals durch spezifisch aufeinanderfolgende Aminosäuren reguliert. Diese sogenannten Sequenzmotive (auch "sequence signals") sind in der Evolution meist hochkonserviert und lassen sich in Proteinen unterschiedlichster Spezies finden. Von besonderer Bedeutung sind solche Motive in der Vermittlung der Interaktionen von Proteinen untereinander. Die am besten konservierten und funktionell relevanten Aminosäuren sind dabei in der Regel namensgebend für das jeweilige Motiv.*

*Dem Schlüssel-Schloss-Prinzip folgend haben sich im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Motiven entwickelt, welche die Bindung ähnlicher Partner miteinander vermitteln. Für regulatorische Proteine ohne eigene enzymatische Aktivität kann man also vereinfacht sagen, dass ihre Funktion der Summe ihrer biologisch aktiven Motive entspricht. Ein solches Beispiel ist das PxxP-Motiv, in dem zwei Proline (P) getrennt durch zwei beliebige Aminosäuren (x) die spezifische Interaktion mit einem Partner (Liganden) vermitteln. Im Fall des PxxP-Motives besteht der Ligand aus einer sogenannten SH3 (Src homology region 3)-Domäne. Diese Art von Interaktion ist für Moleküle in Signaltransduktionsketten typisch. Die Spezifität der Interaktion (es existieren eine Vielzahl verschiedener PxxP-Motive und SH3-Domänen) wird vor allem durch die an das Motiv angrenzenden Aminosäuren bestimmt.*

*Das LL-Motiv (charakterisiert durch zwei aufeinanderfolgende Leuzine) ist ein weiteres Beispiel für ein Motiv, das spezifische Proteininteraktionen vermittelt. Durch LL-Motive wird die Transportmaschinerie der Zelle rekrutiert, um die Proteine, die das LL-Motiv enthalten, an biologisch relevante Lokalisationen innerhalb der Zelle zu bringen. Dies spielt insbesondere für die Internalisierung von Proteinen von der Plasmamembran ins Zellinnere eine entscheidende Rolle.*

*Motive können auch dazu dienen, Modifikationen von Proteinen zu induzieren. Ein Beispiel dafür ist die Myristoylierung von Nef. Die Erkennung eines speziellen Motives (MGxxxS) am Aminoterminus eines Proteins durch ein zelluläres Enzym führt zum Anhängen der Fettsäure Myristoyl an das an Position 2 befindliche Glyzin. Dadurch gewinnt das Protein eine hohe Affinität zu zellulären Membranen und verändert somit deutlich seine Lokalisierung innerhalb der Zelle. Zusammenfassend sind diese drei Effekte – Plasma-Membranbindung, Interaktion mit der Signaltransduktionskaskade und Beeinflussung der zellulären Transportmaschinerie – charakteristisch für die Sequenzmotive des Nef-Proteins.*

**WICHTIGE INTERNETADRESSEN SIND:**

- [http://www.who.int/hiv\\_aids/](http://www.who.int/hiv_aids/)
- <http://www.unaids.org/>
- <http://www.aidshilfe.de/>
- <http://www.hiv.net/>
- <http://www.AIDSfinder.org/>
- <http://www.cdc.gov/hiv/dhap.htm>
- <http://hivinsite.ucsf.edu/international/>
- <http://www.daignet.de>

Nef tatsächlich die direkte Ursache der Ausbildung der Trichopodien ist. Wie genau die Vermittlung von intrazellulären Signalen und die Organisation des Aktin-Zytoskelettes miteinander zusammenhängen, ist noch unklar. So stellen die von Nef induzierten Effekte auch hier ein geeignetes Modellsystem für biologische Studien dar.

ist anzunehmen, dass die Funktionen von Nef im Laufe der Infektion eines Patienten mit HIV unterschiedlich zum Tragen kommen. Ein mögliches Modell für die Funktionsweise von Nef ist in Abbildung 7 gezeigt. In der zeitlichen Abfolge ist demnach die Aktivierung von Signaltransduktion eine früh benötigte Funktion von Nef, während die Funktionen von Nef beim Transport zellulärer Proteine später in der Infektion Wichtigkeit erlangen.

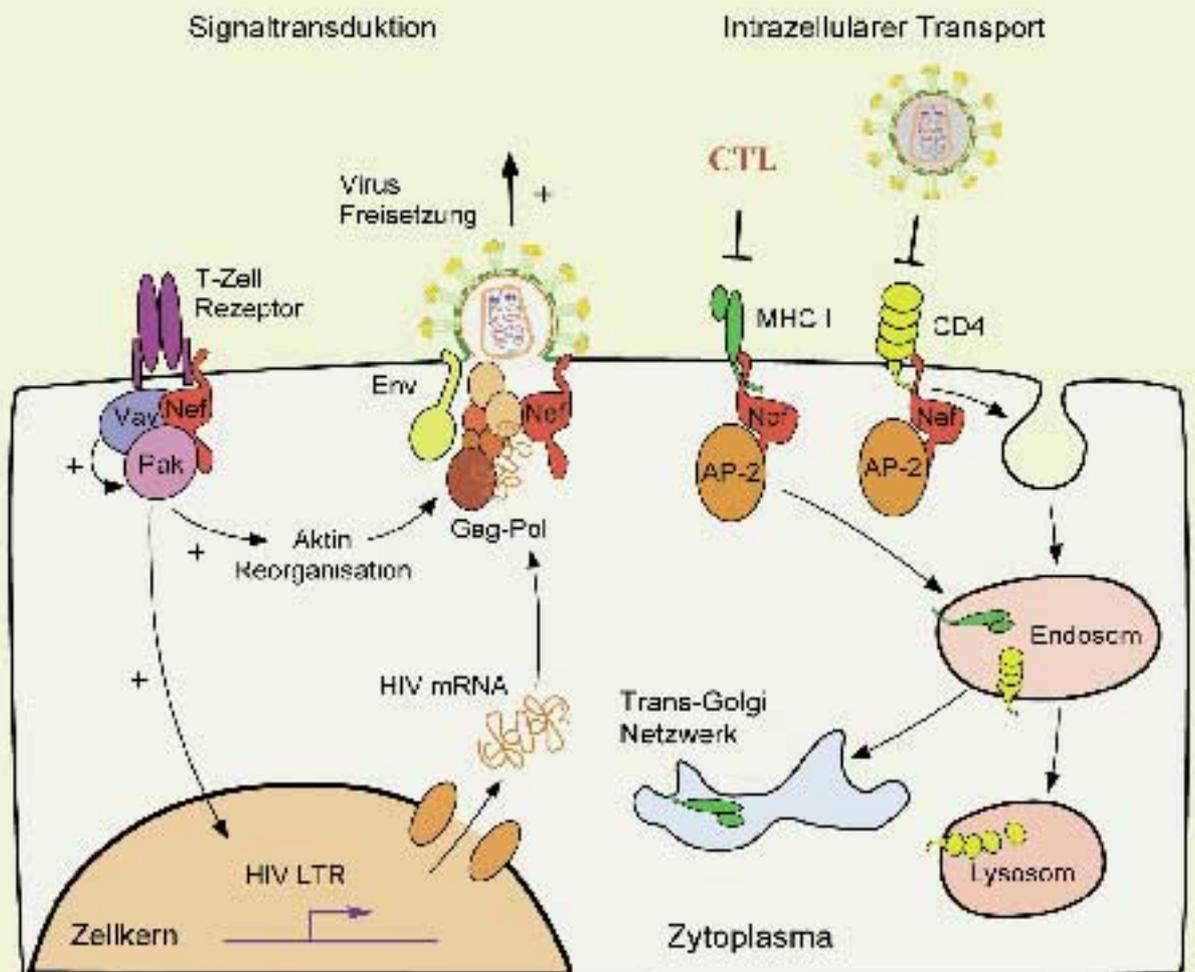
Schon während der initialen Infektion steigert Nef durch Aktivierung frisch infizierter Zellen die Menge an produziertem Virus. Dies beruht auf den verschiedensten Effektorfunktionen zellulärer Aktivierung durch Nef. An der Plasmamembran rekrutiert Nef spezifisch Moleküle der T-Zell Rezeptor-Kaskade wie beispielsweise die ζ-Kette des TCR, Vav und Pak, die einen signaltransduktionskompetenten Komplex bilden. Die resultierende Aktivierung der Pak Kinase ist dabei von zentraler Rolle für die verschiedenen Effektorfunktionen. Zum einen steigert aktiviertes Pak die gebildete Virusmenge direkt durch die Erhöhung der viralen Transkriptionsrate. Zum anderen induziert die Aktivie-

**Ein Modell zur Funktion von Nef**

Wie bereits erwähnt gilt es, die beschriebenen unterschiedlichen Funktionen von Nef auf ihre Relevanz *in vivo* hin zu untersuchen. Dabei ist nicht auszuschließen, dass die individuellen Effekte von Nef funktionell miteinander interagieren und sich somit gegenseitig ergänzen. Zudem

**ABB. 7 | MODELL DER FUNKTIONEN DES NEF-PROTEINS**

Die Hauptfunktionen von Nef werden durch das LL-Motiv in der flexiblen Schleife (intrazellulärer Transport, rechts) beziehungsweise das PxxP-Motiv (Signaltransduktion, links) vermittelt. Früh in der HIV-Infektion sorgt Nef durch die Aktivierung der Pak Kinase für eine gesteigerte Virenproduktion und optimiert den Virusaustritt aus der Wirtszelle (Signaltransduktion). In späteren Phasen der Infektion verlängert Nef die Überlebensdauer infizierter Zellen, da es durch Internalisierung von CD4- und MHC I-Molekülen Superinfektionen beziehungsweise die CTL-Erkennung dieser Zellen verhindert (intrazellulärer Transport).



## GLOSSAR

**AIDS:** Acquired Immunodeficiency Syndrome

**AS:** Aminosäure

**CD4,-8:** T-Zell-Rezeptoren (= T4, T8)

**CD4-Zellen:** Leukozyten, an der Krankheitsabwehr beteiligte weiße Blutzellen.

**CTL:** zytotoxische T-Lymphozyte

**GFP:** Grünes Fluoreszenz-Protein

**HAART:** Highly active antiretroviral therapy. Bei HIV versteht man darunter eine Behandlung mit einer Mehrfachkombination von Medikamenten aus verschiedenen Arzneimittelklassen (Kombinationstherapie)

**HIV:** Human Immunodeficiency Virus

**IL:** Interleukin

**LL-Motiv:** Sequenzmotiv aus zwei aufeinanderfolgenden Leuzinen, das zur Internalisierung des Proteins von der Plasmamembran in intrazelluläre Vesikel führt

**LTR:** long terminal repeats: flankierende Sequenzen im HIV Genom, die dessen Replikation und Transkription sicherstellen

**MHC:** major histocompatibility complex. Der Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex spielt eine Schlüsselrolle bei der spezifischen Immunabwehr

**Nef:** negative factor, kodiert für ein 24-35 kDa großes myristoyliertes, akzessorisches HIV Protein

**Pol:** Polymerase

**PxxP-Motiv:** Sequenzmotiv, bestehend aus vier Aminosäuren (Prolin, zwei beliebige AS, Prolin), das eine Erkennungssequenz für SH3-Domänen darstellt

**RNS:** Ribonukleinsäure

**SH3:** Src homology region 3, Effektor-domäne für PxxP-Motive

**SIV:** Simian Immunodeficiency Virus, ein dem HIV verwandtes Virus, das Affen infiziert



zung durch Nef auch die Reorganisation des Aktin Zytoskelettes. Höchstwahrscheinlich wird die Ausbildung des aktiven Signaltransduktionskomplexes durch die Lokalisierung von Nef in speziellen Strukturen innerhalb der Plasmamembran, den sogenannten Lipid Rafts, gefördert. Diese Strukturen sind auch der bevorzugte Ort der Virusknospung, so dass die Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes in Lipid Rafts die Freisetzung von Viruspartikeln erleichtern könnte. Lipid Rafts würden somit als Schaltstelle fungieren, in denen die Funktionen von Nef zur Signaltransduktion und Virusproduktion integriert werden.

Diese Funktionen dienen vornehmlich der Ausbreitung des Virus im Wirtsorganismus im frühen Stadium der Infektion. In späteren Phasen liegt es im Interesse des Virus, diese Infektion aufrechtzuerhalten und der Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Zu diesem Zeitpunkt spielen vor allem die Transportfunktionen von Nef eine Rolle. Die Internalisierung und anschließende Degradierung von CD4 schützt erfolgreich infizierte Zellen vor Superinfektionen. Ebenso wirkt Nef auf MHC Klasse I Moleküle und macht die Zellen dadurch für die CTL-Antwort des Wirtes unsichtbar. Interessanterweise scheint es dabei als Folge der Internalisierung von MHC I Molekülen von der Zelloberfläche nicht zum Abbau dieser Moleküle im Lysosom zu kommen, da sie durch Nef in das Trans Golgi Netzwerk (TGN) geleitet werden. Wie Nef diesen ungewöhnlichen Plasmamembran-TGN Transport induziert, ist noch unklar und eine weitere Fragestellung von zellbiologischer Bedeutung.

### Auf dem Weg zu einem Nef-Inhibitor

Zusammengenommen könnten diese ausgefeilten Mechanismen die bedeutende Rolle von Nef in der Pathogenese erklären. Das Ziel einer gegen Nef gerichteten Therapie

muss sein, möglichst viele dieser Einzelfunktionen gleichzeitig zu hemmen. Die Herausforderung der nächsten Jahre besteht deshalb darin, diejenigen Faktoren und Proteinoberflächen zu identifizieren, die spezifisch an bestimmten Funktionen von Nef beteiligt sind, und Moleküle zu entwickeln, die diese Oberflächen gleichzeitig blockieren ohne Interaktionen zellulärer Proteine untereinander zu beeinflussen. Die Generierung antiviraler Strategien über die enzymatischen HIV-Proteine hinaus würde einen wesentlichen Schritt in der Behandlung der HIV-Infektion darstellen.

Weiterhin wäre das gerichtete Design solcher Inhibitoren Ausdruck des Verständnisses der molekular- und zellbiologischen Vorgänge.

### Zusammenfassung

Die HIV-Pandemie kostet jedes Jahr Millionen Menschen das Leben und breitet sich weiterhin aus. Bisherige Therapieansätze konzentrieren sich auf die Hemmung viraler Enzyme und sind aufgrund der Entwicklung von Resistenzen sowie der großen Nebenwirkungen nicht ausreichend. Das akzessorische Nef-Protein ist ein Schlüsselfaktor für die Pathogenese von HIV und stellt somit ein mögliches Ziel neuer antiviraler Strategien dar. Dazu ist es notwendig, die molekularen Mechanismen der Funktion von Nef zu verstehen. Entscheidende Aktivitäten des viralen Proteins liegen in der Signaltransduktion sowie dem intrazellulären Proteintransport, die jeweils von spezifischen Motiven von Nef vermittelt werden. Die dazu durchgeführten Studien liefern wertvolle Beiträge für unser Verständnis der Vorgänge in eukaryoten Zellen. Die detaillierte Struktur-Funktionsanalyse dieser Interaktionen ist ein erster Schritt, Inhibitoren gegen diesen Pathogenesefaktor zu entwickeln.

Grundlagenwissen zu diesem Thema finden Sie auch in „Cellular Aspects of HIV-Infection“ von A. Cossarizza und D. Kaplan, erschienen bei John Wiley & Sons, ISBN: 0-471-38666-9.

## Literatur

- [1] A. D. Frankel, J. A. Young, HIV-1: fifteen proteins and an RNA, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 1-25
- [2] M. Stevenson, M. Bukrinsky, S. Haggerty, HIV-1 replication and potential targets for intervention, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1992**, 8, 107-117.
- [3] K. A. Jones, B. M. Peterlin, Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promotor, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 717-743.
- [4] H. W. Kestler, D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel, R. C. Desrosiers, Importance of the *nef* gene for maintenance of high viral loads and for development of AIDS, *Cell* **1991**, 65, 651-662.
- [5] F. Kirchhoff, T. C. Greenough, D. B. Brettler, J. L. Sullivan, R. C. Desrosiers, Brief report: Absence of intact *nef* sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection, *N. Engl. J. Med.* **1995**, 332, 228-232. Kirchhoff
- [6] N. J. Deacon, *et al.*, Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients, *Science* **1995**, 270, 988-991.
- [7] M. D. Daniel, F. Kirchhoff, S. C. Czajak, P. K. Sehgal, R. C. Desrosiers, Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the *nef* gene, *Science* **1992**: 258, 1938-1941.
- [8] B. Guy, M. P. Kieny, Y. Riviere, C. Le Peuch, K. Dott, M. Girard, L. Montagnier, J. P. Lecocq, HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product, *Nature* **1987**, 330, 266-269.
- [9] O. Schwartz, V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, J. M. Heard, Endocytosis of major histocompatibility complex class 1 molecules is induced by the HIV-1 Nef protein, *Nat. Medicine* **1996**, 2, 338-342.
- [10] C. Aiken, D. Trono, Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J. Virol.* **1995**, 69, 5048-5056.
- [11] A. S. Baur, E. T. Sawai, P. Dazin, W. J. Fantl, C. Cheng-Mayer, B. M. Peterlin, HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization, *Immunity* **1994**, 1, 373-384.
- [12] M. Geyer, O. T. Fackler, B. M. Peterlin, Structure-function relationships in HIV-1 Nef, *EMBO Reports* **2001**, 2, 580-585.
- [13] S. Grzesiek, A. Bax, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, J.-S. Hu, J. Kaufman, I. Palmer, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 340-345.
- [14] C.-H. Lee, K. Saksela, U. A. Mirza, B. T. Chait, J. Kuriyan, Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell* **1996**, 85, 931-942.
- [15] M. Geyer, C. E. Munte, J. Schorr, R. Kellner, H. R. Kalbitzer, Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *J. Mol. Biol.* **1999**, 289, 123-138.
- [16] H. M. Craig, M. W. Pandori, J. C. Guatelli, Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 11229-11234.
- [17] O. T. Fackler, W. Luo, M. Geyer, A. S. Alberts, B. M. Peterlin, Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Mol. Cell* **1999**, 3, 729-739.

## Danksagung

Wir danken Heinrich Hohenberg, Barbara Müller und Hans-Georg Kräusslich für die Bereitstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Peter und Traudl Engelhorn Stiftung für Unterstützung und unseren akademischen Lehrern für Anregungen und Diskussionen.

## Die Autoren



*Oliver Fackler, geb. 1970. Studium der Biologie in Saarbrücken. 1997 Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar bei Prof. N. Müller-Lantzsch. Anschließend bis Ende 2000 Postdoktorand am Howard Hughes Medical Institute, Depts. of Medicine, Microbiology and Immunology, University of San Francisco, bei Prof. B. M. Peterlin. Seit 2001 Arbeitsgruppenleiter am Hygiene Institut, Abteilung Virologie in Heidelberg mit dem Schwerpunkt auf molekulare Mechanismen des Pathogenesefaktors Nef von HIV.*



*Matthias Geyer, geb. 1964. Studium der Physik und Mathematik in Kiel, Bonn und Heidelberg. 1995 Promotion über NMR-Spektroskopie zur Analyse biologischer Reaktionsmechanismen. Forschungsaufenthalte am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, Abteilung Biophysik bei Prof. H. R. Kalbitzer und am Howard Hughes Medical Institute, Depts. of Medicine, Microbiology and Immunology, University of San Francisco, bei Prof. B. M. Peterlin. Seit 2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter am European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg. Arbeitsgebiet: Struktur und Dynamik von biologischen Makromolekülen, Design molekularer Inhibitoren.*

**Anschriften:** Dr. Oliver Fackler, Hygiene Institut der Universitätskliniken Heidelberg, Abteilung Virologie, Im Neuenheimer Feld 324, 69120 Heidelberg.  
Dr. Matthias Geyer, EMBL, Structural and Computational Biology Programme, Meyerhofstr. 1, 69117 Heidelberg. Email: Oliver\_Fackler@med.uni-heidelberg.de und geyer@embl-heidelberg.de.