

201009030A

厚生労働科学研究費補助金  
政策創薬総合研究事業  
(H22-政策創薬 - 一般-017)

HIVの宿主因子依存性を逆利用したエイズ発症機構の解明研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 日吉 真照

平成23(2011)年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

HIVの宿主因子依存性を逆利用したエイズ発症機構の解明研究 ----- 1

研究代表者 日吉真照（熊本大学エイズ学研究センター 特任助教）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 14



## HIV の宿主因子依存性を逆利用したエイズ発症機構の解明研究

研究代表者 日吉真照 熊本大学エイズ学研究センター 特任助教

**研究要旨** HIV は自身の酵素だけでなく様々な宿主因子を利用し、複雑なエイズの病態を引き起こす。その中でも典型的な例は HIV Nef である。Nef はエイズ発症に必須なことがよく知られているが、Nef 自身には酵素活性は無く、機能は相互作用する複数の宿主因子に依存する。しかし、最も重要な点、「エイズ発症になぜ Nef が必須なのか」は依然不明である。本研究では、「複数の宿主因子を利用する」Nef の性質を「逆に利用する」ユニークなアプローチで未解明の課題である「エイズ発症になぜ Nef が必須なのか」に迫る。

Nef と最も強く結合する宿主因子は酵素 Hck であることが知られている。Nef-Hck 相互作用のエイズ発症における意義はいまだ明らかではないが、Hck をツールとした研究で、酵素領域を欠くドミナントネガティブ Hck 変異体は、Nef の重要な機能であるウイルス粒子感染力の増強と主要組織適合抗原 MHC I の発現低下を完全に阻害することがわかっている。そこで本研究では、ドミナントネガティブ Hck をもとにして、Nef 標的的低分子ペプチドの同定する。さらに、Nef の機能発現機構を明らかにするために、Hck ペプチドを用いて Nef に関連する宿主因子（群）の同定を試みる。

本年度、HIV-1 の病原性因子 Nef と強く結合する宿主因子 Hck タンパク質のアミノ酸配列から、Nef の重要な機能であるウイルス粒子感染力増強を抑制するペプチドを同定した。さらに、宿主因子 Hck と同じ Nef の領域に結合する低分子化合物 2c が Nef の重要な機能であるウイルス粒子感染力増強と MHC I 発現低下を抑制することを見出した。

### A. 研究目的

エイズ発症機構の理解、発症防止薬剤の開発そして長期療養の課題の克服、全ての点で HIV Nef の徹底的な解析は不可欠である。コホート研究やサル感染モデルで実証された様に、Nef がエイズ発症に必須だからである。しかし、「何故必須、どの機能が重要か、それら機能にどんな宿主因子が必要か」など根本的な点は未解明である。本研究では、Nef がその機能を発揮するために複数の宿主因子を利用する性質を逆手に取ったユニークなアプローチで、その課題解決のための新たなツールと視点（Nef 機能阻害ペプチドと関連宿主因子）を提供する。

Nef と最も強く結合する宿主因子は酵素 Hck である。この結合の意義自体は不明だが、興味深いことに、酵素領域を欠損するドミナントネガティブ Hck 変異体は、ウイルス粒子感染力の増強と主要組織適合抗原 MHC I の発現低下という 2 つの重要な Nef の機能を阻害する。それぞれ、生体内高ウイルス量の維持、感染細胞の免疫監視からの逃避に重要である。そして、ドミナントネガティブ Hck による阻害は、それが Nef との強い結合で他の何らかの宿主因子を排除した結果と考えられる。

以上の知見を逆手に取れば 2 つの点に応用できる。まずドミナントネガティブ

Hck の配列を基にして、上記 2 つの Nef の機能を阻害するペプチドを同定出来る。さらに、ドミナントネガティブ Hck をプローブに上記 2 つの Nef の機能を担う宿主因子を同定できる。いずれも、エイズ発症過程、その中で果たす Nef の役割を解明する上で有用なツールと視点を提供する。これらの検討は未だなされていない。本研究ではドミナントネガティブ Hck の配列をもとに、細胞透過性のある最も効果的な Nef 機能阻害ペプチドを同定する。さらに、ドミナントネガティブ Hck をプローブとして Nef に結合する宿主因子 (群) の同定を試みる。

## B. 研究方法

ドミナントネガティブ Hck に対する特異的プライマーを用いて、キナーゼ領域を欠失した HckN を作製した。この HckN について Nef の機能阻害効果を調べた。具体的には、HckN を発現した細胞を用いて組み替え HIV ウイルスを作製し、p24 Gag タンパク質量を ELISA 法で測定した後、p24 量が一定となるようにインディケーター細胞 TZM-bl に感染させ、ウイルス粒子の感染性を LTR プロモーター下に発現する b-gal を指標に評価した。同時に、293 細胞あるいはヒト MHC I (HLA-A2 や HLA-B35) を発現するマウス L 細胞を用いて、Nef と HckN を発現させ、FACS にて細胞表面の MHC I 発現レベルを測定した。さらに、HckN のアミノ酸配列の中で、どの領域が Nef 機能阻害に重要なのか調べるために、HckN に変異を導入し HckN 変異体を作製して、同様の解析を行なった。その後、明らかになった重要な配列を含むペプチドをコードした発現ベクターを作製し、これらについても同様に Nef 機能阻害効果を調べ、分子の最小化を試みた。これらの実験に用いた Hck の変異体について、Nef との結合を確認するために、グルタチオン S トラंसフェラーゼ (GST) 融合タ

ンパク質を用いた GST pull down 法を行なった。GST と Nef の融合タンパク質をコードした DNA を作製し、大腸菌に導入した。IPTG を用いてタンパク質発現を誘導した後、大腸菌を破碎してグルタチオンビーズを加え、GST-Nef タンパク質とグルタチオンビーズを結合させた。Hck もしくは Hck 変異体を発現させた細胞抽出液に GST-Nef/グルタチオンビーズを加えてインキュベートした後、GST-Nef/グルタチオンビーズと Hck が結合したかどうかを western blot によって解析した。

また、Nef の機能を阻害する他の分子を同定するために、近年申請者らが独自に同定した Nef に結合する可能性がある低分子化合物 2C について詳細な解析を行なった。まず、化合物 2C と Nef の結合について、HckN と同様に GST pull down 法を用いて検討した。さらに、化合物 2C による Nef のウイルス感染力増強と MHC I 発現低下への影響も HckN と同様に解析した。

さらに、Nef と結合してウイルス粒子感染力に関与するとすでに報告されている宿主因子 Dynamin 2 について、Hck 由来ペプチドと化合物 2C の効果を検討した。Hck 由来ペプチドの効果を解析するために免疫沈降-western blot 法を行なった。まず、Hck 由来ペプチド、Nef そして Dynamin 2 を 293 細胞にトランスフェクションにより導入し発現させた。その後、細胞を溶解し細胞質抽出液を調整し、そこに抗 Dynamin 2 抗体と Protein A ビーズを加えてインキュベートして Dynamin 2 を回収した。Dynamin 2 に結合している Nef は western blot によって解析した。一方、化合物 2C の効果を解析するために、Nef と Dynamin 2 を導入した 293 細胞を化合物 2C の存在下で培養し、その後調整した細胞質抽出液を用いて hck 由来ペプチドと同様に解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血液細胞は必要な委員会（熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会）の承認を得た上で規則に従って実施する。医師により本研究の趣旨を説明し、同意を得られた場合のみ採血し、匿名化の後に実験に用いる。組換えDNA実験およびHIVウィルスを用いた実験は、学内の必要な委員会の承認を得た上で規則に従って実施する。所属研究室内のP3実験室で行い、実験終了後のウィルス不活化など安全面には特に留意する。

本研究ではマウス等の実験動物を用いず、ヒトゲノム解析・遺伝子解析研究、疫学研究、遺伝子治療臨床研究、臨床研究、ヒト幹細胞を用いる臨床研究には該当しない。

### C. 研究結果

まず、ドミナントネガティブHckから酵素ドメインを欠失させたHckNを作製し（図1A）、HIVウィルスに対しての影響を調べたところ、HckNはウィルスの感染力を低下させることがわかった（図1B）。このHckNをもとにして、さらなる分子の最小化を試みた。HckNのどの領域がHIVウィルスの感染力抑制に重要か調べるために、HckNに様々な変異を導入して検討したところ、HckNの93番目のトリプトファンをフェニルアラニンに置換したHckN W93F変異体では、ウィルス感染力抑制が全く見られなくなることがわかった（図1B）。次に、HckNによるウィルス粒子感染力抑制はNefの機能阻害による効果かを確認するために、まずGST pull down法を行い、Hck wild typeと同様にHckNがNefタンパク質と結合するか検討した（図2）。その結果、HckNはNefと特異的に結合することがわかった。また、HckN W93F変異体は、ウィルス粒子感染力抑制効果が見られない結果と一致して、Nefと結合しないことが明らかになった（図2）。これまでの報告で

は、HckはNefの機能に重要なPxxP領域に結合することが報告されている。そこで、HckNとHckN変異体はNefのどの領域と結合するのか解析した。GSTとPxxP領域だけを含むペプチドとの融合タンパク質（図3 SF2-PxxP）を作製してGST pull down法を行なったところ、HckNは、Hck wild typeと同様に、Nef PxxP領域と結合することが確認された（図3）。一方、HckN W93F変異体はNef PxxP領域と結合しないことがわかった（図3）。これらの結果から、HckNは93番目のトリプトファン付近の領域でNefの機能に重要なPxxP領域と結合しNef機能を抑制することが明らかになった。

次に、Nef機能抑制活性を持つ分子のさらなる最小化を行なうために、HckNの93番目のトリプトファン周辺に着目して様々な大きさのHckN欠失変異体を作製し、それぞれの変異体についてNefによるウィルス粒子感染力増強に対する効果を検討した。その結果、以下に示す54アミノ酸からなるHckペプチドにおいてもウィルス粒子感染力増強の抑制活性があることを明らかになった。

配列：IVVALYDYEAIHHEDLSFQKGDQMVVLEES  
GEWWKARSLATRKEGYIPSNYVAR

また、他のNefをターゲットにした分子の同定も試みた。近年、申請者らは独自にNefと結合する可能性がある低分子化合物2Cを同定している。そこで、低分子2CについてNef機能に対する効果を詳細に解析した。まず、化合物2CはNefと特異的に結合するか調べるために、NefとHckが特異的に結合することを利用して、GST-NefとHckの結合を化合物2Cが阻害するか検討した。GST-NefをHckを混ぜてインキュベートした後、化合物2Cを加えたところ、化合物2CはGST-NefとHckの結合を阻害しなかった（図4A）。次に、GST-Nef、Hckそして化合物2Cを同時に混ぜてインキュベートしたところ、化合物2CはGST-NefとHckの結合を阻害することがわかった（図

4B)。さらに、GST-Nefと化合物2Cを混ぜてインキュベートした後にHckを加えたところ、化合物2Cはさらに強くGST-NefとHckの結合を阻害することが明らかになった(図4C)。これらの結果から、化合物2CはNefと特異的に結合することが明らかになった。さらに、化合物2CはNefのどの領域と結合するのかを調べるために、Nefの様々な領域とGSTとの融合タンパク質をそれぞれ用いたGST pull down法を行なった。その結果、化合物2CもHckNと同様に、NefのPxxP領域と特異的に結合することが明らかになった(図5)。

次に、化合物2CがNefによるウイルス粒子感染力増強に対する効果を検討した。化合物2C存在下で培養した細胞で作製したHIVウイルスの感染力を調べたところ、化合物2Cの濃度依存的にHIVウイルスの感染力が低下することが明らかになった(図6A)。化合物2Cが結合するNefのPxxP領域に変異を入れたウイルス(SF2-AxxA)とNefを欠失させたウイルス( $\Delta$ Nef)においても同様に化合物2Cの効果を解析したところ、化合物2Cはこれら2つのウイルスの感染力には影響がないことがわかった(図6B、C)。このとき、化合物2CはHIVウイルスタンパク質の翻訳と翻訳後プロセッシングへの影響を調べるために、HIV Gagタンパク質についてwestern blotを行なって解析をしたところ、化合物2CはGagタンパク質の発現量と翻訳後の切断には全く影響しないことがわかった(図7)。また、化合物2Cは細胞のHIVウイルス産生量には影響しなかった(図8)これらのことは、Nefによるウイルス感染力増強はHIVのエンベロープタンパク質の違いによって起こる可能性を示唆している。以上の結果から、化合物2CはNefに結合することによって、Nefの機能であるウイルス粒子の感染力増強を抑制することが明らかになった。さらに、Nef PxxP領域の付近に変異を導入したHIVウイルスの感染力について、化合物2Cの効果を

解析したところ、化合物2Cは検討したすべてのHIVウイルスの感染力を低下させることがわかった(図9)。このことは、化合物2CはNefのPxxP領域が構成する立体構造を特異的に認識して結合し、その機能を阻害することを示唆している。

さらに、化合物2CのNefによるMHC I発現低下に対する効果を検討するために、化合物2Cの存在下でHIVを感染させた細胞のMHC I発現量をFACSによって解析したところ、化合物2CはNefによるMHC Iの発現抑制を部分的に回復させることが明らかになった(添付論文)。

一方、近年 Nef は宿主酵素 Dynamin 2 と結合してウイルス粒子感染力を増強する可能性が報告されている。そこで、Hck 由来ペプチドと化合物 2C が Nef-Dynamin 2 結合に影響するか検討するために、免疫沈降-western blot 法を行なった。その結果、Hck 由来ペプチドと化合物 2C は Nef-Dynamin 2 結合を阻害しないことがわかった。

#### D. 考察

ドミナントネガティブ Hck から、Nef と結合する 54 アミノ酸からなるペプチドを同定することができた。この Hck 由来ペプチドは、ドミナントネガティブ Hck と同様に Nef の機能ドメインとして知られている PxxP 領域と特異的に結合し、Nef の機能であるウイルス粒子感染力増強を抑制することがわかった。この Hck 由来ペプチドはドミナントネガティブ Hck よりも非常に分子量が小さいため、より実用的な分子である。また今回、Hck 由来ペプチドのアミノ酸配列中のトリプトファンが Nef との結合と Nef 機能阻害に重要であることを明らかにすることができた。このことは、さらに Hck 由来ペプチドの最小化などの改良を加える上で有用な情報である。今後、トリプトファン付近の領域に焦点を絞り改良が可能であると考えられる。また、細胞膜への透

過性を向上させるペプチドや脂質などを付加するベースとして Hck 由来ペプチドは利用できる。

近年、我々が独自に同定していた低分子化合物 2C について、Nef との結合性と Nef 機能の抑制効果を詳細に検討したところ、化合物 2C も Hck 由来ペプチドと同様に、Nef と特異的に結合し、Nef の機能であるウイルス粒子感染力増強と MHC I 分子の発現低下を阻害することを見出した。これまでに世界中で Nef をターゲットにして Nef の機能を阻害する分子の報告は他に 1 例だけであり、この化合物 2C は非常に興味深い分子である。既存の抗 HIV 剤とは異なり、化合物 2C は Nef 機能を阻害するという新たな作用機序を持つ薬剤であるため、この化合物をさらに改良することで全く新しい抗 HIV 剤の開発に貢献できる考えられる。

また今回、Hck 由来ペプチドと化合物 2C は共に Nef PxxP 領域に結合することを明らかにした。この PxxP 領域は、Nef が機能を発揮する際の宿主因子との結合に重要な領域であることが知られている。そのため、Hck 由来ペプチドと化合物 2C を作用させた時に Nef との結合が阻害される宿主因子は、Nef 機能を発揮する上で必要とされる因子であると考えられる。例えば、化合物 2C 非存在下で Nef と結合する宿主因子の中で、化合物 2C 存在下では Nef と結合できない宿主因子は Nef の機能発揮において重要なタンパク質であると考えられる。このように、Hck 由来ペプチドと化合物 2C は、Nef 宿主因子（群）の同定を行なうための有用なツールとなりうる。

一方、既にウイルス粒子感染力増強に関与すると報告されている Nef-Dynamin 2 結合について Hck 由来ペプチドと化合物 2C の効果を検証したところ、これら 2 つの分子は、Nef-Dynamin 2 結合を阻害しなかった。前述の通り、Hck 由来ペプチドと化合物 2C は、Nef によるウイルス

粒子の感染力増強を抑制する。このから、ウイルス粒子感染力増強には Dynamin 2 とは別の Nef が結合する新規の宿主因子（群）が存在すると考えられる。

#### E. 結論

Nef によるウイルス粒子感染力増強を抑制する Hck 由来ペプチドを作製することができた。このペプチドをもとにして、さらなる分子の最小化や細胞透過性ペプチドの付加などの最適化を行なう予定である。また、我々が独自に同定していた化合物 2C は、Hck 由来ペプチドと同様に、Nef と結合して Nef の機能を阻害することを見出した。このように、Nef をターゲットとした新たな作用機序で HIV に対して効果を持つ分子を同定することができた。この 2 つの分子は、Nef が機能するための宿主因子との結合に重要な PxxP 領域と結合することから、本研究の目的を達成するための独自のツールとなりうる。今後、この 2 つの分子を用いることで、より確実に Nef の重要な機能であるウイルス粒子感染力増強と MHC I の発現低下を発揮するために必要とされる宿主因子（群）の同定を行なう予定である。

#### F. 健康危機情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Dikeakos JD, Atkins KM, Thomas L, Emert-Sedlak L, Byeon IJ, Jung J, Ahn J, Wortman MD, Kukull B, Saito M, Koizumi H, Williamson DM, Hiyoshi M, Barklis E, Takiguchi M, Suzu S, Gronenborn AM, Smithgall TE, Thomas G.

Small Molecule Inhibition of HIV-1-Induced MHC-I Downregulation Identifies a Temporally Regulated Switch in Nef Action. *Mol Biol Cell* 21, 3279-3292, 2010.

## 2. 学会発表

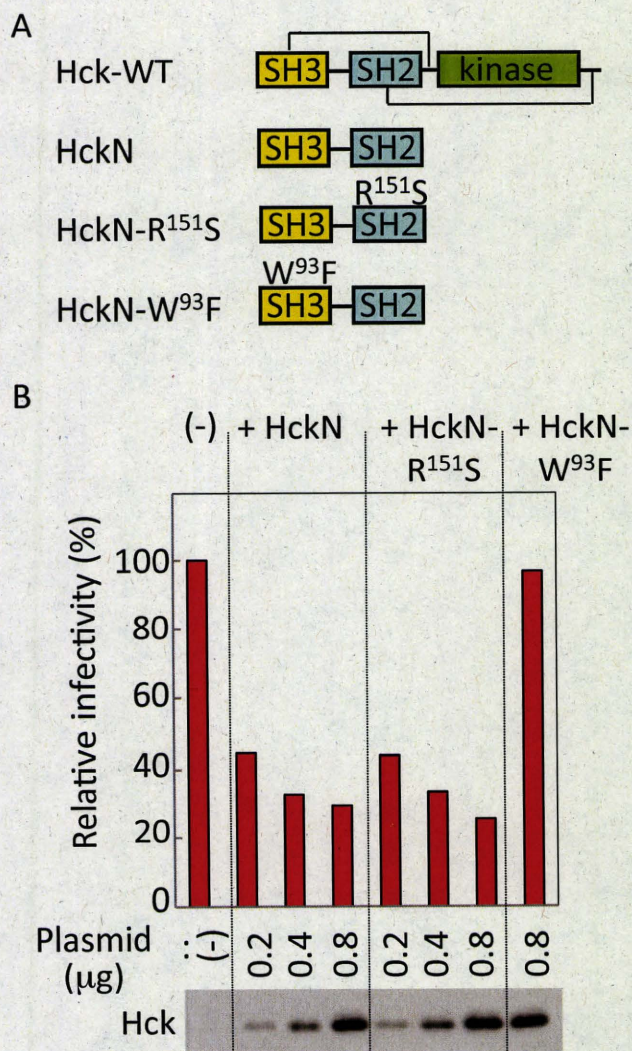
Chutiwitoonchai Nopporn、且吉真照、鈴木伸也. HIV-1 粒子感染性を維持する機構の解析. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、2010 年 11 月 24-26 日、東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし。



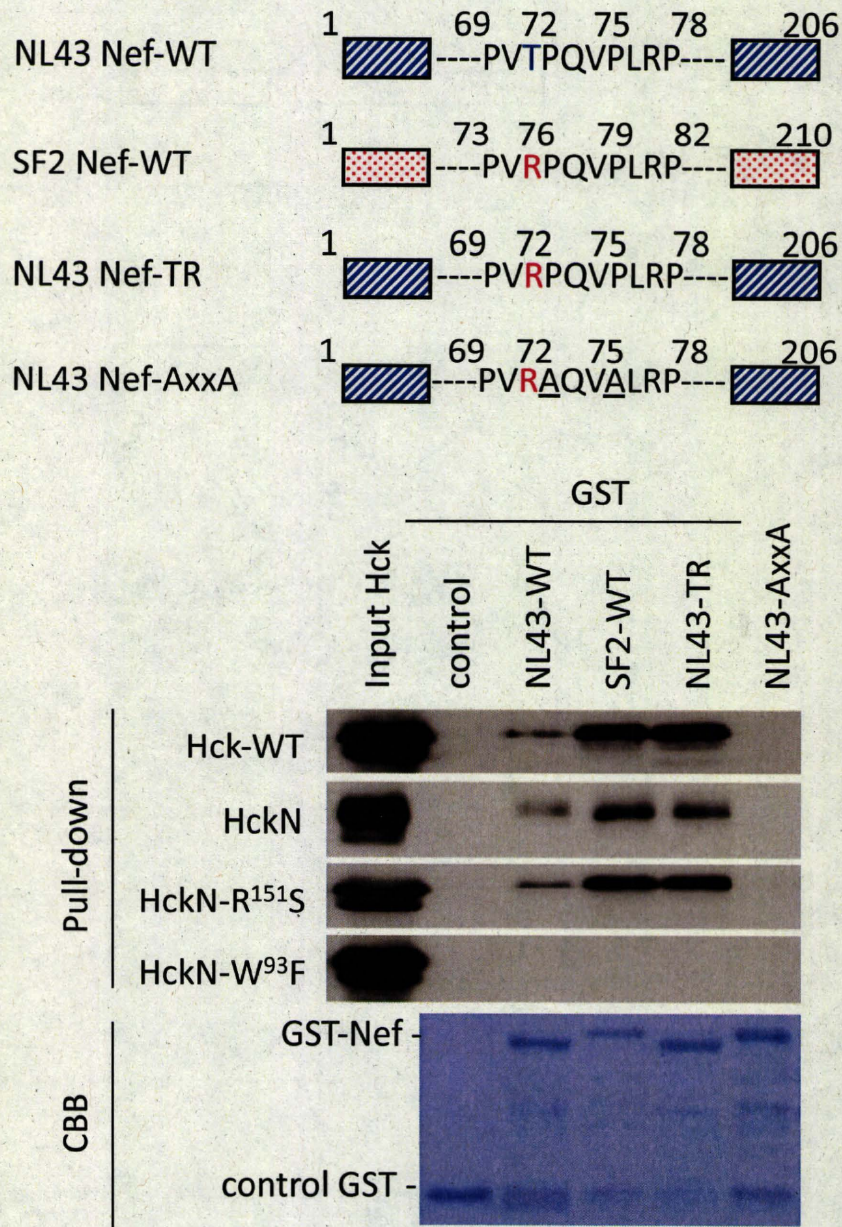
図1. Hck変異体の構造とウイルス感染力抑制効果の解析



HckNはウイルスの感染力を抑制することがわかった。  
また、HckNの93番目のトリプトファンが阻害活性に重要であることが明らかになった。



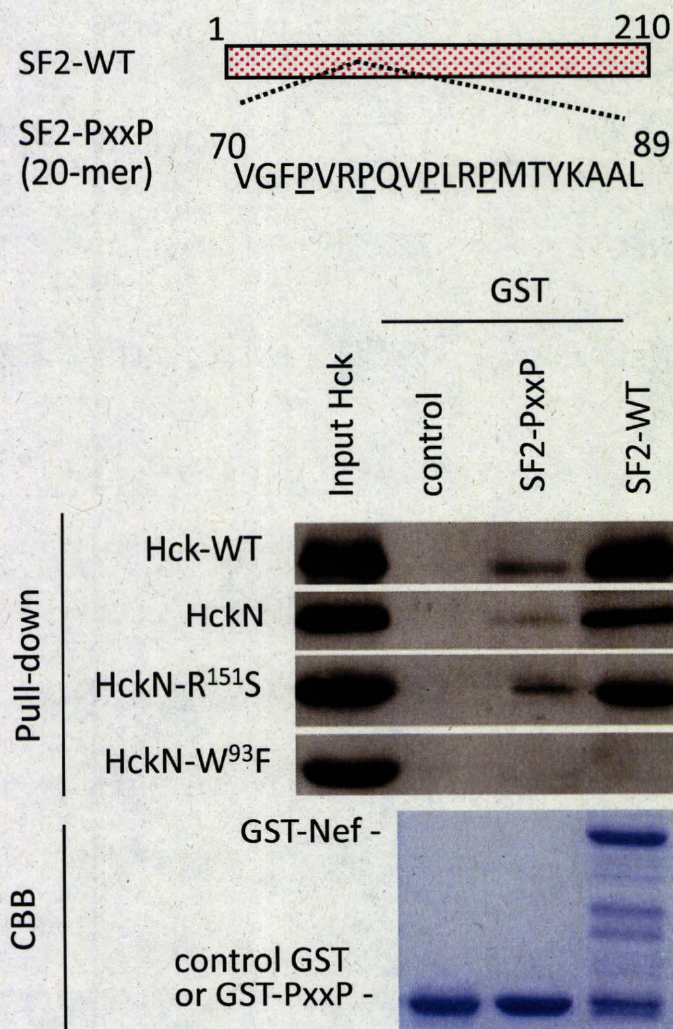
図2. GST pull down法に用いたGST-Nefの構造と  
Hck変異体のそれぞれのNefに対する結合能の解析



HckNはNefと結合することがわかった。また、結合にはHckNの93番目のトリプトファンが重要であることが明らかになった。



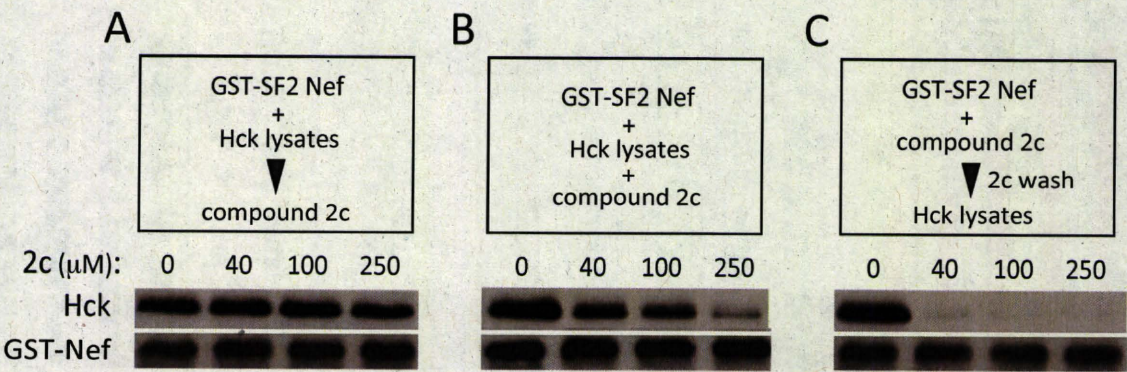
図3.GST pull down法に用いたGST-PxxPの構造と  
Hck変異体のNef PxxP領域に対する結合能の解析



HckNはNefのPxxP領域と特異的に結合することがわかった。また、結合にはHckNの93番目のトリプトファンが重要であることが明らかになった。

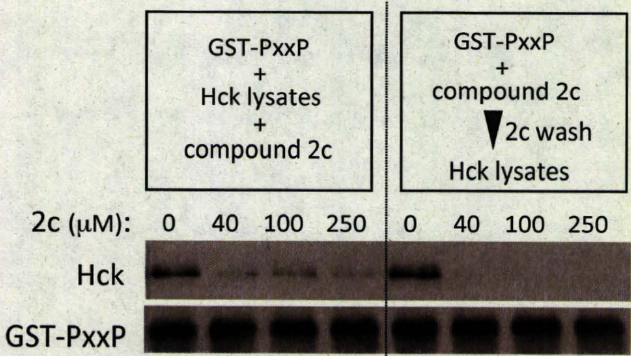


図4. 化合物2CのNefに対する結合能の解析



化合物2CはNefと結合してNef-Hckの結合を阻害することが明らかになった。

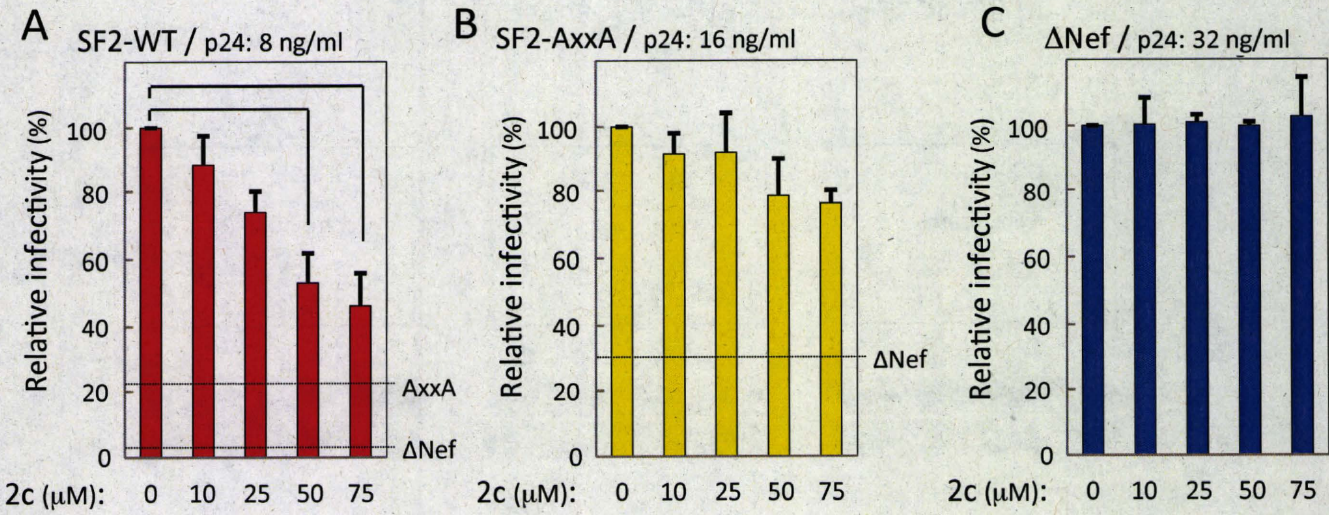
図5. 化合物2CのNef PxxP領域に対する結合能の解析



化合物2CはNefのPxxP領域と特異的に結合してNef-Hckの結合を阻害することが明らかになった。

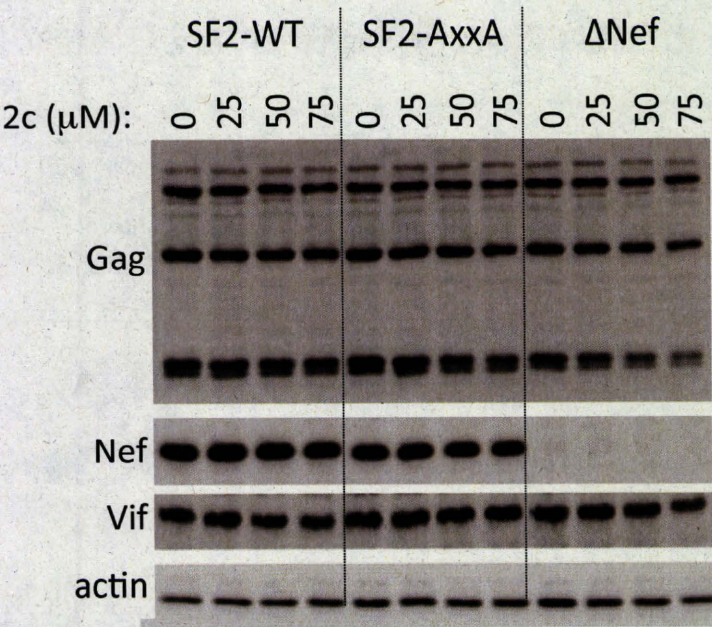


図6. 化合物2CのHIVウイルス感染力抑制効果の解析(1)



化合物2CはNefが存在するHIVウイルスの感染力を濃度依存的に抑制することが明らかになった。

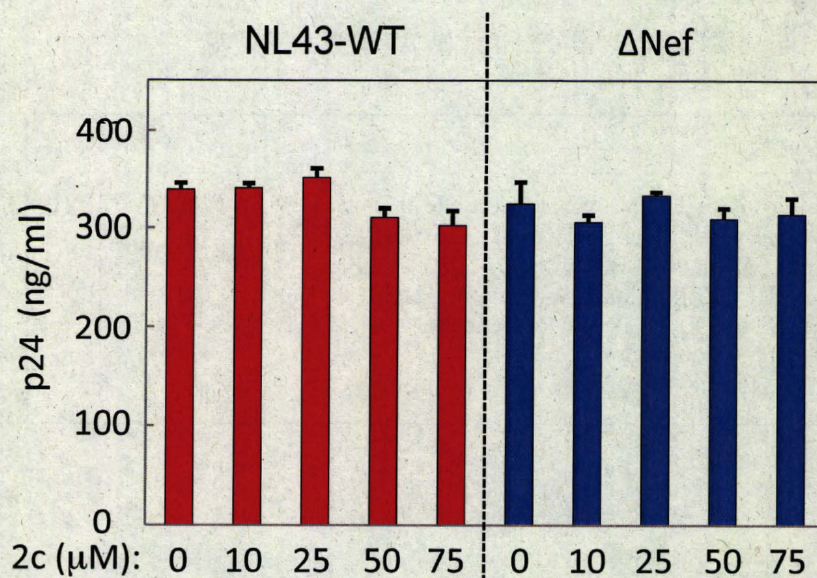
図7. 化合物2CのHIV構成タンパク質に対する影響の解析



化合物2CはNef PxxP領域付近に変異を持ったHIVウイルスの感染力を抑制することが明らかになった。

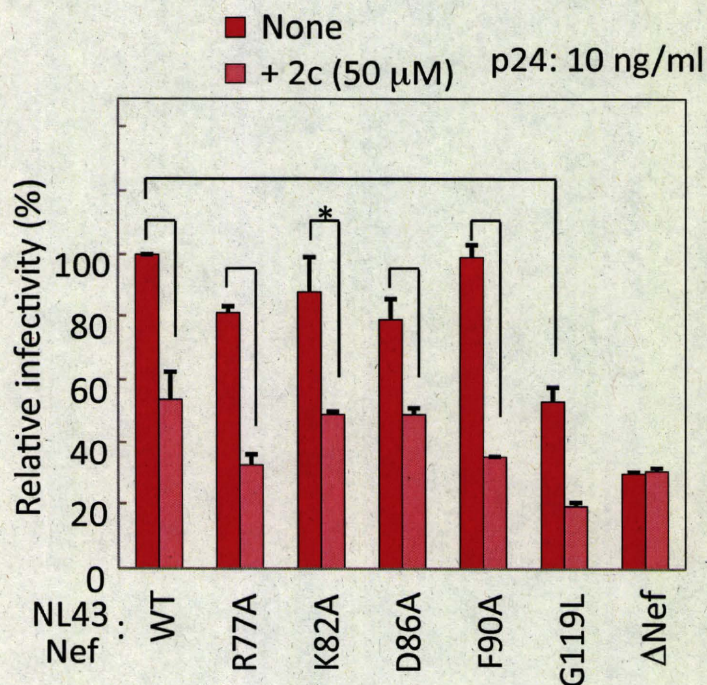


図8. 化合物2CのHIVウイルス産生に対する影響の解析



化合物2Cは細胞のHIVウイルス産生量には影響がないことが明らかになった。

図9. 化合物2CのHIVウイルス感染力抑制効果の解析(2)



化合物2CはNef PxxP領域付近に変異を持ったHIVウイルスの感染力を抑制することが明らかになった。



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Dikeakos JD, Atkins KM, Thomas L, Emert-Sedlak L, Byeon IJ, Jung J, Ahn J, Wortman MD, Kukull B, Saito M, Koizumi H, Williamson DM, Hiyoshi M, Barklis E, Takiguchi M, Suzu S, Gronenborn AM, Smithgall TE, Thomas G.	Small Molecule Inhibition of HIV-1-Induced MHC-I Downregulation Identifies a Temporally Regulated Switch in Nef Action.	<i>Mol Biol Cell</i>	21	3279-3292	2010

# Small Molecule Inhibition of HIV-1–Induced MHC-I Down-Regulation Identifies a Temporally Regulated Switch in Nef Action

Jimmy D. Dikeakos,<sup>\*\*</sup> Katelyn M. Atkins,<sup>\*\*</sup> Laurel Thomas,<sup>\*</sup> Lori Emert-Sedlak,<sup>†</sup> In-Ja L. Byeon,<sup>‡</sup> Jinwon Jung,<sup>‡</sup> Jinwoo Ahn,<sup>‡</sup> Matthew D. Wortman,<sup>§</sup> Ben Kukull,<sup>||</sup> Masumichi Saito,<sup>¶</sup> Hirokazu Koizumi,<sup>¶</sup> Danielle M. Williamson,<sup>\*</sup> Masateru Hiyoshi,<sup>¶</sup> Eric Barklis,<sup>||</sup> Masafumi Takiguchi,<sup>¶</sup> Shinya Suzu,<sup>¶</sup> Angela M. Gronenborn,<sup>‡</sup> Thomas E. Smithgall,<sup>†</sup> and Gary Thomas<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Vollum Institute, Oregon Health & Science University, Portland, OR 97239; Departments of <sup>†</sup>Microbiology and Molecular Genetics and <sup>‡</sup>Structural Biology, University of Pittsburgh, PA 15260; <sup>§</sup>Drug Discovery Center, University of Cincinnati, OH 45237; <sup>||</sup>Department of Molecular Microbiology and Immunology, Oregon Health & Science University, Portland, OR 97239; <sup>¶</sup>Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan 860-0811

Submitted May 28, 2010; Revised July 29, 2010; Accepted July 30, 2010  
Monitoring Editor: Howard Riezman

HIV-1 Nef triggers down-regulation of cell-surface MHC-I by assembling a Src family kinase (SFK)-ZAP-70/Syk-PI3K cascade. Here, we report that chemical disruption of the Nef-SFK interaction with the small molecule inhibitor 2c blocks assembly of the multi-kinase complex and represses HIV-1–mediated MHC-I down-regulation in primary CD4<sup>+</sup> T-cells. 2c did not interfere with the PACS-2–dependent trafficking of Nef required for the Nef-SFK interaction or the AP-1 and PACS-1–dependent sequestering of internalized MHC-I, suggesting the inhibitor specifically interfered with the Nef-SFK interaction required for triggering MHC-I down-regulation. Transport studies revealed Nef directs a highly regulated program to down-regulate MHC-I in primary CD4<sup>+</sup> T-cells. During the first two days after infection, Nef assembles the 2c-sensitive multi-kinase complex to trigger down-regulation of cell-surface MHC-I. By three days postinfection Nef switches to a stoichiometric mode that prevents surface delivery of newly synthesized MHC-I. Pharmacologic inhibition of the multi-kinase cascade prevents the Nef-dependent block in MHC-I transport, suggesting the signaling and stoichiometric modes are causally linked. Together, these studies resolve the seemingly controversial models that describe Nef-induced MHC-I down-regulation and provide new insights into the mechanism of Nef action.

## INTRODUCTION

After infection by HIV-1, the acute viremia induces an immune response that includes the development of anti-HIV CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTLs) (Gandhi and Walker, 2002). Though a significant number of the circulating CTL population is directed against HIV-1–infected cells, the virus escapes the adaptive immune response, establishing reservoirs in numerous cell types that can resist highly active antiretroviral therapy (HAART) (Stevenson, 2003). During disease progression, the HIV-1 viral load increases greatly,

destroying most of the CD4<sup>+</sup> lymphocytes, leaving patients increasingly susceptible to opportunistic infections (Douek *et al.*, 2003).

The adaptive immune response requires members of the class I major histocompatibility complex (MHC-I) to present viral antigens on the surface of infected cells, which destroys the infected cell by the cytolytic, apoptosis-inducing actions of CTLs (Lieberman, 2003). Large DNA viruses, including herpesviruses and poxviruses, possess a large collection of immune evasive genes that are expressed in a coordinated manner to target nearly every step in the biosynthesis, assembly, transport, and cell-surface localization of MHC-I molecules (Yewdell and Hill, 2002; Peterlin and Trono, 2003). By contrast, HIV-1 relies on the single 27-kDa N-myristoylated early gene product Nef to down-regulate MHC-I (Peterlin and Trono, 2003). Nef is required for the onset of AIDS and can affect cells in many ways, including alteration of T-cell activation and maturation, subversion of the apoptotic machinery, and the down-regulation of cell-surface molecules, notably CD4 and MHC-I (Fackler and Baur, 2002). Down-regulation of CD4 through the clathrin/AP-2 pathway to lysosomes eliminates interference of the viral receptor with HIV-1 envelopment or release. Down-regula-

This article was published online ahead of print in *MBoc in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E10-05-0470>) on August 4, 2010.

<sup>\*</sup> These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to: Gary Thomas ([thomasg@ohsu.edu](mailto:thomasg@ohsu.edu)).

© 2010 J. D. Dikeakos *et al.* This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

tion of cell-surface MHC-I molecules encoded by the HLA-A and -B loci to paranuclear TGN/endosomal compartments mediates the ability of HIV-1 to evade the CD8<sup>+</sup> immune surveillance system (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002; Tomiyama *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Peterlin and Trono, 2003).

Two models—here referred to as the “signaling” and “stoichiometric” down-regulation pathways—are currently used to explain the molecular basis of Nef-mediated MHC-I down-regulation (see Hung *et al.*, 2007). The “signaling” model describes the sequential roles of three conserved Nef sites in mediating MHC-I down-regulation. The pathway is initiated by the EEEE<sub>65</sub>-dependent binding to the sorting protein PACS-2, which targets Nef to the paranuclear region, enabling PXXP<sub>75</sub> to bind and activate a Golgi region-localized Src Family Kinase (SFK). This Nef-SFK complex then phosphorylates ZAP-70 (Syk in monocytes and heterologous cells), forming a phosphotyrosine-based docking motif that recruits class I PI3K by ligating the p85 regulatory subunit C-terminal SH2 domain. This multi-kinase complex then triggers internalization of cell-surface MHC-I through a clathrin-independent, ARF6-dependent pathway (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2008). After internalization, Nef M<sub>20</sub>, located within an amphipathic  $\alpha$ -helix, mediates the sequestering of endocytosed MHC-I molecules into paranuclear compartments (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2007; Chaudhry *et al.*, 2008). By contrast, the “stoichiometric” model envisions that Nef mediates MHC-I down-regulation by acting solely via a PI3K-independent pathway that diverts newly synthesized MHC-I molecules to degradative compartments by an M<sub>20</sub>- and AP-1-dependent mechanism (Kasper and Collins, 2003; Roeth *et al.*, 2004; Kasper *et al.*, 2005). However, an alternative interpretation of the stoichiometric model suggests Nef binds endocytosed MHC-I but the underlying mechanism was not described (Roeth *et al.*, 2004; Noviello *et al.*, 2008). While the stoichiometric model suggests the importance of Nef M<sub>20</sub> in mediating MHC-I down-regulation—a finding consistent with both models—it fails to address the roles of EEEE<sub>65</sub> and the PXXP<sub>75</sub> site within the polyproline helix.

The binding of HIV-1 Nef to the SH3 domains of SFKs requires PXXP<sub>75</sub> and an adjacent hydrophobic pocket, which anchors the SFK on Nef (Lee *et al.*, 1995). The determination that Nef can bind and directly activate a subset of SFKs together with the conservation of the SH3 domain binding site across various Nef alleles (Choi and Smithgall, 2004; Tribble *et al.*, 2006) suggests the Nef-SFK interaction is required for disease progression, including AIDS-like disease in animal models and assembly of the SFK-ZAP-70/Syk-PI3K multi-kinase complex, which triggers MHC-I down-regulation in primary CD4<sup>+</sup> T-cells and promonocytic cells (Hanna *et al.*, 1998; Hung *et al.*, 2007). These findings suggest that targeting the assembly of the multi-kinase complex may represent an attractive approach to inhibiting AIDS progression. The ability of isoform-specific class I PI3K kinase inhibitors to repress Nef-induced MHC-I down-regulation in primary CD4<sup>+</sup> T-cells supports this possibility (Hung *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2008). Alternatively, small molecule inhibitors that disrupt the binding of Nef to one or more of the kinases that form the multi-kinase complex would inhibit Nef action without disrupting the activity of cellular kinases that may be required for host cell function.

Here we report that small molecule disruption of Nef-SFK binding represses MHC-I down-regulation in HIV-1-infected primary CD4<sup>+</sup> T-cells by interfering with formation of the multi-kinase complex. We further show that Nef-induced MHC-I down-regulation in primary CD4<sup>+</sup> T-cells is

manifest by the sequential action of the signaling mode, which lasts for more than two days after infection, followed by the stoichiometric mode by three days postinfection. Interference with the multi-kinase complex that triggers the signaling mode disrupts the subsequent stoichiometric block in MHC-I transport, suggesting the two modes are causally linked. These studies challenge the current dogma of Nef-mediated MHC-I down-regulation (Hansen and Bouvier, 2009) and suggest Nef orchestrates a highly regulated molecular program consisting of the sequential use of signaling followed by stoichiometric modes to evade immune surveillance.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells, Viruses, and Plasmids

293T, A7, BSC-40, HeLa-CD4<sup>+</sup>, H9 CD4<sup>+</sup> T-cells, and CEM T-cells were cultured as described (Hung *et al.*, 2007). Peripheral blood was obtained from healthy HLA-A\*0201<sup>+</sup> volunteers by leukapheresis or venipuncture using protocols approved by the OHSU Institutional Review Board (protocols IRB00004039 and IRB00002251) or by the International Medical Center of Japan and the Kumamoto University Ethical Committee. Primary human CD4<sup>+</sup> T-cells were isolated as described (Hung *et al.*, 2007) and cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS and supplemented with IL-2 (50 U/ml; Sigma) and 1  $\mu$ g/ml PHA (Sigma, St. Louis, MO) before infection. HIV-1NL4-3, vaccinia virus (VV), and vaccinia recombinants expressing FLAG-tagged Nef (Nef/f, C-terminal epitope tag), Nef<sub>AXXA</sub>/f, Nef<sub>AXXA</sub>-PI3K\*, Hck, Src, or ZAP-70, and HIV pseudotyped viruses NL4-3ΔG/P-EGFP (titer =  $4.5 \times 10^7$  IFU/ml) and NL4-3ΔG/P-EGFP/ΔNef (titer =  $2.1 \times 10^7$  IFU/ml) were grown and titered by marker expression as described (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2007). Adenoviruses expressing HA-tagged PACS-1 or PACS-2 were described previously (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002; Simmen *et al.*, 2005). Nef-eYFP, Nef<sub>AXXA</sub>-eYFP and pPTEN were previously described (Hung *et al.*, 2007) and pmxGFP was obtained from Dharmacon (Boulder, CO).

### Inhibitors, siRNAs, qRT-PCR, and Kinase Assays

PI-103 (Calbiochem, San Diego, CA) and 2c (2,4-dihydroxy-5-(1-methoxy-2-methylpropyl)benzene-1,3-dialdehyde, (Kyowa Hakkō Kirin Co., Tokyo, Japan) were used as indicated. 2c toxicity was determined by MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer's instructions. Control (nonspecific) siRNA and siRNAs specific for Hck, Lyn, Src, PACS-1, PACS-2, or the  $\mu$ 1A subunit of AP-1 (Smartpool, Dharmacon) were nucleofected (Amaxa, Gaithersburg, MD) into cells according to manufacturer's instructions. RNA was purified from H9 cells nucleofected with siRNAs as indicated in figure legends using the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) according to manufacturer's instructions. cDNA was reverse transcribed from RNA using the random decamers from the RETROscript Kit (Ambion, Austin, TX) via manufacturer's instructions. Utilizing commercially-available Hck, Lyn, and Src primers (Qiagen) and SYBR green qPCR reagent (SA-Biosciences, Frederick, MD), q-PCR was conducted on a StepOnePlus Real-time PCR system (Applied Biosciences, Foster City, CA). PI3K assays were performed as described (Atkins *et al.*, 2008). In vitro Hck kinase assays were performed as described (Emert-Sedlak *et al.*, 2009).

### Flow Cytometry and Immunofluorescence Microscopy

For flow cytometry, cells were processed as described (Hung *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2008) and stained using the following antibodies: anti-MHC-I (W6/32), anti-HLA-A2 (BB7.2, BD, San Jose, CA), anti-CD4-APC (Biollegend, San Diego, CA), or anti-p24-FITC (Virostat, Portland, ME) as indicated in legends. PE-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson IR, West Grove, PA) was used to stain MHC-I- and HLA-A2-positive cells. Isotype-matched antibodies (Serotec, Raleigh, NC) were used as negative controls. Samples were processed on a FACSCalibur (BD) as described (Atkins *et al.*, 2008) and data analyzed using FCS express (De Novo Software, Los Angeles, CA). For immunofluorescence microscopy, cells were processed as indicated in legends and processed for immunofluorescence as described (Atkins *et al.*, 2008). Confocal images were captured as described (Atkins *et al.*, 2008) and colocalization of Nef-eYFP with Golgin-97 was quantified morphometrically using Imaris 7.0. A mask for each field of cells was generated based on the fluorescent signal of Golgin-97 and the percent colocalization of Golgin-97 with Nef-eYFP was determined and presented as the mean  $\pm$  SD from at least 20 cells per condition.

### Immunoprecipitation, Western Blot, and Antibody Uptake

Cells infected with the indicated VV recombinants were harvested as described (Atkins *et al.*, 2008). Where indicated, cells were treated with the

corresponding concentration of 2c before harvest. Flag-tagged Nef constructs were immunoprecipitated with mAb M2-agarose (Sigma), and associated proteins were detected by Western blot. The following antibodies were obtained as indicated: mAb HA.11 (Covance, San Diego, CA); anti-Hck, anti-Lyn (Santa Cruz, Santa Cruz, CA); anti-p85, anti-Src, anti-ZAP-70 (Upstate, Bedford, MA); anti-phospho-ZAP-70 (BD); anti-Akt, anti-pAkt, anti-His<sub>6</sub>, anti-PTEN, anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling, Danvers, MA); anti-actin (Chemicon, Bedford, MA); anti-Nef #2949 (obtained through NIH AIDS Research and Reference Reagent Program), anti-MHC-I K455 (provided by K. Fröh, OHSU), W6/32 and HC10 (provided by D. Johnson, OHSU); anti-AP-1  $\mu$ 1A subunit (provided by L. Traub, University of Pittsburgh), AP- $\gamma$ 1 (Sigma), anti-PACS-1 (703), anti-PACS-2 (Atkins *et al.*, 2008). Antibody uptake using mAb W6/32 was performed as described (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002).

### NMR Spectroscopy

The cDNA encoding consensus nef (obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) was His<sub>6</sub>-tagged, inserted into pET21 vector (EMD chemicals, San Diego, CA), and protein was expressed in Rosetta 2 (DE3) *E. coli*, cultured in modified minimal medium using <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl as the sole nitrogen source, and induced with 0.4 mM IPTG at 18°C for 16 h. Soluble forms of His<sub>6</sub>-tagged Nef proteins were purified over a Ni<sup>2+</sup>-NTA column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and subsequent gel-filtration on a Superdex200 26/60 column (GE Healthcare) equilibrated with 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, and 0.02% sodium azide. Two-dimensional (2D) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) experiments (Bodenhausen and Ruben, 1980) were performed at 27°C on a Bruker Avance 700 MHz spectrometer equipped with a 5-mm, triple resonance, and z-axis gradient cryoprobe. The <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum of free Nef was obtained using a 80- $\mu$ M uniform <sup>15</sup>N-labeled Nef sample in 10 mM HEPES, 10 mM DTT, 100 mM NaCl, and 5% (vol/vol) D<sub>2</sub>O (pH 8.0). A series of <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra were acquired to monitor chemical shift changes upon addition of aliquots of a 10-mM 2c stock solution, dissolved in DMSO, to the Nef sample. The Nef:2c molar ratios of the solutions were 1:0, 1:0.6, 1:1.75, 6:25, and 12:5. A control series of <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra were also obtained after adding the same amounts of DMSO without 2c to the free Nef sample. In this series, in contrast to the titration with the 2c solution, minimal spectral changes occurred (data not shown), confirming that the changes after addition of 2c were indeed caused by this organic molecule and not the solvent.

### Transport Assay and Endo H Treatment

H9 cells were infected with Nef<sup>-</sup> or Nef<sup>+</sup> pseudotyped HIV-1<sup>NL4-3</sup> viruses for 24, 48, or 72 h. After infection, cells were subjected to pulse-chase/surface biotinylation as described (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002). Briefly, to IP with HC10, cells were lysed in m-RIPA [1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)] and then heated for 1 h at 55°C to denature MHC-I proteins. To IP with BB7.2, cells were lysed in PBS (pH 7.2) containing 1% NP-40. Bound MHC-I proteins were eluted from protein A sepharose beads (Sigma) by boiling in TBS, 5% SDS, 2% NP-40, and 2% sodium deoxycholate. One-third of the eluate was used to assess total MHC-I while the rest was incubated with streptavidin agarose (Pierce, Rockford, IL) to capture biotinylated MHC-I. For Endo H treatment, MHC-I was eluted by boiling in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1% SDS, precipitated with acetone and resuspended in glycoprotein denaturation buffer (NEB, Ipswich, MA) and digested with 10 U of Endoglycosidase H for 1 h at 37°C. Samples were separated by SDS-PAGE and processed using Amplify (GE Healthcare). Quantification was performed using NIH Image J.

### Protein Interaction Assays

Plasmids expressing GST, GST-MHC-I CDNef<sub>LL/AA</sub> (provided by J. Guatelli, UCSF), His<sub>6</sub>-Hck $\Delta$ OR GST-Nef (strain NL4-3), were transformed in BL21 *E. coli* and cultures were induced with 1 mM IPTG (Calbiochem) for 4 h at 37°C. Bacterial pellets were resuspended in lysis buffer [50 mM Tris (pH 7.6), 1.5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>] containing protease inhibitors (0.5 mM PMSF and 0.1  $\mu$ M each of aprotinin, E-64, and leupeptin), lysed using a French Press (Aminco, Rockville, MD) and incubated with GST-sepharose (GE Healthcare). For the interaction with GST-MHC-I CDNef<sub>LL/AA</sub>, A7 cells were lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> with protease inhibitors (0.5 mM PMSF and 0.1  $\mu$ M each of aprotinin, E-64, and leupeptin). A7 lysates were added to GST-Sepharose bound to the proteins of interest overnight at 4°C. The resin was incubated or not with 20  $\mu$ M 2c for one hour, washed three times in lysis buffer and once in 50 mM Tris (pH 8.0), and resuspended in SDS-PAGE sample buffer. For the His<sub>6</sub>-Hck interaction with GST-Nef, the proteins were mixed at a 2:1 ratio (Hck:Nef) for 30 min at 4°C in binding buffer [0.1% NP-40, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris (pH 7.9), 150 mM NaCl] containing the indicated concentrations of 2c. After incubation, GST-Sepharose was added and subsequently washed three times in binding buffer and resuspended in SDS-PAGE sample buffer.

## RESULTS

### HIV-1 Nef Uses a Subset of SFKs to Trigger MHC-I Down-Regulation

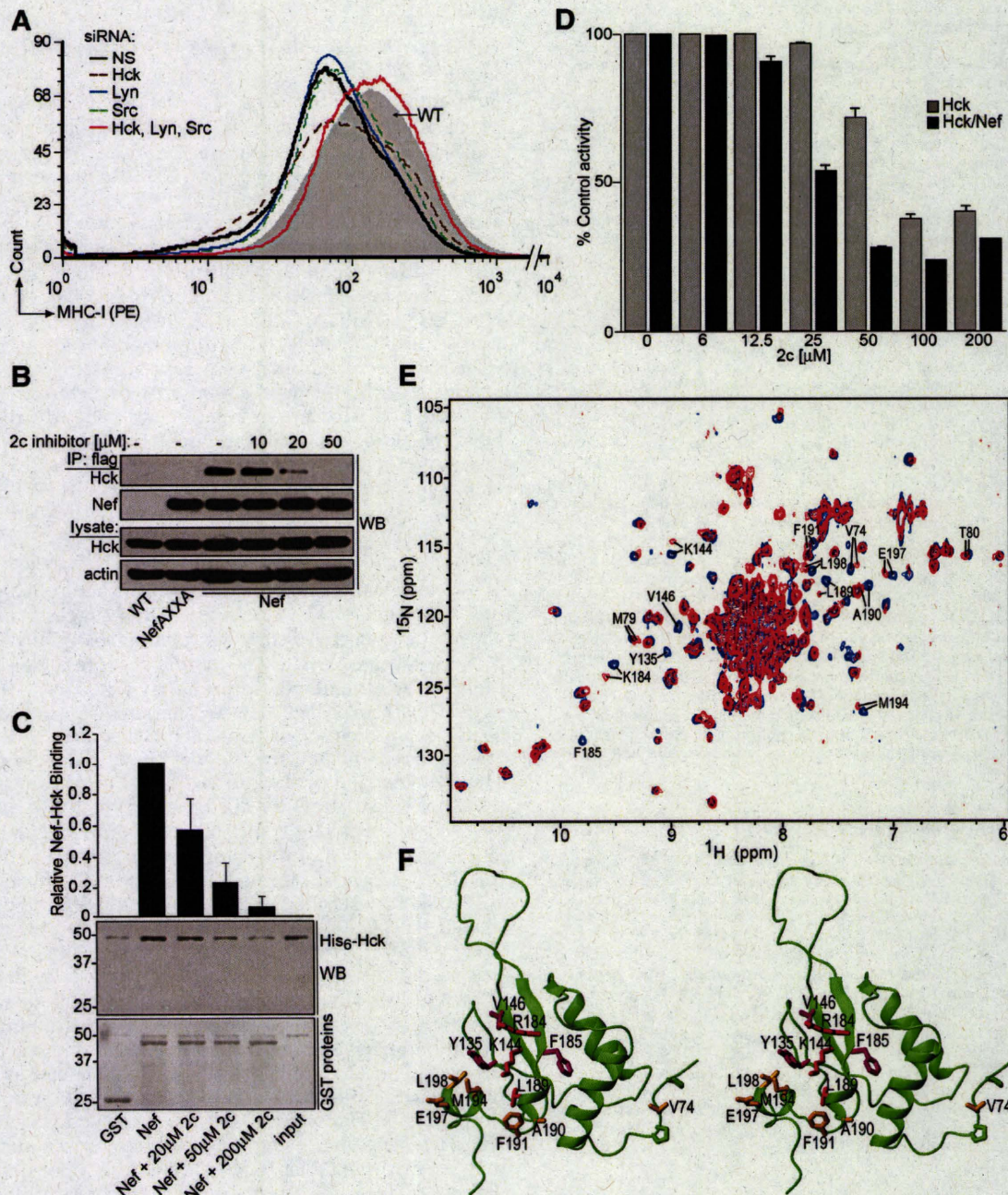
Formation of the SFK-ZAP70/Syk-PI3K multi-kinase complex is initiated by the PXXP<sub>75</sub>-dependent binding of Nef to the SH3 domain of a Golgi region-localized SFK, directly activating the kinase (Hung *et al.*, 2007). Of the seven known SFKs only a subset—Hck, Lyn, and Src—can be directly activated after Nef binding and are found in the Golgi region, suggesting one or more of these kinases mediate MHC-I down-regulation (Matsuda *et al.*, 2006; Tribble *et al.*, 2006; Hiyoshi *et al.*, 2008; Pulvirenti *et al.*, 2008). To test this, H9 CD4<sup>+</sup> T-cells treated with siRNAs specific for Hck, Lyn, or Src (Figure 1A and supplemental Figure S1) were infected with recombinant viruses expressing Nef and the extent of MHC-I down-regulation was determined. Nef-induced MHC-I down-regulation was slightly repressed by siRNA knockdown of Hck alone but blocked by knockdown of Hck, Lyn, and Src together. The data suggest that Hck, Lyn, and Src function redundantly in Nef-induced MHC-I down-regulation.

### Small Molecule Inhibition of the Nef-SFK Interaction

The determination that Nef assembles a multi-kinase complex to trigger MHC-I down-regulation suggests this pathway can be selectively targeted pharmacologically. Indeed, isoform-specific class I PI3K inhibitors repress Nef-induced MHC-I down-regulation in primary CD4<sup>+</sup> T-cells (Hung *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2008). An alternative approach would be to block protein-protein interactions required for complex assembly without affecting cellular enzyme activity directly. The characterized binding of Nef to SFK SH3 domains represents an ideal target for this type of inhibitor (Arold *et al.*, 1997). One candidate compound, 2c (supplemental Figure S2), is a derivative of the compound UCS15A that disrupts the PXXP-dependent binding of Sam68 to Src (Oneyama *et al.*, 2003). To test whether 2c disrupts Nef-SFK binding, we treated H9 CD4<sup>+</sup> T-cells coexpressing flag-tagged Nef (Nef/f) and Hck with increasing concentrations of 2c. Hck was used because it binds Nef with higher affinity than other SFKs and Nef can assemble Hck into the multi-kinase complex (Hung *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2008). Coimmunoprecipitation analysis showed 2c repressed the interaction between Nef and Hck in a dose-dependent manner as well as repressed the interaction with Lyn or Src (Figure 1B and supplemental Figure S3). Next, we incubated GST-Nef and His<sub>6</sub>-Hck with increasing concentrations of 2c and found that 2c disrupted Nef-Hck binding in a dose-dependent manner (Figure 1C). To determine whether the ability of 2c to inhibit Nef-SFK binding also blocked Nef-induced SFK activation, we incubated recombinant, purified Nef, and Hck with increasing concentrations of 2c and measured the resulting Nef-induced Hck activity using a FRET-based *in vitro* kinase assay. Under these assay conditions, activation of Hck is dependent upon Nef (Emert-Sedlak *et al.*, 2009). As shown in Figure 1D, 25  $\mu$ M 2c substantially repressed Nef-dependent Hck activity without affecting Hck in the absence of Nef. High 2c concentrations ( $\geq 100$   $\mu$ M), however, directly inhibited Hck activity. These findings suggest 2c has a bimodal effect on Hck activity; at low concentrations 2c disrupts Nef-induced kinase activity, whereas high concentrations of 2c inhibit Hck directly.

The ability of 2c to selectively inhibit Nef-induced Hck activation suggested 2c may bind Nef directly, thereby affecting Hck activity. Accordingly, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC NMR analysis of the interaction of 2c with recombinant Nef in solution revealed 2c





**Figure 1.** 2c interferes with Nef:SFK binding. (A) H9 CD4<sup>+</sup> T-cells were nucleofected (Amaza) on days 1 and 3 with pmaxGFP and nonspecific siRNA or siRNAs that target Hck, Lyn, or Src alone or in combination. On day 4 cells were infected with VV:WT (gray filled) or VV:Nef (lines, unfilled) (moi = 10, 8 h), and analyzed by flow cytometry using mAb W6/32 as described in experimental procedures. MFI: NS siRNA (WT = 167, Nef = 99.5); Nef + Hck siRNA = 120; + Lyn siRNA = 103; + Src siRNA = 117; + Hck, Lyn, Src = 169. MFI, mean fluorescence intensity. (B) H9 cells were coinfectd with VV:WT, VV:Nef/f or Nef<sub>AXXA</sub>/f (moi = 10, 8 h) and VV:Hck (moi = 2, 8 h) and treated with 10, 20, or 50  $\mu$ M 2c for 4 h before harvest. Nef/f proteins were immunoprecipitated, and coprecipitating Hck was detected by Western blot. (C) GST-Nef was incubated with His<sub>6</sub>-Hck and treated with increasing concentrations of 2c. GST-Nef was captured, and bound His<sub>6</sub>-Hck was quantified using NIH Image J. Accordingly, nonspecific binding of GST to His<sub>6</sub>-Hck in the absence of 2c. Each condition was assayed in triplicate, and results are presented as the mean  $\pm$  SD. (D) Hck alone (gray bars) or Hck plus Nef (black bars) were treated with increasing concentrations of 2c. The resulting Hck enzyme activity was measured using a fluorometric assay and expressed relative to 100% control activity. Each condition was assayed in quadruplicate and results are presented as the mean  $\pm$  SD. (E) Superposition of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of Nef in the absence (blue) and presence (red) of 2c. The  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra were recorded on 80  $\mu$ M uniform  $^{15}\text{N}$ -labeled Nef samples at 27°C in the absence (blue) and presence (red) of 1 mM 2c (1:12.5 M ratio of Nef to 2c). All assignable amide resonances (J. Jung, I.-J.L. Byeon, J. Ahn, and A.M. Gronenborn, unpublished data) that exhibit chemical shift changes  $>0.06$  ppm are labeled with residue name and number. The resonances of Y<sub>135</sub>, V<sub>146</sub>, and F<sub>185</sub> are labeled only on the free Nef spectrum because the identification of the bound resonances was not straightforward either due to very large shift changes or severe line broadening beyond detection. The resonances of M<sub>79</sub> ( $\Delta\delta = 0.041$ ppm) and T<sub>80</sub> ( $\Delta\delta = 0.025$ ppm), which are located immediately after the P<sub>72</sub>XXP<sub>75</sub> motif, are also labeled. Concentrations of 2c as low as 48  $\mu$ M, representing a 1:0.6 M ratio of Nef



induces a number of chemical shift changes in amide resonances of Nef (Figure 1E). These include relatively small chemical shift changes (0.025–0.063 ppm) at V<sub>74</sub>, M<sub>79</sub>, and T<sub>80</sub> located within the Nef polyproline helix that binds the RT loop of SH3 domains on SFKs (Lee *et al.*, 1995), suggesting 2c may influence the conformation of the polyproline helix. The presence of resonance overlap in the NMR spectra precluded more detailed analysis involving the disordered regions of Nef such as the N-terminal region preceding the polyproline helix and the internal loop consisting of residues E<sub>149</sub>–K<sub>178</sub>. More pronounced chemical shift changes (>0.1 ppm) were observed for the resonances of Y<sub>135</sub>, K<sub>144</sub>, V<sub>146</sub>, K<sub>184</sub> (R<sub>184</sub> in Figure 1F [PDB ID: 2NEF]), F<sub>185</sub>, and L<sub>189</sub>, which are clustered on the opposite side of the SH3 domain binding site. Other residues in this region such as V<sub>148</sub>, A<sub>190</sub>, F<sub>191</sub>, M<sub>194</sub>, and E<sub>197</sub>, and L<sub>198</sub> also undergo substantial (>0.06 ppm) changes. These chemical shift perturbations caused by the addition of 2c imply that 2c could bind to the cleft formed by the central  $\beta$ -sheet and the C-terminal  $\alpha$ -helices of Nef, which may provide a good binding pocket (Figure 1F). Together, these findings suggest 2c may interfere with Nef-induced SFK activation most likely by allosteric inhibition of SFK binding or possibly by directly influencing the binding mode of the polyproline helix to SFKs or both.

#### 2c Represses the Ability of HIV-1 to Down-Regulate MHC-I

The 2c concentration range that selectively inhibited Nef-dependent SFK activation showed no measurable cell toxicity up to 60  $\mu$ M for two days, suggesting 2c could be tested in culture (Figure S4, panel A). Accordingly, we treated H9 cells expressing Nef-eYFP with 2c or the class I PI3K inhibitor PI-103, which specifically blocks Nef-induced MHC-I down-regulation (Hung *et al.*, 2007), and measured cell-surface MHC-I (Figure 2A). In agreement with earlier studies (Hung *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2008), Nef-eYFP induced an ~twofold down-regulation of MHC-I that was blocked by PI-103. Similarly, 2c partially blocked MHC-I down-regulation. Next, we asked whether 2c could interfere with HIV-1-induced MHC-I down-regulation in primary CD4<sup>+</sup> T-cells. We infected primary CD4<sup>+</sup> T-cells with HIV-1<sub>NL4-3</sub> and treated the cultures with vehicle or 2c. At 8 d postinfection, the cells were analyzed for cell-surface HLA-A2 and CD4 by flow cytometry (Figure 2B). We found that 2c partially blocked down-regulation of MHC-I but had no effect on down-regulation of CD4, which is mediated by a class I PI3K-independent pathway (Hung *et al.*, 2007).

#### 2c Disrupts Formation of the Multi-Kinase Complex

The ability of 2c to disrupt Nef-SFK binding as well as HIV-1-induced MHC-I down-regulation suggested this

compound would disrupt assembly of the SFK-ZAP-70-PI3K multi-kinase complex. Accordingly, we found that 2c blocked the ability of Nef to recruit class I PI3K activity using an *in vitro* lipid kinase assay (Figure 3A). Moreover, this result was not due to cell toxicity or induction of apoptosis nor was it due to nonspecific inhibition of class I PI3K as treatment of the immunoprecipitate with 40  $\mu$ M 2c had no effect on enzyme activity (supplemental Figure S4, B and C and Figure 3A). The titration analysis of 2c on Nef-induced Hck activation (Figure 1D) suggests 40  $\mu$ M 2c blocked Nef-induced PI3K stimulation by selective inhibition of Nef-induced SFK activation, whereas 100  $\mu$ M 2c may block Nef-induced PI3K stimulation by additionally inhibiting SFK activation directly. The PI3K activity results were supported by coimmunoprecipitation analysis in which 2c inhibited formation of the multi-kinase complex by disrupting the interaction of Nef with Hck, phospho-ZAP-70 and the class I PI3K p85 regulatory subunit (Figure 3B).

The ability of 2c to disrupt Nef-SFK binding did not exclude the possibility that it may affect additional steps in the MHC-I down-regulation pathway. We first asked whether 2c interfered with steps upstream of Nef-SFK binding. Accordingly, we found that 2c had no effect on the Nef-PACS-2 interaction nor the PACS-2-dependent trafficking of Nef-eYFP to the paranuclear region, which is required for Nef-SFK binding and Nef-induced MHC-I down-regulation (Figure 3, C and D and Atkins *et al.*, 2008).

Because Nef M<sub>20</sub> mediates the interaction with AP-1 (Roeth *et al.*, 2004) and is essential for sequestration of MHC-I molecules after their internalization from the cell surface (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002), we tested whether AP-1 was required in the last stage of this signaling pathway. Accordingly, H9 cells knocked down for AP-1A, PACS-2, or PACS-1 which is required for MHC-I down-regulation but not for triggering PI3K stimulation (Piguet *et al.*, 2000; Atkins *et al.*, 2008), were infected with viruses expressing Nef or the Nef<sub>AXXA</sub>-PI3K\* chimera, which rescues the inability of Nef<sub>AXXA</sub> to down-regulate MHC-I by overriding the requirement for assembly of the SFK-ZAP-70-PI3K complex (supplemental Figure S5 and Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2007). The ability of Nef or Nef<sub>AXXA</sub>-PI3K\* to down-regulate MHC-I in cells knocked down for expression of PACS-2, PACS-1, or AP-1A was assessed by antibody uptake to discern the importance of each protein in steps upstream or downstream of PI3K stimulation (Figure 4A). Consistent with our determination that Nef requires PACS-2 upstream of PI3K (Atkins *et al.*, 2008), siRNA knockdown of PACS-2 blocked MHC-I uptake by Nef but not by Nef<sub>AXXA</sub>-PI3K\*. By contrast, siRNA knockdown of AP-1A or PACS-1 blocked MHC-I uptake induced by Nef and Nef<sub>AXXA</sub>-PI3K\*, demonstrating AP-1 and PACS-1 act downstream of PI3K stimulation.

To test potential effects of 2c on the later stages of this pathway, we asked whether 2c interfered with the interaction between Nef and PACS-1 or AP-1. We determined that 2c had no effect on the Nef-PACS-1 interaction (Figure 4B). Additionally, the interaction of AP-1 with Nef M<sub>20</sub> and the MHC-I cytosolic domain can be recapitulated using the chimeric protein GST-MHC-I CD-Nef<sub>LL/AA</sub> to capture AP-1 from cytosol preparations (Noviello *et al.*, 2008). This chimera consists of Nef with an LL<sub>165</sub>→AA substitution, which blocks the LL<sub>165</sub>-dependent binding to adaptors, fused to the MHC-I cytosolic domain. We found that 2c did not interfere with the ability of GST-MHC-I CD-Nef<sub>LL/AA</sub> to capture AP-1 (Figure 4C, left). Interest-

**Figure 1 (cont).** to 2c, revealed chemical shift changes between <sup>15</sup>N-Nef and 2c. (F) Structural mapping of the chemical shift changes in the <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum of Nef induced by 2c onto the Nef NMR structure (PDB ID: 2NEF, see (Grzesiek *et al.*, 1997)). The <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-combined chemical shift changes were calculated using  $\sqrt{\Delta\delta_{HN}^2 + (\Delta\delta_N \times 0.1)^2}$ , with  $\Delta\delta_{HN}$  and  $\Delta\delta_N$  the <sup>1</sup>HN and <sup>15</sup>N chemical shift differences, respectively, between the free and 2c-bound Nef protein spectrum. On a stereoview of the structure in ribbon representation, sidechains of residues whose amide resonances exhibit significant changes are shown in stick representation and color coded according to the size of the change: orange; 0.06–0.1 ppm, and red; >0.1 ppm. Residues whose <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC amide resonances are only detectable/assignable in free Nef are colored in magenta and the sidechains of the two prolines in the P<sub>72</sub>XXP<sub>75</sub> region are shown in green.