

Analyse der Membranbindung von HIV-1 Nef_{SF2}

Dissertation

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

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von

Dipl. Biochemiker Holger Gerlach

aus Karlsruhe

Oktober 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von Mai 2005 - Oktober 2008 am Max-Planck- Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung für Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Leitung von Dr. Matthias Geyer angefertigt.

Erster Gutachter : Prof. Dr. M. Engelhard

Zweiter Gutachter : Prof. Dr. R. Winter

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Überblick über die Pandemie des Humanen Immundefizienz-Virus . . .	3
2.2	Organisation des Genoms von HIV	4
2.3	Das HIV-1 Nef Protein	5
2.3.1	Biochemische und strukturelle Eigenschaften	5
2.3.2	Funktionen des Nef Proteins	6
2.3.2.1	Transportprozesse	7
2.3.2.2	Signaltransduktion	8
2.4	Membranbindung von Proteinen	10
2.4.1	Modifikationen und Motive in peripheren Proteinen, die Membranbindung vermitteln	11
2.4.1.1	Lipidierungen	11
2.4.1.2	Membranbindungsdomänen	13
2.4.1.3	Elektrostatische Ladung und amphipathische Helices	13
2.4.2	Eigenschaften von Lipiden mit Bedeutung für die Membranbindung peripherer Proteine	15
2.4.2.1	Oberflächenladung	16
2.4.2.2	Phosphatidylinositolphosphate	17
2.4.2.3	Membrandomänen	18
2.4.2.4	Form der Lipide und Krümmung	19
2.4.3	Regulation der Membraninteraktion peripherer Proteine	21
2.4.3.1	Elektrostatischer Schalter	21
2.4.3.2	Myristinschalter	22
2.4.3.3	Deacylierung	22
2.4.3.4	Andere Mechanismen	22
3	Motivation und Zielsetzung	24
4	Material	25
4.1	Chemikalien	25
4.2	Bakterienstämme	25
4.3	Vektoren	25
4.4	DNA- und Proteinlängenstandards	26
4.5	Enzyme	26
4.6	Antikörper	26
4.7	Oligodesoxyribonukleotide	26
4.8	Lipide	26
4.9	Verbrauchsmaterialien	26
4.10	molekularbiologische Kits	27
4.11	Laborgeräte	27

4.12	Software	28
5	Methoden	29
5.1	Molekularbiologische Methoden	29
5.1.1	Polymerasekettenreaktion	29
5.1.2	Mutagenese mittels Megaprimer-Methode	29
5.1.3	Agarosegelelektrophorese	30
5.1.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
5.1.5	Restriktionsverdau	30
5.1.6	Ligation	31
5.1.7	Präparation und Transformation kompetenter Zellen	31
5.1.7.1	Hitze-kompetente Zellen	31
5.1.7.2	Elektrokompetente Zellen	32
5.1.8	Plasmidisolierung	32
5.1.8.1	Minipräparation	32
5.1.8.2	Midipräparation	32
5.1.9	DNA-Sequenzierung	33
5.1.10	photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	34
5.2	Biochemische Methoden	34
5.2.1	Proteinexpression	34
5.2.2	Proteinreinigung	34
5.2.2.1	Zellaufschluss	34
5.2.2.2	Chromatographische Verfahren	35
5.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	36
5.2.4	Elektronenspray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)	37
5.2.5	MALDI-TOF	37
5.2.6	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	38
5.2.7	Western Blot	39
5.2.8	PIP-Strips	39
5.2.9	Farnesylierung	39
5.2.10	Herstellung von Liposomen	40
5.2.10.1	LUVs (<i>large unilamellar vesicles</i>)	40
5.2.10.2	SUVs (<i>small unilamellar vesicles</i>)	40
5.2.11	Lipidkonzentrationsbestimmung der Liposomen	40
5.2.12	Kosedimentation mit Liposomen	41
5.3	Biophysikalische Methoden	41
5.3.1	Analytische Gelfiltration	41
5.3.2	Dynamische Lichtstreuung	41
5.3.3	CD-Spektroskopie	42
5.3.4	Fluoreszenzmessungen	42
5.3.5	FRET (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>)	43
5.3.6	<i>Stopped Flow</i> und Kinetik	43
5.4	Oberflächenplasmonresonanz	45

6	Ergebnisse	47
6.1	Klonierung von HIV-1 Nef _{SF2}	47
6.2	Expression und Reinigung von HIV-1 Nef _{SF2}	48
6.3	Analyse der Bindung von HIV-1 Nef _{SF2} an Modellmembranen	50
6.3.1	Fluorimetrische Eigenschaften von HIV-1 Nef _{SF2} und experimenteller Versuchsaufbau für die Detektion der Membranbindung	50
6.3.2	Bestimmung einer Bindungsstelle für Nef auf Liposomen	55
6.3.3	Einfluss der Oberflächenladung der Liposomen auf die Membranbindung	56
6.3.4	Einfluss der Krümmung der Membran auf die Bindung von Nef	58
6.3.5	Einfluss der Lipizusammensetzung der Liposomen auf die Membranbindung	61
6.3.6	Einfluss von N-terminalen Mutationen auf die Membranbindung von HIV-1 Nef _{SF2}	64
6.4	Analyse des Sekundärstrukturgehaltes mittels CD-Spektroskopie	67
6.5	Die Interaktion von Nef und CD4 an Modellmembranen	70
6.6	Farnesylierung von Nef	76
6.6.1	Klonierung des farnesylierten Nefs	76
6.6.2	Expression, Reinigung und Farnesylierung von Nef	77
6.6.3	Biochemische Charakterisierung des farnesylierten Nefs	77
6.6.3.1	Analytische Gelfiltration	77
6.6.3.2	Sekundärstruktur und thermische Stabilität	79
6.6.4	Membranbindung des farnesylierten Nef Proteins	81
6.6.5	Lokalisation und CD4-Internalisierung des farnesyliertes Nef	82
6.7	Expression und Reinigung des myristoylierten Vac8 Proteins	84
7	Diskussion	88
7.1	Die Membranbindung von HIV-1 Nef _{SF2}	88
7.2	Modell für die Membranbindung von Nef	93
7.3	Die Interaktion von Nef und CD4 an Modellmembranen	94
7.4	Artifizielle Farnesylierung von Nef	95
7.5	Darstellung der Struktur von Nef an einer Membran	97
8	Anhang	99
8.1	Herleitung der Formel für die Berechnung einer Bindungsstelle für Nef	99
8.2	Herleitung der Formel für die Berechnung des K_d -Wertes für die Folgereaktion	101
8.3	Kalkulation der Hydrophobizität und des hydrophoben Momentes einer amphipathischen Helix	102
8.4	Auflistung der Auswertung sämtlicher CD-spektroskopischen Messungen	103
	Literaturverzeichnis	105

9 Abkürzungsverzeichnis

116

1 Zusammenfassung

Das Nef Protein trägt als eines der akzessorischen Proteine des HI-Virus zur Pathogenität des Virus bei. Dabei übernimmt es eine Vielzahl an Funktionen, wie z. B. die Internalisierung von Rezeptoren der T-Zelle. Zudem ist intaktes Nef für die Progression einer HIV Infektion zu AIDS erforderlich. Diese Funktion ist von der N-terminalen Myristoylierung des Nef Proteins abhängig, die eine Voraussetzung für die Membranbindung darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem ersten Schritt das native, myristoylierte HIV-1 Nef_{SF2} Protein rekombinant in *E. coli* hergestellt. Die Myristoylierung wurde dabei durch die N-Myristoyl-Transferase katalysiert, und der Nachweis der vollständigen Myristoylierung wurde durch Massenspektrometrie erbracht.

Die Kinetik der Membranbindung von Nef wurde mittels transients Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Durch Entwicklung eines auf FRET basierenden Ansatzes *in vitro* konnte die Assoziation von Nef an Modellmembranen zeitlich aufgelöst werden. Es wurde ein biphasischer Kurvenverlauf beobachtet, der eine schnelle konzentrationsabhängige (20 bis 100 s⁻¹) und eine langsame konzentrationsunabhängige (~ 3 s⁻¹) Rate beinhaltet. Diese Raten konnten der initialen Assoziation von Nef an die Membran und einer anschließend stattfindenden Isomerisierung des Proteins zugeordnet werden. Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie zeigen, dass bei Membranbindung der α -helikale Anteil zunimmt, sodass die Isomerisierung des Proteins vermutlich auf die Ausbildung einer N-terminalen amphipathische α -Helix zurückgeht.

Die Auswertung der Fluoreszenzamplitude der Bindungskinetik lieferte ein Wert von 25 Lipiden, die eine Bindungsstelle für ein Nef Molekül bilden. Durch Annahme einer Folgereaktion der Form



für die Membranbindung von Nef konnte eine auf die Bindungsstelle bezogene Dissoziationskonstante (K_d) von ca. 0,3 μ M ermittelt werden. Dieser K_d -Wert wurde für Modellmembranen erhalten, die 30 % anionische Lipide und einen hydrodynamischen Radius von 50 nm aufweisen. Eine Veränderung der Ladung oder Krümmung der Membran führt zu einem veränderten Bindungsverhalten. Die Affinität von Nef zu Modellmembranen nimmt mit dem Anteil an anionischen Lipiden exponentiell zu. Eine Bindung an elektrisch neutrale Membranen konnte überraschenderweise nicht nachgewiesen werden. Durch Variation des Liposomenradius und somit der Krümmung der Membranoberfläche konnte gezeigt werden, dass Nef eine höhere Affinität zu stärker gekrümmten Membranen aufweist. Die Rate der Myristininsertion zeigt eine Abhängigkeit vom Liposomenradius der Form $1/r^2$. Demgegenüber scheint die Zusammensetzung der Membran eine untergeordnete Rolle zu spielen, da Cholesterol oder Sphingomyelin die Bindung von Nef nicht signifikant beeinflussen.

Durch Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass N-terminal lokalisierte, basische und hydrophobe Aminosäuren zu der Membranbindung von Nef beitragen. Eine

Mutation von vier Argininen zu Alanin führt zu einer um den Faktor 3,8 reduzierten Affinität zu den Modellmembranen. Die Mutation der hydrophoben Aminosäuren W₅, M₁₀ und W₁₃ resultiert in einer um den Faktor 2,5 geringeren Affinität. Für eine nicht myristoylierte Variante von Nef (G₂A) konnte noch eine schwache Membranbindung detektiert werden, während die vollständige Deletion der N-terminalen Ankerdomäne (Nef_{Δ1-59}) die Membranbindung verhindert.

Interessanterweise wird die Gleichgewichtskonstante des ersten Gleichgewichts sowohl durch die Krümmung der Liposomen, als auch durch die Mutation der basischen Aminosäuren bzw. der Konsensussequenz für die Myristoylierung beeinflusst. Daraus kann geschlossen werden, dass die schnelle erste Phase vermutlich zwei Prozesse umfasst, die nicht direkt mit der angewendeten Methode aufgelöst werden konnten. Somit konnte ein Modell für die Membranbindung von Nef entwickelt werden, das aus drei Stufen besteht. Dabei findet zuerst die Assoziation von Nef an die Liposomen über elektrostatische Wechselwirkungen statt, gefolgt von der Insertion des Myristins und ggf. anderer hydrophober Reste in die Membran. Der dritte Schritt entspricht dann der Isomerisierung des Proteins.

In einem weiteren Projekt wurde der Einfluss einer artifiziellen Farnesylierung am C-terminalen Ende von Nef untersucht. Es konnte mittels thermal denaturierender CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass myristoyliertes Nef eine höhere Stabilität besitzt als die nicht myristoylierte Variante, während die C-terminale Farnesylierung das Protein sogar destabilisiert. *In vivo* wird durch die Farnesylierung die Internalisierung des CD4-Rezeptors unterbunden und führt somit zu einem Funktionsverlust von Nef. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wahl der Lipidierung und die Orientierung von Nef an der Membran für seine Funktion entscheidend ist.

Insgesamt sind also mehrere Determinanten - sowohl auf der Seite der Membran als auch auf der Seite des Proteins - essentiell, um die Membranbindung und somit die Funktion von Nef zu gewährleisten.

2 Einleitung

2.1 Überblick über die Pandemie des Humanen Immundefizienz-Virus

Die durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) ausgelöste Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) ist trotz inzwischen 25 Jahren Forschung noch immer eine Erkrankung, für die eine Heilung nicht möglich ist, wenngleich seit ihrer Entdeckung die Therapiemöglichkeiten deutlich verbessert wurden. Allerdings hat nur ein Bruchteil der insgesamt 33,2 Millionen HIV-Infizierten Zugang zu diesen kostenintensiven Therapien. Die Pandemie HIV nahm ihren Anfang in Kamerun, wo das Virus einen Wirtswechsel vom Schimpansen auf den Menschen vollzog [1]. Mithilfe statistischer Methoden wurde der Zeitpunkt für diese Transmission auf 1930 geschätzt [2]. Das früheste HIV-Isolat, das man nachträglich aus einer Probe gewinnen konnte, stammt aus dem Jahr 1959, allerdings dauerte es über 20 weitere Jahre bis das Virus nachgewiesen werden konnte. Bis dahin hatte sich HIV vermutlich bereits über fünf Kontinente ausgebreitet, was durch die fast symptomfreie Inkubationszeit von mehreren Jahren begünstigt wurde. Die erste Vermutung, dass das gehäufte Auftreten von PCP (*pneumocystis carinii pneumonia*), eine Form der Lungenentzündung, auf einen neuartigen Erreger zurückzuführen ist, äußerten Gottlieb *et al.* 1981 [3]. Die Isolierung des Virus gelang wenig später den Gruppen um Luc Montagnier [4] und Robert Gallo [5]. Seitdem wurden große Fortschritte im Kampf gegen HIV gemacht. Ein Bluttest wurde bereits 1985 entwickelt [6], und das erste von der FDA (*Food and Drug Administration*) zugelassene Medikament, AZT (Azidothymidin), das die Reverse Transkriptase des Virus inhibiert, wurde 1987 für den Einsatz freigegeben. Die hohe Mutationsrate des HIV führte jedoch zu der schnellen Resistenzentwicklung gegenüber einzelnen, in Monotherapien verwendeten Präparaten, und der größte Fortschritt wurde durch den Einsatz von HAART (*highly active anti-retroviral therapy*) erzielt. Diese erstmals 1996 eingesetzte Therapie, bei der eine Kombination aus mehreren antiviralen Präparaten verabreicht wird, erhöhte die Lebenserwartung für einen 25-jährigen HIV-Infizierten von 7,6 Jahren auf geschätzte 39 Jahre in den Jahren 2000-2005, wenn keine Koinfektion mit Hepatitis C vorliegt. Durch diese Therapie wurde die Lebenserwartung eines HIV-Patienten in Richtung der durchschnittlichen Lebenserwartung eines Nichtinfizierten verschoben, die bei 51,1 Jahren liegt [7] ¹. Mit 33,2 Millionen Infizierten und 2,1 Millionen Todesfällen im Jahre 2007 [8] ist das HI-Virus für die größte Pandemie der Menschheit verantwortlich und stellt die Forschung immer noch vor die Aufgabe einen Impfstoff oder eine Therapie, die eine vollständige Genesung ermöglicht, zu entwickeln.

¹Diese Statistik wurde in Dänemark, einer Industrienation, in denen der Zugang zu antiviralen Medikamenten gesichert ist, erhoben. Somit sind die Ergebnisse nicht für alle Länder – im Besonderen nicht für die Entwicklungsländer – gültig.

2.2 Organisation des Genoms von HIV

HIV gehört zu der Familie der Retroviren und innerhalb dieser Familie zu der Gruppe der Lentiviren, welche sich durch eine lange Inkubationszeit auszeichnen. Das Genom des Virus ist 9,7 kb groß und enthält 9 offene Leserahmen, die für insgesamt 15 Proteine kodieren (siehe Abb. 1). An beiden Enden wird das Genom durch LTRs (*long terminal repeats*) flankiert, wobei am 5' LTR der Promotor lokalisiert ist. Die Mehrzahl der Proteine wird in Form der drei Polyproteine Gag (*group-specific antigen*), Pol (*polymerase*) und Env (*envelope*) gebildet, die anschließend proteolytisch in die einzelnen, funktionalen Proteine gespalten werden. Aus Gag werden die Proteine MA (*matrix*), CA (*capsid*), NC (*nucleocapsid*) und das Peptid p6 gebildet, von denen die drei Erstgenannten strukturelle Bestandteile des Virus darstellen und p6 für das Verpacken des Virus wichtig ist. Die Spaltprodukte von Pol bilden die Proteine PR (*protease*), RT (*reverse transcriptase*) und IN (*integrase*), die sämtliche Enzyme des Virus umfassen. Um die Stöchiometrie von ca. 20:1 zwischen Strukturproteinen und Enzymen zu gewährleisten, wird das Polyprotein Pol nur als Fusionsprodukt zwischen Gag und Pol nach einer Leserahmenverschiebung gebildet. [9]. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten einer erhöhten Konzentration an Pol führt zu einer drastischen Reduktion der Virusinfektiosität [10]. Das Polyprotein Env wird zu den Hüllproteinen gp120 und gp41 prozessiert. Zusätzlich zu diesen, den Retroviren gemeinen Proteinen, werden noch sechs sogenannte akzessorische Proteine kodiert, nämlich Tat, Rev, Vif, Vpu, Vpr und Nef, die keine enzymatische Aktivität aufweisen, aber für die Replikation ebenfalls von entscheidender Bedeutung sind. Tat z. B. erhöht die niedrige basale Transkription des HIV-LTR ca. 100-fach durch Rekrutierung des humanen pTEFb-Komplexes (*positive-transcriptional elongation factor b*) an TAR (*trans-activating response element*), das am 5'-Ende entstehender viraler Transkripte zu finden ist. Dies führt dann zu einer Phosphorylierung der CTD (*C-terminal domain*) der RNA-Polymerase II und ihrer Überführung in den Elongationszustand. Als weiteres Beispiel vermittelt Rev den Export ungespleißter viraler mRNA durch Bindung an das RRE (*Rev responsive element*). Dadurch wird das normalerweise stattfindende Spleißen der mRNA im Zellkern verhindert und vollständige Transkripte können in das Cytosol gelangen.

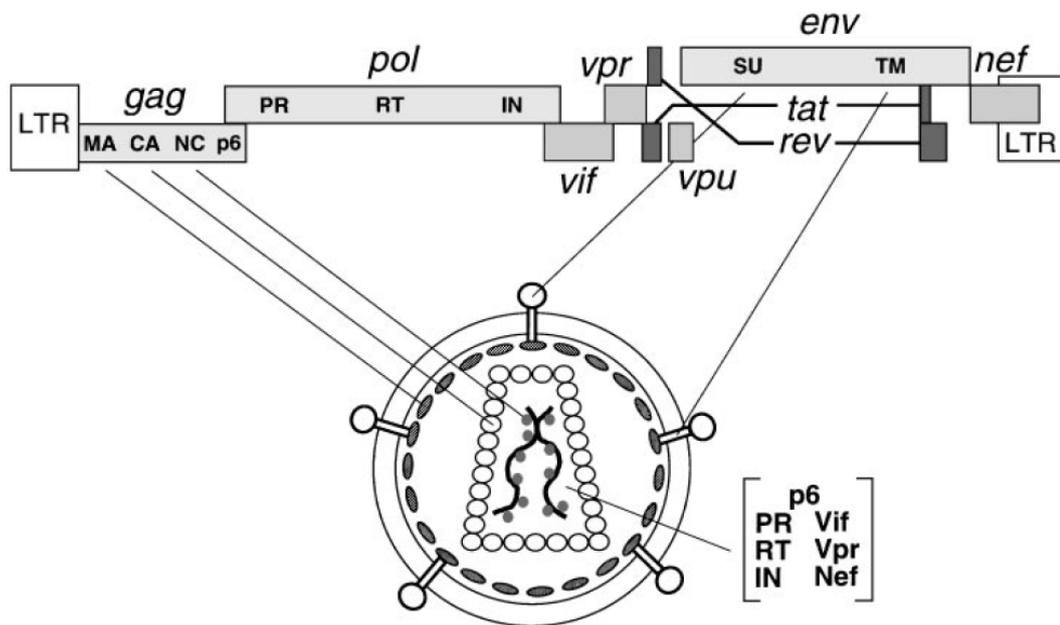


Abbildung 1: Organisation des viralen Genoms; entnommen aus Frankel and Young, 1998 [11].

2.3 Das HIV-1 Nef Protein

Das HIV-1 Nef Protein, das aufgrund seiner Position im Genom zuerst als 3'-orf oder B-ORF bezeichnet wurde, gehört zu den akzessorischen Proteinen des HI-Virus, und die Deletion des *nef*-Gens unterbindet nicht dessen Replikation. Die Abkürzung Nef leitet sich von "negative factor" ab und spiegelt erste Beobachtungen wieder, die einen negativen Einfluss auf die Virusreplikation nahelegten. [12, 13, 14, 15]. Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden und bereits 1991 konnte anhand von Versuchen mit SIV (*simian immunodeficiency virus*), ein dem HIV verwandten Virus bei Affen, gezeigt werden, dass Rhesusaffen mit einer Nef-defizienten Virusvariante deutlich geringere Viruslasten aufweisen [16]. Dies zeigte sich einige Jahre später auch beim Menschen. Untersuchungen einer Gruppe von Langzeitüberlebenden einer australischen Kohorte ergaben eine grosse Deletion im *nef*-Gen [17, 18, 19]. Seitdem wurden Nef eine Vielzahl an Funktionen zugeordnet, die eine Bezeichnung als Pathogenitätsfaktor erlauben.

2.3.1 Biochemische und strukturelle Eigenschaften

Das Nef Protein ist – je nach Variante – ein 25 bis 35 kDa grosses, myristoyliertes Protein, dessen Struktur in zwei verschiedene Domänen gegliedert werden kann, die zuerst durch limitierte Proteolyse identifiziert wurden [20]. Diese Domänen wurden durch Lösen der dreidimensionalen Struktur bestätigt. [21, 22, 23, 24]. Den C-terminalen Bereich bildet die kompakt gefaltete, im Falle von HIV Nef_{NL4-3} 93 Aminosäuren umfassende, Kerndomäne, die aus vier α -Helices und fünf β -Faltblättern

besteht. Unterbrochen wird die Kerndomäne von einer ungeordneten Schleife zwischen AS 152 und 184. Die N-terminalen 61 Aminosäuren stellen den zweiten Bereich des Proteins dar, und das Fragment 2-57 enthält nur zwei kurze α -helicale Bereiche, die durch NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*) identifiziert wurden [25]. Problematisch für die Strukturbestimmung von Nef ist vor allem der geringe Anteil an Sekundärstruktur im Protein. Aus den separaten Strukturen beider Bereiche wurde ein Modell (siehe Abb. 2) für das gesamte Protein erstellt, um die Größenverhältnisse sichtbar zu machen [26]. Während der myristoylierte N-Terminus vermutlich vor allem der Rekrutierung des Proteins an Membranen dient, finden sich in der Kerndomäne nahezu alle Sequenzmotive, die für eine Modulation der Transportfunktionen und der Signaltransduktion in der Wirtszelle von Bedeutung sind. Bezogen auf sämtliche Subtypen von HIV-1 weist Nef einen erstaunlich hohen durchschnittlichen Konservierungsgrad von 84 % auf. Während jedoch vor allem die Kerndomäne eine hohe Sequenzkonservierung besitzt, befinden sich in der N- und C-terminalen Region neben einigen absolut konservierten Motiven, wie die Myristoylierungsstelle oder das Dileuzinmotiv, die weniger konservierten Bereiche. Diese sind allerdings aufgrund ihrer Oberflächenzugänglichkeit, die eine Basis für Interaktionen bildet, und ihrer Flexibilität, die eine Änderung der Konformation erlaubt, ebenfalls für die Funktion von Nef von Bedeutung [29]. Insgesamt wurde für das Modell des Nef Proteins eine Oberfläche von 17.600 \AA^2 errechnet, zu welcher die Aminosäuren aus den flexiblen Bereichen (55 % aller AS) mit 69 % überproportional beitragen. Bei Darstellung des elektrostatischen Potentials der Oberfläche (Abb. 3) fällt auf, dass Nef einen Dipolcharakter besitzt. Der positiv geladene N-Terminus scheint für die Membranbindung des Nef Proteins essentiell zu sein [30], und negative Ladungen in der flexiblen Schleife könnten dazu dienen, diesen ungeordneten Bereich einzuleiten und Sekundärstrukturbildung zu vermeiden. Die elektrostatische Repulsion der Schleife von Membranen könnte für eine korrekte Orientierung von Nef an Membranen von Bedeutung sein. Neben elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Nef und seinen Interaktionspartnern, wurden die AS R105 and D123 mit der Dimerisierung von Nef in Verbindung gebracht, wobei die Dissoziationskonstante von 0,7 mM sehr hohe Konzentrationen von Nef in der Zelle voraussetzen würde [23]. Diese Dimerisierung ist allerdings umstritten und es wurden verschiedene Beobachtungen gemacht, die Dimerisierung, Trimerbildung bis hin zu Formation von höheren Oligomeren favorisieren [31, 32, 33, 34].

2.3.2 Funktionen des Nef Proteins

Bis heute wurde eine Vielzahl an Funktionen und Interaktionspartnern für Nef identifiziert, die die Bezeichnung von Nef als molekularen Adaptor erlauben (für einen Überblick siehe: [35, 36]). Die Funktionen, die Nef in der Wirtszelle ausübt, lassen sich in zwei Kategorien aufteilen: Modulation von Transportprozessen einerseits, und Änderung der Signaltransduktionswege andererseits.

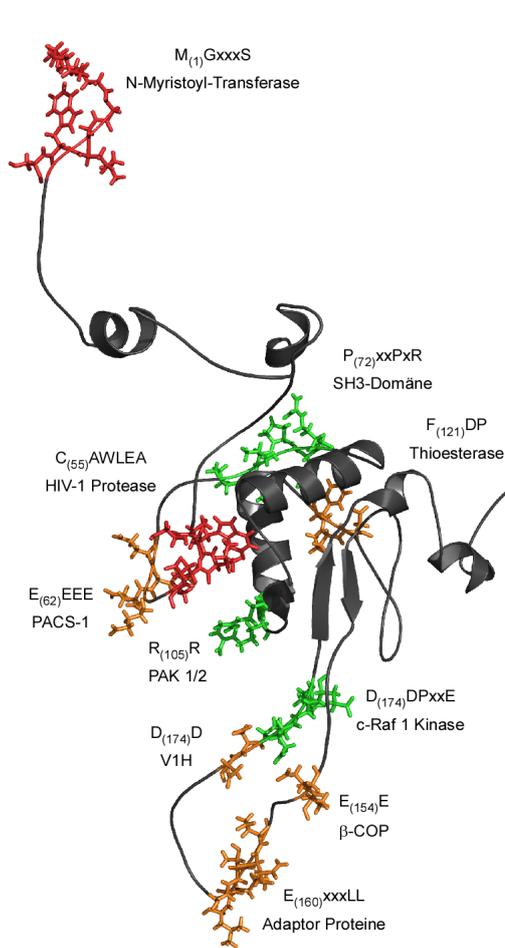


Abbildung 2: Sekundärstruktur des Nef-Proteins mit den für die Modulation von Transportprozessen (Orange) bzw. Signaltransduktion (Grün) wichtigen Motiven; In Rot: Sequenzmotive an den Nef modifiziert werden kann; Die Abb. wurde mit PyMOL [27] erstellt.

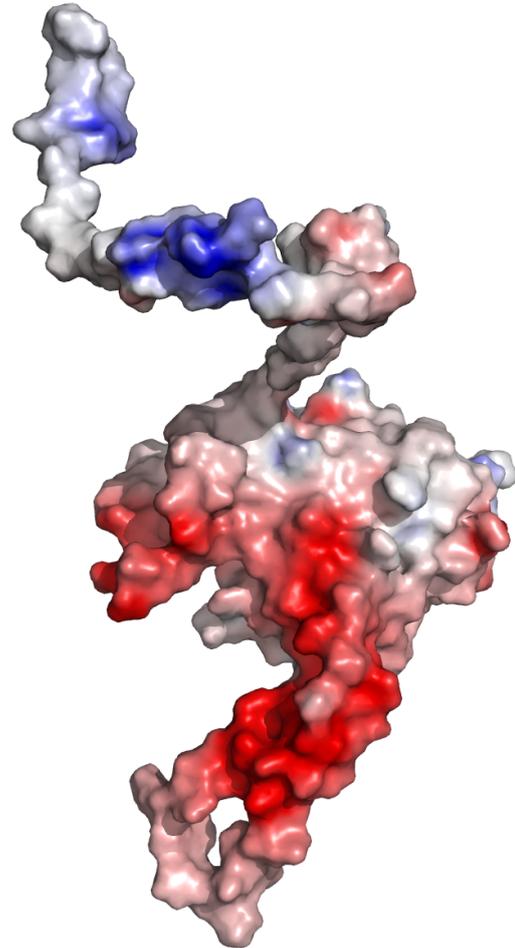


Abbildung 3: Elektrostatistische Oberflächendarstellung, erstellt mit GRASP [28]; gezeigt ist die Ladung von 8 (blau) bis -8 (rot) $k_B T$ mit k_B = Boltzmannkonstante, T = Temperatur.

2.3.2.1 Transportprozesse Zu den wichtigsten Aufgaben von Nef zählt die Internalisierung und Degradierung von Oberflächenrezeptoren infizierter T-Lymphozyten. Durch die Internalisierung des CD4-Rezeptors, der den Hauptrezeptor für den Eintritt des Virus in die Zelle stellt [37, 38], wird sowohl die Superinfektion der Zelle [39], als auch ein Rückbinden neuer, knospender Viren an die bereits infizierte Zelle verhindert. Für diese Funktion ist ein intaktes Dileuzinmotiv $E_{(160)}xxxLL$ in Nef unabdingbar [40]. Das eigene Dileuzinmotiv des CD4-Rezeptors ist normalerweise durch die Kinase Lck maskiert [41], und die Internalisierung kann nach Phosphorylierung des Dileuzinmotivs erfolgen. Nef stört diese Interaktion, indem es an den cytoplasmatischen Teil von CD4 bindet und Bestandteile der Clathrin-vermittelten

Endozytose, die AP(*assembly polypeptide*)-Komplexe, rekrutiert. Als Folge davon wird der CD4-Nef-Komplex internalisiert und zur Degradation in den lysosomalen Weg geleitet.

Auch die Oberflächenkonzentration von MHC-I (*major histocompatibility complex class I*) wird durch Nef vermindert [42]. Die Rolle von MHC-I liegt in der Präsentation von Antigenen auf der Oberfläche infizierter Zellen, die dann von CTLs (*cytotoxic T-lymphocytes*) erkannt und vernichtet werden. Die Nef-vermittelte Inhibition der Antigenpräsentation dient HIV somit dazu, dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen [43]. Bemerkenswert ist die selektive Verminderung von den MHC-I Allotypen HLA-A/HLA-B, nicht aber von HLA-C/HLA-E [44]. Ein Fehlen beider Rezeptoren würde eine Immunantwort durch NKs (*natural killer cells*) auslösen. Darüber wie die Halbwertszeit von MHC-I Molekülen an der Plasmamembran reduziert wird, gibt es unterschiedliche Meinungen. Während die Verminderung von CD4 durch Clathrin-vermittelte Internalisierung geschieht, kann Plasmamembrangebundenes MHC-I durch Arf6 vermittelte Endozytose internalisiert werden [45]. Fraglich ist, ob Nef schon den Transport von MHC-I vom TGN (Transgolginetzwerk) zu der Zellmembran unterbricht. Hierzu wurden unterschiedliche Beobachtungen gemacht [45, 46].

Vor kurzem wurde in einer Studie gezeigt, dass HIV-2 und die meisten Nef Varianten in SIV auch CD3 γ , einen Bestandteil des T-Zell-Rezeptors (TZR) internalisieren, wodurch eine zu starke Aktivierung des Immunsystems verhindert wird. Das Nef Protein des HIV-1 hingegen besitzt diese Fähigkeit nicht, wodurch sich vermutlich die erhöhte Pathogenität des Virus erklären lässt [47].

2.3.2.2 Signaltransduktion Die Replikation von HIV verläuft nur in aktivierten T-Zellen effizient [48], und das Virus ist in der Lage eine teilweise Aktivierung der T-Zelle herbeizuführen. Dies geschieht z. T. durch Nef-vermittelte Modulation der Signaltransduktion des TZR [49]. In einer gesunden CD4⁺-T-Zelle werden, nach Kontakt mit dem antigenpräsentierenden MHC-II Rezeptor einer anderen Zelle, eine Reihe von Phosphorylierungsschritten, sowohl am TZR als auch an cytosolischen Kinasen durchgeführt, die letztendlich über verschiedene Signalwege zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 (Ras-Signalkaskade), NFAT (Ca²⁺-Signalweg) und NF κ B (DAG-Signalweg) führen. Eine Folge davon ist z. B. die Produktion von IL-2 (Interleukin 2) und seinem Rezeptor, was zu einer weiteren Aktivierung und Teilung der T-Zelle beiträgt. Nef greift in diesen Prozess ein, indem es zu einer Erhöhung z. B. der AP-1 Aktivierung [50, 51], der NFAT Aktivierung [52] oder zur erhöhten Produktion von IL-2 [53] beiträgt. In älteren Studien wurden allerdings auch widersprüchliche Beobachtungen gemacht [54, 55].

Weiterhin ist bekannt, dass Nef durch Bindung an die SH3 Domäne von Vav, einem GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) für die GTPasen Rac bzw. Cdc42, diese aktivieren kann [56, 57]. Dies wiederum führt zu einer Aktivierung der Kinase PAK 2 (*p21-activated kinase 2*) [58, 59, 60], was nachfolgend sowohl zu einer Umlagerung des Zytoskeletts, als auch zu einem Auslösen der JNK/SAPK-Signalkaskade

führt. Ersteres könnte einen Einfluss auf das Knospen des Virus haben, wohingegen Letzteres zu einer erhöhten Transkription durch den HIV-Promotor führt [60].

Eine verhältnismäßig neue Erkenntnis ist die Modulation der immunologischen Synapse – ein Zell-Zell-Kontakt zwischen Antigen-präsentierenden Zellen (APZs) und T-Zellen – durch Nef [61]. Der Kontakt zwischen diesen zwei Zellen führt zu einer lokalen Reorganisation des Zytoskeletts und der zielgerichteten Rekrutierung des TZR und vieler Signalproteine an die Kontaktstelle. Die immunologische Synapse ist von entscheidender Bedeutung für eine situationsabhängige Immunantwort, da je nach Kontaktdauer, Aktivierungszustand der beteiligten Zellen oder der Signalstärke unterschiedliche Reaktionen – von der Aktivierung der T-Zelle bis hin zur Vernichtung der Zielzelle – ausgelöst werden können [62]. Nef verhindert das Ausbilden der immunologischen Synapse indem es das Recycling bzw. den anschließenden Transport des TZR und der Kinase Lck zur Kontaktstelle verlangsamt. Dies wird durch ein Zurückhalten der Proteine in den endozytotischen Kompartimenten vermittelt [63], was zu einer verringerten, extrazellulären Stimulation der T-Zelle führt. Da Lck normalerweise für die Internalisierung und Degradation des TZR verantwortlich ist, könnte das Zurückhalten dieses Proteins einen weiteren Beitrag zur Verlangsamung der Internalisierung des TZR leisten. Zusätzlich inhibiert Nef die Reorganisation des Zytoskeletts an der immunologischen Synapse. Das für die Ausbildung eines funktionellen Signalkomplexes kritische Protein N-WASP erhält unter dem Einfluss von Nef nicht mehr die für seine Aktivität wichtige Phosphorylierung, was eine Inhibition der Aktinreorganisation zur Folge hat und letztendlich die Ausbildung einer immunologischen Synapse verhindert.

Nef erfüllt im viralen Lebenszyklus des HIV eine Reihe weiterer Aufgaben, wie z. B. die Inhibition der Apoptose infizierter Zellen. Die meisten davon sind in den Übersichtsarbeiten [35, 64, 65] beschrieben, allerdings sollte erwähnt werden, dass es über einige Funktionen wie z. B. die Bindung von Nef an β -COP oder auch in Bezug auf die Aktivierung von T-Zellen unterschiedlich Befunde gibt. Einen Überblick über die wichtigsten Funktionen von Nef ist in Abb. 4 zu finden.

Nef function	Result	Nef domain
MHC I down-regulation	Viral escape from CTL lysis	²⁰ M ⁶² EEEE ⁶⁵ ⁷² PxxP ⁷⁵
MHC II modulation	Up-regulation of immature MHC II and down-regulation of peptide loaded MHC II	¹⁶³ LL ¹⁶⁴ ⁷² PxxP ⁷⁵
CD4 down-regulation	Enhanced HIV-1 replication Prevention of superinfection Improved Envelope incorporation into budding virions	¹⁶³ LL ¹⁶⁴ H ¹⁹⁶ (SIV _{mac239})
CD28 down-regulation	Disruption of T cell co-stimulatory signalling	¹⁶³ LL ¹⁶⁴ , ⁵⁸ WL ⁵⁹ SIV _{mac239} ¹⁹⁶ H
Apoptosis evasion	ASK1 inhibition Bad activation P53 association	⁷² PxxP ⁷⁵ ¹⁰⁵ RR ¹⁰⁶ ⁷² PxxP ⁷⁵ ¹⁰⁵ RR ¹⁰⁶ Probable ²⁰ M
Resting Tcell permissivness	Macrophage stimulation by Nef to release sCD23 and sICAM. Mediation of lymphocyte permissivity.	Unknown
Fas Ligand induction	Apoptosis induction in lymphocytes by FasL priming. FasL up-regulation by Nef, PAK and TcR ζ-chain.	Likely ¹⁰⁵ RR ¹⁰⁶ and ⁷² PxxP ⁷⁵
Thymopoiesis	Interference with Tcell maturation	
TcR down regulation	Hindered activation of T cell receptors by association with ζ-chain and AP-2	Residue 109-134 SIV _{mac239}
SH3 kinase domain interaction	Association with kinases: Src, Lck, Map, Hck, Fyn affect cell signalling	⁷² PxxP ⁷⁵
Calcium signalling	Interaction with IP ₃ R to induce Ca-signaling in T cells	Unknown
Activation of NFAT	T cell activation, induction of favourable viral replication environment	ITAM (SHIV _{sbg}) ⁷² PxxP ⁷⁵

Abbildung 4: Überblick über die wichtigsten Funktionen von Nef (*Nef function*), den sich daraus ergebenden Änderungen für Nef bzw. die Wirtszelle (*Result*) und die für die entsprechende Funktion essentiellen Aminosäuren in Nef (*Nef domain*). Entnommen aus Tolstrup *et al.*, 2004 [64].

2.4 Membranbindung von Proteinen

Jede Zelle bildet Membranen um z. B. Kompartimente zu formen, oder um Transport zwischen verschiedenen Kompartimenten zu ermöglichen. Das wohl bekannteste Modell einer Membran ist das sog. *fluid-mosaic* Modell von Singer [66], das 1972 vorgeschlagen wurde. Demnach besteht die Membran aus einer fluiden Lipiddoppelschicht, in die Proteine eingelagert sind, die die Aufgaben wie z. B. Signaltransduktion oder Transport von Molekülen übernehmen. Heute wird den Lipiden eine wesentlich aktivere Rolle bei diesen Prozessen zugeschrieben. Durch Variation der Lipide in verschiedenen Zelltypen, zwischen verschiedenen Organellen oder in einzelnen Membranen und durch ihre verschiedenen physikalischen bzw. chemischen

Eigenschaften, kommt den Lipiden eine entscheidende Rolle bei den oben genannten Prozessen zu. Neben integralen und transmembranen Proteinen, die stabil in der Membran verankert sind, existieren Membran-assoziierte Proteine, die sich durch eine reversible Bindung an die Membran auszeichnen. Im Folgenden sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben, wie diese Membran-assoziierten Proteine, die auch als periphere Proteine bezeichnet werden, mit einer Lipiddoppelschicht interagieren können.

2.4.1 Modifikationen und Motive in peripheren Proteinen, die Membranbindung vermitteln

2.4.1.1 Lipidierungen Unter Lipidierung versteht man die kovalente Bindung einer Fettsäure, eines Isoprenoids oder eines GPI-Ankers an ein Protein. Seltene Modifikationen umfassen z. B. die Lipidierung mit Cholesterol [67] oder die O-Acylierung eines Serins mit einer einfach ungesättigten Palmitinsäure [68]. Diese Modifikationen dienen v.a. der Verankerung des Proteins in der Membran, was durch eine Wechselwirkung der hydrophoben Lipidierung mit dem ebenfalls hydrophoben Zentrum der Membran erreicht wird. Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch nur auf Fettsäurenacylierung bzw. die Isoprenylierung genauer eingegangen. Die Strukturen der Modifikationen hierzu sind in Abb. 5 zu sehen.

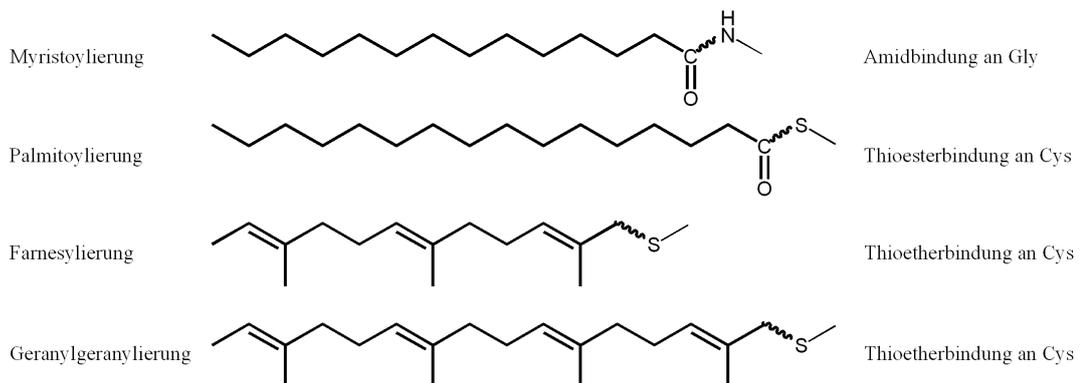


Abbildung 5: Fettsäureacylierung und Isoprenylierung in Proteinen. Gezeigt sind die Strukturen und die Art der Bindung, über die die Lipidierung an die Seitenkette der entsprechende AS gebunden ist.

Myristoylierung Die N-Myristoylierung ist ein auf Eukaryonten beschränkter Prozess [69], bei dem Myristinsäure, eine C14-Fettsäure, auf das Glycin₂ eines Proteinsubstrates übertragen wird [70]. Dieser Prozess wird durch das Enzym N-Myristoyl-Transferase (NMT) katalysiert, die das Konsensusmotiv MG₂xxxS/T erkennt [71], wobei zuvor das initiale Methionin mittels einer Aminopeptidase abgespalten werden muss [72]. Die Myristinsäure wird kovalent über eine Amidbindung an die Aminogruppe des N-terminalen Glycins gebunden. Die Myristoylierung geschieht in der Regel kotranslational [73] bevor sich das Protein faltet und ist irreversibel, da die

Amidbindung eine stabile Bindung darstellt. Eine Ausnahme stellt die sog. morbide Myristoylierung dar, bei der durch Einwirkung einer Caspase ein Myristoylierungsmotiv freigelegt wird, und die Myristoylierung dann post-translational erfolgen kann [74]. Da ca. 0,5 % aller Proteine myristoyliert werden [75], ist es nicht verwunderlich, dass viele verschiedene Proteinklassen diese Modifizierung tragen. Neben Kinasen wie Src oder GTPasen wie Arf, finden sich aber auch virale Proteine wie z. B. Gag oder Nef des HI-Virus darunter. Weitere Klassen umfassen Ca^{2+} -bindende Proteine (z. B. Recoverin) oder das Zytoskelett beeinflussende Proteine wie MARCKS.

Palmitoylierung Bei der Palmitoylierung wird die aus 16 Kohlenstoffatomen bestehende Palmitinsäure über einen Thioester kovalent an die Seitenkette eines Cysteins gebunden. Diese, durch Palmitoyl-Acyltransferasen (PATs) katalysierte Reaktion, findet im Gegensatz zu der Myristoylierung post-translational statt und ist reversibel [70]. Die Deacylierung (siehe 2.4.3.3) wird durch Thioesterasen katalysiert. Obwohl viele Proteine bekannt sind, die palmitoyliert werden (für eine Übersicht siehe: [76]) und auch einige wenige PATs identifiziert wurden [77], ist es immer noch nicht möglich Palmitoylierung anhand der Primärstruktur eines Proteins vorherzusagen. Dies spricht eher gegen einen generellen Mechanismus der Palmitoylierung durch PATs. Eine Alternative wäre die Palmitoylierung eines Cysteins in Membrannähe, einer Umgebung, die die Bildung eines Thiolations fördert, das dann unter Verwendung von Acetyl-CoA acyliert werden kann [78, 79].

Einen besonderen Fall stellt die N-Palmitoylierung z. B. bei Sonic hedgehog (Shh) dar, bei welchem die Palmitoylierung über eine Amidbindung erfolgt [80]. Auch eine S-Acylierung mit anderen – auch ungesättigten – Fettsäuren wie z. B. Oleoilsäure ist möglich.

Isoprenylierung Isoprenylierung ist ebenso wie Palmitoylierung ein posttranslationaler Prozess. Allerdings wird hier eine Isoprenylkette über einen Thioether an ein Cystein des Proteins gebunden. Dies kann entweder eine Farnesylgruppe oder eine Geranylgeranylgruppe sein, und die die Reaktion katalysierenden Enzyme werden dementsprechend als Farnesyltransferase bzw. Geranylgeranyltransferase I bezeichnet. Das Konsensusmotiv ist die sog. CaaX-Box, wobei C einem Cystein entspricht und a einer aliphatischen Aminosäure. Die Aminosäure an der Position X entscheidet darüber, welches Isoprenoid transferiert wird [81]. Nach dem Transfer werden die drei Aminosäuren aaX des Motivs enzymatisch abgespalten und das Cystein carboxymethyliert. Dadurch wird die Irreversibilität dieser Lipidierung gewährleistet. Es wird geschätzt, dass insgesamt ca. 2 % aller eukaryontischen Proteine prenyliert sind [82]. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Möglichkeiten der Prenylierung kann das Enzym Geranylgeranyltransferase II eine doppelte Prenylierung an zwei Cysteinen vornehmen (Konsensussequenz XXCC, XCXC, CCXX(X) oder XCCX), wie sie in sämtlichen Rab-Proteinen zu finden ist.

2.4.1.2 Membranbindungsdomänen Eine weitere Möglichkeit der Interaktion zwischen Proteinen und Membranen besteht in der Bindung von Domänen eines Proteins an bestimmte Lipide. Als besonders wichtiges Erkennungsmotiv auf der Membranoberfläche haben sich die Phosphatidylinositolphosphate (PIP), die in Abschnitt 2.4.2.2 behandelt werden, herausgestellt. Wie wichtig Membranbindungsdomänen sind ist bereits daraus ersichtlich, dass z. B. die PH-Domäne – noch vor der SH3-Domäne – die am häufigsten, in Eukaryonten vorkommende, Domäne ist [83]. Auch andere Lipidbindungsdomänen wie C1, C2 oder PX finden sich unter den häufigsten zehn Proteindomänen. Für Wechselwirkungen zwischen Domänen und Lipiden spielen sowohl unspezifische als auch hochspezifische Interaktionen eine Rolle. Zum Beispiel weist die ca. 120 Aminosäuren große PH-Domäne einen starken dipolaren Charakter auf, der für die unspezifische Wechselwirkung zwischen positiv geladenen Aminosäuren der Domäne und negativ geladenen Phosphatresten der PIPs verantwortlich ist. Etwa 10-20 % der PH-Domänen binden allerdings mit einer hohen Affinität, stereoselektiv an die phosphorylierte Kopfgruppe eines Phosphatidylinositolphosphats, was durch ein Signature-Motif und drei SDRs (*specificity determining regions*), vermittelt wird. Da die verschiedenen Phosphatidylinositole in den Organellen in unterschiedlichen Mengen vorhanden sind, kann so eine gerichtete Lokalisierung der Proteine erzielt werden. Es gibt auch Domänen, die andere Mechanismen für die Membranbindung anwenden und für eine genauere Beschreibung kann auf folgende Übersichtsarbeiten verwiesen werden [84, 85].

2.4.1.3 Elektrostatische Ladung und amphipathische Helices Die amphipathische Helix [86] ist ein weit verbreitetes Sekundärstrukturelement in Proteinen und diese spezielle Helix zeichnet sich durch zwei distinkte Oberflächen aus. Eine dieser Oberflächen wird aus überwiegend hydrophoben Aminosäuren und die andere aus v.a. polaren bzw. geladenen Aminosäuren gebildet (siehe Abb. 6). Diese Art von Helix kann zum einen der Membranbindung von Proteinen dienen, zum anderen kann sie aber auch Funktionen wie z. B. Destabilisierung der Membran [87] oder Autoinhibition übernehmen [88]. In einigen Proteinen dient sie außerdem der Erkennung von physikalischen Eigenschaften der Membran, wie z. B. Ladung (s.u.), oder lose Packung der Lipide [89]. Die vermittelte Membranbindung ist in der Regel von schwacher Natur, was eine Regulation dieser erlaubt (siehe 2.4.3). Es sind jedoch auch Beispiele gegeben, bei denen die Helix ein integrales Membranprotein (z. B. Prostaglandin Synthase H2) stabil verankert.

Amphipathische Helices können unterschiedliche Eigenschaften besitzen und es ist kein striktes Konsensusmotiv vorhanden, anhand dessen ihre Identifizierung möglich ist. Es wurden Helices mit einer Länge von 14-52 Aminosäuren gefunden, sie weisen einen unterschiedlichen Gehalt an geladenen bzw. polaren Resten auf und besitzen unterschiedliche Anteile an hydrophoben Aminosäuren. Einige Gemeinsamkeiten lassen sich jedoch finden. So sind die Helices generell (bis auf wenige Ausnahmen) positiv geladen und weisen eine Gibbsche freie Energie für den Transfer zwischen Wasser und Membran nahe null auf. Zusätzlich kann über die Werte für die mittlere

Hydrophobizität $\langle H \rangle$ und für das hydrophobe Moment $\langle \mu H \rangle$ einer Helix deren Amphiphilität beurteilt werden. Je höher das hydrophobe Moment ist, desto höher ist der amphipathische Charakter einer helikalen Struktur. Als Beispiel sind in Abb. 6 die 52 Aminosäuren der längsten bekannten amphipathischen Helix – die Domäne M der Phosphocholin Cytidylyltransferase (CCT) – als helikales Rad gezeigt. Die Helix weist ein $\langle H \rangle$ von 0,116 und ein $\langle \mu H \rangle$ von 0,505 auf, was im Bereich für oberflächensuchende Helices liegt [90], siehe Abb. 51; (Für die Berechnung siehe: 8.3). Entsprechend dazu ist die Struktur des Fragments Val₂₆₇ – Ser₂₈₈, das durch NMR gelöst wurde, in Abb. 7 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass das Zentrum der polaren Oberfläche vor allem von negativ geladenen Aminosäuren dominiert wird, während die an der Grenzfläche liegenden Aminosäuren sowohl basischer als auch azider Natur sind. Interessant ist die Rolle der drei Glutaminsäuren an der Lipid-Wasser-Grenzfläche. Durch Protonierung dieser im anionischen Milieu der Membran wird die elektrostatische Repulsion verhindert und die Hydrophobizität erhöht. Somit verhindern diese drei Aminosäuren im protonierten Zustand ein Binden des Proteins an gering anionisch geladene Membranen und dienen als "Ladungssensor". Einen größeren Beitrag zur Bindung als die Elektrostatik, liefern jedoch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Aminosäuren und den Fettsäureketten der Lipide [91]. Im Falle von CCT penetriert die Helix ca. die Hälfte der einer einzelnen Lipidschicht, um diese Wechselwirkungen einzugehen [92]. Eine besonders wichtige Eigenschaft einiger amphipathischer Helices liegt in der Erkennung oder Induktion von Krümmung der Membran. Dies wird ausführlich in Kapitel 2.4.2.4 behandelt.

Die amphipathische Helix liefert ein Beispiel dafür, dass geladene Aminosäuren mit einer definierten Position innerhalb einer Sekundärstruktur für die Membranbindung notwendig sein können. Aber auch eine andere Organisation der Aminosäuren ist möglich. Beispiele hierfür umfassen sowohl Proteine, die eine lineare Anhäufung positiv geladener Aminosäuren in der Membranbindungsregion aufweisen, wie z. B. Src (+5) [93], MARCKS (+13) [94] oder K-Ras4B (+6) [95], als auch Proteine bei denen weiter entfernte Aminosäuren eine positiv geladene Oberfläche bilden, wie es z. B. bei sPLA2 [96] der Fall ist.

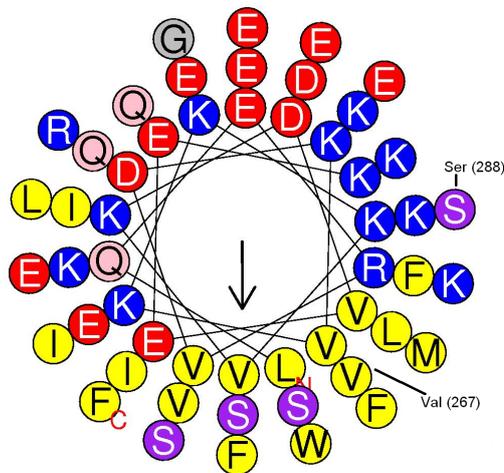


Abbildung 6: Darstellung der 52 Aminosäuren der amphipatischen Helix von CCT als helikales Rad; Die initiale und letzte Aminosäure, die für die Struktur in Abb. 7 verwendet wurden sind gekennzeichnet. Die Abb. wurde mit dem Program Heliquiest erstellt ².

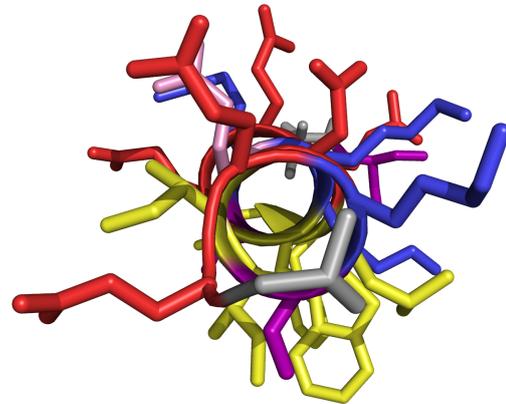


Abbildung 7: Blick entlang der α -Helix eines Teils (V267-S288) der membranbindenden Domäne der CCT; Daten der NMR-Struktur von [97]. Die Abb. wurde mit PyMOL erstellt [27].

2.4.2 Eigenschaften von Lipiden mit Bedeutung für die Membranbindung peripherer Proteine

Membranen wurden als Bestandteil von Zellen bereits sehr früh beschrieben und seit den ersten Beobachtungen ist schon über ein Jahrhundert vergangen [98]. Heute ist bekannt, dass zelluläre Membranen aus einem komplexen Gemisch aus hunderten verschiedener Lipide aufgebaut sind [99]. Insgesamt wenden eukaryontische Zellen ca. 5% ihrer Gene auf, um Tausende unterschiedliche Lipide zu synthetisieren [100]. Deshalb ist es kaum verwunderlich, dass die Zusammensetzung der Membranen streng kontrolliert wird, um die physikalischen und chemischen Unterschiede zwischen ihnen aufrecht zu erhalten und somit eine definierte Umgebung innerhalb der Zelle zu schaffen. Die unterschiedliche Zusammensetzung spielt eine entscheidende Rolle bei dem gerichteten Transport in der Zelle, bei Kontrolle der Fluidität der Membran, bei Endo- bzw. Exozytose, bei Apoptose sowie bei vielen anderen Prozessen. Die in Membranen vorhandenen Lipide (siehe Abb. 8) können grob in zwei Klassen eingeteilt werden: Die vor allem strukturgebenden Lipide wie z. B. Phosphatidylcholin oder Cholesterol, die in hoher Konzentration vorkommen einerseits, und die in geringen Konzentration vorkommenden, aber für Signalfunktionen bedeutsamen Lipide wie z. B. Phosphatidylinositolphosphate oder Phosphatidsäure andererseits. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass auch strukturgebende Lipide ein Bestandteil der Signaltransduktion darstellen. Beide Klassen haben jedoch einen Einfluss auf die

²<http://heliquiest.ipmc.cnrs.fr/>

Assoziation von peripheren Proteinen an die Membran. Einiger dieser Einflüsse sind im Folgendem beschrieben.

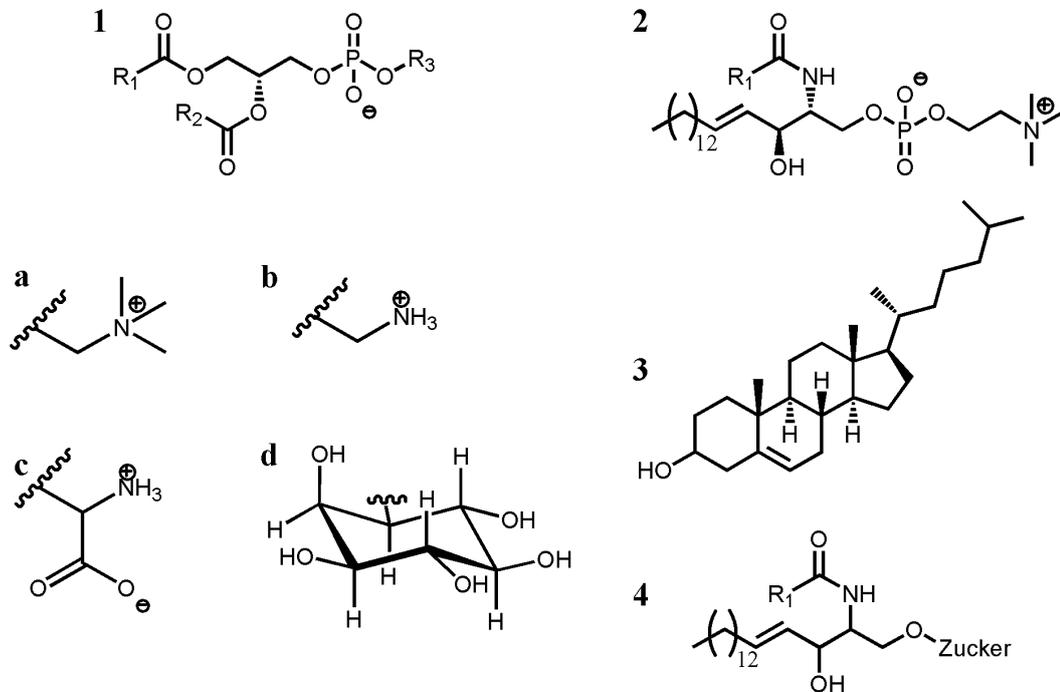


Abbildung 8: Überblick über die am häufigsten in Membranen vorkommenden Lipide; R1 und R2 repräsentieren Fettsäuren **1**. Phosphatidylglyceride; R3 entspricht der Kopfgruppe, die z. T. in **a-d** dargestellt sind. **a**. Cholin **b**. Ethanolamin **c**. Serin **d**. Inositol; **2**. Sphingomyelin **3**. Cholesterol **4**. Cerebroside als Beispiel eines Glykolipids.

2.4.2.1 Oberflächenladung Ein gut untersuchter Unterschied in der Zusammensetzung der Plasmamembran ist ihre Asymmetrie in Bezug auf ihren Ladungszustand. Während sie auf der zytosolischen Seite negativ geladene Lipide aufweist, sind diese auf der extrazellulären Seite nicht zu finden. Ein Vorhandensein des negativ geladenen Phosphatidylserins (PS) in der äußeren Membranschicht zeigt eine apoptotische Zelle an. Extrazelluläres PS wird in diesem Fall durch einen Rezeptor in Phagozyten erkannt, die infolgedessen die apoptotischen Zellen entfernen. Die negative Ladung in der inneren Membranschicht, die vor allem durch das Phosphatidylserin und die Phosphatidylinositolphosphohate erbracht wird, ist dagegen für die Assoziation vieler zytosolischer Proteine an die Membran essentiell, da elektrostatische Wechselwirkungen zu der Bindungsenergie zwischen Membran und Protein beitragen. Dies ist notwendig, da die durch alleinige Farnesylierung oder Myristoylierung erreichte Bindungsenergie nicht ausreicht, um ein Protein stabil an der Membran zu verankern [101, 70], wobei auch der Umkehrschluss zulässig ist: Die elektrostatischen Wechselwirkungen alleine reichen auch nicht aus, um Proteine effizient an der Membran zu lokalisieren, weshalb zusätzlich Motive benötigt werden [102]. Die zusätzliche Bin-

dungsenergie kann neben den oben erwähnten Lipidierungen auch durch Domänen, Oligomerisierung oder an der Lipid-Wasser-Grenzfläche lokalisierte Aminosäuren erbracht werden [103].

Eine neue Erkenntnis ist, dass die unterschiedliche Ladung von Organellen die Rekrutierung unterschiedlich stark positiv geladener Proteine unterstützt. Die am stärksten negativ geladene Plasmamembran bindet die am stärksten positiv geladenen Proteine, wohingegen weniger stark geladene Proteine die mit Phosphatidylserin angereicherten Membranen von Endosomen und Lysosomen bevorzugen [104].

Insgesamt wurde viel Forschung zur Untersuchung dieser Prozesse betrieben [103] und der Einfluss der Ladung auf die Proteinbindung wurde sowohl mittels theoretischer Modelle, die auf numerischer Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung beruhen, [105, 106] als auch experimentell *in vivo* [95] und *in vitro* [94] untersucht. Die erhaltenen theoretischen Ergebnisse stimmen sehr gut mit den experimentell ermittelten Daten überein, auch wenn die elektrostatischen Wechselwirkungen in der Theorie etwas unterschätzt werden [107].

2.4.2.2 Phosphatidylinositolphosphate Eine spezielle Rolle in der Membranzusammensetzung fällt den Phosphatidylinositolphosphaten zu, die in geringer Konzentration in der Zelle vorkommen. Bei Betrachtung der in Abb. 8d zu sehenden Struktur fällt auf, dass die Kopfgruppe dieses Phospholipids sehr viel größer ist als die der anderen. Zusätzlich kann der Inositolring phosphoryliert werden, wodurch sich sieben verschiedene in der Zelle vorkommende Varianten ergeben. Diese strukturellen Eigenschaften sind für die Rekrutierung von peripheren Proteinen entscheidend, wie bereits in Abschnitt 2.4.1.2 erläutert wurde. Das Grundgerüst, aus dem sämtliche PIPs gebildet werden, ist das PI (Phosphatidylinositol), das am ER (Endoplasmatisches Retikulum) synthetisiert wird und anschließend zu den Membranen transportiert wird. Neben der Bindung von Domänen und ihrem Beitrag zu der negativen Ladung von Membranen, können sie auch als Quelle für sekundäre Botenstoffe dienen. Eine Spaltung von $\text{PIP}(4,5)\text{P}_2$ durch PLC (Phospholipase C) führt zu der Bildung von DAG (Diacylglycerol) und $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. DAG wirkt vor allem aktivierend auf Proteinkinase C (PKC), während $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ die Kalziumfreisetzung in der Zelle steigert. Eine weitere Möglichkeit ist die zusätzliche Phosphorylierung von $\text{PIP}(4,5)\text{P}_2$ an Position 3 des Inositolsring durch PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase). Dadurch entsteht der membranständige sekundäre Botenstoff $\text{PIP}(3,4,5)\text{P}_3$, der wiederum spezifisch von Proteinen erkannt wird [108, 109].

Entscheidend für die Funktion der PIPs ist jedoch ihre distinkte Lokalisierung innerhalb der Zelle. Die in Tab. 1 aufgeführte, selektive Verteilung erlaubt die Rekrutierung von bestimmten Proteinen an das richtige Kompartiment. Die organelnspezifische Verteilung wird sowohl durch Kinasen als auch durch Phosphatasen erzielt.

Generell ist die Affinität der Bindung zwischen PIPs und Proteinen schwach, was weitere Interaktionen zwischen Komponenten der Membran und des Proteins voraussetzt. Dieser Mechanismus erlaubt eine gesonderte Regulierung der beteiligten

Bindungsmotive, und bietet somit auch eine Möglichkeit zur Signalintegration [110].

Phosphatidylinositolphosphat	Lokalisierung
PI	Endoplasmatisches Retikulum
PI(4,5)P ₂	Plasmamembran
PI(3,4,5)P ₃	Plasmamembran
PI(3,4)P ₂	Plasmamembran, Frühes Endosom
PI(3)P	Frühes Endosom
PI(3,5)P ₂	Spätes Endosom
PI(4)P	GolgiKomplex, (Plasmamembran)
PI(5)P	nicht bestimmt

Tabelle 1: Die verschiedenen durch Phosphorylierung generierten Phosphatidylinositolphosphate und ihre Lokalisierung innerhalb der Zelle. PI(4)P kommt in geringerer Konzentration auch an der Plasmamembran vor und dient der Synthese von PI(4,5)P₂; PI(3,4)P₂ bzw. PI(3,4,5)P₃ sind sekundäre Botenstoffe und werden nur nach externer Stimulation synthetisiert.

2.4.2.3 Membrandomänen Bereits vor einigen Jahrzehnten wurde beobachtet, dass Lipide und Proteine nicht zufällig in der Membran verteilt sind [111]. Solche Beobachtungen führten zu der Formulierung der Lipid-Raft-Hypothese [112], die derzeit immer noch kritisch diskutiert wird [113, 114, 115, 116, 117]. In diesem Modell stellen Lipid Rafts kleine, kurzlebige Membrandomänen dar, die mit Sphingolipiden und Cholesterol angereichert sind und für sie spezifische Proteine enthalten. Untersuchungen unter Verwendung von Modellmembranen, die Cholesterol, POPC (*palmitoylcholine*) und PSM (*palmitoylsphingomyelin*) enthalten, bestätigten, dass diese Lipide innerhalb einer Membran in verschiedenen Phasen vorliegen können:

- l_d (*liquid disordered*): Lipide und Lipidketten genießen vollständige Bewegungsfreiheit in der Membranebene.
- l_o (*liquid ordered*): Lipide diffundieren frei in der Membranebene, allerdings sind die Lipidketten in einer geordneten, gestreckten Konformation.
- s_o (*solid ordered*): auch als Gelpase bezeichnet, in der zusätzlich die laterale Diffusion der Lipide eingeschränkt ist.

Diese Phasen können je nach Konzentration der beteiligten Lipide auch koexistieren [118]. Modellmembranen, die solche Lipide enthalten, sind auch in der Lage, Proteine, die einen GPI-Anker besitzen, zu einem gewissen Prozentsatz lateral zu sequestrieren [119]. Das Übertragen dieser Ergebnisse auf Zellmembranen *in vivo* ist allerdings nicht trivial und zusammenfassend lässt sich sagen, dass es eine Reihe von Hinweisen für die Existenz von Lipid Rafts gibt [113]. Es ist inzwischen auch gelungen mittels NMR die Existenz der l_o-Phase in natürlichen Membranen des Influenzavirus

nachzuweisen, allerdings tritt sie erst unterhalb physiologischer Temperaturen auf [120].

Proteine die bevorzugt an Lipid Rafts binden, umfassen beispielsweise zweifach acylierte Kinasen der src-Familie (z. B. Fyn) [121], mit GPI-Anker modifizierte Proteine [122] und andere [115]. Im Gegensatz zu der früheren Annahme, dass Rafts unabhängige Plattformen für die Rekrutierung von Proteinen darstellen, entwickelt sich das Modell dahingehend, dass Proteine auch stabilisierend auf Rafts wirken können [113]. Dies könnte z. B. durch Bindung von Proteinen im Grenzbereich zwischen l_o -Phase und der l_d -Phase geschehen, wie es für ein Modellsystem bereits berichtet wurde [123].

2.4.2.4 Form der Lipide und Krümmung Die Krümmung von Membranen ist essentiell für die Funktion aller Zellen und beruht auf einem Zusammenspiel zwischen Proteinen und Lipiden. Schon die Form einer Zelle kann für ihre Funktion von Bedeutung sein, wie es z. B. bei den Erythrozyten der Fall ist, deren bikonkave Form eine schnellere Aufnahme von Sauerstoff erlaubt und deren Verformbarkeit das Erreichen auch kleinster Gefäße garantiert. Aber auch Kompartimente einer Zelle oder lokale Bereiche von Membranen können unterschiedliche Krümmungen besitzen. Beispiele hierfür umfassen Vesikel, das ER oder den Golgi-Apparat und viele Prozesse wie z. B. Zellteilung, Endo- bzw. Exocytose, Phagozytose, Zell-Zell-Kontakte und viele mehr setzen eine bestimmte Membrankrümmung voraus. In Abb. 9 sind die Faktoren aufgezeigt, die die Krümmung einer Membran beeinflussen können.

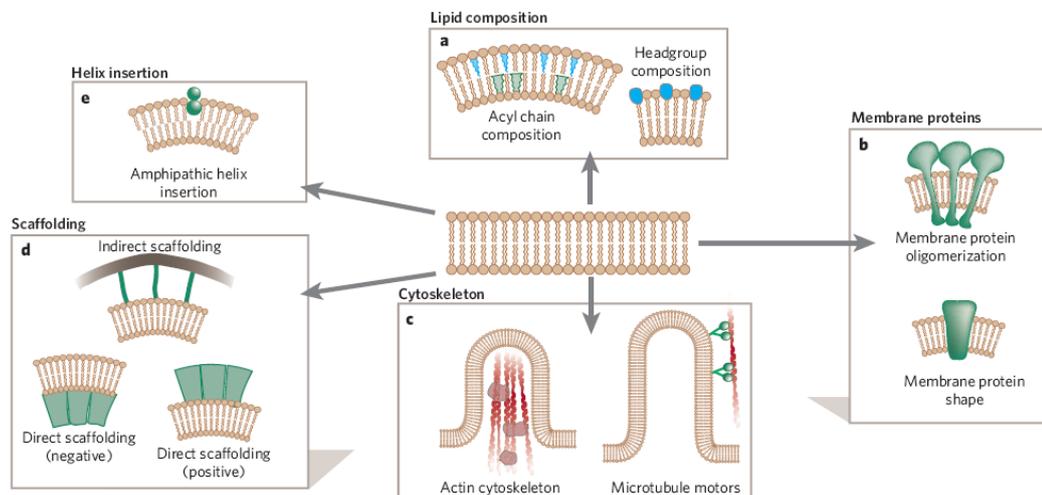


Abbildung 9: Mechanismen für die Generierung von Krümmung in Membranen. **a.** Änderung der Lipidkomposition. **b.** Einfluss von integralen Membranproteinen, die eine Membran per se oder nach Oligomerisierung krümmen. **c.** Änderung der Polymerisation des Zytoskeletts und Ziehen von Tubuli durch Motorproteine **d.** Beteiligung von Gerüstproteinen **e.** Insertion einer amphipathischen Helix in eine Lipidschicht der Membran. Entnommen aus McMahon and Gallop, 2005 [124].

Den ersten die Krümmung bestimmenden Faktor stellen die Lipide selbst da und

viele von ihnen weisen eine Struktur auf, die in Kopfgruppe und Lipidschwanz unterteilt werden kann. Die Fläche, die die Kopfgruppe im Verhältnis zur Schwanzgruppe einnimmt, bestimmt die favorisierte Krümmung eines Lipids (siehe Tab. 2). Somit können Lipide die Krümmung einer Membran entweder erlauben oder verhindern [125].

Beanspruchte Fläche	Krümmung	Form	Beispiel
Kopfgruppe = Lipidkette	$1/R_0 \sim 0$ keine	zylindrisch	PC
Kopfgruppe > Lipidkette	$1/R_0 > 0$ positiv	konisch, invertiert	LPA
Kopfgruppe < Lipidkette	$1/R_0 < 0$ negativ	konisch	PA

Tabelle 2: Favorisierte Krümmung eines Lipids; R_0 Spontaner Radius der Krümmung, PC Phosphatidylcholin, LPA Lysophosphatidsäure, PA Phosphatidsäure.

Eine aktive Form der Membrankrümmung vermittelt das Zytoskelett. Um Strukturen wie z. B. Filopodien zu bilden, kann durch Aktinpolymerisation Kraft auf die Membran ausgeübt werden, die zu ihrer Deformation führt. Dies ist bei vielen Prozessen wie Zellmobilität oder zielgerichtetes Wachstum notwendig [126].

Auch Gerüstproteine liefern einen Beitrag, der für die Generation stark gekrümmter Membranen wichtig ist. Ein Beispiel hierfür sind Proteine, die eine BAR-Domäne enthalten und mit ihrer Hilfe Krümmung stabilisieren können. Durch ihre bananenartige Form favorisiert diese Domäne Membranen mit einer bestimmten Krümmung für die Bindung, die v.a. durch basische Aminosäuren im Interface vermittelt wird [127]. Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass die F-BAR Domäne auch an flache Membranen binden kann, indem sie seitlich mit einem anderen Interface bindet. Eine Folge davon ist, dass die Domäne in der Lage ist auch Krümmung *de novo* zu erzeugen [128, 129]. Ein weiteres Beispiel ist die Familie der Dynamine. Diese Proteine stabilisieren den "Flaschenhals" eines Vesikels bei der Endozytose durch Oligomerisierung und Bildung ringförmiger Strukturen. Die anschließende Fission des Vesikels wird ebenfalls, unter GTP-Hydrolyse, vermittelt [130].

Einige Proteine bzw. Domänen, wie z. B. die N-BAR Domäne von Amphiphysin, besitzen eine amphipathische Helix, die in die Membran insertiert werden kann, um Krümmung zu erzeugen. Dabei wirkt die Helix wie ein Keil und bei hoher lokaler Konzentration wird die Membran gekrümmt. Es wurde aber auch gezeigt, dass amphipathische Helices nicht nur dazu dienen können Membrankrümmung zu generieren, sondern auch diese zu erkennen [131]. Solche Helices weisen ein ALPS (*ArfGAP1 lipid packing sensor*)-Motiv auf, das sich durch polare Reste, v.a. Serin und Threonin, in der polaren Oberfläche der Helix auszeichnet. Positive Ladungen fehlen gänzlich und eine Substitution mit solchen, verhindert die Wahrnehmung von Krümmung durch die Helix [131].

2.4.3 Regulation der Membraninteraktion peripherer Proteine

Die Bindung an Membranen ist ein Prozess, der im Falle der peripheren Proteine reversibel ist. Die Lokalisierung eines Proteins an Membranen kann unterschiedliche Folgen, wie die Regulation der katalytischen Aktivität von z. B. PKC, haben. Nach Bindung von PKC an das membranständige DAG, wird ein Pseudosubstrat entlassen und das Enzym erhält seine volle Aktivität [132]. PKC kann auch als Beispiel dienen, dass periphere Proteine nach Membranbindung einen Bestandteil von Signaltransduktionskomplexen bilden [133]. Weiterhin kann die Membranbindung einen regulierten Zugang zu Substraten für z. B. Phospholipasen schaffen [134]. Um die hierfür notwendige Reversibilität der Membranbindung zu schaffen, greift die Zelle auf unterschiedliche Mechanismen zurück, die im Folgenden kurz angeführt sind.

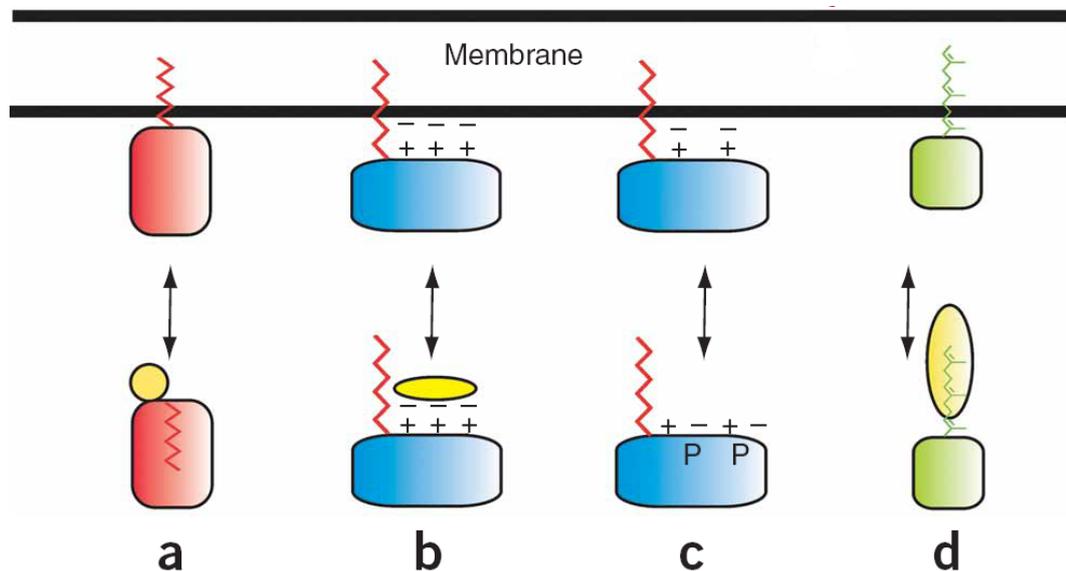


Abbildung 10: Verschiedene Mechanismen für die Regulation der Membranbindung **a.** Ligandenbindung induziert einen Myristinschalter **b.** Ligandenbindung induziert einen elektrostatischen Schalter **c.** Phosphorylierung induziert einen elektrostatischen Schalter **d.** Bindung eines weiteren Proteins an den Isoprenylanker führt zu der Dissoziation von der Membran; entnommen und verändert aus Resh, 2006 [70].

2.4.3.1 Elektrostatischer Schalter Als elektrostatischer Schalter wird ein Kontrollmechanismus bezeichnet, durch den die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Membran entweder gestärkt oder geschwächt werden. Die C2 Domäne von verschiedenen Proteinen wie Synaptotagmin I oder PKC β können ihr elektrostatisches Potential durch Binden von Ca²⁺ erhöhen, was ihre Affinität zu negativ geladenen Lipiden steigert. Im Falle von cPLA₂ α wird das elektrostatische Potential des Proteins neutralisiert, was die Interaktion mit ungeladenen Membranen ermöglicht [84]. Auch Proteine wie Calmodulin können als Ligand eine Potentialänderung z. B. bei MARCKS herbeiführen (siehe 2.4.3.4).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation liegt in der Modifikation eines Proteins durch Phosphorylierung von Aminosäuren innerhalb des polybasischen Motivs: Durch ein Erhöhen der negativen Ladung im membranbindenden Bereich wird die elektrostatische Wechselwirkung vermindert und das Protein dissoziiert von der Membran. Ein Beispiel hierfür ist die Phosphorylierung von MARCKS durch PKC [135]. Da das Protein myristoyliert ist, spricht man in diesem Fall auch von Myristoyl-elektrostatischem Schalter. Natürlich ist dies auch für farnesylierte Proteine denkbar, allerdings wurde mit K-Ras bisher nur ein Beispiel dafür gefunden [136].

2.4.3.2 Myristinschalter Reversible Membranbindung kann auch durch einen Myristinschalter vermittelt werden. Hierbei liegt der hydrophobe Myristinanker in einem ebenfalls hydrophoben Bereich des Proteins und wird erst z. B. nach Ligandenbindung exponiert und somit zur Membranbindung bereitgestellt. Beispiele sind die GTPase Arf1, bei der dieser Schalter durch GTP-Austausch ausgelöst wird [137, 138] oder die Tyrosinkinase c-Abl, bei der die Myristingruppe an die Kinasedomäne gebunden ist und dort strukturell inhibierend wirkt [139, 140]. Eine andere Funktionsweise ist im Fall des HIV-Gag-Proteins zu beobachten. Dieses myristoylierte Polyprotein wird durch die HIV-Protease gespalten, wodurch unter anderem das N-terminale, myristoylierte Matrix-Protein freigesetzt wird (vergl. Abb. 1). MA liegt ebenso wie Gag in einem Monomer/Trimer-Gleichgewicht vor, allerdings stabilisieren Wechselwirkungen zwischen Domänen den trimeren Zustand von Gag. Durch dessen Proteolyse entfallen diese, und somit wird das Gleichgewicht bei MA in Richtung des monomeren Zustands, in dem der Myristoylanker sequestriert ist, verschoben [141].

2.4.3.3 Deacylierung Aufgrund der reversiblen Natur der Thioesterbindung, wie sie bei der Palmitoylierung vorliegt, kann die Membranbindung eines Proteins auch geschwächt werden, indem eine Palmitoylgruppe durch Thioesterasen entfernt wird. Das wohl bekannteste Beispiel hierfür ist der Acylierungs/Deacylierungszyklus der kleinen GTPase H-Ras. Nach Depalmitoylierung an der Plasmamembran kann das Protein, das noch immer eine Farnesylierung aufweist, zwischen Membranen und Cytosol wechseln. Durch Repalmitoylierung am Golgi-Apparat wird das Protein dort stabil verankert und anschließend wieder dem Transport zur Plasmamembran zugeführt. Somit entstehen zwei verschiedene Reservoirs für H-Ras: Eines an der PM und eines am Golgi-Apparat. Da die Aktivität von H-Ras am Golgiapparat länger Bestand hat als an der PM, könnte eine positive Rückkopplung für eine lokale Aufrechterhaltung der Aktivität verantwortlich sein [79]. Es wurde allerdings bisher nur ein Enzym, die APT1 (Acyl-Protein Thioesterase 1), identifiziert, das in der Lage ist eine Depalmitoylierung von verschiedenen Proteinen zu vermitteln [142, 76].

2.4.3.4 Andere Mechanismen Ein anderer Mechanismus für die Regulation der Membranbindung benötigt zusätzliche Proteine, die sog. GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*). Diese sind für die Extraktion von GTPasen der Rho- bzw. Rabfamilie aus der Membran notwendig. Im Falle des doppelt geranylierten

Ypt1 (ein Hefehomolog zu Rab1) besitzt das zugehörige GDI zwei Bindungsstellen für die beiden Lipidierungen: Eine davon liegt tief vergraben innerhalb des GDIs, die andere ist eher flach und liegt an der Oberfläche. Im ersten Schritt der Extraktion wird ein niedrigaffiner Komplex zwischen Ypt1 und dem GDI geformt. Weitere Interaktionen führen zu einer Orientierung des GDIs und infolgedessen wird vermutlich zuerst ein Geranylrest aus der Membran in die besser zugängliche Tasche überführt. Anschließend wird dieser Lipidanker in die tiefere Tasche transferiert und der zweite Geranylrest kann an die äußere Tasche binden, womit die Extraktion abgeschlossen ist [143].

Natürlich bietet auch die Lipidzusammensetzung eine Möglichkeit die Membranbindung von Proteinen zu beeinflussen. Dem kann eine Modifikation der bereits in einer Membranschicht vorhandenen Lipide oder Änderung der Verteilung der Lipide zwischen den beiden Membranschichten zugrunde liegen. Nach der Endocytose enthalten Vesikel PIP_2 , das allerdings spezifisch für die Plasmamembran ist. Um eine PIP_2 -vermittelte Interaktion von Proteinen mit Vesikeln zu vermeiden, muss das PIP_2 z. B. durch die Inositol(5)Phosphatase dephosphoryliert werden [110].

Flippasen können den eigentlich langsamen, da energetisch ungünstigen, Flip-Flop eines Lipids zwischen den Membranschichten bewerkstelligen. Das führt zwar zu einer Änderung der Lipidzusammensetzung, aber anscheinend ist der ebenfalls entstehende Flächenunterschied die entscheidende Größe, um die Krümmung der Membran bei der Endocytose zu unterstützen [144]. Ein Beispiel für eine lokal unterschiedliche Lipidzusammensetzung wurde mit den Mikrodomänen unter dem Abschnitt 2.4.2.3 behandelt.

Eine letzte hier erwähnte Möglichkeit ist die Freisetzung von zuvor gebundenen Lipiden. Ein Beispiel hierfür ist MARCKS: Dieses Protein liegt in einer Konzentration vergleichbar mit PIP_2 in der Zelle vor und bindet Membranen über einen Myristinanker und ein polybasisches Motif. MARCKS ist dabei in der Lage drei PIP_2 -Moleküle zu sequestrieren [145]. Obwohl dies vermutlich durch unspezifische, elektrostatische Wechselwirkungen des polybasischen Motifs mit PIP_2 vermittelt wird, ist das ebenfalls negativ geladene PS davon nicht betroffen [146]. Ein Ansteigen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an das polybasische Motiv von MARCKS und dessen Dissoziation von der Membran, wobei die drei Moleküle PIP_2 freigesetzt werden, die dann für die Signaltransduktion zur Verfügung stehen. Auch die oben beschriebene Phosphorylierung von MARCKS (siehe 2.4.3.1) führt zu einer Freisetzung des PIP_2 [147].

Diese Einleitung hatte zum Ziel, die Komplexität der Protein-Membran bzw. Protein-Lipid-Interaktionen darzustellen. In der folgenden Arbeit wurde versucht das membranassoziierte HIV-1 Nef Protein in Hinblick auf einige dieser Determinanten zu untersuchen.

3 Motivation und Zielsetzung

Den Anstoß für dieses Projekt – die Analyse der Bindung von HIV-1 Nef_{5F2} an Modellmembranen – lieferte die Beobachtung, dass Nef sowohl in einer membrangebundenen als auch in einer membranungebundenen Form existiert [148, 149]. Die für die Membranbindung essentielle Myristoylierung ist für nahezu alle Funktionen von Nef entscheidend [150]. Deshalb lag das erste Ziel in der rekombinanten Herstellung der nativen, myristoylierten Form von HIV-1 Nef_{5F2}. Die Löslichkeit des Nef Proteins vorausgesetzt, sollte sodann mittels eines FRET-basierenden Ansatzes die Membranbindung des Proteins an Modellmembranen *in vitro* untersucht werden. Im speziellen sollte dieser Ansatz eine zeitliche Auflösung und Bestimmung kinetischer Parameter der Membranbindung erlauben. Die Anwendung von FRET ist möglich, da Nef mehrere Tryptophane enthält und somit eine intrinsische Fluoreszenz aufweist, die es bei geeigneter Wahl eines FRET-Akzeptors innerhalb der Membran ermöglicht, die Membranbindung zu verfolgen. Mittels anderer biophysikalischer Methoden wie SPR sollte dieses System validiert werden.

Da bisher kein die Membranbindung vermittelnder Bindungspartner von Nef bekannt ist, und auch die alleinige N-terminale Myristoylierung nicht ausreicht ein Protein stabil an der Membran zu verankern, sollten weitere Determinanten für die Membranbindung in Nef untersucht werden. Auffällig sind mehrere positiv geladene Aminosäuren, die elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Lipiden eingehen könnten, wie es auch inzwischen *in vivo* für Nef berichtet wurde [30], sowie zwei hochkonservierte Tryptophane, innerhalb der N-terminalen Domäne. Eine Darstellung der Aminosäuren K₄ – A₂₃ in Form eines helikalen Rades (siehe Abb. 26b) lässt vermuten, dass die Ausbildung einer amphipathischen Helix eine Rolle bei der Membranbindung spielen könnte, was auch durch NMR-spektroskopische Experimente gestützt wird [25].

Durch gezielte Mutation sowohl basischer als auch hydrophober Aminosäuren innerhalb der vermuteten amphipathischen Helix sollte der Anteil, den diese Aminosäuren an der Membranbindung haben, untersucht werden. Der Einfluss dieser Mutationen auf die Faltung des Proteins in An- bzw. Abwesenheit von Liposomen sollte die Hypothese der Ausbildung einer N-terminalen Helix bei Membranbindung von Nef überprüfen. Dies sollte durch CD-Spektroskopie bewerkstelligt werden. Die Veränderung der Modellmembranen in ihren Eigenschaften in Bezug auf die Ladung, die Krümmung und der Zusammensetzung ihrer Lipide sollte Aufschluss über die Präferenz des Nef-Proteins für die Bindung an definierte Membranen geben. Insbesondere sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob die Membranbindung von Nef genereller Natur ist, die z. B. rein auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht, oder ob spezifische Lipide wie z. B. Phosphatidylinositolphosphate benötigt werden.

Die Frage, ob die Orientierung von Nef an der Membran eine Rolle für seine Funktionalität spielt, sollte durch einen Austausch der N-terminalen Myristoylierung gegen eine C-terminale Farnesylierung adressiert werden. Abschließend sollte als Kontrolle und zum Zweck des Nachweis der allgemeinen Anwendung des FRET-Systems ein weiteres myristoyliertes Protein, Vac8, rekombinant erzeugt werden.

4 Material

4.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden bei folgenden Firmen geordert:

Baker	(Deventer, Niederlande)
Boehringer	(Mannheim)
Fluka	(Neu-Ulm)
GE Healthcare	(Freiburg)
Merck	(Darmstadt)
Qiagen	(Hilden)
Roth	(Karlsruhe)
Serva	(Heidelberg)
Sigma-Aldrich	(Steinheim)

4.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Verwendung
top10	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)\phi 80lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$	Plasmidamplifikation
TG1	$supE thi-1 \Delta(lac-proAB) \Delta(mcrB-hsdSM)5 (r_K^- m_K^-) [F' traD36 pro-AB lacI^q Z\Delta M15]$	Plasmidamplifikation
BL21(DE3)	$E.coli B F^- dcm ompT (r_B^- m_B^-) gal \lambda(DE3)$	Proteinexpression
BL21(DE3) RIL	$E.coli B F^- ompT hsdS (r_B^- m_B^-) dcm+ Tetr gal \lambda (DE3) endA Hte[argU ileY leuW Cam^r]$	Proteinexpression

4.3 Vektoren

pET30a	(Invitrogen, Karlsruhe)
pET23d	(Invitrogen, Karlsruhe)
pProEx-HTa	(Invitrogen, Karlsruhe)

4.4 DNA- und Proteinlängenstandards

LMW-Marker für SDS-PAGE (GE Healthcare, Freiburg)
 1 kb DNA-ladder (Invitrogen, Karlsruhe)

4.5 Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller
<i>EcoR</i> I	20.000 U/ml	(NEB, Schwalbach)
<i>Hind</i> III	20.000 U/ml	(NEB, Schwalbach)
Ligase	40.000 U/ml	(NEB, Schwalbach)
<i>Nco</i> I	10.000 U/ml	(NEB, Schwalbach)
<i>Nde</i> I	20.000 U/ml	(NEB, Schwalbach)
Expand high Fidelity Polymerase		(Roche, Mannheim)

4.6 Antikörper

Anti-His (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

4.7 Oligodesoxyribonukleotide

Sämtliche Primer wurden bei MWG Biotech in München geordert.

4.8 Lipide

β -DPH-HPC (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA)
 Cholesterol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
 DOPC (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA)
 DOPE (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA)
 DOPG (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA)
 DOPS (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA)
 Sphingomyelin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

4.9 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche (Roth, Karlsruhe)
 Elektroporationsküvetten (Invitrogen, Karlsruhe)
 HyperfilmTM ECL (GE Healthcare, Freiburg)
 PIP-Strips (Echelon, Salt Lake City, UT, USA)
 Ultrafiltrationseinheiten (Millipore Amicon, Witten)

4.10 molekularbiologische Kits

ECL-Western-Blot-Detection-Kit	(GE Healthcare, Freiburg)
Gel Extraction Kit	(Qiagen, Hilden)
Plasmid Miniprep Kit	(Qiagen, Hilden)
Plasmid Midiprep Kit	(Qiagen, Hilden)

4.11 Laborgeräte

Zentrifuge Centrifuge 5415 C	(Eppendorf, Hamburg)
Zentrifuge Sorvall RC 5B	(Du Pont Instruments, Bad Homburg)
Zentrifuge J2-HS centrifuge	(Beckman, Fullerton, CA, USA)
Ultrazentrifuge Optima - TL ultracentrifuge	(Beckman, Fullerton, CA, USA)
Vortexer Vortex Genie 2	(Bender Hobein, Zürich, Schweiz)
Heizrührer RCT basic	(IKA-Werke, Staufen)
Kontaktthermometer ETS D4 fuzzy	(IKA-Werke, Staufen)
Heizblock DRI - BLOCK DB2A	(Techne, Duxford, U.K.)
Waage PC 440 Delta Range	(Mettler, Giessen)
Waage BP 110 S	(Sartorius, Göttingen)
Geltrockner Model 543	(Bio-Rad, München)
Magnetrührer MR 2000	(Heidolph, Schwabach)
Photometer 1101 M	(Eppendorf, Hamburg)
Rotor TLA 100.4	(Beckman, Fullerton, CA, USA)
Stopped-Flow SX20	(Applied Photophysics, Surrey, UK)
Biacore 3000	(GE Healthcare, Freiburg)
MS Voyager DE-Pro MALDI	(Perseptive Biosystems, Weiterstadt)
ESI-MS Agilent 1100	(Agilent, Santa Clara, CA, USA)
Autoklav Varioklav	(H+P Labortechnik, Oberschleissheim)
FPLC Äkta prime	(GE Healthcare, Freiburg)
FluoroMax-3 Spectrofluorometer	(HORIBA Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA)
Gelkammer Mini-Protean III Bio-Rad	(Bio-Rad, München)
Fluidizer M-110S	(Microfluidics Corp., Newton, U.K.)
PCR-Gerät PCR-Express	(Hybaid, Heidelberg)
Schüttler	(Brunswick, Nürtingen)
Brutschrank Heraeus CO2 Auto zero	(Heraeus, Hanau)
Gefriergrät (-80 °C) Heraeus Herafreeze	(Heraeus Instruments, Hanau)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103H	(Bandelin electronic, Berlin)
Ultraschallgerät Branson Sonifier W-250	(Branson, Danbury, CT, USA)
Extruder	(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA)

4.12 Software

Origin 7.0	(OriginLab, Northampton, MA, USA)
MagTran	(Freeware)
Pymol	(DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA)
HeliQuest	(http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/)
LALIGN	(http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)
NetPrimer	(http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html)
Expasy	(http://www.expasy.org)

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient der exponentiellen Amplifikation eines DNA-Abschnitts mit Hilfe zweier Oligonukleotide, den sog. *sense* bzw. *antisense* Primern. Die Ansätze wurden wie in Tab. 3 beschrieben vorbereitet, und anschließend im Thermocycler mit dem Programm aus Tab. 4 amplifiziert. Die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer wurde über das Programm "netprimer"³ ermittelt.

Reagenz	Konzentration	Volumen [μ l]
dNTP	10 mM	1
Primer (<i>sense</i>)	10 pmol	1
Primer (<i>antisense</i>)	10 pmol	1
Puffer	10 x	5
DNA-Matrize	2-100 ng	1
Polymerase	10 U/ μ l	0,5
Wasser		ad 50 μ l

Tabelle 3: Pipettierschema für einen Standard PCR-Ansatz.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [s]
initiale Strangtrennung	96	120
Strangtrennung	94	15
Anlagerung	primerspezifisch 50-60 $^{\circ}$ C	30
Elongation	72	45-60 längenspezifisch
finale Elongation	72	420
Ende	4	bis zur weiteren Verwendung

Tabelle 4: Programm zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion.

5.1.2 Mutagenese mittels Megaprimer-Methode

Einführung von Mutationen in DNA ist im Falle einer Punktmutation durch PCR mit Megaprimern möglich. Es werden zwei Runden einer PCR und insgesamt vier Primer benötigt. Zwei Primer tragen die Mutation, während die anderen beiden die Zielsequenz flankieren. Für die erste PCR werden zwei Ansätze mit je einem der mutationstragenden und dem entsprechenden flankierenden anderen Primer verwendet.

³<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>

Die entstehenden Megaprimer werden zuerst durch Agarosegelelektrophorese gereinigt und nachfolgend in der zweiten PCR mit den flankierenden Primern eingesetzt. Für die verwendeten PCR-Bedingungen siehe Kap. 5.1.1 und für die Reinigung der Megaprimer siehe Kap. 5.1.3 bzw. 5.1.4

5.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Größencharakterisierung und Reinigung von DNA-Molekülen. Dabei wandert die negativ geladene DNA durch Anlegen eines elektrischen Feldes durch ein Agarosegel, wobei größere Fragmente langsamer zur Anode wandern als kleinere.

Die Elektrophorese erfolgte bei typischerweise bei 80-110 V und einer Agarosekonzentration des Gels von entweder 1,2 % bei DNA-Fragmenten kleiner als 500 bp oder 0,8 % bei Fragmenten größer als 500 bp. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer verdünnt und als Laufpuffer diente TBE-Puffer (siehe unten). Um die DNA sichtbar zu machen waren sowohl im Laufpuffer als auch im Agarosegel selbst 0,01 % Ethidiumbromid enthalten.

TBE - Puffer	6x Ladepuffer (in TBE - Puffer)
89 mM Tris pH (8,9)	10 % Ficoll
89 mM Borsäure	0,025 % Bromphenolblau
0,9 mM EDTA	0,025 % Xylencyanol

5.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA wurde mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* durchgeführt. Die zu reinigende DNA bleibt unter Hochsalzbedingungen an einer Silica-Membran gebunden, während Verunreinigungen wie z. B. Primer oder Enzyme abgetrennt werden. Die DNA wurde unter Niedrigsalzbedingungen mit 32 μ l von der Membran eluiert, falls ein Restriktionsverdau folgte. Für bereits geschnittene Fragmente betrug das Elutionsvolumen 50 μ l.

5.1.5 Restriktionsverdau

Bei einem Restriktionsverdau wird die Eigenschaft von Restriktionsendonukleasen, die spezifische Spaltung palindromischer DNA-Sequenzen zu katalysieren, ausgenutzt. Je nachdem ob es sich um einen analytischen oder präparativen Restriktionsverdau handelt, wurden folgende Ansätze verwendet:

Reagenz	Konzentration/Menge	Reagenz	Konzentration/Menge
DNA	~100 ng	DNA	Gesamtansatz
Enzym(e)	je 10 U	Enzym(e)	je 20 U
Puffer (10 x)	1 μ l	Puffer (10 x)	5 μ l
Wasser	ad 10 μ l	Wasser	ad 50 μ l

Tabelle 5: Konzentrations,- bzw. Mengenangaben für einen analytischen Restriktionsverdau. **Tabelle 6:** Konzentrations,- bzw. Mengenangaben für einen präparativen Restriktionsverdau.

5.1.6 Ligation

Ligation bezeichnet die Verknüpfung des 3'-Hydroxy mit dem 5'-Phosphatendes zweier DNA-Stränge. Als Katalysator fungiert das Enzym Ligase.

Der Standardansatz für eine Ligation zwischen einem geschnittenen Vektor und einem PCR-Fragment ist in Tab. 7 aufgelistet. Der Ansatz wurde für 5 h bei Raumtemperatur inkubiert, in hitzekompetente TG1 - Zellen transformiert (siehe Kap. 5.1.7) und auf Agarplatten ausgestrichen. Positive Klone wurden nach einer Minipräparation mittels Restriktionsverdau und nachfolgender Sequenzierung identifiziert.

Reagenz	Volumen [μ l]
10 x Ligationspuffer	2
geschnittener Vektor	1
geschnittenes PCR - Fragment	8
T4 Ligase	1
ddWasser	ad 20

Tabelle 7: Pipettierschema für einen Ligationsansatz.

5.1.7 Präparation und Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation dient dem Einbringen von Fremd-DNA in die *E. coli*-Zellen. Durch einen elektrischen oder temperaturbedingten Schock wird die Zellmembran für das Plasmid durchlässig gemacht. Der Vorteil der Elektroporation liegt in der erhöhten Kompetenz der Zellen, allerdings wird ein Elektroporationsgerät benötigt. Je nach Aufgabenstellung wurden für die Transformation entweder TG1-Zellen (Plasmidvermehrung) oder *E. coli* (BL21DE3) (Proteinexpression) verwendet.

5.1.7.1 Hitzekompetente Zellen Zur Herstellung hitzekompetenter Zellen wurde eine Übernackkultur (5 ml) angeimpft und davon am nächsten Tag ein Milliliter auf einen Liter Kultur übertragen. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,5 \pm 0,05$ angezogen. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation auf Eis und

Zentrifugation für 5 min. bei 4 °C und 8000 rpm. Das Pellet wurde in 10 ml eiskalten TSS-Puffer resuspendiert und 1,5 μ l Glycerin zugefügt. Die Zellen konnten dann auf Eis aliquotiert und schockgefroren werden.

Für die Transformation wurden entweder der gesamte Ligationsansatz oder 1 μ l einer QIAgen-Minipräparation mit 170 μ l kompetenten Zellen gemischt und anschließend für eine Stunde auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock fand bei 42 °C für 60 Sekunden statt. Nach Zugabe von 600 μ l LB-Medium wurden die Zellen für 1 min. bei 6000 rpm zentrifugiert und 600 μ l Medium wieder abgenommen. Es folgte das Resuspendieren der Zellen und das Ausstreichen auf Agarplatten.

5.1.7.2 Elektrokompente Zellen Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 3 ml LB-Medium mit dem gewünschten *E. coli* Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Mit 2 ml dieser Kultur wurden 500 ml LB-Medium angeimpft und unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 angezogen. Anschließend wurden die Kolben für 20 min auf Eis gestellt und für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde sodann in 400 ml sterilem, kaltem Glycerin (5 %) gewaschen und resuspendiert. Es folgte eine Wiederholung des Zentrifugationsschrittes und des Waschschrittes, mit dem Unterschied, dass zum Waschen nur 200 ml des Glycerins verwendet wurden. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Pellet in 20 ml sterilem und kaltem Glycerin (20 %) gewaschen. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt (20 min, 4 °C, 4000 rpm), und die Resuspendierung des erhaltenen Pellets in 2,5 ml Glycerin (20 %) an. Die Suspension wurde dann in sterile, vorgekühlte Eppis zu je 80 μ l aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Transformation wurden 10 μ l des Ligationsansatzes zu 50 μ l elektrokompenter Zellen gegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Der Elektroschock erfolgte bei 1,5 V für ca. 7 Sekunden. Danach wurde wie bei hitzekompenten Zellen weiterverfahren, mit Ausnahme, dass die Zellen nach Zugabe von 600 μ l Medium eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert wurden.

5.1.8 Plasmidisolierung

5.1.8.1 Minipräparation Die Reinigung der DNA erfolgte unter Verwendung des *QIAprep Spin Plasmid Kit* und nach dem beiliegenden Protokoll. Die Zellen werden hierbei durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA an eine Säule mit Silicamembran gebunden.

Für die Elution wurden typischerweise 50 μ l TE-Puffer verwendet.

5.1.8.2 Midipräparation Der für die Midipräparation verwendete *QIAGEN Plasmid Midi Kit* beruht auf dem selben Prinzip wie der für die Minipräparation verwendete Kit. Allerdings erfolgt hierbei die DNA-Bindung an eine Anionenaustauschersäule.

Das Elutionsvolumen betrug typischerweise 150 μ l TE-Puffer.

5.1.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach dem von Sanger entwickelten Kettenabbruchverfahren durchgeführt. Dabei werden dem Reaktionsansatz neben Desoxyribonukleotiden auch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) zugefügt, die bei Einbau durch die Polymerase während der Replikation zum Kettenabbruch führen. Anschließend werden die unterschiedlich langen Fragmente durch Kapillarelektrophorese getrennt. Da die verschiedenen ddNTPs unterschiedliche Farbstoffe am 3'-Ende tragen, kann eine photometrische Detektion zur Identifizierung der entsprechenden Base herangezogen werden.

Als erster Schritt wurde eine Sequenzierungs-PCR nach folgendem Schema durchgeführt:

Reagenz	Menge/Volumen
Terminator Reaction mix	4 μ l
Sequenzierungspuffer	2 μ l
template DNA	150-300 ng
Primer	3,2 pmol
Wasser	ad 20 μ l

Tabelle 8: Pipettierschema für die PCR eines Sequenzierungsansatz.

Schritt	T [°C]	t [min]
initiale Strangtrennung	90	1
Strangtrennung	90	1
annealing	60	1
Elongation	72	5
finale Elongation	72	1
Ende	4	halten

Tabelle 9: PCR - Programm für einen Sequenzierungsansatz.

Nach Abschluss der PCR musste die DNA gereinigt und gefällt werden. Dazu wurden dem 20 μ l-Ansatz der PCR 2 μ l einer 125 mM EDTA, 2 μ l einer 3 M Natriumacetat und 50 μ l einer 100 % Ethanollösung zugefügt und durchmischt. Der Ansatz wurde für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 min. bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 400 μ l 70 % Ethanol gewaschen. Es schloss sich ein zweiter identischer Zentrifugationsschritt an. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet getrocknet. Die DNA wurde dann durch Kapillarelektrophorese in einem Servicelabor des Max-Planck-Instituts Dortmund sequenziert.

5.1.10 photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Basen der Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, weshalb sich die Konzentration an DNA in Lösung photometrisch bestimmen lässt. Eine OD von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ca. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNA, 37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einzelsträngiger DNA und 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA. Da Proteine eine Absorption bei 280 nm aufweisen, kann der Koeffizient $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ als Indiz für die Verunreinigung der DNA mit Protein verwendet werden. Ein Wert von ca. 1,8 zeigt saubere DNA an.

Zuerst erfolgte der Abgleich des Gerätes gegen Puffer. Die Konzentration der DNA wurde so gewählt, dass die Absorption zwischen 0,1 und 1,0 liegt, da nur hier der Messbereich des Photometers linear ist.

5.2 Biochemische Methoden

5.2.1 Proteinexpression

Für die Proteinexpression wurden Flüssigkulturen von *E. coli* erstellt. Je nach Größe des Ansatzes wurden entsprechende Mengen LB-Medium autoklaviert und in sterile Kolben oder Reagenzgläser gefüllt. Für größere Menge (>1 L) mussten Vorkulturen über Nacht angesetzt werden ($\frac{1}{20}$ des Endvolumens), die nach Wachstum über Nacht übertragen wurden. Bei Expression eines zu myristoylierenden Proteins musste Myristinsäure zuerst in ausreichender Menge gelöst werden. Um dies zu erreichen wurden 5 mM Myristinsäure zusammen mit 600 μM BSA bei pH 9,0 und einer Temperatur von 45-50 °C bis zum vollständigen Lösen gerührt. Die Proteinexpression wurde bei 27 °C, dem Temperaturoptimum der NMT, für ca. 4 h durchgeführt. Etwa 30 min. vor der Induktion wurden 10 ml gelöste Myristinsäure je Liter Kultur zugegeben. Die Induktion erfolgte mit 0,3 μM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,8-1,2. Nach der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation für 30 min. bei 5000 g und 4 °C geerntet, der Überstand verworfen und die Zellen in PBS-Puffer resuspendiert. Nach einem zweiten, dem ersten identischen, Zentrifugationsschritt wurden die Zellen entweder sofort weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.2 Proteinreinigung

5.2.2.1 Zellaufschluss Das Zellpellet einer geernteten Expressionskultur wurde in dem Waschpuffer für die Affinitätschromatographie (siehe 5.2.2.2) bei 4 °C resuspendiert, wobei für den Aufschluss der Vac8-Proteine 0,1 % Tween und 1 mM PMSF zugesetzt wurden. Im Falle der Nef-Proteine wurde auf Zugabe von sämtlichen Zusätzen verzichtet, da z. B. CHAPS in eine hydrophobe Tasche von Nef bindet. Der Zellaufschluss erfolgte sodann entweder durch einen Fluidizer oder mittels eines Sonicator. Beim Fluidizer geschieht der Aufschluss durch Scherkräfte in einer Scherkammer, wohingegen beim Sonicator Schallwellen den Aufschluss bewerkstelligen. Für kleine Ansätze wurde der Sonicator mit einer Mikrospritze ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) verwendet, für größere Ansätze wurde der Fluidizer bevorzugt.

5.2.2.2 Chromatographische Verfahren Chromatographische Verfahren können für die Trennung von Proteinen herangezogen werden, wobei unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Protein und Matrix ausgenutzt werden. Je nach Eigenschaft der mobilen und der stationären Phase wandern Proteinen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Säule, abhängig von der Stärke der Wechselwirkung mit der stationären Phase.

Sämtliche Proben wurden – falls nötig – durch Dialyse in den entsprechenden Puffer für die jeweilige Chromatographiemethode überführt. Nach jedem Chromatographieschritt wurden die erhaltenen Proben mittels SDS-PAGE analysiert und die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Für den Fall, dass das Protein anschließend nicht einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen wurde, wurde zusätzlich die molekulare Masse mittels ESI-MS ermittelt.

Metallaffinitätschromatographie Durch Metallaffinitätschromatographie ist es möglich ein rekombinantes Protein effektiv von anderen Proteinen und Zellbestandteilen zu trennen. Als Matrix dient z. B. NTA (*nitrilotriacetic acid*), das zweiwertige Nickelionen binden kann. Die Nickelionen wiederum können dann mit einem Histidinanker interagieren. Bei der Klonierung muss hierfür gewährleistet werden, dass das spätere Protein einen Histidinanker trägt, der die Wechselwirkung mit der Säulenmatrix erlaubt.

Sämtliche Nef-Varianten trugen einen C-terminalen Hexahistidinanker, um die N-terminale Myristoylierung zu erlauben. Die Säule wurde vor Benutzung mit 10 cv (*column volume*) Waschpuffer (750 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH (8,0), 30 mM Imidazol, 2,5 mM β -Mercaptoethanol) äquilibriert. Nach Auftragen des Proteins auf die Säule wurde diese so lange gewaschen bis das Chromatogramm wieder eine Absorption in Höhe der Basislinie aufwies. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten des Elutionspuffers (entspricht Waschpuffer mit 300 mM Imidazol) über 10 cv. Nach dem Lauf wurden 1 cv 6 M Guanidinium-Hydrochlorid über die Säule gegeben und zur Lagerung mit 5 cv 1 mM NaN_3 gespült. Nach jedem fünften Lauf wurde die Regeneration der Säule nach dem Protokoll von Qiagen durchgeführt.

Der erste Schritt der Reinigung des myristoylierten Vac8 erfolgte ebenfalls nach diesem Protokoll, allerdings mit Tris-HCl pH (7,8) als Puffer.

Ionenaustauschchromatographie (IEC) Bei der IEC weist die Säulenmatrix entweder positiv (Anionenaustauscher) oder negativ (Kationenaustauscher) geladene funktionelle Gruppen auf. Die Wechselwirkungen zwischen Protein und Austauscher sind elektrostatischer Natur und je nach Ladung des Proteins bei gegebenen pH-Wert verwendet man den entsprechenden Austauscher. Die Elution erfolgt dann entweder durch ein Erhöhen der Ionenstärke oder durch Änderung des pH-Wertes.

Für die Reinigung von myristoyliertem Vac8 wurde das Protein durch Dialyse in einen Puffer mit geringer Salzkonzentration gebracht (30 mM NaCl, 10 mM Tris-

HCl pH (7,8), 1 mM DTE, 10 % Glycerin). Nach Äquilibrieren der Säule wurde das Protein auf die Säule gegeben, die Säule mit ca. 30 cv Puffer gewaschen und das Protein anschließend graduell durch einen Puffer mit hohem Salzgehalt (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH (7,8), 1 mM DTE, 10 % Glycerin) eluiert. Die Fraktionen, die das Protein enthielten wurden vereinigt und durch Dialyse in den gewünschten Puffer überführt (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH (7,8), 1 mM DTE, 10 % Glycerin).

Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) HIC beruht auf der Interaktion hydrophober Proteinbereiche mit dem ebenfalls hydrophoben Säulenmaterial. Durch Zugabe eines chaotropen Salzes wie z. B. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in hoher Konzentration zu der Proteinlösung kommen die hydrophoben Interaktionen zum Tragen. Für die Chromatographie muss darauf geachtet werden, dass das Protein nicht präzipitiert. Die Elution erfolgt durch ein Verringern der Salzkonzentration. Geeignete Salze, die die hydrophoben Interaktionen stärken, lassen sich aufgrund der Hofmeister-Serie ermitteln [151].

Myristoyliertes Vac8 wurde in einen Puffer mit einer hohen Konzentration an Ammoniumsulfat (1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 Tris-HCl pH (8,0), 1 mM DTE, 1 mM EDTA) gebracht und auf eine Phenylsepharosesäule gegeben. Das Waschen der Säule erfolgte mit Hilfe des oben genannten Puffers und einem sich anschließenden linearen Gradienten zu einen Puffer ohne Ammoniumsulfat (20 Tris-HCl pH (8,0), 1 mM DTE, 1 mM EDTA). Da die Interaktion zwischen der Matrix und dem Protein – vermutlich auch aufgrund der Myristoylierung – sehr stark war, musste für die Elution des Proteins dem Puffer zusätzlich Glycerin zugefügt werden. Die Elution erfolgte wiederum über einen linearen Gradienten auf einen Puffer mit 50 % Glycerin (50 % Glycerin, 20 Tris-HCl pH (8,0), 1 mM DTE, 1 mM EDTA).

Größenausschlusschromatographie Bei der Größenausschlusschromatographie werden Moleküle ihrem hydrodynamischen Radius entsprechend getrennt, wobei größere Moleküle früher eluieren als kleinere. Moleküle, deren Größe die der Poren der Gelmatrix übersteigt, sind im Ausschlussvolumen zu finden.

Gelfiltration wurde immer dann eingesetzt, wenn die Reinheitsgrad von Nef oder Vac8 nicht ausreichend war. Das maximale Probenvolumen, das auf die präparative Säule (S75, Superdex) gegeben wurde, betrug 1 ml. Die Säule wurde vor Nutzung mit 2 cv Puffer (750 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM DTE) äquilibriert. Für die Flußrate wurden $\leq 1,5$ ml/min gewählt.

5.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, weshalb sich die Konzentration eines Proteins in Lösung photometrisch bestimmen lässt. Die Konzentration ergibt sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \quad (1)$$

mit c = Konzentration, E = Extinktion, ϵ = Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke

Der theoretische Extinktionskoeffizient des Proteins wurde mittels des Programms ProtParam⁴ ermittelt. Die Konzentration wurde wie bei jeder photometrischen Messung zwecks Linearität so gewählt, dass die Extinktion zwischen 0,1 und 1 lag. Einen Hinweis auf eine Verunreinigung der Probe mit Nukleinsäuren gibt der Quotient der Absorptionsmessung bei 280 nm und 260 nm. Der ideale Wert, der keine Kontamination mit Nukleinsäuren anzeigt, liegt bei $\frac{A_{280}}{A_{260}}=1,75$.

5.2.4 Elektronenspray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)

ESI-MS kann für die Massenbestimmung von Proteinen eingesetzt werden. Dafür wird die Analytflüssigkeit über eine Kapillare, an der ein elektrisches Feld in der Größenordnung von einigen keV anliegt, zugegeben. An der Spitze der Kapillare bildet sich ein Konus, an welchem sich aufgrund des elektrischen Feldes eine Ladungstrennung ereignet. Von diesem Konus geht ein konstanter Flüssigkeitsstrom aus, der bei steigendem Abstand zur Anode instabil wird und es bilden sich ladungstragende Tropfen. Von diesen Tropfen verdunstet Lösungsmittel bis die elektrostatische Abstoßung der Oberflächenladungen größer als die Oberflächenspannung ist. Bei Erreichen dieses Raleigh Limits zerfallen die Tropfen in viele kleine Tropfen. Aus diesen Mikrotropfen entstehen die gasförmigen Ionen, die detektiert werden können.

Die Entsalzung der Probe wurde durch eine dem Massenspektrometer vorgeschalteten HPLC mit einer C₄ - Säule erzielt. Für die Analyse wurden typischerweise 30 μ l einer 150-250 μ M Proteinlösung verwendet. Zur Analyse der Ionen diente eine Ionenfalle und die Auswertung erfolgte mittels des Programmes MagTran.

5.2.5 MALDI-TOF

Für die massenspektrometrische Bestimmung eines Proteins wird das Protein im ersten Schritt mit einer geeigneten Matrix, die bei der verwendeten Laserwellenlänge absorbiert, kokristallisiert. Durch Beschuss der Probe mit Laserpulsen im Nanosekunden-Bereich wird sowohl die Matrix als auch das Analytmolekül schlagartig desorbiert und ionisiert. Die gebildeten Ionen werden durch ein elektrisches Potential beschleunigt und durch die Messung der Zeit, die die Ionen für eine definierte Flugstrecke im sog. Flugrohr benötigen, kann auf ihre Masse zurückgeschlossen werden.

Für die Massenbestimmung wurde ein Voyager DE-Pro MALDI Massenspektrometer verwendet. Als Matrix wurde 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure), die eine Absorption bei 266, 337 und 355 nm aufweist, eingesetzt. Im ersten Schritt wurde eine gesättigte Lösung der Matrix in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (50:50) mit 0,1 % TFA angesetzt. Überschüssige Matrix wurde durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge entfernt. 1 μ l und eine 1:10 bzw. 1:100-Verdünnung

⁴<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>

des zu analysierenden Proteins wurden 1:1 mit der gelösten Matrix auf einer Metallprobenplatte gemischt. Durch Verdunsten der Lösungsmittel bildeten sich die Analytkristalle. Die Desorption erfolgte mit einem gängigen Laser wie z. B. N_2 oder Nd:YAGx3, die bei einer Wellenlänge von 337 bzw. 355 nm emittieren.

5.2.6 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird angewendet, um eine Aussage über die Reinheit und Zusammensetzung einer Proteinprobe zu erhalten. Das im Probenpuffer enthaltene, anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich dabei in einem Verhältnis von ca. 1 Molekül SDS pro 2 Aminosäuren an das Protein an und maskiert dessen Ladung. Die negative Ladung des SDS ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse.

Für die Elektrophorese wurden in der Regel 15%ige Polyacrylamidgele verwendet, die nach Polymerisation mit einem 6%igen Sammelgel überschichtet wurden. Die Proteinproben wurden mit 2x Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 2 min. erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Polyacrylamidgel durch Aufkochen in Färbelösung zuerst gefärbt, gefolgt von der Entfärbung des Gels, wodurch der Farbstoff nur an Proteinen gebunden bleibt.

Lösung	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
Wasser	2,4	1,35
30 % (w/v) Acrylamid	5	0,025
Trenngelpuffer	2,5	
Sammelgelpuffer		0,625
10 % SDS	0,1	0,025
10 % APS	0,05	0,0125
TEMED	0,005	0,00125

Tabelle 10: Pipettierschema zur Herstellung eines 15%igen Polyacrylamidgels.

Sammelgelpuffer	Trenngelpuffer	2x Probenpuffer
0,5 M Tris-HCl pH (6,8)	1,5 M Tris-HCl pH (8,8)	62,5 M Tris-HCl pH (6,8)
0,4 % (w/v) SDS	0,4 % (w/v) SDS	2 % (w/v) SDS
		25 % (v/v) Glycerin
		0,01 % (w/v) Bromphenolblau
		10 % β -Mercaptoethanol

Tabelle 11: Verwendete Lösungen für die SDS-PAGE.

10x Laufpuffer	Färbelösung	Entfärbelösung
0,25 M Tris-HCl pH (8,3)	0,1 % (w/v) Coomassie R250	5 % (w/v) Essigsäure
2 M Glyzin	5 % (v/v) Essigsäure	10 % Ethanol
1 % (w/v) SDS	10 % (v/v) Ethanol	

Tabelle 12: Verwendete Lösungen für die SDS-PAGE (Fortsetzung).

5.2.7 Western Blot

Ein Western Blot erlaubt den sensitiven Nachweis eines Proteins unter Verwendung der SDS-PAGE und nachfolgendem Übertrag des Proteins auf eine Nitrozellulosemembran durch ein elektrisches Feld. Die Detektion erfolgt sodann mit Antikörpern. Zuerst wurde eine SDS-PAGE (siehe 5.2.6) mit den gewünschten Proben und einem Marker, der bereits einen Farbstoff enthielt, durchgeführt. Das Gel wurde nicht gefärbt, sondern zusammen mit Whatmanfilterpapier für 15 min. in Transferpuffer eingelegt. Bei konstanter Spannung und einem Strom von 5 mA pro cm² Gelfläche wurde das Protein von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit PBS-T und Blocken der Membran über Nacht mit einer 1:10 Verdünnung Blockreagenz. Nach dreimaligen Waschen wurde die Membran mit einem gegen den Histidin-Tag des Protein gerichteten Kaninchen anti-His Antikörper für eine Stunde inkubiert. Es wurde ein Verdünnung 1:2000 (in PBS-T mit 5 % Magermilchpulver) eingesetzt. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen entfernt. Es folgte die Inkubation der Membran mit einem zweiten, peroxidasegekoppelten, gegen den primären Antikörper gerichteten, sekundären Antikörper für 1 h bei RT. Nach weiteren drei Waschschritten wurde der Blot in einem Fotolabor unter Verwendung eines lichtsensitiven Films ausgewertet.

5.2.8 PIP-Strips

PIP-Strips bestehen aus einer Nitrozellulosemembran, die mit 100 pmol verschiedener Lipide dotiert ist. Mittels PIP-Strips kann die Bindung von Proteinen an Lipide abschätzt werden.

Zuerst wird die Membran ü.N. bei 4 °C mit 9 ml PBS-T (entspricht PBS + 0,05 % Tween 20) + 1 ml Blocking-Reagenz geblockt. Die Flüssigkeit wird verworfen und 9 ml PBS-T + 1 ml Blocking-Reagenz + Protein (Endkonzentration 1 µg/ml) zugefügt. Nach dreimaligen Waschen mit PBS-T wird genauso weiter verfahren wie beim Western Blot (siehe Kap. 5.2.7).

5.2.9 Farnesylierung

Die Farnesylierung einer Nef-Mutante mit entsprechendem Prenylierungsmotiv wurde mit Hilfe der FTase (der Ratte entlehnt) erzielt. Dafür wurde die FTase in einer Konzentration von 1:1000 im Verhältnis zu dem zu modifizierenden Protein eingesetzt

und Farnesylpyrophosphat in zweifachem Überschuss, ebenfalls im Verhältnis zum Protein, zugegeben. Der Puffer für die Farnesylierung enthielt 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH (8,0), 1 mM DTE und 100 mM ZnSO₄. Die erfolgreiche Farnesylierung wurde mittels ESI-MS überprüft.

5.2.10 Herstellung von Liposomen

5.2.10.1 LUVs (*large unilamellar vesicles*) LUVs zeichnen sich durch einen Durchmesser zwischen 0,1 μm und 1 μm aus und wurden mit Hilfe eines Extruders präpariert. Sämtliche Schritte wurden unter Helium- bzw. Argonatmosphäre durchgeführt. Als erstes wurden die errechneten Mengen an in Chloroform gelösten Lipiden in einen Spitzkolben pipettiert, und das Chloroform unter leichtem, später stärkeren Heliumstrom in einem Rotationsverdampfer für insgesamt ca. 45 min evaporiert. Zu dem gebildeten Lipidfilm wurde das gewünschte Volumen wässriger Pufferlösung gegeben und nach ca. 30 min wurde der Kolben für weitere 30 min schüttelgerührt. Danach wurde die Liposomenlösung zuerst durch einen Filter mit einem Durchmesser von 400 nm extrudiert und anschließend mit einem weiteren Filter ($\text{\O} = 100\text{-}200\text{ nm}$) auf die gewünschte Größe gebracht. Die Lösungen wurde jeweils 15 Durchgängen durch einen Filter unterworfen. Liposomen, die einen Anteil eines Farbstoffes enthielten, wurden unter Lichtausschluss präpariert.

5.2.10.2 SUVs (*small unilamellar vesicles*) Die Herstellung von Liposomen mit einem Radius kleiner als 0,1 μm , der sog. SUVs, erfolgte entweder nach der oben erwähnten Methode für LUVs oder durch Ultraschall. Hierfür wurde die Liposomenlösung wie für Herstellung der LUVs präpariert, diese dann allerdings in ein Ultraschallbad gegeben, bis die trübe Lösung klar wurde. MLVs (*multilamellar vesicles*) wurden durch Zentrifugation bei 50.000 g abgetrennt.

5.2.11 Lipidkonzentrationsbestimmung der Liposomen

Die Konzentrationsbestimmung des Gesamtlipidgehalts erfolgte mittels eines Protokolls von Avanti Polar Lipids⁵. Dazu wurden 6 Mengen eines Phosphatstandards (0, 2, 4, 6, 8, 10 μg Phosphor; als Hydrogenphosphat eingesetzt) und Proben der Liposomen (bis in diesen Bereich verdünnt) in dickwandige Reagenzgläser pipettiert. Um das organische Phosphat freizusetzen, wurden 0,45 ml einer 8,9 N Schwefelsäure zugesetzt und die Proben für 25 min auf 215 °C erhitzt, wobei eine Braunfärbung der Lösung eintritt. Die Proben wurden sodann für 5 min. abgekühlt und 150 μl H₂SO₄ zugegeben, die Proben dann weitere 30 min bis zu Entfärbung erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 3,9 ml entionisiertes Wasser zugesetzt, und anschließend 0,5 ml Ammoniummolybdat und 0,5 ml Ascorbinsäure zugegeben, wobei die Proben jeweils nach Zugabe fünfmal schüttelgerührt wurden. Die Reagenzgläser wurden mit Metallkappen abgedeckt und für 7 min auf 100 °C erhitzt. Das entstan-

⁵<http://www.avantilipids.com/DeterminationofTotalPhosphorus.html>

dene Phosphormolybdänblau wurde dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 820 nm bestimmt.

5.2.12 Kosedimentation mit Liposomen

Die Kosedimentation mit Liposomen dient dazu, die Bindung von z. B. Proteinen oder Peptiden an Modellmembranen nachzuweisen.

Dazu wurden Liposomen in einer Konzentration von 1 mM präpariert und das Nef Protein in einer Konzentration von 1 μ M zugegeben. Das CD4-Peptid wurde bereits bei der Präparation der Liposomen zugefügt. Dabei wurde den in Chloroform gelösten Lipiden 22,7 μ l einer 9,7 μ M Lösung des Peptids zugesetzt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 200.000 g für 4 h. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 150 μ l des für die Vesikelpräparation verwendeten Puffers resuspendiert. Es wurden 20 μ l des Überstandes und 4 μ l bzw. 20 μ l des Pellets mit SDS-Probepuffer auf 30 μ l ergänzt und anschließend eine SDS-PAGE durchgeführt. Es folgte die Detektion des fluoreszierenden Peptids mittels eines Fluoreszenzscanners und die Detektion des Proteins mittels Coomassiefärbung.

5.3 Biophysikalische Methoden

5.3.1 Analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltration dient dazu, die Masse z. B. eines Proteins oder Proteinkomplexes abzuschätzen. Ebenso wie bei der präparativen Gelfiltration eluieren große Moleküle schneller als kleine Moleküle von einer Säule, die eine poröse stationäre Phase enthält. Durch Auftragen eines Standards kann sodann die Masse des Proteins errechnet werden.

Die Analytische Gelfiltration wurde unter Verwendung eines Waters 626 LC Systems und einer Säule Superdex 75 oder Superdex 200 durchgeführt. Die entsprechende Säule wurde vor der Messung in 100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH (8,0) und gegebenenfalls mit 2 mM DTE äquilibriert. Sämtliche Proteine wurden zuvor über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Als Flußrate wurden 1,0 ml/min gewählt und alle Experimente wurden bei RT gemessen. Der Standard für die Massenbestimmung enthielt: Thyroglobulin (670 kDa), bovine-globulin (158 kDa), chicken ovalbumin (44 kDa), equine myoglobin (17 kDa), und Vitamin B12 (1,35 kDa). Für die Bestimmung des Totvolumens wurde Dextranblau verwendet, das aufgrund seiner großen Masse nicht in die Poren der stationären Phase binden kann. Von dem zu messenden Protein wurden 90 μ l einer Konzentration von 1 mg/ml injiziert.

5.3.2 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung (DLS) werden zeitabhängige Fluktuationen der Lichtstreuung gemessen, die aufgrund der Brownschen Bewegung von Molekülen entstehen. Aus der erhaltenen Korrelationsfunktion lässt sich der Diffusionskoeffizient

errechnen, und über die Stokes-Einstein-Gleichung können Rückschlüsse auf den hydrodynamischen Radius eines Moleküls gezogen werden.

DLS wurde für die Größenbestimmung präparierter Vesikel verwendet. Die Messungen wurden in einem DynaProTitanTM von Wyatt Technologies durchgeführt. Dazu wurden die Vesikel auf ca. 0.1 mM Gesamtlipid verdünnt und die Laserintensität so gewählt, dass der Photonenzähler im linearen Bereich arbeitete. Es wurden je Probe 10 Akkumulationen über 10 Sekunden gemessen. Die Auswertung der Größe erfolgte mit der dem Gerät zugehörigen Software unter Annahme einer sphärischen Form der Vesikel und PBS (*phosphate buffered saline*) als Lösungsmittel.

5.3.3 CD-Spektroskopie

CD (*circular dichroism*) bezeichnet die unterschiedliche Absorption von rechts- bzw. linkszirkular polarisiertem Licht eines Moleküls. Diese Methode wird vor allem eingesetzt, um die Sekundärstruktur von Proteinen zu untersuchen, da diese im fernen UV je nach Art und Ausdehnung der Sekundärstrukturelemente unterschiedliche Spektren liefern. Ein schrittweises Aufheizen der Probe und das dadurch erzielte Entfalten des Proteins liefert eine Aussage über die thermische Stabilität eines Proteins. Sämtliche Messungen wurden in einem J-815 CD-Spektrometer der Firma JASCO durchgeführt. Die Nef-Proteine wurden am Tag vor der Messung gegen 5 mM KPi pH (8,0) dialysiert, die Konzentration dreifach bestimmt und anschließend auf 6 μ M verdünnt. Dann erfolgte eine weitere 1:1 Verdünnung, entweder mit Liposomen, hergestellt aus 500 μ M der Lipide DOPC (70 %) und DOPG (30 %), oder mit Puffer. Für die Messungen wurden folgende Parameter verwendet: Stickstofffluss: 3 L/min, Temperatur: 25 °C, Datapitch: 0,5 nm, Wellenlänge: 250-190 nm, Integrationszeit: 0,5 s, Küvettenvolumen: 700 μ l; Schichtdicke: 2 mm.

Für die thermale Denaturierungsmessung wurden die Proteine wieder am Vortag der Messung gegen 5 mM KP_i pH (8,0) dialysiert und die Konzentration einfach bestimmt. Für die Messungen wurden folgende Parameter verwendet: Aufgenommene Wellenlänge: 222 nm, Temperaturbereich: 4 °C - 85 °C, Stickstofffluss: 3 L/min, Datapitch: 0,2 nm, Integrationszeit: 2 s, Bandwidth: 2 nm, Küvettenvolumen: 700 μ l, Schichtdicke: 2 mm. Der Scan wurde anschließend wieder rückwärts von 85 °C nach 4 °C durchgeführt.

$$\Theta = \frac{mdeg}{\text{Pfadlänge [mm]} \cdot \text{Proteinkonzentration [M]} \cdot \text{Anzahl der AS}} \quad (2)$$

Die erhaltene Elliptizität wurde dann über Gleichung 2 in die mittlere residuale Elliptizität umgerechnet. Die Kurvenanpassung erfolgte mit dem Analyseprogramm von JASCO. Die Herleitung der verwendeten Formel ist in einer Übersichtsarbeit von Greenfield zu finden [152].

5.3.4 Fluoreszenzmessungen

Wird ein Molekül durch Absorption eines Photons in einen angeregten Zustand versetzt, so kann es auf unterschiedliche Weise in den Grundzustand zurückkehren. Ge-

schiebt dies als Singulett-Singulett-Übergang ($S_1 \rightarrow S_0$) unter Emission eines Photons, so spricht man von Fluoreszenz. Die Aminosäure Tryptophan stellt durch ihren Indolring ein natürliches Fluorophor dar, und somit besteht die Möglichkeit die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins zu untersuchen.

Alle Messungen wurden bei 30 °C in einem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Die Exzitation von Tryptophan erfolgte bei 284 nm und die Emission wurde bei 340 nm beobachtet. Untersuchungen des Farbstoffes β -DPH-HPC erfolgten durch Anregung bei 340 nm und Beobachtung der Emission bei 460 nm. Die Konzentration der Proteine betrug 38 μ M, die der Vesikel 100-1000 μ M Gesamtlipid.

5.3.5 FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)

FRET bezeichnet einen Prozess, bei dem Energie strahlungslos von einem Donorfluorophor auf ein Akzeptorfluorophor übertragen wird, die räumliche Nähe beider Fluorophore vorausgesetzt. Der Radius bei dem 50 % Energieübertrag für ein gegebenes Donor-Akzeptor-Paar erfolgt, wird als Försterradius bezeichnet. Der Försterradius liegt im Nanometerbereich und beträgt z. B. für Tryptophan und 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) 40 Å [153]. Die Effizienz des Energieübertrages ist durch Gleichung 3 gegeben und hängt von der sechsten Potenz des Abstandes ab.

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (3)$$

mit E_{FRET} = Effizienz des Energieübertrages, R = Entfernung der beiden Fluorophore, R_0 = Försterradius.

Es wurde der Förstertransfer zwischen den Tryptophanen in Nef und dem in die Vesikel intergrierten Farbstoff β -DPH-HPC beobachtet.

5.3.6 *Stopped Flow* und Kinetik

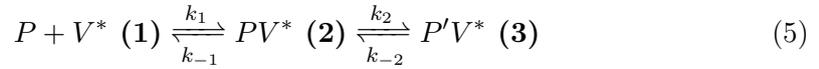
Die *Stopped Flow* Technik wird für Fluoreszenzmessungen schneller Reaktionen im Sekunden- bis Millisekundenbereich angewendet. Dabei werden die Analytlösungen zunächst jeweils in getrennte Spritze gegeben. Durch eine Rampe werden sodann beide Lösungen simultan in einer Mischkammer zusammengeschossen und nach einer Totzeit von ca. 1 ms die zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität verfolgt.

Die Messungen erfolgten in einer *Stopped Flow*-Apparatur (Applied Photophysics). Die eingesetzte Konzentration an Gesamtlipid betrug zwischen 5 und 1000 μ M, die des Proteins in der Spritze 0,4 μ M. Die Exzitation wurde bei 280 nm gewählt und die Emission durch einen 420 nm cut-off Filter beobachtet. Für die Auswertung wurden i.d.R. 7-10 Messungen gemittelt und die erhaltenen Daten wurden mittels einer biexponentiellen Gleichung (siehe Gleichung 4) angepasst.

$$F(t) = F_{max} + \sum_{i=1}^{n-2} A_{(i)obs} e^{(-k_{(i)obs}t)} \quad (4)$$

mit $F(t)$ = Fluoreszenz zum Zeitpunkt t , $A_{(i)obs}$ = Amplitude der i -ten Exponentialfunktion, $k_{(i)obs}$ = beobachtete Ratenkonstante der i -ten Exponentialfunktion, t = Zeit, n = Anzahl der Exponentialfunktionen; für eine biexponentielle Funktion gilt $n = 2$.

Die Bindung von Nef an Vesikel kann durch Gleichung 5 beschrieben werden. Die zwei Phasen, die durch die biexponentielle Kurvenanpassung erhalten werden, entsprechen zum einem der Bindung von Nef an Vesikel und zum anderen einer Isomerisierung.



mit P = Protein, V^* = Bindungsplatz für Nef auf einem fluoreszenzmarkierten Vesikel, P' = Protein in anderem Zustand

Da die Konzentration an Bindungsplätzen auf den Vesikeln im Überschuss im Vergleich zu Nef eingesetzt wurde (siehe Kap. 25), kann eine Reaktion pseudo-erster Ordnung vorausgesetzt werden kann. Weiterhin äquilibriert die erste Gleichgewichtsreaktion viel schneller als das Gleichgewicht (2) $\xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2}$ (3). Das zweite Gleichgewicht beschreibt eine Isomerisierung des Proteins, die ca. um den Faktor 10 langsamer abläuft. Generell ist $k_{(1)obs}$ durch Gleichung 6 gegeben, die sich aber wegen der oben erwähnten Voraussetzungen zu Gleichung 7 vereinfachen lässt .

$$k_{(1)obs} = k_{-1} + k_1 * [V] + k_2 + k_{-2} \approx k_{-1} + k_1 * [V] \quad (6)$$

$$k_{(1)obs} \approx k_{-1} + k_1 * [V] \quad (7)$$

Für die zweite beobachtete Ratenkonstante $k_{(2)obs}$ gilt Gleichung 8, die eine hyperbolische Funktion beschreibt. Die Betrachtung als von Gleichgewicht (1) \rightleftharpoons (2) unabhängiges System ist erlaubt, da der Zustand (2) stark bevorzugt ist und somit der Term $\frac{K_1 * [V]}{1 + K_1 [V]}$ annähernd 1 ergibt.

$$k_{(2)obs} = k_2 \frac{K_1 * [V]}{1 + K_1 [V]} + k_{-2} \approx k_2 + k_{-2} \quad (8)$$

Die erhaltenen Ratenkonstanten $k_{(1)obs}$ und $k_{(2)obs}$ wurden gegen die Konzentration der oberflächenzugänglichen Lipide aufgetragen. Dafür wurde die Konzentration des Gesamtlipids bestimmt (siehe Kap. 5.2.11) und die 1:2 Verdünnung im *Stopped Flow* berücksichtigt. Da Vesikel aus einer Membrandoppelschicht bestehen, wurde angenommen, dass ebensoviele Lipide an dem Aufbau der inneren, nicht zugänglichen Membranschicht beteiligt sind. Gleichung 6 entspricht einer Geradengleichung und eine lineare Regression dieser Daten liefert k_{on} (Steigung der Geraden) und der

Schnittpunkt mit der Ordinate liefert k_{off} . K_d ergibt sich dann aus dem Verhältnis k_{off}/k_{on} . Aufgrund der Ungenauigkeit dieser Methode wurde bei der Bestimmung von k_{off} zusätzlich die Dissoziation untersucht, indem der Komplex aus Nef und Vesikel mit einem 10-fachen Überschuss nicht fluoreszenzmarkierter Vesikel zusammengebracht wurden.



Aufgrund des Überschusses an unmarkierten Vesikeln liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion auf der rechten Seite und nahezu sämtliche Nef Moleküle liegen am Ende im Komplex mit unmarkierten Vesikeln vor.

Um die Anzahl der Lipide zu bestimmen, die eine Bindungsstelle für ein Molekül Nef bilden, wurde eine Titration durchgeführt. Hierzu wurden $0,2 \mu\text{M}$ myrNef(wt) gegen verschiedene Konzentrationen von Vesikeln im *Stopped Flow* gemessen. Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, dass das Verhältnis von Lipid zu Protein von sehr gering bis hin zu hohem Überschuss reichte. Die Vesikel setzten sich aus 66% DOPC, 30% DOPG und 4% β -DPH-HPC zusammen. Die Kurvenanpassung der erhaltenen Daten erfolgte nach Gleichung 10 (Herleitung: siehe Anhang).

$$F = F_0 + \frac{(F_\infty - F_0)}{2 \cdot [P_0]} \cdot \left([P_0] + n \cdot [L_0] + K_d - \sqrt{([P_0] + n \cdot [L_0] + K_d)^2 - 4 \cdot [P_0] \cdot n \cdot [L_0]} \right) \quad (10)$$

mit F = Fluoreszenzsignal, F_0 = Fluoreszenzintensität ohne Ligand, F_∞ = Fluoreszenzintensität bei maximaler Sättigung mit Ligand, $[P_0]$ = Konzentration des Proteins, $[L_0]$ = Konzentration der Lipide, K_d = Dissoziationskonstante, n = Anzahl der Bindungsstellen.

5.4 Oberflächenplasmonresonanz

In Metallen wie z.B. Gold können die Valenzelektronen näherungsweise als Elektronengas aufgefasst werden. Transversale Wellen, die an der Grenzfläche zwischen Metall und angrenzendem Dielektrikum zu finden sind, werden als Oberflächenplasmonen bezeichnet. Diese können, falls der Wellenvektor des eingestrahlt Licht mit dem des Oberflächenplasmons übereinstimmt, optisch angeregt werden. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass das einfallende Licht von einem optisch dichteren in ein optisch weniger dichtes Medium übergeht. Oberhalb eines kritischen Winkels tritt dann die Totalreflektion des Lichts ein, wobei eine evaneszente Welle auftritt, die mit den Oberflächenplasmonen interagieren kann. Bei Anregung eines Oberflächenplasmons wird die Totalreflektion des Lichts abgeschwächt und es wird ein scharfes Minimum in der winkelabhängigen Reflektion beobachtet. Eine Änderung des Brechungsindex z. B. führt auch zu einer Änderung des SPR (*surface plasmon resonance*)-Winkels, der die Basis für das Signal darstellt.

SPR wurde eingesetzt um Bindung von Nef an Vesikel zu verfolgen. Für die Messungen wurde ein Biacore 3000 mit einem L1-Chip, der mit Vesikeln beladen werden kann, verwendet. Die Temperatur für die Messungen betrug 25 °C. Protokolle, die für das Biacore verwendet wurden:

Reagenz	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]	injiziertes Vol. [μl]	Waschdauer (Puffer) [s]
Isopropanol/50 mM NaOH 2:3	50	100	60
3 M Guanidiniumhydrochlorid	5	20	60
40 mM Octylglykosid	5	30	420

Tabelle 13: Protokoll für die Reinigung des Chips.

Reagenz	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]	injiziertes Vol. [μl]	Waschdauer (Puffer) [s]
Vesikel (0,8 mM Lipid)	2	15	300
Vesikel (0,8 mM Lipid)	2	15	480
Puffer	100	20	300
10 mM NaOH	5	10	120

Tabelle 14: Protokoll für die Beladung des Chips mit Vesikeln.

Reagenz	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]	injiziertes Vol. [μl]	Waschdauer (Puffer) [s]
Protein (0,125-10 μM)	5	35-70	1800

Tabelle 15: Protokoll für die Bindungsreihe von Protein an die Vesikel.

Zuerst erfolgte die zweifache Reinigung des Chips, dann wurde der Chip mit Liposomen beladen und die Bindungsreihe des Proteins an die Liposomen folgte. Erfolgte die Messung bei gleichbleibender Vesikelzusammensetzung und es wurde nur die Proteinkonzentration geändert, wurde der Chip nur einmalig zwischen den Messungen gereinigt, ansonsten zweifach. Die Auswertung der Messungen erfolgte nur qualitativ über die Änderung der Amplitude, da ein Fit der erhaltenen Daten mit dem vom Hersteller bereitgestellten Programm nicht möglich war.

6 Ergebnisse

Die Untersuchung der Bindung des HIV-1 Nef_{SF2} Proteins an Modellmembranen bildet den Kern dieser Arbeit. Der erste Abschnitt der Ergebnisse befasst sich mit der Expression und der Charakterisierung des myristoylierten Nef Proteins, während der zweite Abschnitt die kinetischen und biophysikalischen Ergebnisse der Protein-Liposom-Interaktion darstellt. Zum Schluss wird auf die Membranbindung eines artifiziell farnesylierten Nef Proteins eingegangen, und die Charakterisierung eines weiteren myristoylierten Proteins, Vac8, beschrieben.

6.1 Klonierung von HIV-1 Nef_{SF2}

Um die Membranbindung des nativen HIV-1 Nef_{SF2} Proteins zu untersuchen, musste das Protein in ausreichender Menge und mit hohem Reinheitsgrad gewonnen werden. Zudem musste eine Myristoylierung des Proteins erzielt werden. Hierfür wurde *E. coli* als bakterielles Expressionssystem gewählt. Da eine Myristoylierung in *E. coli* nicht stattfindet, standen zwei Varianten zur Auswahl, um diese zu erzielen. Zum einen kann die N-Myristoyl-Transferase (NMT) separat gereinigt werden und anschließend in einem Ansatz *in vitro* mit dem zu myristoylierenden Protein – unter Zugabe des Kosubstrates Myristinsäure – eingesetzt werden [72]. Zum anderen kann die Myristoylierung durch Koexpression des Substrats und der NMT in *E. coli in vivo* erfolgen. [154, 155]. Auch bei diesem Ansatz muss eine Zugabe von Myristinsäure erfolgen. Da letztere Variante weniger Reinigungsschritte umfasst, sollte die Myristoylierung von Nef durch Koexpression von Nef und der humanen NMT, die den Transfer der Myristinsäure katalysiert, bewerkstelligt werden. Hierzu wurden zwei Plasmide generiert, die die genetische Information von Nef bzw. der NMT enthielten.

Nef und sämtliche in Tab. 16 aufgeführten Mutanten des Proteins wurden in den Vektor pET23d subkloniert, der eine Ampicillinresistenz aufweist. Für die Reinigung des Proteins mittels Metallaffinitäts-Chromatographie enthält der Vektor einen C-terminalen Histidinanker. Durch die Wahl geeigneter Restriktionsenzyme wurde gewährleistet, dass Nef ein initiales Methionin trägt, damit die N-terminale Myristoylierung erfolgen kann. Das Plasmid der NMT wurde freundlicherweise von Dr. J.I. Gordon (*Washington University School of Medicine*) zur Verfügung gestellt. Das Gen wurde in den Vektor pET30a, der eine Kanamycinresistenz trägt, subkloniert. Der Histidinanker wurde durch die Klonierung entfernt, um eine gemeinsame Reinigung der NMT mit Nef zu verhindern.

Bezeichnung	Mutationen	Beschreibung
myrNef(wt)	-	Wildtyp von Nef _{SF2}
Nef(G2A)	G ₂	myristoylierungsdefizientes Nef
myrNef(R4)	R ₁₇ , R ₁₉ , R ₂₁ , R ₂₂	Mutation basischer AS
myrNef(WMW)	W ₅ , M ₁₀ , W ₁₃	Mutation hydrophober AS
myrNef(WR)	W ₅ , M ₁₀ , W ₁₃ , R ₁₇ , R ₁₉ , R ₂₁ , R ₂₂	Kombination der Mutationen von Nef(R4) und Nef(WMW)
Nef(59)	Δ59	Deletion der N-terminalen 59 AS

Tabelle 16: Bezeichnung der bei den Messungen verwendeten Nef-Konstrukte. Sämtliche Mutationen wurden zu Alanin durchgeführt. Alle Konstrukte, ausgenommen Nef(G2A) und Nef(59), wurden myristoyliert. Weiterhin trugen alle hier beschriebenen Varianten die Mutation $C_{210}S$.

Die Koexpression von Nef mit der NMT in *E. coli* unter Beigabe von Myristinsäure führte zu vollständig myristoyliertem Nef Protein in hoher Ausbeute. Ein verändertes Laufverhalten des lipidierten Proteins in der SDS-PAGE, wie es z. B. für Arf1 nach Myristoylierung beobachtet wurde [156], war im Fall von Nef nicht zu beobachten. Allerdings konnte die erwartete Erhöhung der molekularen Masse mittels ESI-MS nachgewiesen werden. Sämtliche generierten Mutanten von Nef wiesen ebenfalls eine vollständige Myristoylierung auf. Die Löslichkeit der myristoylierten Proteine wie auch der nicht myristoylierten Nef Proteine war sehr gut, und die Proteine konnten auf hohe Konzentrationen von 20 mg/ml gebracht werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der N-terminale Myristinanker nicht solvens exponiert ist, sondern an das Protein bindet. Ein solcher Myristin-Schalter ist für mehrere Proteine bekannt [70] und auch für Nef wurden inzwischen Hinweise für einen solchen Schalter gefunden [34, 157].

6.2 Expression und Reinigung von HIV-1 Nef_{SF2}

Die Expression der Proteine erfolgte bei einer Temperatur von 30 °C, dem Temperaturoptimum der NMT. Vor Induktion wurden 50 μM gelöster Myristinsäure je Liter Kultur zugefügt, um einen Überschuss an Kosubstrat für die NMT zu erzielen. Für die Expression wurden die Plasmide von Nef und der NMT in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen kotransformiert, wobei die Effizienz der Transformation in elektrokompente Zellen deutlich höher war als bei der Verwendung hitzekompetenter Zellen. Bei Nef(G2A) und Nef(59) wurde von einer Kotransformation mit der NMT abgesehen, da diese Proteine nicht myristoyliert werden können. Die Reinigung über Metallaffinitäts-Chromatographie (siehe Kap. 5.2.2.2) war in der Regel ausreichend, um einen hohen Reinheitsgrad zu erzielen. Im Falle einer ungenügenden Reinheit wurde das Protein mittels Gelfiltration weiter gereinigt. Es wurden zunächst nur geringe Mengen der Proteine isoliert, nach einer Codonoptimierung steigerte sich die Ausbeute des Nef-Proteins – je nach Konstrukt – jedoch auf bis zu 50 mg je Liter Kultur. Bei der Codonoptimierung wurden in *E. coli* selten genutzte Codons (z. B. AGG) durch stille

Mutationen in häufig genutzte Codons überführt [34]. Der Myristoylierungsgrad der Proteine wurde mittels ESI-MS und MALDI-TOF überprüft und beide Methoden zeigen eine vollständige Myristoylierung der Proteine auf (siehe Abb. 11).

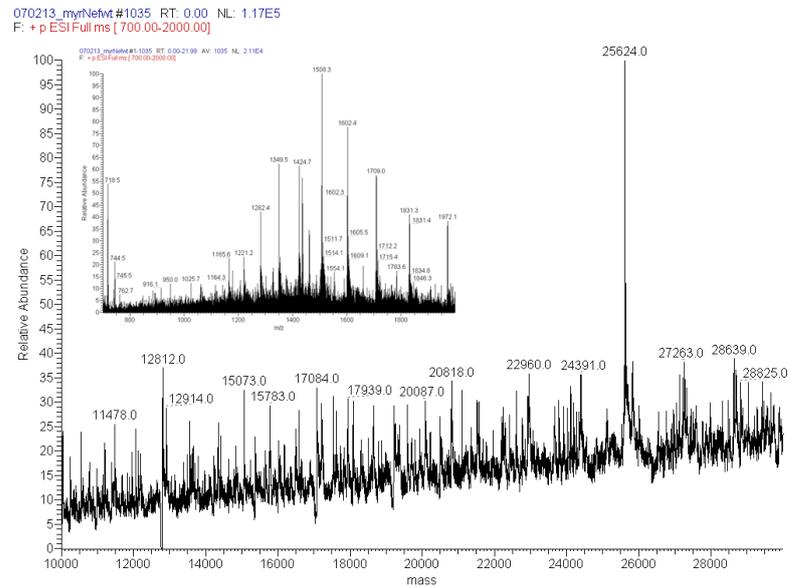


Abbildung 11: Dekonvoluiertes ESI-Massenspektrum von myrNef(wt) C210S; Die Masse von 25.624 Da stimmt exakt mit der erwarteten Masse überein. Im Fenster: Originales, nicht dekonvoluiertes Spektrum.

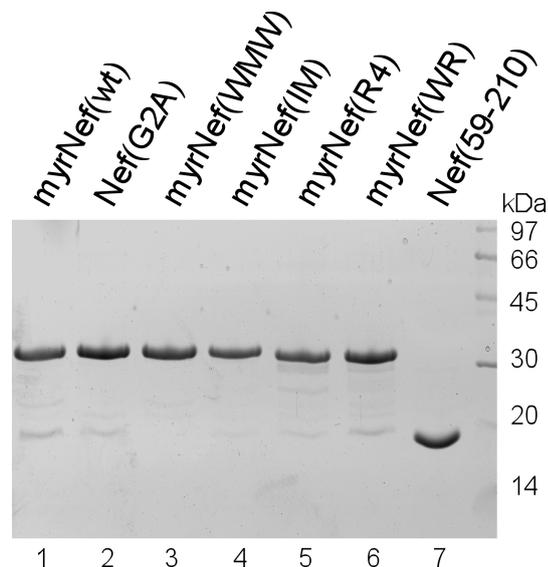


Abbildung 12: SDS-PAGE der in den Versuchen eingesetzten Proteine. Der Reinheitsgrad ist >95 %.

6.3 Analyse der Bindung von HIV-1 Nef_{SF2} an Modellmembranen

Eine Voraussetzung dafür, dass Nef seine Funktionen wie z. B. die Internalisierung von Oberflächenrezeptoren ausüben kann, ist seine Membranständigkeit. Diese wird durch die Myristoylierung und einem Bereich positiv geladener Aminosäuren gewährleistet. Somit dienen Nef sowohl elektrostatische als auch hydrophobe Wechselwirkungen für die Membranbindung, deren Untersuchung Gegenstand dieser Arbeit war.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Bindung von HIV-1 Nef_{SF2} an Modellmembranen zeitlich aufgelöst zu verfolgen. Dafür sollte ein auf FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) basierendes System aufgebaut werden, das in ähnlicher Weise bereits z. B. von Antony *et al.* für die Untersuchung der Interaktion von Arf mit Modellmembranen angewendet wurde [138] und in Abschnitt 6.3.1 näher beschrieben ist. Durch gezielte Mutation von N-terminalen Aminosäuren, die vermutlich für die Membranbindung essentiell sind, sollte der Einfluss dieser Aminosäuren und auch der Myristoylierung auf die Membranbindung geklärt werden. Umgekehrt sollte auch untersucht werden, wie die Zusammensetzung der Liposomen bzw. ihre Krümmung die Membranbindung von Nef beeinflusst.

6.3.1 Fluorimetrische Eigenschaften von HIV-1 Nef_{SF2} und experimenteller Versuchsaufbau für die Detektion der Membranbindung

Um die Bindung von Nef an Membranen zu verfolgen, wurde ein System aufgebaut, dessen Funktionsweise in Abb. 13 schematisch dargestellt ist: Die in Nef intrinsisch vorhandenen Tryptophane bilden zusammen mit dem in der Modellmembran inkorporierten Farbstoff β -DPH-HPC ein FRET-Paar. Insgesamt besitzt Nef acht Tryptophane, von denen sechs in der Kerndomäne und zwei in der N-terminalen Ankerdomäne zu finden sind, die nach Exzitation zu dem Förster-Transfer beitragen können. Der Försterradius für diese beiden Fluorophore beträgt ca. 4 nm [158] und somit kann die Annäherung des Proteins an die Membran über FRET – durch Exzitation der Tryptophane bei zeitgleicher Detektion der Emission des β -DPH-HPC – beobachtet werden. Die intrinsisch vorhandenen Tryptophane sind von Vorteil, da Tryptophane die Membranbindung entscheidend beeinflussen können [159]. Durch Mutation rekombinant eingeführte Tryptophane könnten die Ergebnisse also verfälschen. Eine Veränderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz nach Membranbindung konnte nicht beobachtet werden. Allerdings war dies auch nicht zu erwarten, da die Umgebungsänderung einzelner Tryptophane wegen der Fluoreszenz der anderen Tryptophane nicht detektiert werden kann. Deswegen wurde der bereits oben erwähnte, auf FRET basierende Ansatz gewählt. FRET bietet im Vergleich zu der intrinsischen Fluoreszenzmessung den Vorteil der höheren Sensitivität, und durch die geringere notwendige Konzentration an Bindungspartnern, ist die Bestimmung höherer Affinitäten möglich. Der Nachteil dieser Methode ist, dass ein Teil der Lipide mit einem Farbstoff modifiziert werden muss. Ein zu hoher Hintergrund der Fluoreszenz, der durch Tryptophane generiert wird, die nicht an dem Förster-Transfer beteiligt

sind, war nicht zu beobachten. Vermutlich sind aufgrund des Försterradius von 4 nm und der geringen Größe von Nef die meisten Tryptophane bei Membranbindung von Nef an dem Förstertransfer beteiligt. Zusätzlich ist die Emission von Tryptophan im Vergleich zu β -DPH-HPC bei der detektierten Wellenlänge von >420 nm sehr gering.

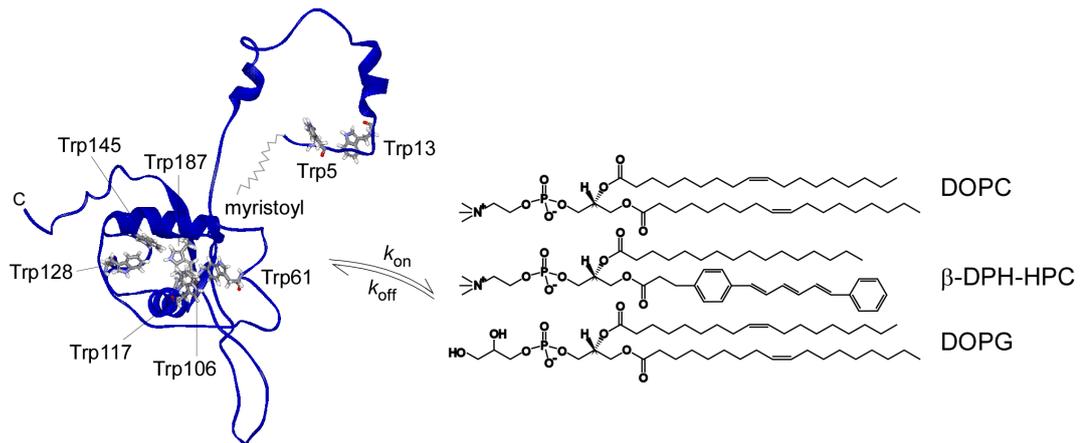


Abbildung 13: Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsaufbaus: Aufgrund der spektralen Überlappung der Emission von Tryptophan und β -DPH-HPC kann die Bindung von Nef (links) an Modellmembranen (rechts) über FRET verfolgt werden. Die dargestellten Lipide repräsentieren in dieser Arbeit häufig eingesetzte Lipide für die Herstellung von Modellmembranen.

In Abb. 14 sind die Exzitations- und Emissionsspektren beider Fluorophore dargestellt. Das Exzitationsmaximum für Tryptophan liegt bei 280 nm, das von β -DPH-HPC bei 360 nm. Für die Emission liegen die Maxima bei 340 nm im Falle von Nef und bei 428 nm für den Farbstoff. Die grün schraffierte Fläche zeigt die spektrale Überlappung der beiden Fluorophore an, die eine Voraussetzung für FRET darstellt. Für einen besseren Vergleich wurde die Fluoreszenz auf die gleiche Höhe skaliert.

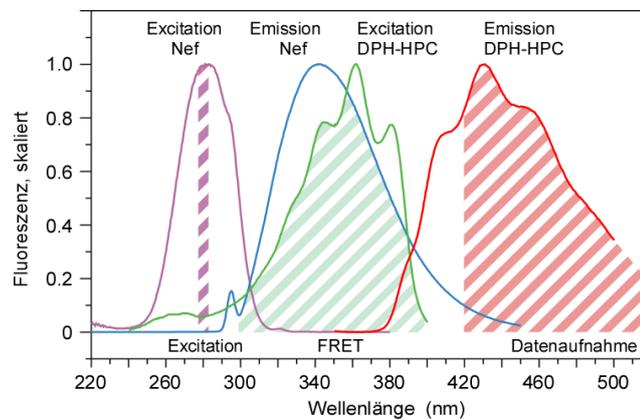


Abbildung 14: Spektrale Eigenschaften des verwendeten FRET-Paares. Nef: $Ex_{\max} = 280$ nm, $Em_{\max} = 340$ nm; β -DPH-HPC: $Ex_{\max} = 360$ nm, $Em_{\max} = 428$ nm. Der Bereich der spektralen Überlappung ist grün schraffiert dargestellt.

Erste zeitabhängige Experimente wurden in einem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Hierzu wurden Liposomen der Zusammensetzung DOPC (66 %)/DOPG (30 %)/ β -DPH-HPC (4 %) vorgelegt, myristoyliertes Nef unter Rühren zugegeben und die Emission bei 460 nm beobachtet. Die Exzitation erfolgte bei 280 nm. Nach Zugabe des Proteins ist eine Zunahme der Emission zu beobachten, was auf das Auftreten von FRET zurückzuführen ist. Allerdings kann ein Großteil der Signaländerung zeitlich nicht aufgelöst werden (Abb. 15a). Aus diesem Grund musste im Folgenden eine Methode verwendet werden, die auch die Aufnahme schneller Reaktionen erlaubt.

Für sämtliche Messungen wurden die Größen der Liposomen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) überprüft, um einen Unterschied im Bindungsverhalten der Nef Proteine aufgrund dieser Eigenschaft ausschließen zu können. Das typische Ergebnis einer solchen Messung ist in Abb.15b gezeigt.

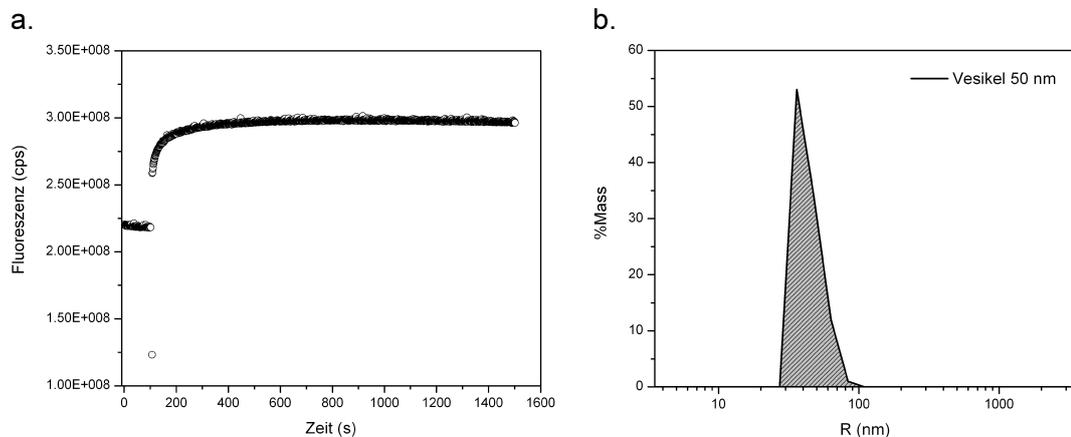


Abbildung 15: **a.** Auf FRET beruhende Fluoreszenzänderung nach Zugabe von myrNef(wt) zu farbstoffmarkierten Liposomen, aufgenommen in einem Fluoreszenzspektrometer. Im Gegensatz zu Messungen mit der *Stopped Flow* Technik ist hier ein zusätzlicher langsamerer Prozess zu sehen, der vermutlich wegen der hohen Konzentration von $38 \mu\text{M}$ Nef auftritt. **b.** Ergebnis der DLS-Messung von einer typischen Liposomenpräparation. Es wurde ein hydrodynamischer Radius von $43,8 \text{ nm}$ und eine Polydispersität von $22,5 \%$ erhalten.

Eine Methode, die es erlaubt schnelle Kinetiken im Sekunden- bzw. Millisekundenbereich aufzunehmen, ist die *Stopped Flow* Technik. Durch ein sehr schnelles Durchmischen zweier Lösungen und Beobachtung der Einstellung des Gleichgewichts bei Bindung der Komponenten, kann der zeitliche Verlauf einer Reaktion über eine Änderung der Fluoreszenz verfolgt werden. Hierfür wurden die beiden Spritzen des *Stopped Flow* Gerätes entsprechend mit farbstoffmarkierten Liposomen und myrNef(wt) befüllt. Die Exzitation wurde wie zuvor bei einer Wellenlänge von 280 nm gewählt und die Emission durch einen *cut off* Filter mit einer Wellenlänge von 420 nm aufgezeichnet. Im Gegensatz zu den Messungen, die mit dem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt wurden, ist mit dieser Methode eine zeitliche Auflösung der zuvor sprunghaft erscheinenden Signaländerung möglich.

Ein Beispiel für ein Bindungsexperiment zwischen myrNef(wt) und Liposomen ist in Abb. 16 zu sehen. Es ist bereits anhand des Kurvenverlaufes zu erkennen, dass eine monoexponentielle Kurvenanpassung die erhaltenen Daten nicht gut beschreibt. Deshalb wurde ein biexponentielles Modell angewendet. Die Abweichung der Kurvenanpassung von den experimentellen Daten lässt ein leichtes Wellenmuster erkennen, wobei die Höhe der Abweichung sehr gering ist. Die erhaltenen Parameter sind in der Abbildung integriert, und es ist zu erkennen, dass sich die beobachteten Ratenkonstanten $k_{1(obs)}$ und $k_{2(obs)}$ nahezu um den Faktor zehn unterscheiden. Die folgenden Experimente zeigten, dass $k_{1(obs)}$ von der Konzentration der Liposomen abhängt, während $k_{2(obs)}$ nahezu konstant bleibt und einen Wert von ca. 3 s^{-1} aufweist.

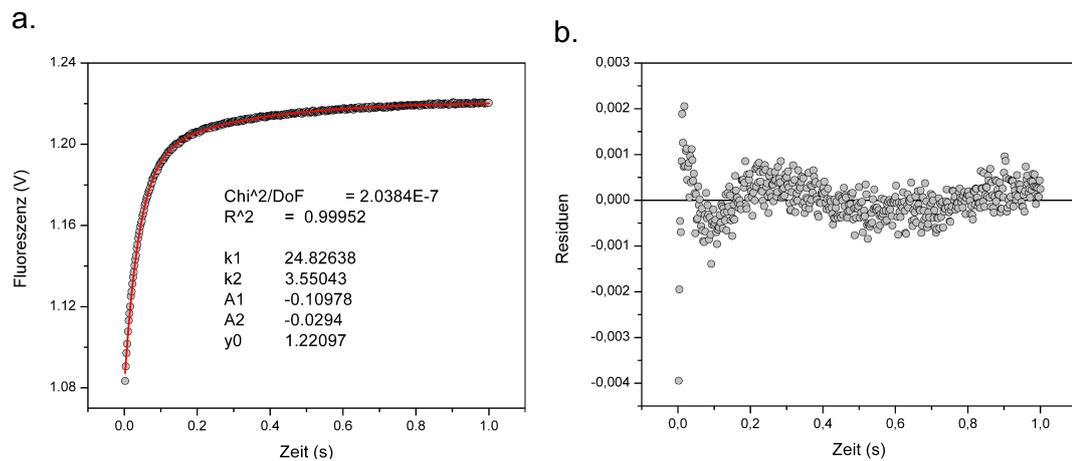


Abbildung 16: **a.** Beispiel einer biexponentiellen Kurvenanpassung eines mittels *Stopped Flow* aufgezeichneten Datensatzes der Bindung von myrNef(wt) an Liposomen mit einem Anteil von 30 % negativ geladenen Lipiden (DOPG) und 4 % β -DPH-HPC. Die erhaltenen Parameter sind aufgeführt. Die gezeigte Kurve ist dem Datensatz aus Abschnitt 6.3.4 entnommen. Der Radius der Liposomen entsprach 48 nm und die eingesetzte Konzentration an myrNef(wt) in der Spritze lag bei $0,4 \mu\text{M}$. Die initiale Konzentration der Lipide betrug $250 \mu\text{M}$. **b.** Residuen der Kurvenanpassung.

Aus der Messung von Nef und einer variablen Konzentrationen an Liposomen im *Stopped Flow* Gerät kann bei Auftragung der beobachteten Ratenkonstante gegen die Konzentration der Liposomen durch lineare Regression sowohl k_1 (Steigung) als auch k_{-1} (Achsenabschnitt) ermittelt werden. Da die Bestimmung von k_{-1} mittels dieser Methode allerdings stark fehlerbehaftet sein kann, wurden auch separate Dissoziationsexperimente durchgeführt. Ein Beispiel für ein Dissoziationsexperiment, bei dem zu dem Komplex aus myrNef(wt) und farbstoffmarkierten Liposomen ein achtfacher Überschuss an nicht markierten Liposomen gegeben wurde, ist in Abb. 17 gezeigt. Auch bei der Dissoziation wurde die Kurvenanpassung mit einem biexponentiellen Modell durchgeführt, und die Residuen wurden überprüft (Abb. 17b).

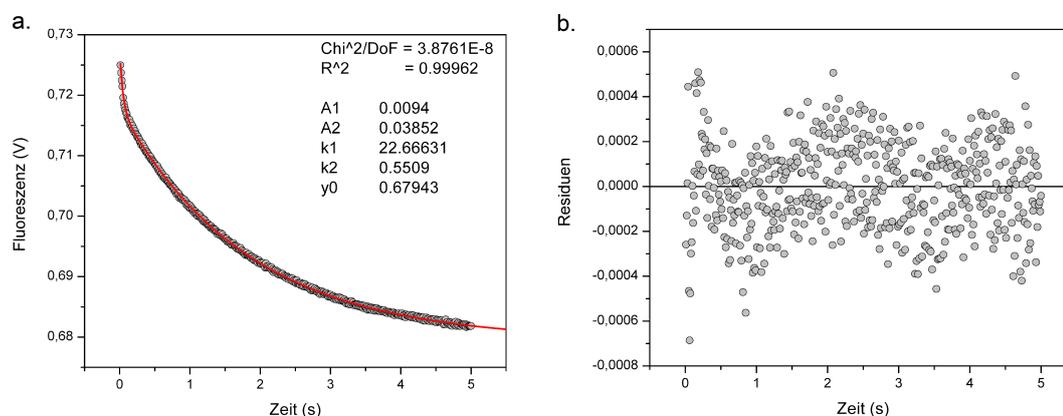


Abbildung 17: a. Beispiel einer biexponentiellen Kurvenanpassung eines mittels *Stopped Flow* aufgezeichneten Datensatzes der Dissoziation von myrNef(wt) von farbstoffmarkierten Liposomen. Der Datensatz ist ebenso wie in Abb. 16 aus dem Abschnitt 6.3.4 entnommen. Die initiale Konzentration der Lipide für die farbstoffmarkierten Liposomen lag bei $125 \mu\text{M}$ und für die Verdrängung wurde das achtfache an unmarkierten Liposomen eingesetzt. b. Residuen der Kurvenanpassung.

6.3.2 Bestimmung einer Bindungsstelle für Nef auf Liposomen

Um den K_d -Wert der Bindung von Nef an Modellmembranen zu ermitteln, musste die Anzahl der Lipide bestimmt werden, die notwendig sind, um eine Bindungsstelle für Nef zu bilden. Aus dem Ergebnis ist auch ersichtlich, welche Lipidkonzentration benötigt wird, um Experimente mit einem Überschuss an Bindungsstellen durchzuführen und somit eine Reaktion pseudo-erster Ordnung annehmen zu können.

Die Anzahl der Lipide, die einer Bindungsstelle entsprechen, wurde zunächst durch Titration von myrNef(wt) mit Liposomen bestimmt. Dazu wurden Liposomen über einen großen Konzentrationsbereich, ausgehend von einer sehr niedrigen Lipidkonzentration von $5 \mu\text{M}$ bis zu einer Konzentration von $750 \mu\text{M}$ hergestellt und im *Stopped Flow* mit $0,4 \mu\text{M}$ myrNef(wt) gemessen. Diese Konzentrationen entsprechen denjenigen, die in den Spritzen des Gerätes vorlagen. Im Folgenden werden immer die Endkonzentrationen nach Verdünnung im *Stopped Flow* Gerät und unter Berücksichtigung der Zugänglichkeit der Lipide angegeben (siehe Kap. 5.3.6). Die Herstellung der Liposomen erfolgte mittels des Extruders unter Verwendung eines Polycarbonatfilters mit einem Durchmesser von 50 nm und die Lipidkonzentration wurde über einen Phosphatassay bestimmt. Als Zusammensetzung wurde 66 % DOPC, 30 % DOPG und 4 % β -DPH-HPC gewählt. Die erhaltenen Daten wurden wie bereits beschrieben, einem biexponentiellen Modell angepasst, und die Summe der Amplituden berechnet. Ein Auftragen der Amplitudensumme gegen die effektive Konzentration der zugänglichen Lipide lieferte eine annähernd hyperbolische Kurve, die einer Kurvenanpassung nach Gleichung 10 unterzogen wurde (siehe Abb. 18b). Dies lieferte einen Wert von 25 Lipiden, die ein Molekül Nef für die Bindung benötigt und einen K_d -Wert für die Bindung von $0,25 \mu\text{M}$. Anhand dieses Experimentes ist allerdings keine Aussage darüber möglich, ob Nef mit 25 Lipiden interagiert, oder ob Nef durch sterische Hinderung den Zugang weiterer Nef Moleküle zu der Membran

blockiert.

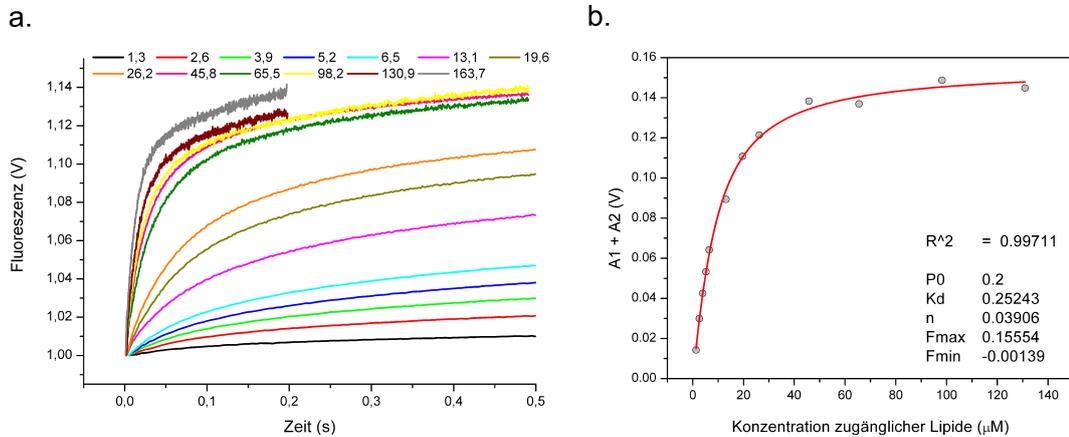


Abbildung 18: **a.** Assoziationskurven der Titration von myrNef(wt) mit Liposomen unterschiedlicher Konzentration. Die Konzentration an zugänglichen Lipiden lag zwischen 1,3 und 163,7 μM . **b.** Auftragung der ermittelten Amplitude gegen die Konzentration an zugänglichen Lipiden und die entsprechende Kurvenanpassung nach einer quadratischen Gleichung (vergl. Gleichung 10). Die Konzentration des Proteins (P0) wurde konstant gehalten; die erhaltenen Parameter sind dargestellt und es ergibt sich ein Wert von 25 Lipiden pro Bindungsplatz für ein Molekül Nef.

6.3.3 Einfluss der Oberflächenladung der Liposomen auf die Membranbindung

Die Sequenzkonservierung der N-terminalen Domäne von Nef zeigt das Vorhandensein mehrerer hochkonservierter, basischer Aminosäuren (Abb. 26a). Da die N-terminale Myristoylierung alleine nicht ausreicht, um eine stabile Membranbindung zu vermitteln, liegt es nahe, dass die positiv geladenen Aminosäuren die Membranbindung unterstützen könnten, und Studien, die *in vivo* durchgeführt wurden, zeigen, dass ebendies der Fall ist [160, 30]. Falls die basischen Aminosäuren einen Anteil an der Bindung von Nef an negativ geladene Membranen haben, sollte auch eine Veränderung der Oberflächenladung der Liposomen die Affinität beeinflussen [125]. Dies sollte im folgenden Experiment überprüft werden.

Hierfür wurden Liposomen mit einem unterschiedlichen Gehalt des negativ geladenen Phospholipids DOPG mittels Extruder präpariert, wobei sämtliche Präparationen 4% des farbstoffmarkierten Lipids enthielten. Dabei variierte der Gehalt an DOPG zwischen 0% und 30%. Bei Liposomen ohne jegliche Ladung (96% DOPC oder 66% DOPC 30% DOPE) konnte keine Interaktion zwischen Nef und den Liposomen beobachtet werden. Mit steigendem Gehalt an negativer Ladung konnte jedoch eine Zunahme der Bindung von Nef an Liposomen gezeigt werden. (Abb. 19a). Eine Auswertung der Daten nach einem biexponentiellen Modell gestaltete sich schwierig, da die Qualität der Daten mit 20% DOPG schlecht war, und nur wenige Kurven gemittelt werden konnten. Dies ist auch bei der Auftragung von $k_{(1)obs}$ gegen die zugängliche Lipidkonzentration zu erkennen: Die lineare Regression liefert eine ähnliche Steigung für die Gerade wie sie auch für die Liposomen mit 30% DOPG erhalten

wurde (Abb. 19b). Allerdings sollte k_1 bei einer Reduktion der negativ geladenen Phospholipide ebenfalls abnehmen. Eine Auswertung von 10 % DOPG ist aufgrund der niedrigen Fluoreszenz nicht möglich. Die Amplitude hängt nicht linear von dem Gehalt an negativ geladenen Phospholipiden ab und die aus der Amplitude abgeschätzten K_d -Werte (ausgehend von einem K_d -Wert von $0,25 \mu\text{M}$ für 30 % DOPG) sind $9 \mu\text{M}$ bzw. $56 \mu\text{M}$ für einen Anteil von 20 % bzw 10 % DOPG. Ein in Abb. 20 dargestelltes logarithmisches Auftragen der resultierenden Assoziationskonstanten gegen die Fraktion azider Lipide, lässt einen linearen Verlauf vermuten, wie er zu erwarten ist [161]. Allerdings ist die Gerade mit nur drei Punkten unzureichend bestimmt.

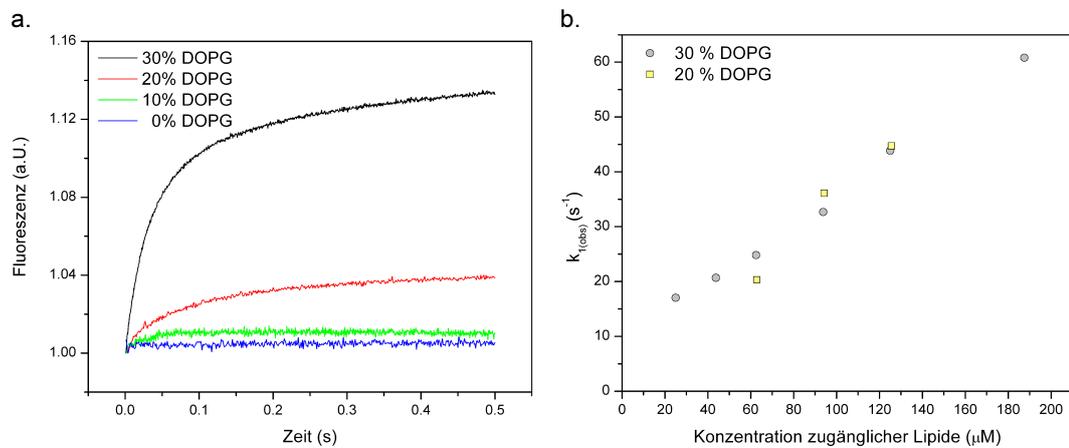


Abbildung 19: **a.** Vergleich der Assoziationskurven von myrNef(wt) an Liposomen, die einen unterschiedlichen Anteil an DOPG aufweisen. Die Konzentration an zugänglichen Lipiden betrug: 10 %: $61 \mu\text{M}$, 20 %: $62 \mu\text{M}$, 30 %: $65,5 \mu\text{M}$, **b.** Graphische Darstellung der Werte für $k_{1(obs)}$; Die Auswertung von $k_{1(obs)}$ ist im Fall von 20 % DOPG-Gehalt wegen der schlechten Qualität der erhaltenen Daten nicht aussagekräftig; eine Auswertung der Daten mit 10 % DOPG war nicht möglich.

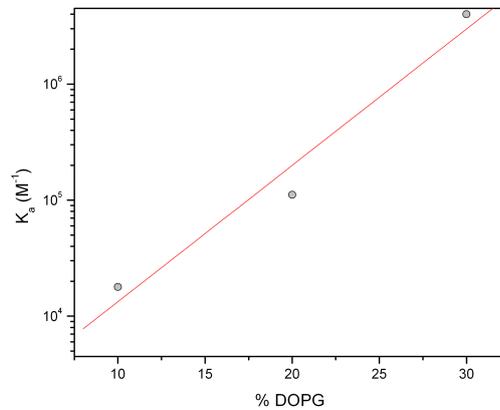


Abbildung 20: Logarithmische Darstellung der Assoziationskonstante gegen die Molfraktion azider Lipide. Die lineare Regression ist eingezeichnet.

6.3.4 Einfluss der Krümmung der Membran auf die Bindung von Nef

Membranen innerhalb einer Zelle weisen unterschiedlichste Krümmungen auf und können nahezu planare Strukturen, wie es z. B. bei der Plasmamembran der Fall ist, bis hin zu stark gekrümmten Strukturen, wie es z. B. bei Vesikeln der Fall ist, bilden. Es ist ein seit jüngstem untersuchtes Phänomen, dass einige Proteine die Krümmung einer Membran "erkennen" und oder auch beeinflussen können (siehe Kap. 2.4.2.4). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Größe und somit die Krümmung der Modellmembranen auf die Bindung von HIV-1 Nef_{SF2} hat.

Die Zusammensetzung der Modellmembranen wurde wie im ersten Experiment gewählt (siehe Kap. 6.3.2). Die Liposomen wurden mittels des Extruders erzeugt und anschließend ihr hydrodynamischer Radius über DLS bestimmt. Die Konzentration der Lipide wurde über die Absorption des Farbstoffes ermittelt.

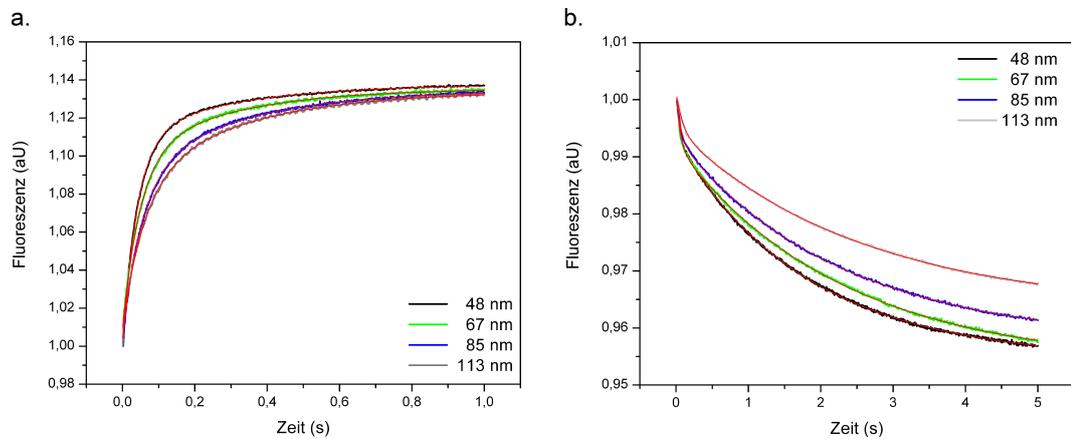


Abbildung 21: a. Vergleich der Assoziation von myrNef(wt) an Liposomen mit unterschiedlichen Radien bei einer Konzentration von $31,3 \mu\text{M}$ zugänglichen Lipiden und $0,2 \mu\text{M}$ myrNef(wt); die biexponentielle Kurvenanpassung ist eingezeichnet b. Ergebnis des Dissoziationsexperiments mit zehnfachem Überschuss an unmarkierten Liposomen.

Der bekannte biphasische Verlauf für die Assoziation von Nef an Membranen ist auch in diesem Experiment wiederzufinden (Abb.21a). Es ist zu erkennen, dass die Bindung von Nef an Modellmembranen von deren Krümmung abhängt. k_1 weist für Liposomen mit einem hydrodynamischen Radius von 48 nm den höchsten Wert auf. Je größer die Modellmembranen gewählt werden, desto geringer ist die zugehörige Steigung bzw. das entsprechende k_1 (Abb. 22a). Die Werte reichen von $k_1 = 6,25 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Liposomen mit einem Radius von 48 nm bis zu $k_1 = 1,68 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Liposomen mit einem Radius von 113 nm.

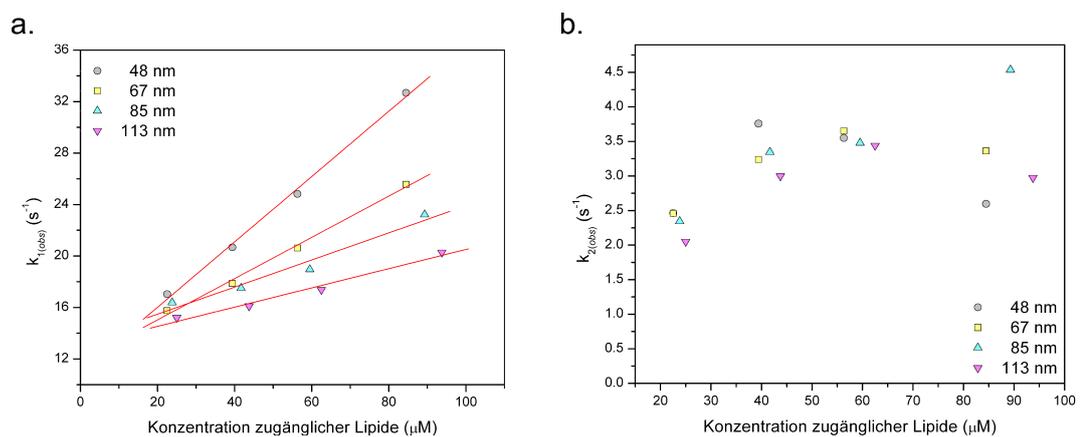


Abbildung 22: a. $k_{1(obs)}$ aufgetragen gegen die Konzentration der Lipide und die entsprechende lineare Regression für die Bestimmung von k_1 b. $k_{2(obs)}$ aufgetragen gegen die Konzentration der Lipide.

Auch die Dissoziation weist einen biphasischen Kurvenverlauf auf (Abb. 21b). Die aus diesen Daten errechnete Ratenkonstante für die erste Rückreaktion ist allerdings

unzureichend bestimmt, weshalb für die Berechnung des K_d -Wertes die aus dem Ordinatenschnittpunkt erhaltenen Werte verwendet wurden. Die langsamere Ratenkonstante für die zweite Rückreaktion wurde jedoch diesem Experiment entnommen.

Radius [nm]	$k_1 \cdot n$ [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{-1} (1) [s^{-1}]	k_{-1} (2) [s^{-1}]	k_{-2} [s^{-1}]	k_2 [s^{-1}]	K_d [μM]
48	6,25	10,94	22,67	0,551	2,45	0,32
67	4,00	11,83	18,26	0,437	2,56	0,41
85	2,75	13,38	16,49	0,443	2,56	0,72
113	1,68	13,04	10,93	0,389	2,61	1,01

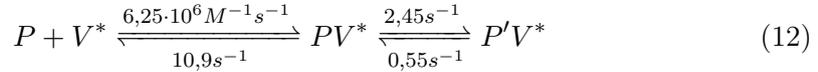
Tabelle 17: Die aus den Messungen zur Oberflächenkrümmung gewonnenen kinetischen Parameter; k_{-1} (1) wurde aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate nach linearer Regression gewonnen, k_{-1} (2) durch das Dissoziationsexperiment. Für die Berechnungen wurde k_{-1} (1) verwendet. k_1 wurde aus der Steigung errechnet, die mit $n=25$ multipliziert wurde, um die Bindungsplätze zu berücksichtigen. $k_{2(obs)}$ wurde als konstant mit 3 s^{-1} angenommen. Daraus ergeben sich nach Gleichung 11 die Werte für K_d .

Die in Tab.17 aufgelisteten K_d -Werte wurden unter Verwendung des Ergebnisses für den Wert für einer Bindungsstelle aus Kap. 6.3.2 nach Gleichung 11 berechnet. Es ist zu erkennen, dass die K_d -Werte eine Abhängigkeit von der Liposomengröße zeigen.

$$K_d = \frac{1}{K_1 \cdot (1 + K_2)} = \frac{1}{\frac{0,25\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1} \cdot 25}{10,9\text{s}^{-1}} \cdot (1 + \frac{2,45\text{s}^{-1}}{0,55\text{s}^{-1}})} = 0,32\mu\text{M} \quad (11)$$

Berechnung des K_d -Wertes für die Bindung von Nef an Liposomen mit einem Radius von 48 nm (Herleitung siehe Anhang 8.2); mit k_1, k_2, k_{-1}, k_{-2} = Ratenkonstanten der entsprechenden Hin- bzw. Rückreaktionen, wobei k_1 einer apparenten Ratenkonstante zweiter Ordnung entspricht und k_2, k_{-1}, k_{-2} Ratenkonstanten erster Ordnung entsprechen; n = Anzahl der Lipide, die eine Bindungsstelle formen. k_2 ergibt sich aus der Summe der entsprechenden beobachteten Ratenkonstanten. Mit einem durchschnittlichen Wert für $k_{2(obs)}$ von ca. 3 s^{-1} ergibt sich für k_2 $2,45\text{ s}^{-1}$.

Der ermittelte Wert für die Dissoziationskonstante von $0,32\mu\text{M}$ bei einer Liposomengröße von 48 nm stimmt gut mit dem in Kap. 6.3.2 bestimmten Wert von $0,25\mu\text{M}$ überein. Die Bindung kann somit durch folgendes Schema dargestellt werden:



Das Schema stellt die Bindung von myrNef(wt) an Liposomen mit den entsprechenden Ratenkonstanten für die zwei unterschiedlichen Prozesse dar. P bezeichnet das Protein, V^* die farbstoffmarkierten Vesikel und P' das Protein in einer anderen Konformation. Die Zuordnung der Ratenkonstanten für die zwei Prozesse wird in Kap. 48 diskutiert.

Ein Auftragen von K_1 , also der Assoziationskonstanten des ersten Prozesses, gegen den Liposomenradius zeigt eine Abhängigkeit von $1/r^2$ (Abb. 23). Die Kurvenanpassung, die eine Abhängigkeit von $1/r$ annimmt, zeigt eine nur unwesentlich schlechtere Abweichung von den experimentellen Daten, allerdings besitzt die erhaltene Hyperbel einen Schnittpunkt mit der x-Achse, was physikalisch nicht zu erklären ist. Eine

Abhängigkeit der Assoziationskonstanten in der Form $1/r^2$ kann durch die Krümmung einer Kugel (die Liposomen näherungsweise darstellen) erklärt werden, die dieselbe Abhängigkeit aufweist [162]. Je kleiner der Radius der Liposomen wird, desto größer wird der Abstand zwischen den Kopfgruppen der Phospholipide auf der äußeren, konvexen Membranschicht. Vermutlich resultiert eine erhöhte Krümmung der Membran in einer vereinfachten Insertion des hydrophoben Myristinankers in die Membran.

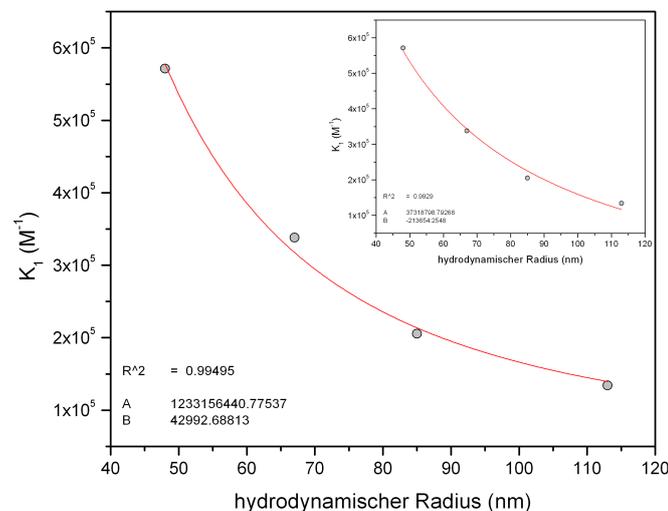


Abbildung 23: K_1 zeigt eine Abhängigkeit von dem Radius der Liposomen in der Form $1/r^2$. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels der Gleichung $K_1 = A \cdot \frac{1}{r} + B$. Im Fenster: Die Kurvenanpassung wurde mit einer Gleichung der Form $K_1 = A \cdot \frac{1}{r} + B$ durchgeführt.

6.3.5 Einfluss der Lipidzusammensetzung der Liposomen auf die Membranbindung

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die Lipidzusammensetzung der Liposomen eine Rolle für die Membranbindung von Nef spielt, da berichtet wurde, dass Nef z. B. bevorzugt in Lipid Rafts lokalisiert ist [163, 164].

Dazu wurde als erstes ein Test mittels eines PIP-Strips durchgeführt, bei dem eine hydrophobe Membran mit unterschiedlichen Lipiden dotiert ist, und gebundenes Protein wie bei einem Western Blot über Antikörper nachgewiesen werden kann. PIP-Strips dienen v.a. einer Abschätzung, ob ein Protein eventuell ein bestimmtes Phosphatidylinositolphosphat bevorzugt bindet. Das Ergebnis ist in Abb. 24b zu sehen und es fällt auf, dass Nef an alle Phosphatidylinositolphosphate bindet. Phosphatidylinositol, das keine negativ geladene Phosphatgruppe am Inositolring aufweist und bei einem pH-Wert von 8,0 eine Nettoladung von -1 besitzt, wird nicht gebunden. Dies ist auch für das einfach negativ geladene Phosphatidylserin der Fall. Ebenso

kann für ungeladene Lipide (PC, PE, LPC) und die Kontrolle keine Bindung detektiert werden. Phosphatidsäure (PA), das aufgrund der pKa-Werte von $pK_{a1}=3,0$ und $pK_{a2}=8,0$ unter den verwendeten Versuchsbedingungen eine Nettoladung von ca. -1,5 besitzt, hingegen zeigt eine Bindung. Lysophosphatidsäure (LPA), das sogar einen niedrigeren pK_{a2} -Wert aufweist als PA [165], allerdings mit nur einer Fettsäurekette modifiziert ist, wird nicht gebunden. Insgesamt zeigt dieser Versuch, dass Nef anscheinend negativ geladene Lipide benötigt, um an Membranen zu binden, wobei es nebensächlich ist, welches Lipid die Ladung beisteuert. Die Ausnahme ist LPA, das trotz seiner negativen Ladung nicht fähig ist, Nef zu rekrutieren. Dies könnte auf eine geschwächte hydrophobe Interaktion des Myristinankers von Nef mit dem hydrophoben Bereich der Membran zurückzuführen sein, da nur eine Fettsäure für diese Interaktion zur Verfügung steht.

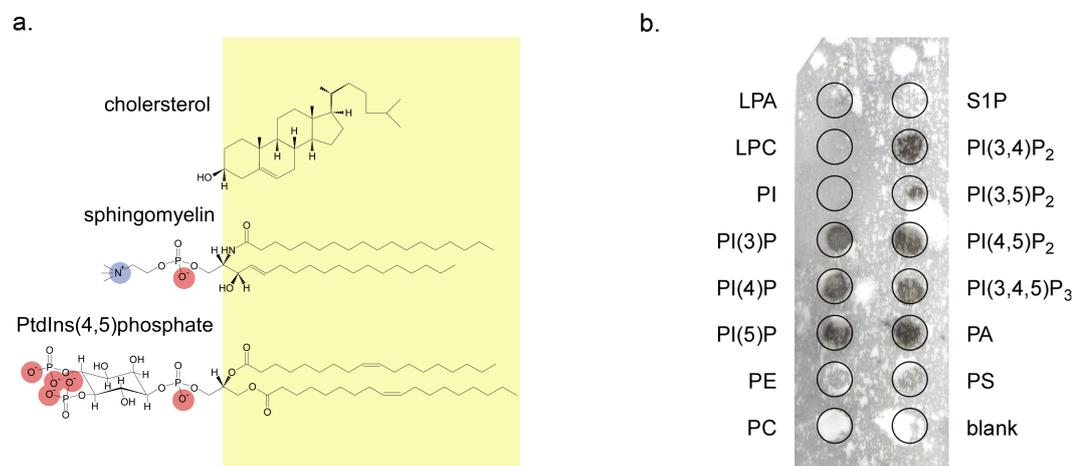


Abbildung 24: **a.** Darstellung verschiedener Lipide, deren Einfluss auf die Membranbindung untersucht wurde. **b.** PIP-Strip; gebundenes und über Antikörper detektiertes myrNef(wt) ist als Dunkelfärbung zu erkennen.

Eine weitere Membrankomponente, die unter Verwendung des FRET-Ansatzes untersucht wurde, ist Cholesterol. Dieses Lipid unterscheidet sich in seiner Struktur, Form und Größe von den Phospholipiden und verringert z. B. die Fluidität von Membranen. Von besonderer Bedeutung ist die Rolle von Cholesterol bei der Bildung von sog. Mikrodomänen (Kap. 2.4.2.3).

Für dieses Experiment wurde die Konzentration an DOPC und DOPG konstant bei 36% bzw. 30% gehalten, um einen Einfluss der Ladung auf die Bindung auszuschließen und es wurden wiederum 4% β -DPH-HPC zugesetzt. Die verbleibenden 30% wurden entweder durch Cholesterol, Sphingomyelin oder einen gleichen Anteil beider Lipide ergänzt. Die Konzentration der Lipide wurde über einen Phosphatansatz bestimmt. Allerdings ist es mit dieser Methode nicht möglich den Gehalt an Cholesterol zu bestimmen, da dieses Lipid keine Phosphatgruppe aufweist. Deshalb wurde angenommen, dass der Verlust von Cholesterol dem der Phospholipide entspricht. Die erhaltenen Daten für die Assoziation sind in Tab. 18 dargestellt. Die

Werte für k_1 weisen die gleich Größenordnung auf, wie sie auch für die Bindung von Nef an Liposomen ohne Cholesterol bzw. Sphingomyelin erhalten wurde. Nur bei Modellmembranen, die sowohl Sphingomyelin als auch Cholesterol enthalten, ist eine leicht verringerte Steigung für k_1 zu erkennen. Dies würde einer bevorzugten Lokalisierung von Nef in Mikrodomänen widersprechen. Allerdings ist k_1 von der Lipidkonzentration abhängig, die im Falle von Cholesterol, wie bereits erwähnt, mit dem verwendeten System nicht bestimmt werden konnte. Die Werte für k_2 konnten nicht ermittelt werden, da die erhaltenen Daten für Sphingomyelin und Cholesterol bei einer hohen Konzentration an zugänglichen Lipiden monoexponentiell angepasst werden konnten. Die Dissoziation unterscheidet sich um bis zu einen Faktor 5 im Fall von 30 % Cholesterol. Da die Dissoziation unabhängig von der Konzentration der Lipide ist, kann ein Fehler bei der Annahme der Konzentration nicht der Grund für diese Änderung sein. Allerdings ist die Bestimmung der Dissoziation über den Schnittpunkt der Ordinate stark fehlerbehaftet. Um eine gültige Aussage zu erhalten, müssten Konzentrationsreihen mit unterschiedlichem Anteil der verschiedenen Lipide durchgeführt werden. Falls die Unterschiede signifikant sind, scheint der Effekt dieser Lipide aber im Vergleich z. B. zu der Ladung eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Protein	$k_1 \cdot n$ [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	$1/K_1$ [μM]
Cholesterol	8,0	2,0	0,25
Sphingomyelin	7,5	5,7	0,76
Cholesterol/Sphingomyelin	5,0	7,0	1,40

Tabelle 18: Vergleich der Werte für K_1 bei unterschiedlicher Zusammensetzung der Modellmembran.

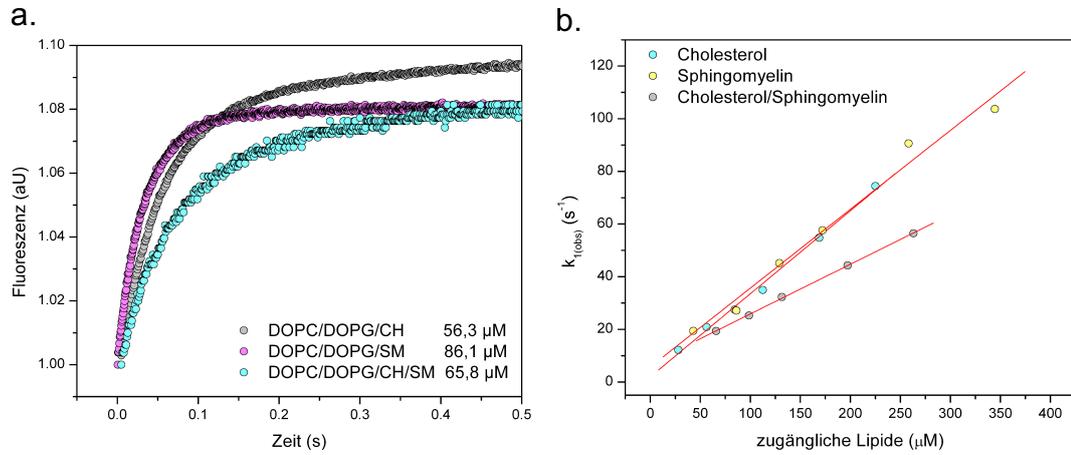


Abbildung 25: **a.** Assoziationskurven von $0,2 \mu\text{M}$ myrNef(wt) an Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung. Die Konzentration der jeweils zugänglichen Lipiden ist dargestellt. **b.** Auftragung der ersten beobachteten Ratenkonstante gegen die Konzentration an zugänglichen Lipiden und lineare Kurvenanpassung der Daten.

6.3.6 Einfluss von N-terminalen Mutationen auf die Membranbindung von HIV-1 Nef_{SF2}

Die wechselseitige Interaktion von myrNef(wt) mit Liposomen sollte als nächstes von Seiten des Proteins untersucht werden. Wenn die Nettoladung der Liposomen einen Einfluss auf die Affinität von Nef zu Modellmembranen hat, dann sollten basische Aminosäuren innerhalb des Proteins ebenfalls einen Einfluss auf die Membranbindung haben [125]. Dies wurde sowohl für Peptide als auch für Proteine gezeigt [166, 161]. Die mit Abstand am höchsten konservierte Aminosäure in der N-terminalen Domäne von Nef (abgesehen vom Myristoylierungsmotiv) ist jedoch W_{13} und für Tryptophan wurde beobachtet, dass es bevorzugt an der Lipid-Wasser-Grenzschicht lokalisiert ist [167]. Eine Darstellung der N-terminalen Aminosäuren $K_4 - A_{23}$ in Form eines helikalen Rades zeigt zudem, dass die Ausbildung einer amphipathischen Helix möglich sein könnte (Abb. 26b) und ein Beitrag dieser zu der Membranbindung von Nef wäre denkbar. Aufgrund dieser Ausgangssituation wurden die in Tab. 16 aufgeführten Mutationen rekombinant in das Nef Protein eingeführt. Diese umfassen sowohl Mutationen der basischen AS (myrNef(R4)), als auch der hydrophoben AS (myrNef(WMW)), sowie eine Kombination aus beiden (myrNef(WR)). Als Kontrolle wurden zwei Mutanten erzeugt: Zum einem Nef(G2A), das kein Substrat für die NMT darstellt und somit nicht myristoyliert werden kann, zum anderen Nef(59), das N-terminal verkürzt ist und keine Ankerdomäne aufweist.

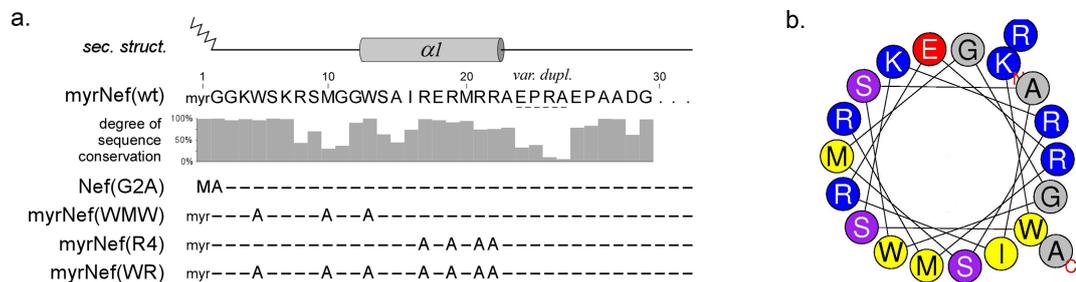


Abbildung 26: a. Sequenzkonservierung der N-terminalen 30 AS von Nef; zusätzlich dargestellt sind die Sekundärstruktur in diesem Bereich, wie auch die rekombinant erzeugten Mutanten. b. Darstellung von K₄ – A₂₃ als helikales Rad; die Abb. wurde mit dem Programm Heliquest erstellt (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).

Sämtliche Versuche wurden unter den in Kap. 6.3.2 bereits beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Der Verlust an Lipiden, der durch die Präparation der Liposomen entsteht, wurde nicht bestimmt, da nur eine relative Aussage im Vergleich zu myrNef(wt) gezogen werden sollte. Außerdem wurden die Liposomen mittels Ultraschall erzeugt.

Abbildung 27 zeigt die erhaltenen Assoziationskurven der verschiedenen Mutanten von Nef bei einer Konzentration von 375 μM eingesetztem Gesamtlipid. Sämtliche erhaltenen Daten, mit der Ausnahme von Nef(59), konnten einem biexponentiellen Modell nach angepasst werden. Der myristoylierte Wildtyp zeigte den gleichen, bereits in Abb. 16a zu erkennenden, biphasischen Kurvenverlauf. $k_{2(obs)}$ ist bei der eingesetzten Lipidkonzentration wiederum um ca. den Faktor zehn geringer als $k_{1(obs)}$, und $k_{1(obs)}$ zeigt einen linearen Verlauf in Abhängigkeit von der Konzentration an Liposomen.

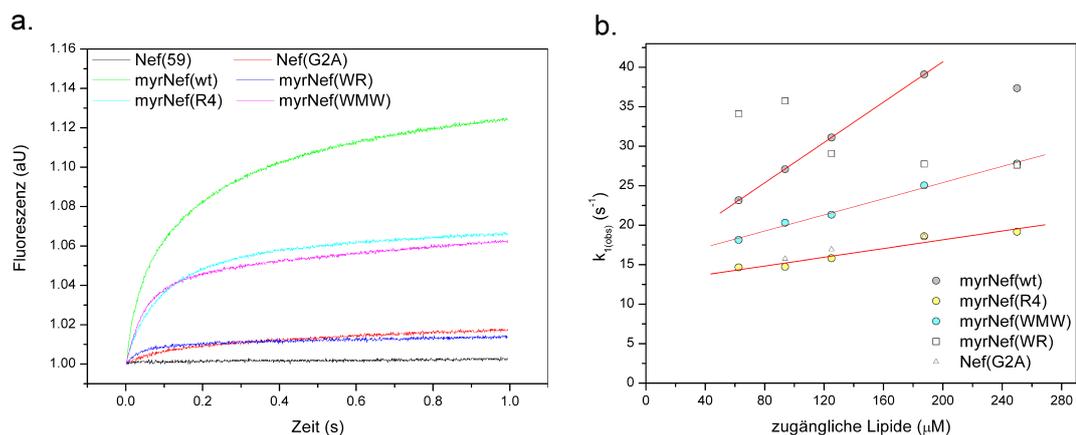


Abbildung 27: a. Vergleich der FRET-Messung der Mutanten des Nef Proteins bei 375 μM Gesamtlipid. b. Grafische Darstellung von $k_{1(obs)}$, aufgetragen gegen die Lipidkonzentration. Die lineare Regression ist für myrNef(wt), myrNef(R4) und myrNef(WMW) dargestellt.

Da $k_{2(obs)}$ keine von der Liposomenkonzentration abhängige Änderung zeigt, könn-

te dieser Phase eine Zustandsänderung des Proteins an Liposomen wie z. B. eine Änderung der Sekundärstruktur zugrunde liegen (Abb.28a).

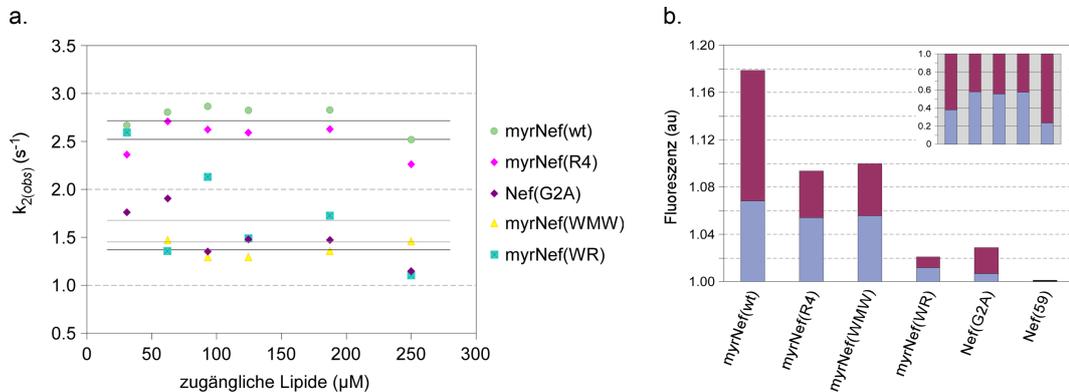


Abbildung 28: **a.** Grafische Darstellung von $k_{2(obs)}$, aufgetragen gegen die Lipidkonzentration. **b.** Vergleich der Amplituden der zwei Phasen bei einer exemplarischen Konzentration; in Blau: A1, zugehörig zu $k_{1(obs)}$ in Rot: A2, zugehörig zu $k_{2(obs)}$. Im Kasten: Relative Anteile der Amplituden an der Gesamtamplitude.

Nicht myristoyliertes Nef(G2A) bindet – wenn auch schwach – ebenfalls an Liposomen. Nur Nef(59), das, wie auch myrNef(WMW) und myrNef(WR), noch sechs Tryptophane enthält, zeigt keine Bindung und somit müssen verschiedene Aminosäuren innerhalb der N-terminalen Domäne an der Membranbindung von Nef beteiligt sein. Die Mutante myrNef(R4), die eine geringere elektrostatische Wechselwirkung mit der Membran eingehen sollte, zeigt eine deutlich verringerte Ratenkonstante k_1 im Vergleich zu myrNef(wt), wie aus Abbildung 27b ersichtlich ist. Dies resultiert auch in einer niedrigeren absoluten Amplitude, die eine geringere Affinität des Proteins nahelegt. Die Mutation der hydrophoben Aminosäuren resultiert in einer weniger starken Änderung von k_1 im Vergleich zu myrNef(wt). Während die Assoziationskonstante K_1 für myrNef(WMW) im Vergleich zum myristoylierten Wildtyp um den Faktor 2,5 reduziert ist, ist dieser Effekt für myrNef(R4) mit einem Faktor von 3,8 deutlicher ausgeprägt (Tab.19). Die Mutanten Nef(G2A) und myrNef(WR) zeigen keinen Anstieg der beobachteten Ratenkonstante, was eine sehr geringe Affinität vermuten lässt, wie es auch die Amplitude anzeigt.

In Abbildung 28b ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzänderung bei der Bindung von Nef(G2A) vor allem innerhalb der zweiten Phase erzielt wird und die Amplitude der ersten Phase stark reduziert ist. Folglich scheint die Myristoylierung für die erste Phase von Bedeutung zu sein. myrNef(R4), myrNef(WMW) und myrNef(WR) weisen hingegen eine verringerte Amplitude der zweiten Phase auf und vermutlich leistet in diesem Fall die Myristoylierung einen höheren Beitrag zu der Membranbindung. Weiterhin könnte die Isomerisierung des Proteins beeinflusst werden und dies könnte durch die geringere Ausbildung der oben erwähnten amphipathischen Helix erklärt werden. Die Darstellung des Verhältnisses der Amplituden zeigt, dass Mutationen innerhalb der vermuteten amphipathischen Helix in einer Verschiebung

von 40%/60% A1/A2 zu 60%/40% A1/A2 resultieren. Die Verhinderung der Myristoylierung dagegen führt zu einem Verhältnis, zu dem A1 nur ca. 20% beiträgt.

Anzumerken ist, dass die beobachteten kinetischen Parameter für myrNef(wt) nicht vollständig mit den anderen Experimenten übereinstimmt. Dies dürfte daran liegen, dass eine andere Methode für die Liposomenpräparation gewählt wurde und die finale Konzentration der Lipide nicht bestimmt wurde. Da für die Messungen aber identische Liposomen aus derselben Präparation verwendet wurden, ist ein relativer Vergleich Werte für K_1 möglich. Aufgrund fehlender Dissoziationsexperimente ist eine Bestimmung des absoluten K_d -Werts nicht möglich.

Protein	$k_1 \cdot n$ [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{-1} [s^{-1}]	k_2 [s^{-1}]	$1/K_1$ [μM]
myrNef(wt)	3,25	15,15	2,70	4,7
myrNef(G2A)	-	-	-	-
myrNef(WMW)	1,28	15,16	1,40	11,8
myrNef(R4)	0,7	12,61	2,47	18,0
myrNef(WR)	-	-	-	-
myrNef(59)	-	-	-	-

Tabelle 19: Vergleich der kinetischen Parameter für die verschiedenen, N-terminal Mutationen tragenden Nef Proteine. Eine Bestimmung der Dissoziationskonstante K_1 für Nef(G2A), myrNef(WR) und Nef(59) war nicht möglich.

6.4 Analyse des Sekundärstrukturgehaltes mittels CD-Spektroskopie

Bei den bisher beschriebenen Ergebnissen wurde bei der Membranbindung von Nef immer ein biphasischer Prozess beobachtet, bei dem $k_{2(\text{obs})}$ konstant bleibt und somit eine Isomerisierung des Proteins nahelegt. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob Nef in Anwesenheit von Liposomen eine Änderung der Sekundärstruktur vollzieht, wurde CD-Spektroskopie angewendet. Bei kurzen, ungefalteten Peptiden mit definierter Sequenz ist es mit dieser Methode z. B. möglich die Faltung einer amphipathischen Helix bei Zugabe von Liposomen zu beobachten [131].

Es wurden CD-Spektren sowohl von myrNef(wt) als auch von allen in Kap. 6.3.6 beschriebenen Mutanten in Anwesenheit und in Abwesenheit von Liposomen untersucht. Zum besseren Vergleich ist in Abb. 29b nochmals ein schematischer Überblick über die eingesetzten Nef Proteine gezeigt. In Abb. 29a sind die in Puffer (5 mM KP_i) aufgenommenen CD-Spektren sämtlicher Nef Proteine dargestellt. Es fällt auf, dass der myristoylierte Wildtyp eine andere Faltung besitzt, als z. B. myrNef(WR) und myrNef(WMW). Das Minimum bei einer Wellenlänge von 222 nm, das bei myrNef(wt) eine Schulter bildet, tritt bei diesen Mutanten nicht auf. Dieses Phänomen ist ebenso bei Nef(28) zu beobachten. myrNef(R4) zeigt dagegen eine vergleichsweise kleine Signalreduktion bei dieser Wellenlänge. Zudem ist das Signal bei einer Wellenlänge von 208 nm für myrNef(WR) und myrNef(WMW) geringer als für

myrNef(wt). Eine Analyse des Sekundärstrukturgehaltes mit Dichroweb [168, 169] zeigt, dass Nef(28), myrNef(WR) und myrNef(WMW) per se einen geringeren α -helikalen Anteil als myrNef(wt) aufweisen (siehe Tab.30). Dies deutet darauf hin, dass eine oder alle der Aminosäuren W_5, M_{10}, W_{13} an der Ausbildung einer helikalen Struktur beteiligt sind. Unterstützt wird dieses Ergebnis dadurch, dass die Faltung von Nef(G2A) der des myristoylierten Wildtyps ähnlich ist. In der NMR-Struktur der Ankerdomäne beginnt die Helix allerdings erst mit der Aminosäure W_{13} . Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die NMR-Struktur auf Nef_{NL-43} basiert, das im Gegensatz zu dem Serin von Nef_{SF2}, ein Prolin an Position 14 aufweist, das eine Ausweitung der Helix in N-terminaler Richtung verhindert (Vergl. Abb. 29b). Der Einfluss der Mutationen in myrNef(R4) auf die Helizität ist geringer, aber auch bei dieser Mutante ist eine geringerer α -helikaler Anteil zu beobachten, der vermutlich auf eine Störung der α_1 -Helix am C-terminalen Ende zurückzuführen ist.

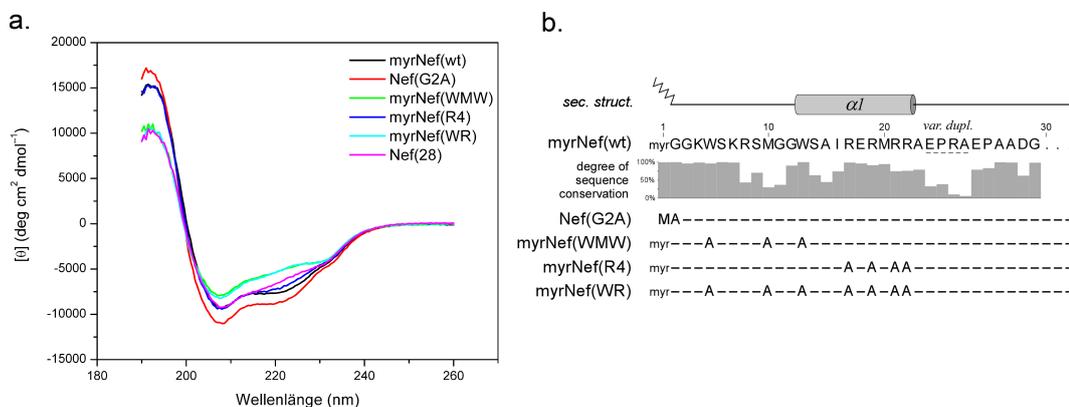


Abbildung 29: **a.** Vergleich der in 5 mM KP_i aufgenommenen CD-Spektren sämtlicher in Kap. 6.3.6 beschriebener Nef Proteine. Anstelle von Nef59 (Deletion Nef $_{\Delta 1-59}$) wurde Nef28 (Deletion Nef $_{\Delta 1-28}$) eingesetzt. Die Ordinate der Spektren wurden über Gleichung 2 von mdeg in molare Elliptizität überführt. Die Proteinkonzentration betrug jeweils $3 \mu\text{M}$. **b.** Schematische Darstellung der N-terminalen Domäne von Nef, in der die Nomenklatur der Mutanten und die zugehörigen Mutationen gezeigt sind. Zusätzlich ist die Sekundärstruktur und die Sequenzkonservierung eingezeichnet.

Eine prägnante Änderung der CD-Spektren in Abhängigkeit von Liposomen ist für myrNef(wt) und Nef(G2A) zu beobachten. Hierfür wurden die Proteine mit einer Liposomenlösung verdünnt, so dass die finale Proteinkonzentration bei $3 \mu\text{M}$ und die finale Liposomenkonzentration bei $250 \mu\text{M}$ lag. Das Differenzspektrum zeigt eine Zunahme der Elliptizität bei einer Wellenlänge von 208 nm, was auf die Ausbildung einer α -Helix hindeutet. Erstaunlicherweise ist aber auch eine Abnahme der Elliptizität bei 222 nm zu beobachten. Somit scheint die Änderung der Sekundärstruktur nicht ausschließlich auf der Ausbildung einer α -Helix zu beruhen, da für diesen Fall auch eine Zunahme der Elliptizität bei 222 nm zu erwarten wäre. Es könnte z. B. sein, dass die N-terminale Domäne in wässriger Umgebung an das Protein gebunden ist und es dann in diesem Bereich bei Entfernen des Ankers durch die Bindung

von Liposomen zu einer Änderung der Sekundärstruktur innerhalb der Kerndomäne kommt. Bei myrNef(WR) und den anderen Mutanten findet keine solche Änderung der Sekundärstruktur bei Anwesenheit von Liposomen statt (Abb. 30c). Zu dem CD-Signal leisten die Liposomen keinen Beitrag, aber der Bereich bei einer Wellenlänge <190 nm ist aufgrund der zu hohen Absorption, zu der die Liposomen beitragen, schwierig auszuwerten.

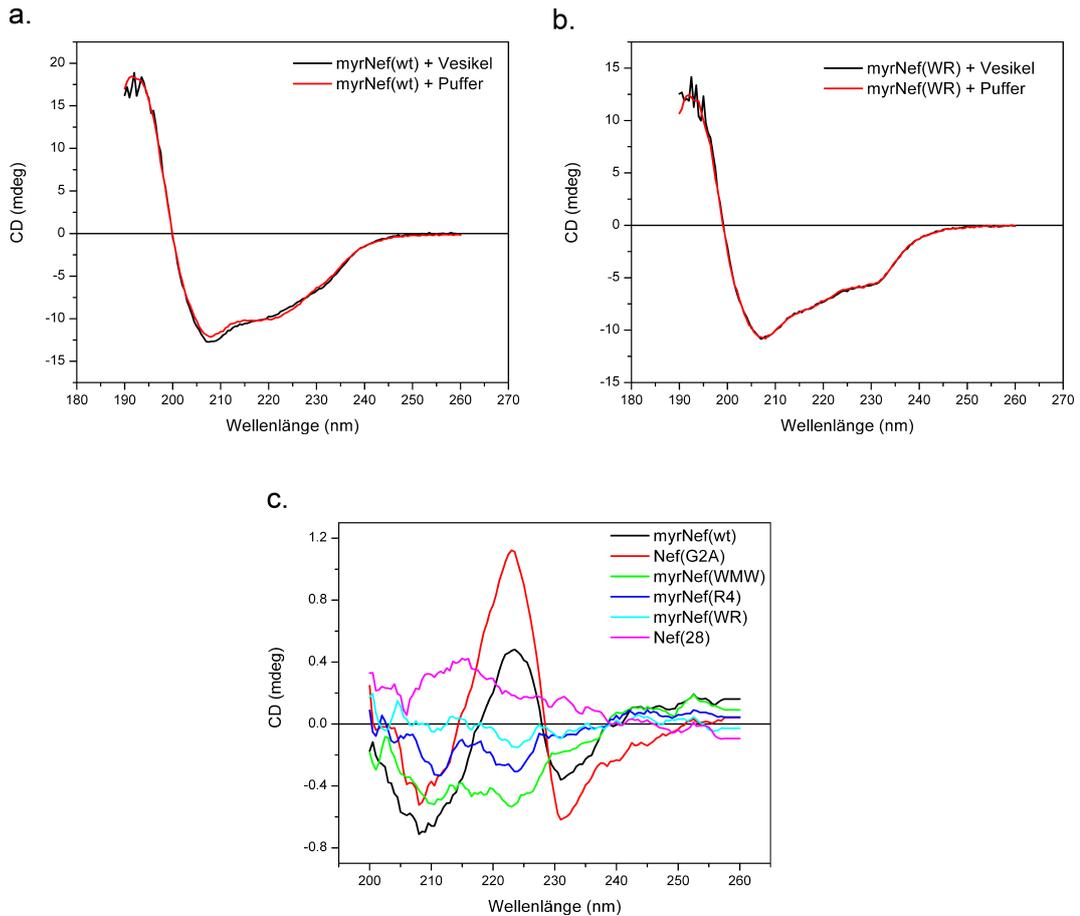


Abbildung 30: **a.** CD-Spektren von $3 \mu\text{M}$ myrNef(wt) mit bzw. ohne $250 \mu\text{M}$ Liposomen (DOPC/DOPG 70:30). Es ist eine Differenz zwischen den Spektren sowohl bei 208 nm als auch bei 222 nm zu erkennen. **b.** CD-Spektren von myrNef(WR), aufgenommen unter denselben Bedingungen wie in a. Die Spektren liegen übereinander und weisen keine Differenz bei 208 bzw. 222 nm auf. **c.** Differenz der CD-Spektren in An- bzw. Abwesenheit von Liposomen für sämtliche untersuchten Mutanten von Nef.

Protein	Helix	Sheet	Turns	Unordered	Total	NRMSD
myrNef(wt)	0.30	0.21	0.18	0.30	0.99	0.015
myrNef(wt)+Lip	0.33	0.19	0.16	0.31	0.99	0.021
Nef(G2A)	0.34	0.17	0.19	0.29	0.99	0.018
myrNef(R4)	0.24	0.26	0.20	0.31	1.01	0.019
myrNef(WMW)	0.20	0.26	0.19	0.36	1.01	0.022
myrNef(WR)	0.21	0.25	0.17	0.36	0.99	0.025
Nef(28)	0.23	0.24	0.18	0.35	1.00	0.029

Tabelle 20: Der ermittelte Anteil an Sekundärstrukturgehalt von myrNef(wt) und der Mutanten ist in tabellarischer Form gezeigt. +Lip zeigt an, dass die Messung des Proteins in Anwesenheit von Liposomen erfolgte. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe von Dichroweb [168, 169]. Die durch das Programm erhaltenen Werte für reguläre und nichtreguläre α -Helices wurden ebenso wie die Werte für reguläre und nichtreguläre β -Faltblätter summiert. Dargestellt sind nur die Ergebnisse, die den niedrigsten NRMSD-Wert aufweisen, die mit dem Programm CDSSTR unter Verwendung des Datensatzes 7 bei Dichroweb erzielt wurden. Der NRMSD-Wert ist ein Hinweis auf die Qualität der von dem Programm durchgeführten Kurvenanpassung und ist definiert als: $[\sum(\theta_{exp} - \theta_{calc})^2 / \sum(\theta_{exp})^2]^{1/2}$. Weitere Ergebnisse, die unter Verwendung anderer Analyseprogramme oder Referenzdatensätze ermittelt wurden, sind im Anhang zu finden (Kap. 8.4).

6.5 Die Interaktion von Nef und CD4 an Modellmembranen

Eine der wichtigsten Funktionen von Nef ist die durch das Protein vermittelte Internalisierung des CD4-Rezeptors von der Oberfläche einer infizierten Zelle. Dies dient zum einen der Vermeidung einer Superinfektion der Zelle durch mehrere Viren und zum anderen wird ein Rückbinden knospender Viren auf die Zelle verhindert. Wie die Internalisierung des Rezeptors allerdings auf molekularer Ebene vermittelt wird, ist noch weitgehend unbekannt. Grzesiek *et al.* ermittelten durch NMR-Spektroskopie einen K_d von ca. $500 \mu\text{M}$ für die direkte Bindung von Nef an ein CD4 Peptid [170]. Dagegen zeigten Bentham *et al.*, dass die Internalisierung von CD4 unabhängig von der direkten Nef-CD4-Interaktion ist [171]. Weiterhin berichten Lock *et al.*, dass Nef Adaptorproteine benötigt, um eine Internalisierung zu bewerkstelligen, wobei keine Bindung zwischen Nef und CD4 stattfindet [172].

Das von Grzesiek *et al.* für die NMR-Spektroskopie verwendete Nef-Protein wies keine Myristoylierung auf und aufgrund der Unlöslichkeit des Komplexes aus cytoplasmatischer Domäne von CD4 und Nef wurde auch nur ein 13 AS umfassendes Peptid von CD4 eingesetzt. Deshalb sollte nun überprüft werden, ob die Interaktion zwischen myristoyliertem Nef und der vollständigen cytoplasmatischen Domäne von CD4 durch Liposomen stabilisiert werden kann.

Hierzu wurde zunächst von Vanessa Laumann mittels Festphasensynthese ein CD4-Peptid synthetisiert, das in seiner natürlichen, 39 AS umfassenden cytoplasmatischen Form, in Abb. 31 schematisch dargestellt ist [173]. Die cytoplasmatische Domäne von CD4 enthält bereits zwölf positiv geladene Aminosäuren und nur eine azide Aminosäure. Die Synthese erfolgte beginnend von AS 422. Das an Position 422 vorhandene Cystein wurde durch ein Lysin ersetzt, das an beiden Aminogruppen mit

einer Palmitoylierung versehen wurde, um eine Membranbindung zu erzielen. Weiterhin weist es neben den für die Signaltransduktion von CD4 entscheidenden Motiven, ein mit dem Farbstoff NBD modifiziertes Lysin (K₄₅₃) für die Fluoreszenzdetektion auf. Das erhaltene Peptid war in 49,9% Wasser, 50% Acetonitril und 0,1% TFA gelöst.

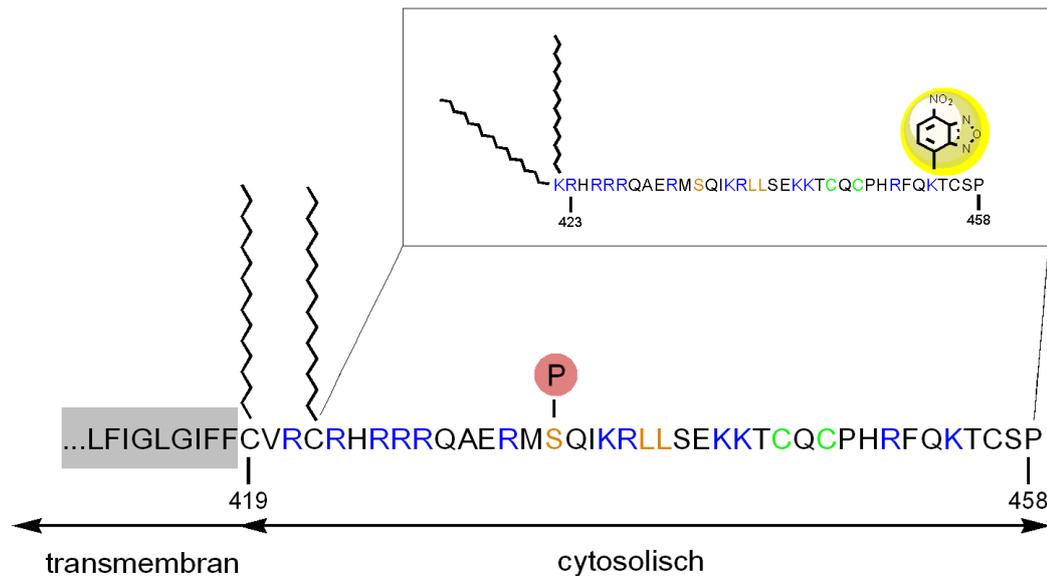


Abbildung 31: Schematische Darstellung der nativen cytoplasmatischen Domäne von CD4; der transmembrane Bereich ist grau unterlegt. Das synthetisierte Peptid (dargestellt im Kasten) entspricht dem cytosolischen Teil, beginnend von AS 422. Die Synthese wurde von Vanessa Laumann durchgeführt [173]. Um die Membranbindung zu vermitteln, wurde die Mutation C₄₂₂ → K eingeführt, und das Lysin anschließend an beiden Aminogruppen palmitoyliert. Das phosphorylierungsabhängige Dileuzinmotiv für die Bindung von AP-2 ist in Orange und das Bindungsmotiv für Lck in Grün dargestellt. Positiv geladene AS sind blau dargestellt.

Der erste Schritt lag in der Präparation von CD4-dekorierten Liposomen. Dazu wurde das Peptid entweder

- direkt in der gewünschten Konzentration zu einer Stammlösung an Liposomen gegeben oder
- vor der Präparation der Liposomen in den Kolben gegeben, das Lösungsmittel (s.o.) entfernt und dann wie in Kap. 5.2.10 beschrieben mit der Präparation der Liposomen fortgefahren.

Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal der CD4-dekorierten Liposomen überprüft. Die Exzitation des NBD-modifizierten Peptids erfolgte bei 476 nm und die erhaltene Emission ist in Abb. 32 zu sehen. Als Maximum der Emission wurden 520 nm bestimmt, und alle nachfolgenden, zeitabhängigen Experimente wurden bei

dieser Emissionswellenlänge gemessen. Für die Liposomen wurde mittels DLS ein Radius von 49,3 nm ermittelt.

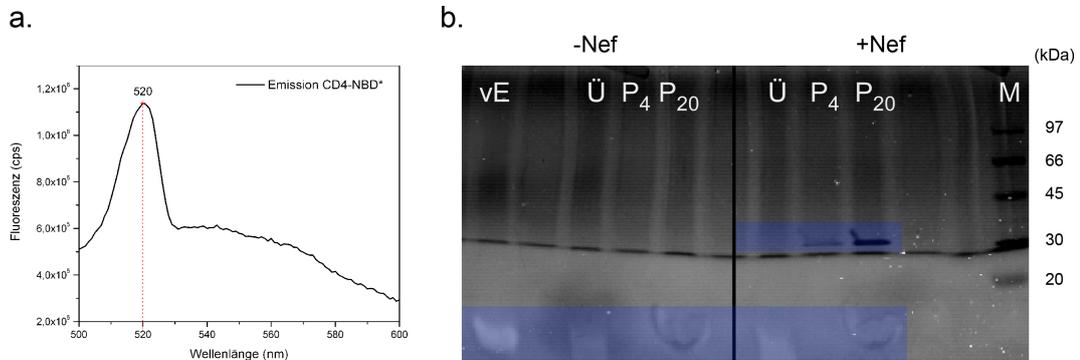


Abbildung 32: **a.** Emissionsspektrum der CD4-NBD*-dekorierten Liposomen; das Maximum liegt bei 520 nm, für die Anregung wurde eine Wellenlänge von 476 nm gewählt. **b.** Kopräzipitation der CD4-NBD*-tragenden Liposomen ohne (links) und mit myrNef(wt) (rechts); M=Marker, vE=Kontrolle vor Anwendung des Extruders, Ü=Überstand, P₄ bzw. P₂₀=4 bzw. 20 µl des resuspendierten Pellets. myrNef(wt) ist bei ca. 30 kDa und das Peptid bei <20 kDa zu erkennen.

Die Bindung des Peptids an Liposomen wurde zunächst durch Kopräzipitation überprüft. Dazu wurden Liposomen der Komposition DOPC/DOPG 70:30 zusammen mit dem Peptid präpariert und anschließend bei 200.000 g zentrifugiert. Der Überstand und das resuspendierte Pellet wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Dieser Versuch wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von myrNef(wt) durchgeführt. Dies diente der Kontrolle, dass Nef nicht im Überstand, sondern an Liposomen gebunden im Pellet zu finden ist, wie es auch für CD4 zu erwarten war. Während myrNef(wt) vollständig an die Liposomen bindet, ist eine fluoreszierende Bande auch teilweise im Überstand zu finden. Aufgrund der doppelten Palmitoylierung und dem hohen Anteil positiv geladener AS im Peptid wird allerdings angenommen, dass es sich bei dieser im Überstand befindlichen Fluoreszenz um eine Verunreinigung mit z. B. nicht palmitoyliertem Peptid handelt.

Um zu sehen, ob eine Änderung der NBD-Fluoreszenz von CD4 auftritt, wenn Nef zu den CD4-dekorierten Liposomen gegeben wird, wurde eine Titration der Liposomen mit myrNef(wt) durchgeführt. Im Gegensatz zu den bisherigen beschriebenen FRET Messungen, wurde hier direkt die Fluoreszenz des NBDs beobachtet. Durch eine Änderung der chemischen Umgebung der Fluorophors kann es zu einer veränderten Fluoreszenz kommen. Es wurden 750 µl einer Liposomenlösung (1 mM; DOPC/DOPG 70:30) vorgelegt und insgesamt fünfmal myrNef(wt) zugegeben, sodass die Konzentration des Proteins 2, 4, 6, 8, und 10 µM betrug. Es ist zu erkennen, dass die erste und die zweite Zugabe des Proteins eine rasche Zunahme der Fluoreszenz bewirkt. Eine weitere Zugabe ändert das Signal jedoch nicht weiter (Abb. 33a). Dies zeigt eine Änderung der chemischen Umgebung des NBD-Fluorophors durch die Anwesenheit von Nef an. Eine Erhöhung der Konzentration an CD4-NBD auf 0,2 µM bei zeitgleicher Senkung der Lipidkonzentration auf 250 µM resultiert nach

der Zugabe von $2,3 \mu\text{M}$ myrNef(wt) in dem Kurvenverlauf, der in Abb. 33b zu sehen ist. Dabei wurde festgestellt, dass das Protein-Liposomen-Gemisch nach der Messung präzipitiert war.

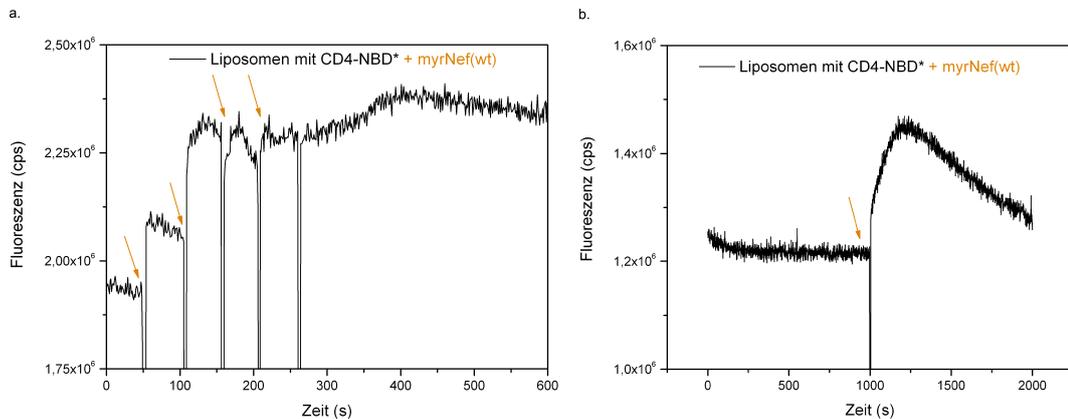


Abbildung 33: a. Fluoreszenzmessung von CD4-dotierten Liposomen, wobei die Liposomen 1 mM Gesamtlipid und $0,1 \mu\text{M}$ CD4-Peptid enthalten; die Pfeile zeigen Zugabe von je $2 \mu\text{M}$ myrNef(wt) an. b. Wiederholung von a., allerdings mit $250 \mu\text{M}$ Gesamtlipid, $0,2 \mu\text{M}$ CD4 und einer einmaligen Zugabe von $3 \mu\text{M}$ myrNef(wt).

Als Kontrolle wurden drei Ansätze erstellt, um die Stabilität der einzelnen Komponenten zu überprüfen:

- (1) $250 \mu\text{M}$ Liposomen + $2,3 \mu\text{M}$ myrNef(wt)
- (2) $250 \mu\text{M}$ Liposomen + $0,2 \mu\text{M}$ CD4-NBD
- (3) $250 \mu\text{M}$ Liposomen + $0,2 \mu\text{M}$ CD4-NBD + $2,3 \mu\text{M}$ myrNef(wt)

Während die Lösungen aus Ansatz 1 und Ansatz 2 selbst nach Inkubation bei RT über Nacht keine Indizien für eine Präzipitation aufwiesen, war bei Ansatz 3 bereits nach kurzer Zeit das Ausfallen des Gemisches zu beobachten. Ansatz 3 wurde bei 13.000 g zentrifugiert und das Pellet in $200 \mu\text{l}$ Chloroform aufgenommen. Dünnschichtchromatographie (DC) mit Chloroform:Methanol (1:1) und anschließende Färbung mit Phosphomolybdat zeigte, dass die Lipide im Pellet enthalten waren (Abb.34). Eine Erklärung hierfür wäre die Vernetzung der Liposomen durch die Interaktion von CD4 und Nef. Ein Ausfallen der Komponenten verhindert die Anwendung von Gleichgewichtsfluoreszenz-Techniken.



Abbildung 34: DC des ausgefallenen Fluoreszenzansatzes (Ansatz 3); Laufmittel Chloroform:Methanol 1:1; Färbung der Lipide mit Phosphomolybdat; v.l.n.r.: Probe, DOPC (rein), DOPG (rein). Es kann davon ausgegangen werden, dass die höhere Bande bei der Probe DOPG entspricht, da nur DOPC und DOPG in den Liposomen enthalten war. Die Spur in der reinen DOPG aufgetragen ist, ist überladen.

Da sich das Ausfallen des Protein-Liposomen-Gemischs allerdings verhältnismäßig langsam vollzieht, und die Fluoreszenzänderung sehr schnell erfolgt, wurde versucht diesen Sprung mittels *Stopped Flow* Messungen zeitlich aufzulösen. Dazu wurden $0,1 \mu\text{M}$ des CD4-Peptids zu Liposomen ($250 \mu\text{M}$ zugängliche Lipide) gegeben, und diese CD4-dekorierten Liposomen wurden sodann im *Stopped Flow* Gerät gegen eine variable Konzentration von myrNef(wt) gemessen (Abb. 35a). Die erhaltenen Daten konnten biexponentiell angepasst werden (Abb. 35b).

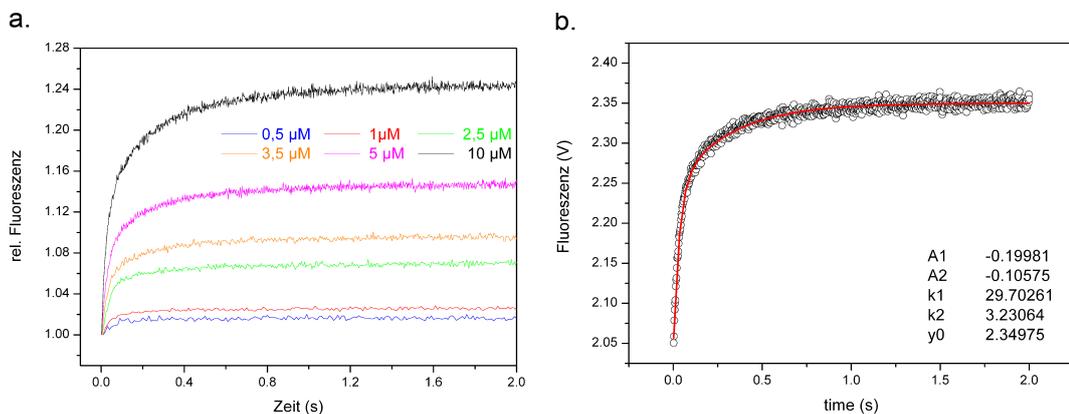


Abbildung 35: **a.** Daten der *Stopped Flow* Messungen von mit $0,1 \mu\text{M}$ CD4-NBD dekorierten Liposomen gegen $0,5 \mu\text{M}$ - $10 \mu\text{M}$ myrNef(wt). **b.** Beispiel für eine biexponentielle Kurvenanpassung; es liegt der Datensatz für den Kurvenverlauf aus Abb. 35a bei einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ myrNef(wt) zugrunde; Die erhaltenen Parameter sind dargestellt.

Ein Auftragen der beiden beobachteten Ratenkonstante $k_{(1)obs}$ und $k_{(2)obs}$ ist in Abb. 36a dargestellt. Auffällig ist, dass $k_{(2)obs}$ eine ähnlichen Wert wie für die Nef-Liposom-Interaktion aufweist. $k_{(1)obs}$ liegt ebenfalls in einem vergleichbaren Bereich,

auch wenn bei der hier verwendeten Konzentration an zugänglichen Lipiden ein höherer Wert zu erwarten wäre. Es muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass CD4 bereits Bindungsplätze auf den Liposomen besetzt und somit die effektive Konzentration an für Nef zugänglichen Bindungsstellen geringer ist. Die graphische Darstellung der Amplitudensumme beider Phasen ist in Abb. 36b zu sehen. Es ist eher ein linearer als ein hyperbolischer Zusammenhang zu erkennen, der sich der Auswertung nach Gleichung 10 (siehe Kap. 5.3.6) entzieht. Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Nef scheint sich jedoch ein Abflachen der Kurve anzudeuten, was einen K_d -Wert von etwas größer als $10 \mu\text{M}$ nahelegt.

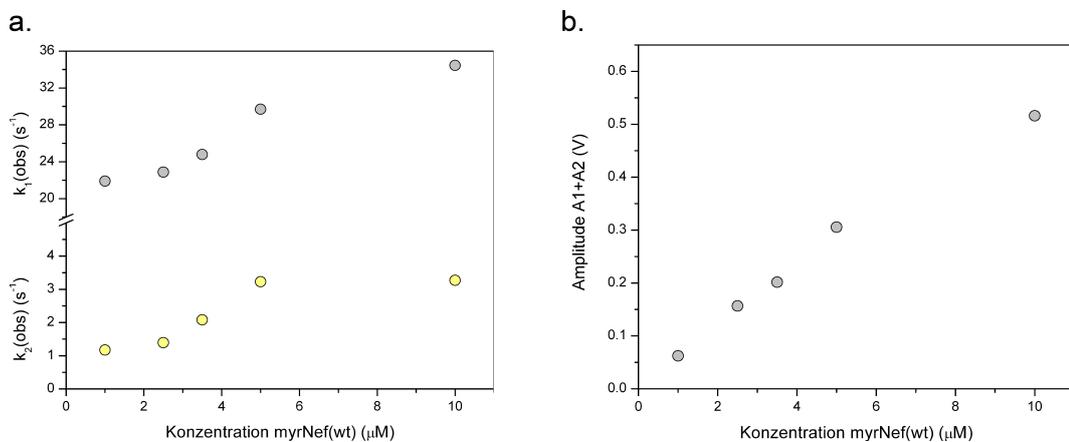


Abbildung 36: Die aus den Daten aus Abb. 35a durch biexponentielle Kurvenanpassung bestimmten Raten (a.) und Amplituden (b.).

Aufgrund der Ergebnisse der Titration sollte versucht werden, die Konzentration des CD4-Peptids, bei einer konstanten Konzentration von myrNef(wt) ($10 \mu\text{M}$), zu erhöhen. Eine Steigerung der Konzentration in den Bereich des K_d -Wertes war allerdings nicht möglich, da zum einen das Peptid in einer zu geringen Menge vorlag, und zum anderen die Membranen vermutlich kaum noch Bindungsstellen für Nef aufweisen würden. Aber auch bereits die Erhöhung der Peptid-Konzentration um den Faktor 10 und die Verlängerung der Messzeit auf 200 s zeigt ein Problem auf (Abb. 37). Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ CD4 tritt eine starke Abnahme der Fluoreszenz ein, die vermutlich mit dem Ausfallen des Komplexes korreliert. Dieser Effekt ist auch bereits bei einer Peptidkonzentration von $0,5 \mu\text{M}$ in einer weniger stark ausgeprägten Form zu erkennen.

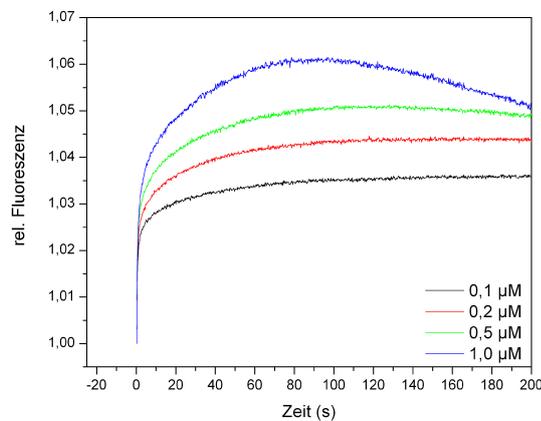


Abbildung 37: Variation der Konzentration an CD4 von 0,1-1,0 μM und Messung über einen verlängerten Zeitbereich von 200 s. Die Konzentration des myristoylierten Nefs lag bei 10 μM .

6.6 Farnesylierung von Nef

In einem weiteren Projekt sollte untersucht werden, ob die Funktionen von Nef unabhängig von der Art der Lipidierung sind, also ob die N-terminale Myristoylierung gegen eine C-terminale Farnesylierung ausgetauscht werden kann.

Es wurden verschiedene Konstrukte generiert, die anstatt des N-terminalen Myristoylierungsmotivs ein C-terminales CaaX-Motiv für die Farnesylierung aufwiesen. Um eine stabile Membranassoziation zu erreichen, wurde ein weiteres Konstrukt erstellt, das zusätzlich C-terminal positiv geladene Aminosäuren enthielt. Dieses Sequenzmotiv wurde dem humanen Rac1 Protein, einer kleinen GTPase, entlehnt.

6.6.1 Klonierung des farnesylierten Nefs

Für biochemische Experimente mit rekombinant erzeugten Proteinen, wurde die Klonierung ausgehend von der codonoptimierten Variante von Nef (siehe Kap. 6.1) in den Vektor pProEx-HTa vorgenommen. Dieser weist eine Schnittstelle für die TEV-Protease auf, um den Histidin-Tag, der der Reinigung mittels Metallaffinitäts-Chromatographie dient, zu entfernen. Im Gegensatz zu den myristoylierten Nef Varianten musste darauf geachtet werden, dass der Histidinanker N-terminal lokalisiert ist, um die C-terminale Farnesylierung zu ermöglichen. Es wurden insgesamt drei Konstrukte generiert, die in Tab. 21 aufgelistet sind. Dabei unterscheiden sich die ersten beiden lediglich in der Sequenz der CaaX-Box. Die Sequenz, die effizienter durch die verwendete FTase farnesyliert wird, sollte dann als Grundlage für das dritte Konstrukt dienen, das sowohl positive Aminosäuren als auch die CaaX-Box enthält. Vor Expression des Proteins wurden PCR-generierten Plasmide durch die hausinterne Sequenzierung überprüft.

Bezeichnung	C-terminale Sequenz	Beschreibung
Nef(G2A/CIIM)	C ₂₁₀ IIM	myristoylierungsdefizient; CaaX-Motiv
Nef(G2A)	C ₂₁₀ AIM	myristoylierungsdefizient; CaaX-Motiv
Nef(G2A/KKCIIM)	PVKKRKRKC ₂₁₀ IIM	myristoylierungsdefizient; CaaX-Motiv mit vorhergehendem C-terminalen, positiven Ladungscluster

Tabelle 21: Generierte Konstrukte von Nef, die eine C-terminale CaaX-Box für eine Farnesylierung aufweisen.

6.6.2 Expression, Reinigung und Farnesylierung von Nef

Die Plasmide von Nef(G2A/CIIM), Nef(G2A/CAIM) und Nef(G2A/KKCIIM) wurden in hitzekompetente BL21(DE3)Zellen transformiert. Die Expression und Reinigung erfolgte wie bereits für andere Nef-Varianten beschrieben (siehe Kap. 6.1), allerdings ohne Zugabe von Myristinsäure bei der Expression, da keine Coexpression der NMT erfolgt. Weiterhin wurde der Histidin-Tag durch Einsatz der TEV-Protease enzymatisch entfernt. Die Reaktion erfolgte bei 4 °C für 12 h und einem molaren Verhältnis von Protease/Protein von 1:200. Nef(G2A/CAIM) und Nef(G2A/CIIM) erzielte Ausbeuten von ca. 12 mg je Liter LB-Mediumkultur.

Die enzymatische Reaktion erfolgte durch die Tev-Protease für eine Dauer von 12 h bei 4 °C in 50 mM Tris pH (8,0), 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA und einem molaren Verhältnis Tev-Protease/Protein von 1:200.

Das Protein konnte ohne Probleme in dem standardmäßig verwendeten Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH (8,0), 1 mM DTE) konzentriert werden. Die Homogenität und Stabilität war für weitere Experimente ausreichend (siehe Abb. 38a). Die anschließende Farnesylierung verlief allerdings nur bei Nef(G2A/CIIM) erfolgreich, woraufhin das Konstrukt Nef(G2A/KKCIIM), wie oben beschrieben erstellt wurde. Dieses Protein präzipitierte jedoch bereits zu Beginn der Konzentrierung. Eine Änderung des pH-Wertes durch Verwendung von 20 mM MES pH=[6,0], 20 mM Tris-HCl pH (7,5) oder 20 mM Bicine pH=9,0 war ebensowenig erfolgreich wie eine Veränderung der Salzkonzentration (50 mM NaCl, 200 mM NaCl, 500 mM NaCl).

Die Farnesylierung von Nef(G2A/CIIM) wurde *in vitro* unter Verwendung der Farnesyltransferase, die freundlicherweise von Alexey Rak (MPI Dortmund) zur Verfügung gestellt wurde, und Farnesylpyrophosphat als Kosubstrat durchgeführt (siehe 5.2.9). Mittels ESI-MS wurde die erwartete Masse für das farnesylierte Nef bestätigt (siehe Abb. 38b).

6.6.3 Biochemische Charakterisierung des farnesylierten Nefs

6.6.3.1 Analytische Gelfiltration Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob farnesyliertes Nef ähnlich wie myristoyliertes Nef in einer kompakteren Form als nicht lipidiertes Nef vorliegt und um den Oligomerisierungszustand zu überprüfen, wurde

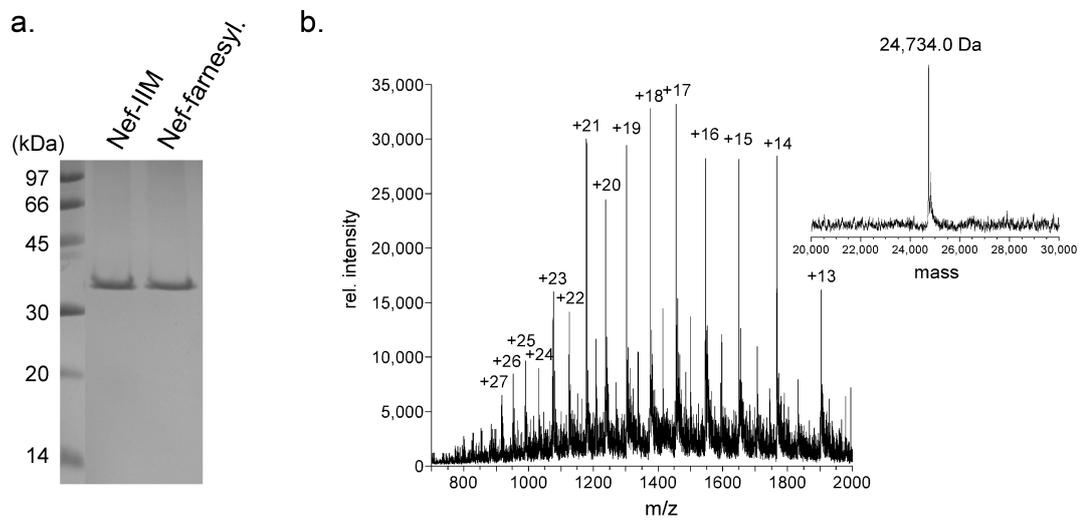


Abbildung 38: a. SDS-Gel von Nef vor (l.) und nach der Farnesylierung (r.) b. Esi-MS des farnesylierten Nef vor (l.) und nach Dekonvolution (r.)

zunächst eine analytische Gelfiltration durchgeführt. Bei Verwendung einer S75-Säule ist im Falle des farnesylierten Nefs ein Teil der Probe im Ausschlussvolumen zu finden, was eine Aggregation des Proteins nahelegt. Da bei Gebrauch einer S200-Säule trotz Zugabe von DTE ein Peak bei ca. 400 kDa im Elutionsprofil zu erkennen ist, scheint die Aggregation unspezifischer Natur zu sein. Auffällig ist weiterhin, dass das farnesylierte Nef keinen scharfen, definierten Peak, sondern einen breiteren, flacheren Peak liefert, als das nicht farnesylierte Protein. Der Grund hierfür könnte in einer Interaktion des Farnesylrestes mit der Gelmatrix liegen. Das unfarnesylierte Nef weist neben dem erwarteten Peak bei ca. 30 kDa, der dem monomeren Zustand des Proteins entspricht, einen kleinen Peak bei ungefähr der doppelten Masse auf. Da dieser Peak jedoch nach Zugabe von DTE nicht mehr zu sehen ist, scheint es sich um eine durch Disulfidbrücken vermittelte dimerisierte Form von Nef zu handeln. Im Vergleich zu der myristoylierten Variante, bei der ein scharfer Peak erhalten wird [34], könnte das Protein somit in einer weniger kompakten Form vorliegen, in der der Farnesylanker solvens exponiert ist.

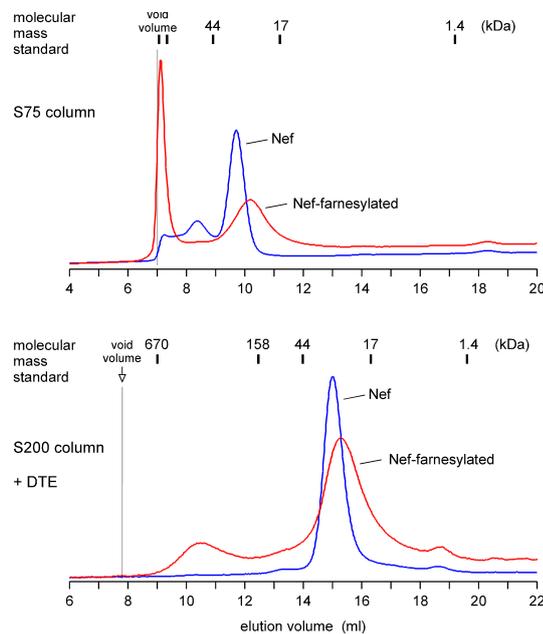


Abbildung 39: Analytische Gelfiltration des farnesylierten Nefs. Farnesyliertes Nef entspricht dem roten Kurvenverlauf, nicht farnesyliertes Nef als Kontrolle ist in Blau dargestellt; oben: Gelfiltrationslauf unter Verwendung einer S75-Säule; unten: Gelfiltrationslauf unter Verwendung einer S200-Säule und Zusatz von 2 mM DTE, um eventuelle Dimerisierung oder Oligomerisierung zu unterbinden.

6.6.3.2 Sekundärstruktur und thermische Stabilität Der mögliche Einfluss der unterschiedlichen Lipidierungen auf die thermische Stabilität des Proteins sollte mittels CD-Spektroskopie untersucht werden. Als Vergleich wurden myr-Nef(wt) und Nef(G2A) eingesetzt. Abb. 40 zeigt die CD-Spektren der verwendeten Proteine. Die Konzentration der Proteine wurde so gewählt, dass ein maximales Signal bei der Wellenlänge von 222 nm, erzielt wurde. Bei dieser Wellenlänge wurde die Temperaturdenaturierung der Proteine beobachtet. Aufgrund der hohen Absorption ist es nicht möglich die Spektren unterhalb einer Wellenlänge von 200 nm auszuwerten. Es ist jedoch an dem Kurvenverlauf zu erkennen, dass die Proteine eine vergleichbare Faltung, die sowohl α -Helices als auch β -Faltblattstrukturen beinhaltet, besitzen.

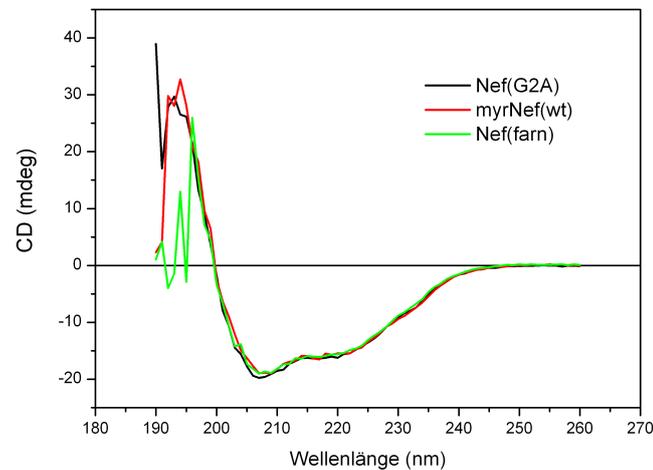


Abbildung 40: CD-Spektren des farnesylierten, myristoylierten und nicht myristoylierten Nef. Der ähnliche Kurvenverlauf zeigt an, dass die Proteine eine vergleichbare Faltung aufweisen.

Die temperaturinduzierte Denaturierung (siehe Abb. 41) liefert im Falle von myrNef(wt) und Nef(G2A) einen hierfür typischen Kurvenverlauf mit einer Schmelztemperatur von $64,8^{\circ}\text{C}$ bzw. $61,3^{\circ}\text{C}$. Dies zeigt eine höhere Stabilität der myristoylierten Form im Vergleich zu der myristoylierungsdefizienten Variante an. Die farnesylierten Form hingegen zeigt einen anderen Verlauf: Das Protein schmilzt eher langsam, als schlagartig bei einer definierten Temperatur. Dies deutet auf eine geringere Stabilität des Proteins in seiner cytosolischen Form hin. Weiterhin könnte die in der analytischen Gelfiltration zu sehende Aggregation und eine daraus resultierende Inhomogenität des farnesylierten Nefs für den atypischen Verlauf der Schmelzkurve verantwortlich sein. Sämtliche Proteinen waren nach der Messung präzipitiert und eine Rückfaltung durch Abkühlung war nicht möglich. Die Parameter der Kurvenanpassung sind in Tabelle 22 aufgelistet.

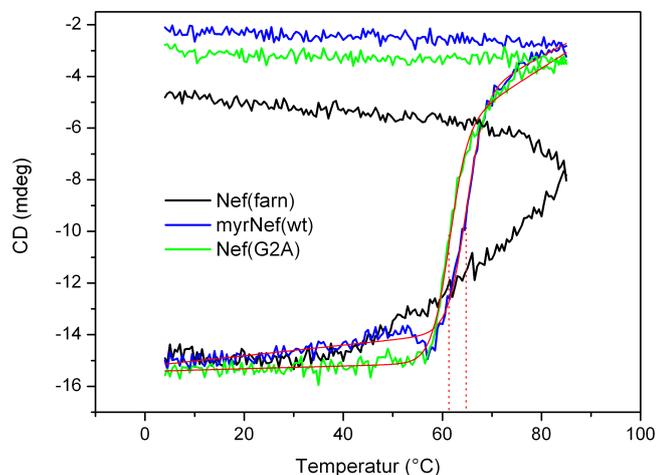


Abbildung 41: Schmelzkurven der Proteine zwischen 4 °C und 85 °C, die Kurvenanpassung – soweit möglich – ist in Rot dargestellt. Die Schmelztemperatur beträgt 64,8 °C für das myristoylierte bzw. 61,3 °C für das nicht myristoylierte Nef. Eine Bestimmung der Schmelztemperatur für farnesyliertes Nef ist nicht möglich.

	myrNef(wt)		Nef(G2A)	
(1)	4 - 85	[°C]	4 - 85	[°C]
(2)	$y = 0,102x - 11,38$		$y = 0,122x - 13,479$	
(3)	$y = 0,021x - 15,22$		$y = 0,0053x - 15,4224$	
(4)	0,255		0,252	
(5)	$T_m = 64,68 \pm 0,084$	[°C]	$T_m = 61,31 \pm 0,074$	[°C]
(6)	$dH = -508075 \pm 22560,2$	[J/mol]	$dH = -507047 \pm 21432,1$	[J/mol]
(7)	$dS = -1503,95 \pm 66,78$	[J/mol/K]	$dS = -1516,03 \pm 64,08$	[J/mol/K]

Tabelle 22: Die erhaltenen Parameter der Kurvenanpassung; (1) Bereich der Denaturierung; (2/3) Regressionsgeraden der stabilen Bereiche nach und vor Denaturierung; (4) Residuale Abweichung der Kurvenanpassung (5-7) Schmelzpunkt und thermodynamischen Parameter.

6.6.4 Membranbindung des farnesylierten Nef Proteins

Die Frage, wie die Farnesylierung von Nef im Vergleich zu der Myristoylierung die Membranbindung des Proteins beeinflusst, sollte mittels Oberflächenplasmonresonanz beantwortet werden. Farnesyliertes Nef wurde mit den Kontrollen myrNef(wt), Nef(G2A) und Nef(59) gemessen, wobei die Konzentration der Proteine jeweils 1 μ M betrug. Die Liposomen setzten sich aus 70 % DOPC und 30 % DOPG zusammen. Die bereits in Kap. 6.3.6 beschriebenen Ergebnisse für myrNef(wt), Nef(G2A) und Nef(59) konnten reproduziert werden: Das myristoylierte Protein bindet in hohem

Maße an die verwendeten Liposomen, wohingegen Nef(G2A) eine deutlich schwächere und Nef(59) keine Membranbindung aufweist. Farnesyliertes Nef bindet in etwas geringerem Ausmaß an die Liposomen als myristoyliertes Nef. Die beobachtete Dissoziation des farnesylierten Nef Proteins zeigt nicht wie erwartet einen exponentiellen Verlauf und verhindert eine kinetische Auswertung der Membranbindung. Das selbe Ergebnis wurde bei Konzentrationen der Proteine von $2 \mu\text{M}$ bzw. $5 \mu\text{M}$ beobachtet.

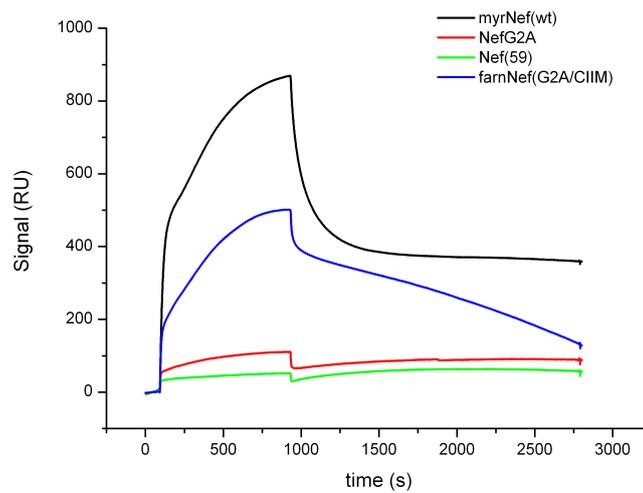


Abbildung 42: SPR-Messung des farnesylierten Nef. Die Proteine wurden in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ eingesetzt.

6.6.5 Lokalisation und CD4-Internalisierung des farnesyliertes Nef

Die Auswirkung der Farnesylierung sollte auch *in vivo* überprüft werden. Hierzu wurde untersucht inwieweit die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen Nef-Varianten und die Fähigkeit CD4 zu internalisieren beeinflusst wird. Es wurden verschiedene Mutanten generiert, die ein Farnesylierungsmotiv oder zusätzlich ein polybasisches Motiv trugen (Tab. 23). Diese Experimente wurden von Matthew Bentham und Johann Lok (Labor Mark Harris, University of Leeds) durchgeführt.

Bezeichnung	Myristoylierung	Farnesylierung	polybas. Motiv
myrNef(wt)	+	-	-
Nef(G2A)	-	-	-
Nef(CIIM)	+	+	-
Nef(G2A/CIIM)	-	+	-
Nef(+CIIM)	+	+	+
Nef(G2A/+CIIM)	-	+	+

Tabelle 23: Die für Experimente *in vivo* verwendeten Nef Proteine. Die jeweiligen vorhandenen Motive sind mit + gekennzeichnet. Das C-terminal eingefügte polybasische Motiv wurde der kleinen GTPase Rac1 entlehnt.

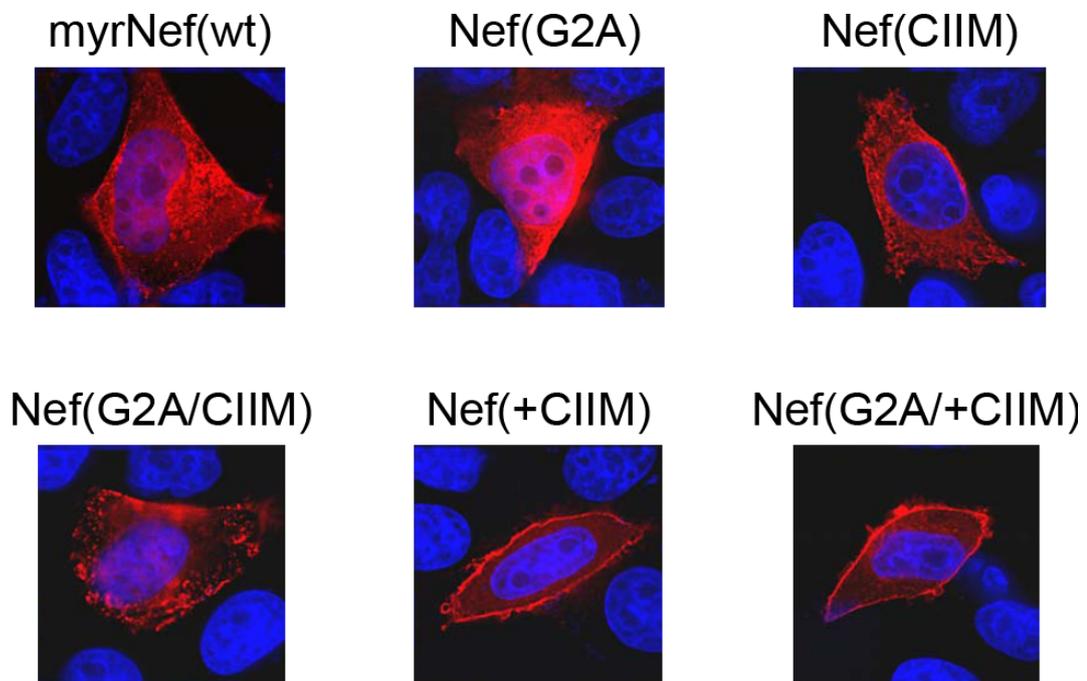


Abbildung 43: Konfokale Mikroskopie von HeLa-Zellen, die mit den unterschiedlichen Nef Konstrukten transfiziert wurden. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden zuerst mit einem monoklonalen Nef Antikörper und anschließend mit einem sekundären Antikörper inkubiert, der mit dem Fluorophor Alexa-Fluor594 konjugiert ist. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst blau gefärbt.

Wie bereits bekannt, ist der Wildtyp von Nef sowohl im Zytoplasma als auch an der Plasmamembran lokalisiert, während die myristoylierungsdefiziente Variante ausschließlich im Zytoplasma zu finden ist (Abb. 43). Die zusätzliche Farnesylierung des myristoylierten Wildtyps zeigt keinen Unterschied, während die Farnesylierung der myristoylierungsdefiziente Variante zu einer punktförmigen Färbung innerhalb des Zytoplasmas führt. Somit führt die Farnesylierung nicht zu einer stabilen Verankerung des Proteins an die Membran. Erstaunlicherweise wird durch diese Lipidierung

aber die Internalisierung von CD4 verhindert (Tab. 24). Dies ist vermutlich auf eine andere Orientierung von Nef an der Membran zurückzuführen. Die Anwesenheit des polybasischen Motivs führt in jedem Fall zu einer Rekrutierung des Proteins an die Plasmamembran. Da kein Unterschied zwischen Nef(+CIIM) und Nef(G2A/+CIIM) zu erkennen ist, scheint die Farnesylierung zusammen mit dem polybasischen Motiv ein stabiles Membranbindungsmotiv zu formen. Diese Mutanten sind ebenfalls nicht fähig CD4 zu internalisieren.

Protein	Fraktion Zytosol (%)	Fraktion Membran (%)	SD (+/-)	Subzelluläre Lokalisation	CD4 Internalisierung
Nef Wildtyp*	76	24	1,46 (n=7)	Cyto/PM	+++
Nef(G2A)*	86	14	1,97 (n=5)	Cyto	+/-
Nef(IIM)	36	64	1,24 (n=3)	Cyto/PM	+/-
Nef(G2A/IIM)	71	29	1,78 (n=3)	Cyto/PM	-
Nef(+IIM)	34	66	0,94 (n=3)	PM	-
Nef(G2A/+IIM)	37	63	2,45 (n=3)	PM	-

Tabelle 24: Ergebnis der subzellulären Fraktionierung, die wie in Bentham *et al.* beschrieben [30] durchgeführt wurde. Ebenfalls dargestellt ist die Fähigkeit der Nef Proteine CD4 zu internalisieren.

6.7 Expression und Reinigung des myristoylierten Vac8 Proteins

Für eine Analyse der allgemeinen Anwendungsmöglichkeit der auf FRET basierenden Messung der Membranbindung, sollte Vac8 als ein weiteres myristoyliertes Protein rekombinant hergestellt werden. Dieses 578 AS umfassende Protein ist für die Vererbung von Vakuolen in Hefe kritisch, und nach Strukturvorhersagen besteht das Protein v.a. aus α -Helices. Diese Helices formen vermutlich mindestens elf Armadillo(Arm)-Repeats. Arm-Repeats weisen ein wenig striktes Konsensusmotiv von ungefähr 42 Aminosäuren auf und werden aus je drei α -Helices gebildet. Durch Interaktion benachbarter Arm-Repeats entsteht eine rechtshändige Superhelix von Helices, die eine Basis für Protein-Protein-Interaktionen bildet [174]. Für die Assoziation an die Vakuole wird Vac8 sowohl myristoyliert als auch palmitoyliert [175], wobei die Palmitoylierung an drei C-terminalen Cysteinen erfolgen kann [176].

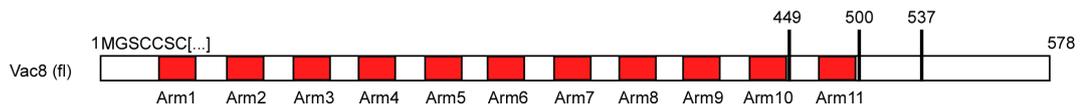


Abbildung 44: Vorhergesagte Domänenstruktur von Vac8; Die elf vorhergesagten Armadillo-Repeats sind eingezeichnet (Arm1-11), ebenso wie die ersten sieben AS, die sowohl das Myristoylierungsmotiv $M_{(1)}GxxxS$ als auch drei Cysteine für die Palmitoylierung enthalten. Die C-terminal verkürzten Konstrukte sind durch die Nummer der letzten im jeweiligen Konstrukt vorkommenden AS dargestellt (449, 500, 537).

Aufgrund der Strukturvorhersage wurden verschiedene Konstrukte generiert, die in Tab. 25 aufgeführt sind. Die Konstrukte sind auch graphisch zusammen mit der vermuteten Domänenarchitektur in Abb. 44 dargestellt. Die Klonierung erfolgte wie im Fall von Nef in den Vektor pET23d und die Sequenzierung zeigte eine unerwünschte Mutation des Prolins 19 zu Serin. Da das Prolin aber außerhalb der vorhergesagten Arm-Repeats lag, wurde die Mutation hingenommen. Die Myristoylierung und Expression wurde wie schon für Nef beschrieben durchgeführt (siehe Kap. 6.2).

Bezeichnung	Beschreibung	Expression
myrVac8(449)	AS 1-449; Arm10 und der restliche C-Terminus sind entfernt	nicht löslich
myrVac8(500)	AS 1-500; Konstrukt, dass direkt nach Arm11 endet	nicht löslich
myrVac8(537)	AS 1-537; C-terminaler, vermutlich ungefalteter Bereich ist entfernt	löslich, starke Verunreinigung bzw. Abbau
myrVac8(fl)	AS 1-578; Vac8 in gesamter Länge	löslich, starke Verunreinigung bzw. Abbau
myrVac8(M194L)	AS 1-537; entspricht dem Konstrukt myrVac8(537) mit Mutation M ₁₉₄ L	bedingt löslich, kaum Verunreinigung
myrVac8(AA)	AS 1-537; entspricht dem Konstrukt myrVac8(537) mit Mutation M ₁₉₄ L, C ₄ A, C ₅ A, C ₇ K	wenig löslich, kaum Verunreinigung
myrVac8(GG)	AS 1-537; entspricht dem Konstrukt myrVac8(537) mit Mutation M ₁₉₄ L, C ₄ G, C ₅ G, C ₇ S	gut löslich in 10 % Glycerin, kaum Verunreinigung

Tabelle 25: Auflistung der erstellten Konstrukte von Vac8; Sämtliche Proteine sind myristoyliert und enthalten die Mutationen C₄S, C₅S, C₇S, P₁₉S. Ausnahmen hiervon sind myrVac8(AA) und myrVac8(GG), siehe Tab.

Von den ersten vier exprimierten Konstrukten waren nur myrVac8(537) und myrVac8(fl) löslich. SDS-PAGE zeigte neben der erwarteten Bande bei 64 kDa zusätzlich eine starke Verunreinigung bei ca. 45 kDa (Abb. 45a). Eine weitere Reinigung mittels Gelfiltration (Säulen: S75, S200) oder Q-Sepharose waren nicht erfolgreich. Nur unter Verwendung einer Phenylsepharosesäule konnte eine weitere Reinigung bewerkstelligt werden (siehe Abb 45c). Allerdings präzipitierte das Protein nahe der für diesen Reinigungsschritt notwendigen Konzentration an (NH₄)₂SO₄ von 1 M.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Verunreinigung um ein verkürztes Fragment von Vac8 oder ein anderes Protein handelt, wurde ein Western-Blot mit einem gegen den C-terminalen Histidin-Tag von Vac8 gerichteten Antikörper durchgeführt. Dieser detektierte sowohl die Bande bei 64 kDa, als auch die Bande bei 45 kDa (Abb. 45b). Deshalb lag es nahe, dass die Verunreinigung ein N-terminal verkürztes Fragment von Vac8 darstellt. Dies ist im Einklang mit der Beobachtung, dass sich die Proteine durch HIC trennen lassen, da das verkürzte Fragment keine Myristoylierung und somit vermutlich eine geringere Hydrophobizität aufweisen würde. Massenbestimmung mittels ESI-MS identifizierte eine Masse, die dem 385 Aminosäuren umfassenden

Fragment M₁₉₄-H₅₇₈ entsprechen könnte.

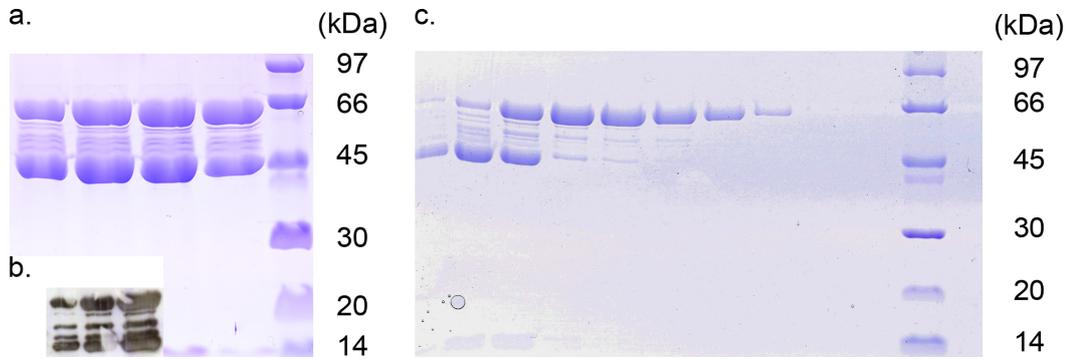


Abbildung 45: a. SDS-PAGE der Fraktionen von myrVac8(fl) nach Metallaffinitäts-Chromatographie b. Westernblot von myrVac8(fl) c. SDS-PAGE der Fraktionen von myrVac8(fl) nach Reinigung mittels einer Phenylsepharosesäule.

Die Ergebnisse der Massenbestimmung ließen vermuten, dass das Codon des Methionins 194 an Position einen Start für die Translation in *E.coli* darstellt. Eine Mutation dieses Restes zu Leuzin verhinderte die Expression des verkürzten Fragments (siehe Abb. 46a).

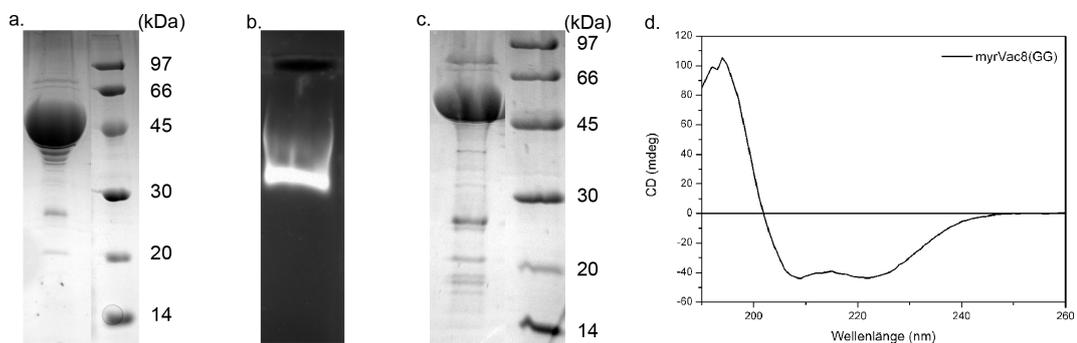


Abbildung 46: a. myrVac8(M194L) nach Metallaffinitäts-Chromatographie. b. Durch einen Anionenaustauscher abgetrennte DNA oder RNA c. myrVac8(GG) nach Reinigung nach Metallaffinitäts-Chromatographie und Anionenaustauscher d. CD-Spektrum von myrVac8(GG); Das Protein ist gefaltet und weist einen hohen α -helikalen Anteil auf.

Protein	Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total	NRMSD
myrVac8(GG)	0,32	0,22	0,05	0,05	0,17	0,18	0,99	0,011

Tabelle 26: Mittels Dichroweb ermittelter Sekundärstrukturgehalt von myrVac8(GG)1-537. Die Berechnung wurde wie für Abb. 30 beschrieben durchgeführt.

Da das Verhältnis von $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ bei der Konzentrationsbestimmung des Proteins einen

Wert von 1,8 lieferte, war eine Verunreinigung der Probe mit DNA oder RNA zu vermuten. Unter Verwendung eines Anionenaustauscher wurde diese Verunreinigung abgetrennt und ein Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung bestätigte die Vermutung, dass es sich bei der Verunreinigung um eine Nukleinsäure handelt (Abb. 46b). Nach Abtrennung der Nukleinsäure stellte sich myrVac8(GG) als stabilste Variante heraus. Das schließlich erhaltene Protein konnte in einem Puffer, der 10 % Glycerin enthielt, bis auf eine Konzentration von 12 mg/ml gebracht werden. Durch CD-Spektroskopie wurde die Faltung des Proteins bestätigt (Abb. 46d). Der berechnete Sekundärstrukturgehalt zeigt, dass das Protein, wie es für Armadillopepeats zu erwarten ist, nahezu vollständig α -helikal vorliegt (Tab. 26).

Es wurde begonnen mit dem Protein einige Kristallisationsansätze zu erstellen, die bislang allerdings keinen Erfolg brachten.

7 Diskussion

7.1 Die Membranbindung von HIV-1 Nef_{SF2}

In dieser Studie wurde die Membranbindung von HIV-1 Nef_{SF2} mit molekularen, biochemischen und biophysikalischen Methoden untersucht. Um zu verstehen, welcher Mechanismus der Membranbindung zugrunde liegt, wurden sowohl die Eigenschaften des Proteins als auch der Membran verändert. Die für Nef unter Verwendung des in Kap. 6.3.1 beschriebenen FRET-Ansatzes erhaltenen Daten wiesen alle einen biexponentiellen Kurvenverlauf auf, was auf ein Vorhandensein zweier Prozesse bei der Membranbindung schließen lässt. Nalefski *et al.* konnten bei der Untersuchung der Membranbindung von PKC β II mit einem ähnlichen System ebenfalls zwei Prozesse beobachten, wobei sie einen Prozess der Membranbindung und den anderen einer unimolekularen Transition zuordneten [177].

Um den K_d -Wert für die Bindung von Nef an Membranen abschätzen zu können, wurde zunächst die Anzahl der Lipide bestimmt, die eine Bindungsstelle für Nef formen. Es ist zu beachten dass der Begriff Bindungsstelle in diesem Fall nicht als absolut zu betrachten ist. Vermutlich handelt es sich eher um einen Bereich an Lipidmolekülen, je nachdem ob Nef sterisch ungehindert an die Membran binden kann, oder sich benachbarte Nef-Moleküle aufgrund einer dichten Packung beeinflussen. Durch Änderung der Konformation von Nef könnten dann eventuell mehr Moleküle Nef pro Fläche an die Membran binden.

Das Ergebnis von ca. 25 Lipiden für eine Bindungsstelle stimmt gut mit in der Literatur beschriebenen Werten für Proteine ähnlicher Größenordnung überein. So wurden z. B. für Arf1, ein Protein mit einer molekularen Masse von 21 kDa, 20-25 Lipide ermittelt, um einen Bindungsplatz zu formen [138] und für Cytochrom c, das ca. eine Masse von 12 kDa aufweist, 11-13 Lipide [178]. Ausgehend von einer Fläche von $0,7 \text{ nm}^2$ mit der ein Molekül DOPC zu der Oberfläche eines Liposoms beiträgt [179], würde ein Nef Molekül ca. eine Fläche von $17,5 \text{ nm}^2$ für sich beanspruchen. Nimmt man für Nef eine sphärische Geometrie mit einem Radius von 2 nm an, würde dies einer Projektionsfläche von $A_{\text{PF}} = \pi r^2 = 12,5 \text{ nm}^2$ und somit einer dichten Packung des Proteins auf der Oberfläche der Membran entsprechen. In Abb. 47 sind die Strukturen der beschriebenen Proteine für einen Größenvergleich gezeigt. Es fällt auf, dass Nef deutlich größer im Vergleich zu den anderen Protein ist. Es muss jedoch beachtet werden, dass es sich nur um ein Modell handelt, das aus zwei verschiedenen NMR-Strukturen generiert wurde. Ein Binden der N-Terminalen Domäne an die Kernstruktur würde in einem deutlich kompakteren Protein resultieren, das in seinen Dimensionen mit Arf1 vergleichbar sein könnte [34, 157]. Der durch dieses Experiment ebenfalls erhaltene K_d -Wert von $0,25 \mu\text{M}$ für die Membranbindung von Nef stimmt gut mit dem durch die Gleichgewichtskonstanten ermittelten K_d -Wert von $0,32 \mu\text{M}$ überein.

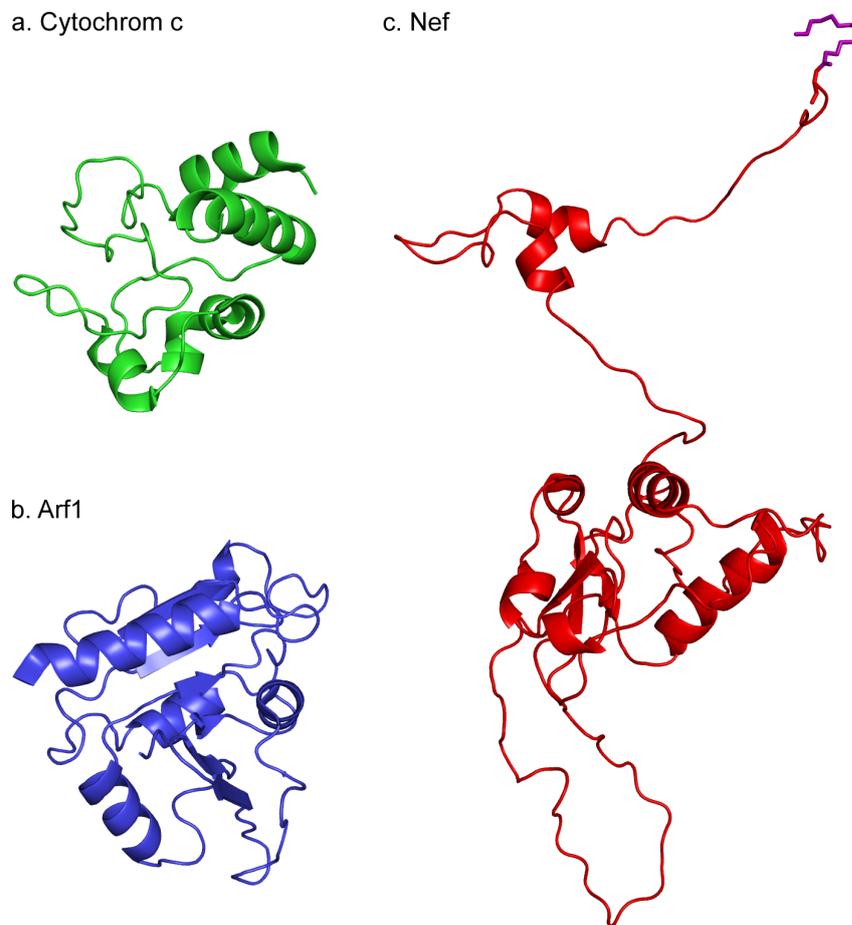


Abbildung 47: Beispiele einiger membranbindender Proteine, von denen die Anzahl der Lipide pro Bindungsfläche bestimmt wurde. **a.** NMR-Struktur von Cytochrom c in seiner reduzierten Form, PDB-ID: 1J3S, to be published Jeng, W.-Y **b.** NMR-Struktur von Arf1; die ersten 17 AS wurden für die Strukturbestimmung entfernt, PDB-ID: 1U81, Seidel *et al.*, 2004 [180] **c.** Modell von Nef, das sich aus zwei NMR-Strukturen zusammensetzt. Die Myristoylierung ist in violett dargestellt. PDB-ID: 1QA5/2NEF, Geyer *et al.*, 2001 [26].

Viele membranassoziierte Proteine besitzen Ansammlungen basischer Aminosäuren, die häufig im Zusammenspiel mit einem Myristinanker, wie es z. B. bei Src der Fall ist [93], oder einer Prenylierung [181], wie es z. B. bei K-Ras der Fall ist, die Membranbindung unterstützen. Mittels Mutationen innerhalb der N-terminalen Ankerdomäne konnte der Einfluss sowohl basischer als auch hydrophober Aminosäuren auf die Membranbindung gezeigt werden. Der Beitrag der basischen Aminosäuren fällt allerdings im Vergleich zu Src, dessen Membranbindungseigenschaften bereits gut untersucht wurden, gering aus. Sigal *et al.* [93] bestimmten einen K_d -Wert von $0,6 \mu\text{M}$ für die Bindung von c-Src an Liposomen, die einen Anteil von 33 % azider

Lipide aufwiesen⁶.

Die Mutation von K₅/K₉ bzw. fünf basischen Aminosäuren in Src (vergl. Tab. 27) zu Asparagin führte zu Dissoziationskonstanten von 20 μ M, bzw. 100 μ M, was eine Reduktion der Affinität um über zwei bzw. drei Größenordnungen bedeutet. Bei Nef wurde durch Mutation von vier Argininen zu Alanin nur eine Reduktion um einen Faktor 3,8 erzielt. Die Grund hierfür könnte darin liegen, dass bei der verwendeten Variante myrNef(R4) nur ein Teil der basischen Aminosäuren mutiert wurden. Insbesondere besitzt Nef neben dem für die Myristoylierung förderlichen K₇ noch ein Arginin und ein Lysin an Position 4 bzw. 8. Da die Mutation von vergleichbaren Aminosäuren in Src bereits in einer Reduktion der Affinität um einen Faktor 30 resultiert, ist davon auszugehen, dass die in Nef verbliebenen positiv geladenen AS ausreichen, um einen vergleichbar drastischen Effekt auf die Affinität der Membranbindung zu verhindern. Somit könnte das basische Bindungsmotiv in Nef alle in Tab. 27 hervorgehobenen Aminosäuren umfassen. Weiterhin könnte es eine Rolle spielen, dass die Mutationen in Src zu Asparagin durchgeführt wurden. Diese Aminosäure ist im Vergleich zu den in Nef eingeführten Alaninen, das als Seitenkette nur eine Methylgruppe besitzt, größer und ist zudem polar.

Protein	N-terminale Sequenz
Nef(wt)	myr-GGKWSKRSMGGWSAIREMRRRAEPR
c-Src	myr-GSSKSKPKDPSQRRRSLEPPDSTHH

Tabelle 27: Vergleich der N-terminalen Aminosäuren von Nef_{SF2} und c-Src. Basische Aminosäuren sind blau dargestellt und Reste, die in dieser Studie bzw. in einer Studie von Sigal *et al.* [93] mutiert wurden sind unterstrichen. Eine Mutation von K₇ ist nur unter Vorbehalt möglich, da es sich bei dieser Aminosäure um ein Bestandteil des erweiterten Konsensusmotiv für die Myristoylierung handelt [182].

Neben basischen Aminosäuren können auch hydrophobe Aminosäuren zu der Membranbindung von Proteinen beitragen. Vor allem Tryptophan und Tyrosin haben eine spezifische Affinität für die Lipid-Wasser-Grenzschicht [183, 184]. Untersucht wurde die Rolle hydrophober AS z. B. bei PLA₂ [159]. Dieses Protein nutzt sowohl basische als auch hydrophobe AS für die Membranbindung. Bereits die Mutation eines einzelnen Tryptophans kann zu einer Abnahme der Affinität zu DHPG (*dihexanoylphosphatidylglycerol*) um einen Faktor von 7,4 führen⁷. Bei Nef bewirkt die Mutation der drei Aminosäuren W₅, M₁₀ und W₁₃ nur eine Reduktion der Affinität um den Faktor 2,5. Allerdings berichten Sumandea *et al.*, dass die hydrophoben Aminosäuren

⁶Der in dieser Veröffentlichung ermittelte K_d -Wert bezieht sich auf die Konzentration zugänglicher Lipide und nicht auf die Konzentration an Bindungsplätzen.

⁷Der Faktor 7,4 berücksichtigt die Anzahl der Lipide pro Bindungsplatz, die PLA₂ benötigt. Diese sind allerdings mit 48 für den Wildtyp und 130 für die Mutante W_{61A} sehr unterschiedlich [159]. Bei Annahme einer konstanten Zahl an Lipidmolekülen pro Bindungsplatz für die unterschiedlichen Mutanten, wie sie für Nef getroffen wurde, ergibt sich lediglich ein Faktor von 2,7.

besonders wichtig für die Assoziation dieser Variante der PLA₂ an neutrale Liposomen sind [159]. Da Nef nicht an neutrale Vesikel bindet, würde dies erklären, warum der Einfluss der hydrophoben Reste bei Nef geringer ausfällt. Die elektrostatischen Wechselwirkungen sind für die Assoziation an negativ geladene Modellmembranen von größerer Bedeutung.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass drei verschiedene Motive einen Beitrag zu der Membranbindung von Nef leisten:

- (1) Myristoylierung
- (2) basische Aminosäuren
- (3) hydrophobe Aminosäuren

Wie der Einfluss der basischen Aminosäuren auf die Membranbindung bereits vermuten lässt, konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenladung der Liposomen die Membranbindung von Nef ebenfalls stark beeinflusst. Die Affinität von Nef zu Modellmembranen nimmt in dem untersuchten Bereich von 10-30% azider Lipide exponentiell zu, wie es zu erwarten war (McLaughlin *et al.*, 2005 [161] *supplement*). Erstaunlicherweise bindet Nef nicht an Liposomen mit neutraler Ladung, obwohl der apparente K_d -Wert für die Bindung einer Myristoylgruppe an Phospholipidvesikel auf $10^{-4}M$ bestimmt wurde. Dieser Wert wurde von Peitzsch *et al.* durch Bindungsstudien kleiner hydrophiler Peptide an elektrisch neutrale Membranen erhalten [101]. Angemerkt sei, dass diese Affinität im zellulären Kontext zu schwach ist, um eine stabile Membranbindung zu vermitteln. Da die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentrationen von Nef im mikromolaren Bereich lagen, könnte die Affinität für neutrale Membranen zu gering sein, um eine Bindung nachzuweisen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Präsenz eines "Schalters", der zwischen zwei Konformationen des Proteins wechselt, in denen der Myristinanker entweder exponiert oder an das Protein gebunden ist. Dadurch würde sich die Affinität von Nef zu Membranen reduzieren. Die elektrostatische Interaktion zwischen Nef und der Membran könnte die zusätzliche freie Bindungsenergie bereitstellen, um diesen Effekt aufzuheben. Bei Arf1 z. B. ist der Austausch von GDP zu GTP Voraussetzung für ein Herausklappen des Lipidankers [138] und mehrere Arten von Myristinschaltern wurden bereits gefunden [70]. Indizien, die ein Binden des eigenen N-Terminus in Nef nahelegen, unterstützen diese Hypothese [34, 157].

In dieser Arbeit wurde ein starker Einfluss der Krümmung auf die schnelle Phase der Assoziation von Nef an Membranen nachgewiesen. Die Gleichgewichtskonstante der ersten Phase zeigt eine Abhängigkeit vom Radius der Liposomen in der Form $1/r^2$, die eine einfachere Insertion des Lipidankers nahelegt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Krümmung der Membran zu einer Spreizung von Lipiden in der äußeren Membranschicht führt. Dies könnte z. B. auch auf die Seitenketten von Aminosäuren zutreffen. Da die Ratenkonstanten der zweiten Phase keinen Unterschied aufweisen, scheint die Formation der Helix nicht von der Krümmung der Membran

abhängig zu sein. Dies ist nicht selbstverständlich, und es wurden bereits Beispiele gefunden, bei denen amphipathische Helices z. B. durch ein ALPS-Motiv Krümmung erkennen können [131] (siehe Kap. 2.4.2.4). Auch die Induktion von Krümmung der Membran durch ein Protein ist möglich. Die kleine GTPase Sar1 kann z. B. in ihrer aktiven Form Tubulierung von Modellmembranen bewirken [91]. Hierfür ist eine N-terminale, amphipathische Helix essentiell. Da Nef eine erhöhte Affinität zu stärker gekrümmten Membranen aufweist, ist es auch möglich, dass Nef eine Krümmung der Membranen bewirkt, was aber untersucht werden müsste. Aufgrund der Rolle von Nef bei der Clathrin-vermittelten Endozytose von CD4, wäre es denkbar, dass Nef entweder bevorzugt in Bereichen der Invagination bindet, oder nach Bindung des CD4 Moleküls selbst an der Generation von Krümmung für die Ausbildung einer solchen Invagination beteiligt ist.

Im Gegensatz zu der Oberflächenladung und der Krümmung, scheint die Komposition der Modellmembranen in den hier durchgeführten Experimenten eine untergeordnete Rolle für die Membranbindung von Nef zu spielen. Es konnte mittels PIP-Strips bestätigt werden, dass Nef negativ geladene Membranen binden kann, wobei nicht entscheidend ist, ob die Ladung durch z. B. Phosphatidylinositolphosphate oder andere Lipide beigesteuert wird. Auch ein Unterschied zwischen den an unterschiedlichen Positionen phosphorylierten Phosphatidylinositolphosphate konnte nicht festgestellt werden. Weiterhin bindet Nef nicht an Lipide, die mit nur einem Fettsäurerest modifiziert sind, was an einer Schwächung der hydrophoben Interaktionen zwischen dem Lipidanker und der Membran liegen könnte. PIP-Strips stellen allerdings kein gutes Membranmodell dar, da sie zum einen keine Lipiddoppelschicht entsprechen und zum anderen die Lipide kovalent an eine hydrophobe Membran gebunden sind. Dies verhindert eine laterale Diffusion der Lipide und somit die Fluidität der Membran. Für die Untersuchung der Zusammensetzung der Modellmembran in Bezug auf Cholesterol und Sphingomyelin wurde die bereits zuvor eingesetzte *Stopped Flow* Technik eingesetzt. Hierzu wurden 30% DOPC durch jeweils eines der Lipide ersetzt, wobei kein nennenswerten Einfluss auf die erste Gleichgewichtskonstante zu beobachten war. Eine Zusammensetzung der Liposomen, die 15% beider Lipide enthält, resultiert allerdings in einem um den Faktor 5,6 niedrigeren Wert von K_1 . Dies würde Ergebnissen widersprechen, die zeigen dass Nef bevorzugt in *lipid rafts* lokalisiert ist [163, 164]. Allerdings konnte kein K_d -Wert ermittelt werden, da sich die erhaltenen Assoziationskurven bei höheren Konzentrationen monoexponentiell anpassen ließen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Messdauer für eine bessere Auflösung der ersten Phase verkürzt wurde und die zweite Phase somit unterbestimmt ist. Zum anderen wurde bei der Assoziation von Melittin an Membranen, die Cholesterol enthalten ebenfalls nur ein monoexponentieller Kurvenverlauf beobachtet [185]. Dagegen zeigt Melittin an POPC oder POPC/POPG-Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung eine biexponentielle Assoziation. Die Autoren vermuten, dass die l_o -Phase in Liposomen, die Cholesterol enthalten, eine tiefere Insertion der Helix in die Membran verhindert. Allerdings ist hier beobachtet Effekt für Nef nur bei erhöhter Konzentration der Liposomen und einer verkürzten Messdauer zu beobachten, weshalb ersterer Fall anzunehmen ist.

7.2 Modell für die Membranbindung von Nef

Für den biphasischen Kurvenverlauf der *Stopped Flow* Messungen, der zwei Prozesse bei der Assoziation von Nef an Membranen zeigt, sind generell zwei verschiedene Modelle denkbar. Zum einen kann zuerst die Interaktion des Proteins mit der Membran und anschließend eine Isomerisierung des Proteins erfolgen, zum anderen kann der umgekehrte Fall auftreten. Diese beiden Möglichkeiten sind in Gleichung 13 und 14 dargestellt.



Modell, bei dem die Isomerisierung des Proteins nach der Membranbindung erfolgt.



Modell, bei dem die Isomerisierung des Proteins vor der Membranbindung erfolgt.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse können durch das in Abbildung 48 dargestellte Modell, das Gleichung 13 entspricht, zusammengefasst werden. Dieser Rückschluss kann aufgrund der Mutationsstudien gezogen werden, da die Mutation basischer Aminosäuren den ersten Prozess beeinflussen (Kap.6.3.6). Demnach erfolgt die Membranbindung von Nef in zwei Schritten: Zuerst findet die initiale Assoziation von Nef an die Membran über eine Interaktion basischer Aminosäuren mit negativ geladenen Lipiden statt. Anschließend erfolgt eine Isomerisierung des Proteins, die vermutlich die Ausbildung einer N-terminalen α -Helix, wie auch weitgreifendere Sekundärstrukturänderungen umfasst. Auch ein Eindringen der α -Helix in die Membran könnte stattfinden. Es wurde z. B. für Melittin gefunden, dass die zweite Phase (Ratenkonstante im Bereich von 1 s^{-1}) mit einer tieferen Insertion der Helix und einer Erhöhung des α -helikalen Anteils verbunden ist [185].

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die beobachtete schnelle Phase selbst nochmal in zwei Prozesse unterteilt werden kann, die nicht direkt mit den angewendeten Techniken aufgeschlüsselt werden konnten. Bei diesen beiden Prozessen handelt es sich einerseits um die bereits erwähnte elektrostatische Interaktion, andererseits um die Insertion des Myristinankers in die Membran. Diese Vermutung kann aus der Mutationsstudie geschlossen werden, da sowohl die Verhinderung der Myristoylierung, als auch die Mutation basischer Aminosäuren die beobachtete Ratenkonstante der erste Phase beeinflussen. Auch die Ergebnisse der Krümmung unterstützen dieses Ergebnis. Da k_1 eine Abhängigkeit von der Krümmung der Liposomen aufweist, die elektrostatische Interaktion aber unabhängig von der Krümmung sein sollte, liegt es nahe, dass diese Abhängigkeit auf eine vereinfachte Insertion des Myristins in die Membran zurückzuführen ist. Somit lässt sich k_1 als Produkt der Gleichgewichtskonstanten der elektrostatischen Interaktion K_{el} und der Rate für die Insertion des Lipidankers k_{ins} schreiben:

$$k_1 = K_{el} \cdot k_{ins} \quad (15)$$

Unter Berücksichtigung dieser Gleichung ergibt sich dann das Modell in Abbildung 48.

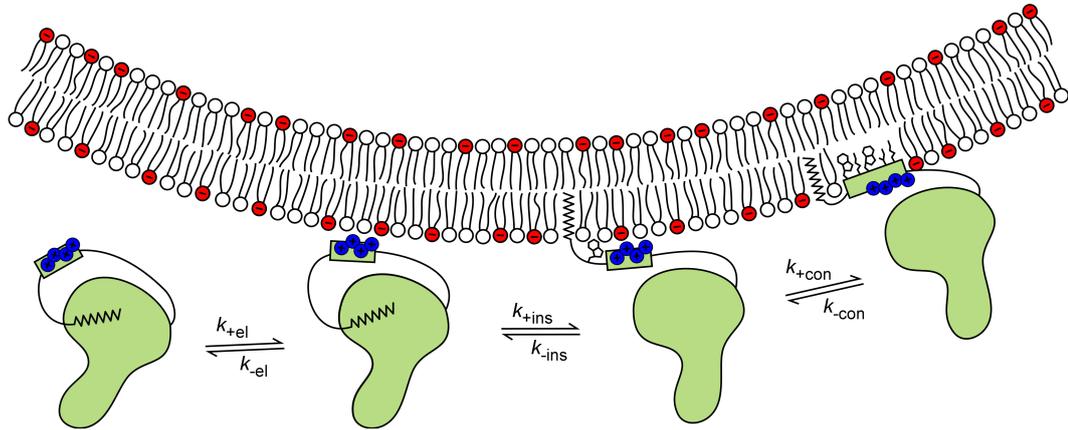


Abbildung 48: Modell für die Bindung von HIV-1 Nef_{SF2} an Lipidmembranen. Die Membranbindung erfolgt demnach in drei Schritten: Der erste Schritt wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Lipiden und dem Protein vermittelt. Der zweite Schritt stellt die Insertion des Myristins und gegebenenfalls weiterer Aminosäuren in die Lipidmembran dar. Der dritte Schritt entspricht einer Isomerisierung des Proteins, bei dem vermutlich die Ausbildung einer α -helikalen Struktur beteiligt ist.

7.3 Die Interaktion von Nef und CD4 an Modellmembranen

Die Internalisierung von CD4 ist eine der wichtigsten Funktionen von Nef, die phänomenologisch auch intensiv erforscht wurde [29, 65, 36]. Die molekularen Mechanismen dieser Interaktion, wie z. B. die Frage in welchem Ausmaß die einzelnen Aminosäuren zu der Bindung beitragen, sind allerdings immer noch nicht geklärt. Auch über die Affinität gibt es unterschiedliche Berichte. Ein Problem stellt die Unlöslichkeit des Komplexes aus CD4 und Nef dar. Die Präzipitation des Komplexes könnte durch ein Exponieren der flexiblen Schleife von Nef, die ein Dileuzinmotiv enthält, nach Binden von CD4 zustande kommen. Im zellulären Kontext würde das Dileuzinmotiv des Nef Proteins von AP-2 gebunden werden, und die anschließende Internalisierung durch Clathrin-vermittelte Endocytose erfolgen. Ein freiliegendes, hydrophobes Dileuzinmotiv könnte die Präzipitation zur Folge haben. Der von Grzesiek *et al.* durch NMR erhaltene K_d -Wert von 0,5 mM für die Interaktion zwischen Nef und CD4 ist zu niedrig, um von biologischer Relevanz zu sein. Das eingesetzte Peptid umfasste jedoch auch nur einen Teil der cytoplasmatischen Domäne des CD4-Rezeptors [170]. Preusser *et al.* erhielten unter Verwendung von Gleichgewichtsfluoreszenzmessungen einen K_d -Wert von 0,87 μ M, wobei anscheinend keine Präzipitation des CD4-Nef-Komplexes auftrat, wie es zu erwarten wäre [186]. Dieses Experiment konnte im Rahmen dieser Arbeit auch nicht reproduziert werden. Da Nef zumindest CHAPS bindet (persönliche Mitteilung S. Breuer) und vermutlich auch seinen eigenen My-

ristinanker, könnte bei dieser Studie auch die Bindung des Fluorophors an Nef für Fluoreszenzänderungen verantwortlich sein. Die Stabilisierung der beteiligten Komponenten durch eine SH3-Domäne (bei zeitgleicher Mutation des PxxP-Motivs in Nef) und einen GST-Anker führte Breuer zu einem Wert von $1,2 \mu\text{M}$ für die Dissoziationskonstante [187].

Der Versuch die Interaktion der beiden Bindungspartner an Modellmembranen nachzustellen und dadurch einen stabilisierten Zustand des Komplexes zu generieren, war in der vorliegenden Arbeit nur bedingt erfolgreich. Auch bei diesem System führte die Interaktion zu einer Präzipitation sämtlicher beteiligter Komponenten nach einigen Minuten. Es könnte neben dem bereits oben beschriebenen Mechanismus für die Präzipitation auch eine Quervernetzung der Liposomen durch die Nef-CD4 Interaktion stattfinden. Die Verwendung der *Stopped Flow* Technik erlaubte es jedoch eine schnelle Fluoreszenzänderung aufzulösen. Diese Fluoreszenzänderung könnte die Bindung von Nef an CD4 darstellen, wobei die Dissoziationskonstante nach einer ersten Abschätzung höher als $10 \mu\text{M}$ liegen würde. Somit wäre die Affinität im Vergleich zu den Ergebnissen der oben erwähnten Veröffentlichungen um mindestens den Faktor 10 geringer. Zudem sind die beobachteten Ratenkonstanten denen der zuvor bestimmten Ratenkonstanten für die Nef-Liposom-Interaktion sehr ähnlich. Dies deutet darauf hin, dass eventuell nicht die Bindung von Nef an CD4, sondern von Nef an die Membran beobachtet wurde. Ein weiteres Indiz dafür ist eine sich andeutende Sättigung der Amplitude bei Erreichen eines Verhältnisses von Nef zu Bindungsplätzen von 1:1. Sollte die beobachtete schnelle Phase tatsächlich der Bindung von Nef an die Membranen widerspiegeln, so könnte der Prozess der Nef-CD4-Interaktion mit einer langsameren Rate verknüpft sein. Die dazu erhaltenen Daten müssen allerdings mindestens mit einer exponentiellen Kurve vierten Grades angepasst werden und eine Zuordnung der erhaltenen Raten zu distinkten Prozessen ist nicht möglich. Außerdem verhindert die Präzipitation des Nef-CD4-Komplexes eine Erhöhung der CD4-Konzentration. Eine Möglichkeit wäre das Dileuzinmotiv in Nef zu mutieren oder den Komplex aus Nef und CD4 durch eine weitere Komponente wie z. B. AP-2, den natürlichen Bindungspartner von Nef, zu stabilisieren.

Wenn die schnelle Fluoreszenzänderung allerdings doch die Interaktion von Nef und CD4 anzeigt, müsste das Experiment mit einer erhöhten Konzentration des CD4-Peptids wiederholt werden, um eine Konzentration in die Nähe des K_d -Wertes einzustellen. Es treten dann aber neben der Verfügbarkeit des Peptids weitere Schwierigkeiten auf, wie z. B. die benötigte erhöhte Kapazität der Liposomen, eine stärkere Neutralisation der negativ geladenen Lipide durch das stark positiv geladenen CD4, sowie ein beschleunigtes Ausfallen des Komplexes.

7.4 Artifizielle Farnesylierung von Nef

In dieser vergleichenden Studie zwischen zwei unterschiedlichen Lipidierungen von Nef sollten vor allem zwei Fragen beantwortet werden. Erstens: Dient die Myristoylierung nur dazu, Nef an der Membran zu verankern, oder spielt auch die Orientierung von Nef an der Membran eine Rolle? Zweitens: Ist die dynamische Interaktion von Nef

mit Membranen entscheidend für die Funktion, also ist es wichtig dass das Gleichgewicht zwischen cytosolischer Form und membrangebundener Form *in vivo* auf Seiten der cytosolischen Form liegt? Um diese Fragen zu beantworten wurde unmyristoyliertes Nef C-terminal mit einem künstlichen Farnesylierungsmotiv versehen.

Die rekombinante Expression des Proteins und die anschließende C-terminale Farnesylierung war erfolgreich, allerdings zeigte die Anwendung von CD-Spektroskopie unter thermal denaturierenden Bedingungen eine deutlich verringerte Stabilität des Proteins. Das Einbringen mehrerer basischer Aminosäuren am C-Terminus führte sogar zu einer Präzipitation des Proteins. Dagegen führt die Myristoylierung des Proteins zu einer deutlich stabileren Konformation des Proteins als die Farnesylierung. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der von Breuer *et al.* gemachten Beobachtung, dass myristoyliertes Nef in der analytischen Gelfiltration kompakter erscheint als nicht myristoyliertes Nef [34]. Dies könnte z. B. darauf hinweisen, dass Nef einen Myristinschalter besitzt, und das Myristin in einen nicht membranassoziiertem Zustand an das Protein gebunden ist. Die Farnesylierung kann dann entweder aufgrund des anders geformten Isoprenoids und einer daraus z. B. resultierenden sterischen Einschränkung (siehe Abb.49), oder aufgrund der geringeren Flexibilität des C-Terminus diese Bindungsstelle nicht besetzen.

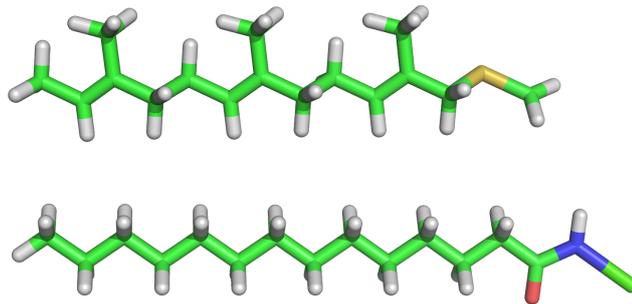


Abbildung 49: Vergleich der Farnesylgruppe (oben) und der Myristoylgruppe (unten). Bei der Myristoylierung ist die Peptidbindung und das C_{α} -Atom des Glycins, bei der Farnesylierung der Thioether eingezeichnet.

Da die Farnesylierung ebenso wie die Myristoylierung ein vergleichsweise schwaches Membranbindungsmotiv darstellt, sollte diese Modifikation keinen drastischen Einfluss auf die Membranbindung haben. Farnesyliertes Nef weist zusätzlich zu dem hydrophoben Membrananker auch N-terminal lokalisierte, basische Aminosäuren auf und kann somit an Membranen mit einer negativen Oberflächenladung binden. Die Membranbindung ist im Vergleich zu myristoyliertem Nef allerdings etwas reduziert. Dies könnte an einer geringeren Synergie zwischen den beiden Membranbindungsmotiven, die an den unterschiedlichen Termini des Proteins lokalisiert sind, liegen.

In vivo durchgeführte Experimente zeigen ein ähnliches Bild. Hier ist die Membranbindung des farnesylierten, unmyristoylierten Nefs im Vergleich zum Wildtyp jedoch leicht erhöht. Diesem Unterschied zu den Experimenten *in vitro* können viele

Ursachen, wie z. B. eine unterschiedliche Zusammensetzung der Membran, eine erhöhte Stabilität des farnesylierten Nefs *in vivo* oder anderes, zugrunde liegen. Die doppelte Lipidierung von Nef mit einem Myristin- und einem Farnesylanker, wie auch das Einfügen der basischen AS am C-Terminus, resultiert in einer deutlich erhöhten Membranbindung von Nef. Interessanterweise verlieren die Mutanten, die eine höhere Affinität zu Membranen aufweisen ihre Fähigkeit CD4 zu internalisieren. Hierfür sind zwei Erklärungen denkbar. Zum einen könnte die Dissoziation von Nef von der Membran nötig sein, um die Internalisierung zu bewerkstelligen. Zum anderen könnte aber auch die korrekte Orientierung von Nef an der Membran wichtig sein, um die Interaktion zwischen CD4 und Nef zu gewährleisten. Die letztere Erklärung ist allerdings wahrscheinlicher, da eine N-terminal palmitoylierte Variante von Nef in der Lage ist CD4 zu internalisieren [188]. Zusätzlich erfolgt die Internalisierung von CD4 über Clathrin vermittelte Endozytose [36], die keine Dissoziation der Frachtproteine von der Plasmamembran voraussetzt.

7.5 Darstellung der Struktur von Nef an einer Membran

Der zentrale Bestandteil dieser Arbeit ist in Abb. 50 dargestellt. Hier ist die Struktur von myristoyliertem Nef im Größenverhältnis zu einer DOPC-Membran⁸ dargestellt. Die in dieser Arbeit mutierten Motive sind farblich hervorgehoben und entsprechen der Myristoylierung, sowie den basischen und hydrophoben Aminosäuren.

⁸Die DOPC-Membran wurde von Heller *et al.* mittels molekulardynamischer Simulation berechnet [189]. Zu beachten ist, dass Nef nicht an Liposomen mit neutraler Ladung bindet.

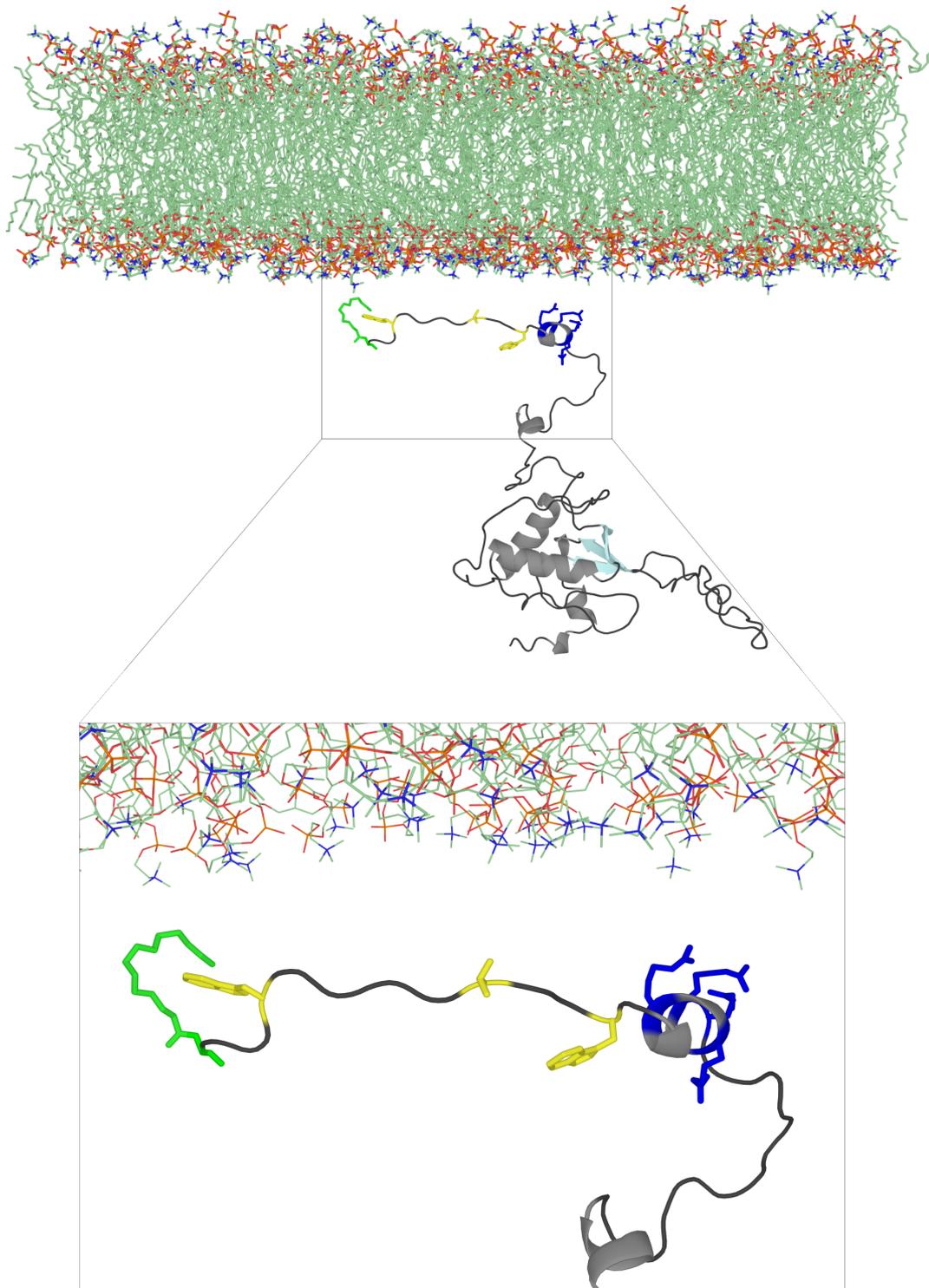


Abbildung 50: Modell der N-terminalen Ankerdomäne von Nef, wie sie in Lösung mittels NMR-Spektroskopie bestimmt wurde [26]. Die Membran entspricht einer DOPC-Lipiddoppelschicht, deren Struktur durch molekulardynamische Simulationen erhalten wurde [189]. Für die entsprechende Größe sind zwei Datensätze der Membran nebeneinander gezeigt. Weiterhin dargestellt sind das in dieser Arbeit innerhalb des Nef Proteins mutierte Myristoylierungsmotiv (grün), die mutierten hydrophoben Aminosäuren (gelb) und die mutierten basischen Aminosäuren (blau).

8 Anhang

8.1 Herleitung der Formel für die Berechnung einer Bindungsstelle für Nef

Variable	Beschreibung
K_d	Dissoziationskonstante
$[P]$	Konzentration des freien Proteins
$[L]$	Konzentration des freien Liganden
$[P_0]$	initiale Konzentration des Proteins
$[L_0]$	initiale Konzentration des Liganden
$[PL]$	Konzentration des Komplexes aus Protein und Ligand
α	Fraktion durch Liganden gebundenes Protein
n	Bindungsstellen

Tabelle 28: In der folgenden Herleitung verwendete Variablen.

Die Dissoziationskonstante ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_d = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} \quad (16)$$

Die initiale Konzentrationen des Proteins bzw. des Liganden sind gegeben durch:

$$[P_0] = [PL] + [P] \quad (17)$$

$$[L_0] = [PL] + [L] \quad (18)$$

Gleichung 17 und 18 nach $[P]$ bzw. $[L]$ auflösen und einsetzen in 16:

$$K_d = \frac{([P_0] - [PL]) \cdot ([L_0] - [PL])}{[PL]} \quad (19)$$

umformen:

$$0 = [P_0] \cdot [L_0] - [P_0] \cdot [PL] - [L_0] \cdot [PL] - K_d \cdot [PL] + [PL]^2 \quad (20)$$

$$0 = [P_0] \cdot [L_0] - ([P_0] + [L_0] + K_d) \cdot [PL] + [PL]^2 \quad (21)$$

Anwenden der Lösungsformel für quadratische Gleichungen:

$$[PL] = \frac{[P_0] + [L_0] + K_d - \sqrt{([P_0] + [L_0] + K_d)^2 - 4 \cdot [P_0] \cdot [L_0]}}{2} \quad (22)$$

Der Bindungsgrad ist gegeben durch:

$$\alpha = \frac{[PL]}{[P_0]} \quad (23)$$

Für Fluoreszenztitration gilt:

$$\alpha = \frac{F_0 - F}{F_0 - F_\infty} \quad (24)$$

Einsetzen von Gleichung 23 in 22:

$$\alpha = \frac{[P_0] + [L_0] + K_d - \sqrt{([P_0] + [L_0] + K_d)^2 - 4 \cdot [P_0] \cdot [L_0]}}{2 \cdot [P_0]} \quad (25)$$

Einsetzen von Gleichung 24 in 25:

$$F = F_0 + \frac{([P_0] + [L_0] + K_d - \sqrt{([P_0] + [L_0] + K_d)^2 - 4 \cdot [P_0] \cdot [L_0]}) \cdot (F_\infty - F_0)}{2 \cdot [P_0]} \quad (26)$$

Erweitern des Modells um Bindungsstellen n:

$$F = F_0 + \frac{([P_0] + [L_0]n + K_d - \sqrt{([P_0] + [L_0]n + K_d)^2 - 4 \cdot [P_0] \cdot [L_0]n}) \cdot (F_\infty - F_0)}{2 \cdot [P_0]} \quad (27)$$

8.2 Herleitung der Formel für die Berechnung des K_d -Wertes für die Folgereaktion

Variable	Beschreibung
K_d	Dissoziationskonstante
$[P]$	Konzentration des Proteins
$[V]$	Konzentration der Bindungsplätze für das Protein
$[K1]$	Gleichgewichtskonstante des ersten Gleichgewichts
$[K2]$	Gleichgewichtskonstante des zweiten Gleichgewichts
$[PV]$	Konzentration des Komplexes aus P und V
$[P'V]$	Konzentration des Komplexes aus P' und V

Tabelle 29: In der folgenden Herleitung verwendete Variablen. P' zeigt an, dass das Protein in einem veränderten Zustand vorliegt.

Für die Bindung von Nef wird folgendes Reaktionsschema vorausgesetzt:



Die Gleichgewichtskonstante der Reaktion ergibt sich dann nach:

$$K_{eq,ges} = \frac{[PV] + [P'V]}{[P][V]} \quad (29)$$

$$= \frac{[PV]}{[P][V]} + \frac{[P'V]}{[P][V]} \quad (30)$$

mit $K_1 = \frac{[PV]}{[P][V]}$ und $K_2 = \frac{[P'V]}{[P][V]}$ ergibt sich:

$$K_{eq,ges} = K_1 + \frac{[P'V]}{[P][V]} \cdot \frac{[PV]}{[PV]} \quad (31)$$

$$= K_1 + \frac{[PV]}{[P][V]} \cdot \frac{[P'V]}{[PV]} \quad (32)$$

$$= K_1 + K_1 \cdot K_2 \quad (33)$$

$$= K_1 \cdot (1 + K_2) \quad (34)$$

Daraus folgt:

$$K_d = \frac{1}{K_1 \cdot (1 + K_2)} \quad (35)$$

8.3 Kalkulation der Hydrophobizität und des hydrophoben Momentes einer amphipathischen Helix

Um die Amphiphilie einer Helix zu erkennen, werden Werte für die mittlere Hydrophobizität $\langle H \rangle$ und für das mittlere hydrophobe Moment der Helix errechnet.

H und μH wurden mittels des Programms Heliquest ermittelt (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr>). Die berechneten Werte basieren auf dem Artikel von [90].

$$\langle H \rangle = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N H_n \quad (36)$$

Hydrophobizität einer Helix mit $\langle H \rangle$ = mittlere Hydrophobizität, N = Anzahl der AS, n = nte AS, H_n = Hydrophobizität der nten AS.

$$\langle \mu H \rangle = \frac{1}{N} \left\langle \left[\sum_{n=1}^N H_n \sin(n\delta) \right]^2 + \left[\sum_{n=1}^N H_n \cos(n\delta) \right]^2 \right\rangle \quad (37)$$

hydrophobes Moment einer Helix mit $\langle \mu H \rangle$ = hydrophobes Moment, N = Anzahl der AS, H_n = Hydrophobizität der nten AS, $n\delta$ = Winkel zwischen den Seitenketten entlang des Peptidrückgrats = 100° für α -Helix.

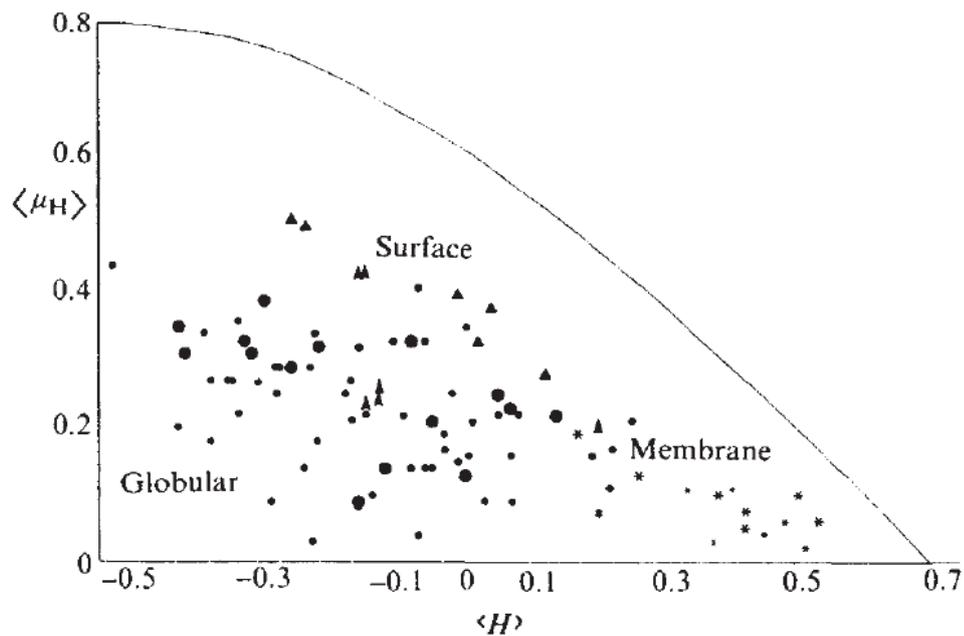


Abbildung 51: Grafische Darstellung des hydrophoben Momentes von 64 α -helikalen Bereichen aus 26 verschiedenen Proteinen. Entnommen aus Eisenberg et al., 1982 [90].

8.4 Auflistung der Auswertung sämtlicher CD-spektroskopischen Messungen

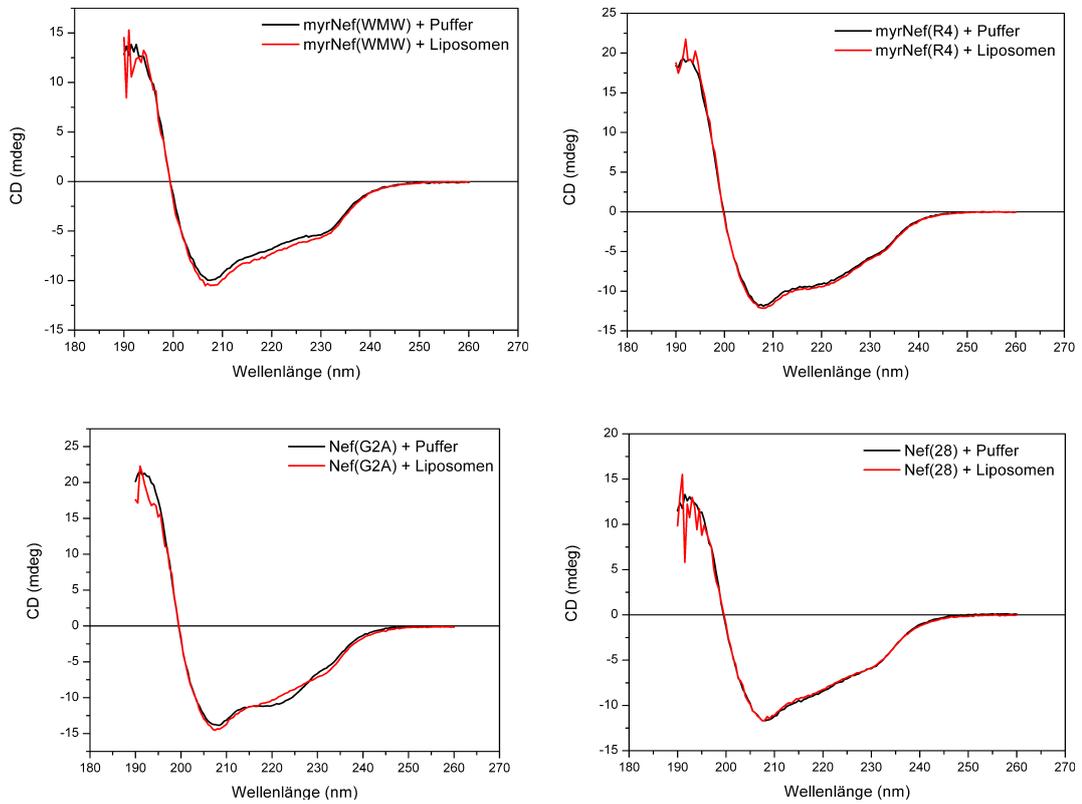


Abbildung 52: CD-Spektren sämtlicher Mutanten von Nef in An- und Abwesenheit von Liposomen.

myrNef(wt)+P	α_r	α_d	β_r	β_d	Turns	Unordered	Total	NRMSD
SELCON3	0.148	0.126	0.136	0.085	0.199	0.276	0.97	0.074
CONTIN-LL	0.151	0.114	0.121	0.075	0.167	0.372	1	0.061
CDSSTR(7)	0.17	0.13	0.13	0.08	0.18	0.3	0.99	0.015
CDSSTR(4)	0.16	0.12	0.12	0.09	0.2	0.3	0.99	0.017
myrNef(wt)+L								
SELCON3	0.147	0.124	0.124	0.084	0.213	0.274	0.965	0.155
CONTIN-LL	0.159	0.123	0.112	0.071	0.169	0.367	1.001	0.073
CDSSTR(7)	0.19	0.14	0.12	0.07	0.16	0.31	0.99	0.021
CDSSTR(4)	0.17	0.13	0.15	0.09	0.19	0.27	1	0.022
myrNef(WR)+P								
SELCON3	0.105	0.093	0.267	0.118	0.152	0.27	1.005	0.191
CONTIN-LL	0.125	0.109	0.134	0.078	0.172	0.382	1	0.088
CDSSTR(7)	0.11	0.1	0.16	0.09	0.17	0.36	0.99	0.025
CDSSTR(4)	0.07	0.09	0.2	0.1	0.22	0.31	0.99	0.022
Nef(28)+P								
SELCON3	0.105	0.11	0.257	0.123	0.173	0.251	1.019	0.164
CONTIN-LL	0.133	0.111	0.125	0.076	0.173	0.382	1	0.062
CDSSTR(7)	0.12	0.11	0.15	0.09	0.18	0.35	1	0.029
CDSSTR(4)	0.07	0.09	0.2	0.1	0.23	0.3	0.99	0.032
myrNef(R4)+P								
SELCON3	0.137	0.118	0.123	0.086	0.219	0.277	0.96	0.178
CONTIN-LL	0.162	0.136	0.164	0.095	0.199	0.244	1	0.061
CDSSTR(7)	0.13	0.11	0.16	0.1	0.2	0.31	1.01	0.019
CDSSTR(4)	0.15	0.12	0.13	0.09	0.2	0.29	0.98	0.02
Nef(G2A)+P								
SELCON3	0.162	0.136	0.102	0.081	0.223	0.294	0.997	0.207
CONTIN-LL	0.166	0.119	0.094	0.068	0.164	0.39	1.001	0.033
CDSSTR(7)	0.19	0.15	0.09	0.08	0.19	0.29	0.99	0.018
CDSSTR(4)	0.18	0.13	0.11	0.08	0.2	0.29	0.99	0.02
myrNef(WMW)+P								
SELCON3	0.097	0.088	0.263	0.113	0.162	0.268	0.991	0.164
CONTIN-LL	0.121	0.104	0.14	0.079	0.168	0.388	1	0.085
CDSSTR(7)	0.1	0.1	0.17	0.09	0.19	0.36	1.01	0.022
CDSSTR(4)	0.07	0.09	0.22	0.11	0.22	0.29	1	0.023

Tabelle 30: Ergebnisse der Kurvenanpassung CD-spektroskopischer Daten unter Verwendung von Dichroweb. Es wurden verschiedene Algorithmen angewendet, von denen CDSSTR die besten Ergebnisse lieferte. CDSSTR wurde sodann mit zwei verschiedenen Datensätzen von Proteinen angewendet, wobei sich Datensatz 7 die etwas besseren Ergebnisse lieferte. α_r , α_d , β_r und β_d bezeichnen reguläre und nichtreguläre Formen der α -Helix bzw. des β -Faltblatts [190]. Für Referenzen und weitere Informationen siehe <http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html> und [169, 168].

Literatur

- [1] Keele, B. F., et al. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, **313**, 523–526.
- [2] Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S., and Bhattacharya, T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*, **288**, 1789–1796.
- [3] Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 1425–1431.
- [4] Barré-Sinoussi, F., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868–871.
- [5] Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., and Safai, B. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, **224**, 500–503.
- [6] Sarngadharan, M. G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J., and Gallo, R. C. (1984). Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science*, **224**, 506–508.
- [7] Lohse, N., Hansen, A.-B. E., Pedersen, G., Kronborg, G., Gerstoft, J., Sørensen, H. T., Vaeth, M., and Obel, N. (2007). Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, 1995–2005. *Ann. Intern. Med.*, **146**, 87–95.
- [8] WHO, Aids epidemic update 2007. <http://www.unaids.org/>.
- [9] Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J., and Varmus, H. E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, **331**, 280–283.
- [10] Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S. M., and Mak, J. (2001). Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J. Virol.*, **75**, 1834–1841.
- [11] Frankel, A. D. and Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 1–25.
- [12] Terwilliger, E., Sodroski, J. G., Rosen, C. A., and Haseltine, W. A. (1986). Effects of mutations within the 3' orf open reading frame region of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) on replication and cytopathogenicity. *J. Virol.*, **60**, 754–760.
- [13] Luciw, P. A., Cheng-Mayer, C., and Levy, J. A. (1987). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 1434–1438.
- [14] Ahmad, N. and Venkatesan, S. (1988). Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science*, **241**, 1481–1485.
- [15] Cheng-Mayer, C., Iannello, P., Shaw, K., Luciw, P. A., and Levy, J. A. (1989). Differential effects of Nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science*, **246**, 1629–1632.
- [16] Kestler, H. W., Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., and Desrosiers, R. C. (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*, **65**, 651–662.
- [17] Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. (1995). Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.*, **332**, 228–232.

- [18] Deacon, N. J., et al. (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science*, **270**, 988–991.
- [19] Salvi, R., Garbuglia, A. R., Caro, A. D., Pulciani, S., Montella, F., and Benedetto, A. (1998). Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J. Virol.*, **72**, 3646–3657.
- [20] Freund, J., Kellner, R., Houthaeve, T., and Kalbitzer, H. R. (1994). Stability and proteolytic domains of Nef protein from human immunodeficiency virus (HIV) type 1. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 811–819.
- [21] Grzesiek, S., Bax, A., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Hu, J. S., Kaufman, J., Palmer, I., Stahl, S. J., and Wingfield, P. T. (1996). The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 340–345.
- [22] Lee, C. H., Saksela, K., Mirza, U. A., Chait, B. T., and Kuriyan, J. (1996). Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell*, **85**, 931–942.
- [23] Grzesiek, S., Bax, A., Hu, J. S., Kaufman, J., Palmer, I., Stahl, S. J., Tjandra, N., and Wingfield, P. T. (1997). Refined solution structure and backbone dynamics of HIV-1 Nef. *Protein Sci.*, **6**, 1248–1263.
- [24] Arold, S., Franken, P., Strub, M. P., Hoh, F., Benichou, S., Benarous, R., and Dumas, C. (1997). The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signaling. *Structure*, **5**, 1361–1372.
- [25] Geyer, M., Munte, C. E., Schorr, J., Kellner, R., and Kalbitzer, H. R. (1999). Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *J. Mol. Biol.*, **289**, 123–138.
- [26] Geyer, M. and Peterlin, B. M. (2001). Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS Lett.*, **496**, 91–95.
- [27] The pymol molecular graphics system (2002) delano scientific, palo alto, ca, usa.
- [28] Nicholls, A., Sharp, K. A., and Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, **11**, 281–296.
- [29] Geyer, M., Fackler, O. T., and Peterlin, B. M. (2001). Structure–function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep.*, **2**, 580–585.
- [30] Bentham, M., Mazaleyrat, S., and Harris, M. (2006). Role of myristoylation and N-terminal basic residues in membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein. *J. Gen. Virol.*, **87**, 563–571.
- [31] Arold, S., Hoh, F., Domergue, S., Birck, C., Delsuc, M. A., Jullien, M., and Dumas, C. (2000). Characterization and molecular basis of the oligomeric structure of HIV-1 Nef protein. *Protein Sci.*, **9**, 1137–1148.
- [32] Liu, L. X., et al. (2000). Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions. *J. Virol.*, **74**, 5310–5319.
- [33] Dennis, C. A., Baron, A., Grossmann, J. G., Mazaleyrat, S., Harris, M., and Jaeger, J. (2005). Co-translational myristoylation alters the quaternary structure of HIV-1 Nef in solution. *Proteins*, **60**, 658–669.
- [34] Breuer, S., Gerlach, H., Kolaric, B., Urbanke, C., Opitz, N., and Geyer, M. (2006). Biochemical indication for myristoylation-dependent conformational changes in HIV-1 Nef. *Biochemistry*, **45**, 2339–2349.
- [35] Arold, S. T. and Baur, A. S. (2001). Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 356–363.

- [36] Roeth, J. F. and Collins, K. L. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 548–563.
- [37] Garcia, J. V. and Miller, A. D. (1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature*, **350**, 508–511.
- [38] Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C., and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, **312**, 767–768.
- [39] Harris, M. (1999). HIV: a new role for Nef in the spread of HIV. *Curr. Biol.*, **9**, R459–R461.
- [40] Bresnahan, P. A., Yonemoto, W., Ferrell, S., Williams-Herman, D., Geleziunas, R., and Greene, W. C. (1998). A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr. Biol.*, **8**, 1235–1238.
- [41] Kim, P. W., Sun, Z.-Y. J., Blacklow, S. C., Wagner, G., and Eck, M. J. (2003). A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science*, **301**, 1725–1728.
- [42] Schwartz, O., Maréchal, V., Gall, S. L., Lemonnier, F., and Heard, J. M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.*, **2**, 338–342.
- [43] Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D., and Baltimore, D. (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, **391**, 397–401.
- [44] Cohen, G. B., Gandhi, R. T., Davis, D. M., Mandelboim, O., Chen, B. K., Strominger, J. L., and Baltimore, D. (1999). The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity*, **10**, 661–671.
- [45] Blagoveshchenskaya, A. D., Thomas, L., Feliciangeli, S. F., Hung, C. H., and Thomas, G. (2002). HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell*, **111**, 853–866.
- [46] Kasper, M. R., Roeth, J. F., Williams, M., Filzen, T. M., Fleis, R. I., and Collins, K. L. (2005). HIV-1 Nef disrupts antigen presentation early in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, **280**, 12840–12848.
- [47] Schindler, M., et al. (2006). Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell*, **125**, 1055–1067.
- [48] Stevenson, M. (2003). HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.*, **9**, 853–860.
- [49] Baur, A. S., Sawai, E. T., Dazin, P., Fantl, W. J., Cheng-Mayer, C., and Peterlin, B. M. (1994). HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity*, **1**, 373–384.
- [50] Biggs, T. E., Cooke, S. J., Barton, C. H., Harris, M. P., Saksela, K., and Mann, D. A. (1999). Induction of activator protein 1 (AP-1) in macrophages by human immunodeficiency virus type-1 Nef is a cell-type-specific response that requires both hck and MAPK signaling events. *J. Mol. Biol.*, **290**, 21–35.
- [51] Manninen, A., Huotari, P., Hiipakka, M., Renkema, G. H., and Saksela, K. (2001). Activation of NFAT-dependent gene expression by Nef: conservation among divergent Nef alleles, dependence on SH3 binding and membrane association, and cooperation with protein kinase C-theta. *J. Virol.*, **75**, 3034–3037.
- [52] Fortin, J.-F., Barat, C., Beauséjour, Y., Barbeau, B., and Tremblay, M. J. (2004). Hyperresponsiveness to stimulation of human immunodeficiency virus-infected CD4+ T cells requires Nef and Tat virus gene products and results from higher NFAT, NF-kappaB, and AP-1 induction. *J. Biol. Chem.*, **279**, 39520–39531.
- [53] Wang, J. K., Kiyokawa, E., Verdin, E., and Trono, D. (2000). The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 394–399.

- [54] Niederman, T. M., Hastings, W. R., Luria, S., Bandres, J. C., and Ratner, L. (1993). HIV-1 Nef protein inhibits the recruitment of AP-1 DNA-binding activity in human T-cells. *Virology*, **194**, 338–344.
- [55] Bandres, J. C. and Ratner, L. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein down-regulates transcription factors NF-kappa B and AP-1 in human T cells in vitro after T-cell receptor stimulation. *J. Virol.*, **68**, 3243–3249.
- [56] Lu, X., Wu, X., Plemenitas, A., Yu, H., Sawai, E. T., Abo, A., and Peterlin, B. M. (1996). CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1. *Curr. Biol.*, **6**, 1677–1684.
- [57] Fackler, O. T., Luo, W., Geyer, M., Alberts, A. S., and Peterlin, B. M. (1999). Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Mol. Cell*, **3**, 729–739.
- [58] Renkema, G. H., Manninen, A., Mann, D. A., Harris, M., and Saksela, K. (1999). Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Curr. Biol.*, **9**, 1407–1410.
- [59] Renkema, G. H., Manninen, A., and Saksela, K. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 Nef selectively associates with a catalytically active subpopulation of p21-activated kinase 2 (PAK2) independently of PAK2 binding to Nck or beta-PIX. *J. Virol.*, **75**, 2154–2160.
- [60] Fackler, O. T., Lu, X., Frost, J. A., Geyer, M., Jiang, B., Luo, W., Abo, A., Alberts, A. S., and Peterlin, B. M. (2000). p21-activated kinase 1 plays a critical role in cellular activation by Nef. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 2619–2627.
- [61] Fackler, O. T., Alcover, A., and Schwartz, O. (2007). Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis? *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 310–317.
- [62] Friedl, P., den Boer, A. T., and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 532–545.
- [63] Thoulouze, M. I., Sol-Foulon, N., Blanchet, F., Dautry-Varsat, A., Schwartz, O., and Alcover, A. (2006). Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse. *Immunity*, **24**, 547–561.
- [64] Tolstrup, M., Ostergaard, L., Laursen, A. L., Pedersen, S. F., and Duch, M. (2004). HIV/SIV escape from immune surveillance: focus on Nef. *Curr. HIV. Res.*, **2**, 141–151.
- [65] Das, S. R. and Jameel, S. (2005). Biology of the HIV Nef protein. *Indian J. Med. Res.*, **121**, 315–332.
- [66] Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720–731.
- [67] Porter, J. A., Young, K. E., and Beachy, P. A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*, **274**, 255–259.
- [68] Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell*, **11**, 791–801.
- [69] Johnson, D. R., Bhatnagar, R. S., Knoll, L. J., and Gordon, J. I. (1994). Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 869–914.
- [70] Resh, M. D. (2006). Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 584–590.
- [71] Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P., and Glaser, L. (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 69–99.
- [72] Towler, D. A., Adams, S. P., Eubanks, S. R., Towery, D. S., Jackson-Machelski, E., Glaser, L., and Gordon, J. I. (1987). Purification and characterization of yeast myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 2708–2712.

- [73] Wilcox, C., Hu, J. S., and Olson, E. N. (1987). Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science*, **238**, 1275–1278.
- [74] Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*, **290**, 1761–1765.
- [75] Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., and Eisenhaber, F. (2002). N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, **317**, 541–557.
- [76] Smotryś, J. E. and Linder, M. E. (2004). Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 559–587.
- [77] Mitchell, D. A., Vasudevan, A., Linder, M. E., and Deschenes, R. J. (2006). Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J. Lipid Res.*, **47**, 1118–1127.
- [78] Bizzozero, O. A., Bixler, H. A., and Pastuszyn, A. (2001). Structural determinants influencing the reaction of cysteine-containing peptides with palmitoyl-coenzyme A and other thioesters. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1545**, 278–288.
- [79] Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P. J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., and Bastiaens, P. I. H. (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science*, **307**, 1746–1752.
- [80] Pepinsky, R. B., et al. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14037–14045.
- [81] Moores, S. L., Schaber, M. D., Mosser, S. D., Rands, E., O’Hara, M. B., Garsky, V. M., Marshall, M. S., Pompliano, D. L., and Gibbs, J. B. (1991). Sequence dependence of protein isoprenylation. *J Biol Chem*, **266**, 14603–14610.
- [82] Nalivaeva, N. N. and Turner, A. J. (2001). Post-translational modifications of proteins: acetylcholinesterase as a model system. *Proteomics*, **1**, 735–747.
- [83] Yu, J. W. and Lemmon, M. A. (2003). Genome-wide analysis of signaling domain function. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 103–109.
- [84] DiNitto, J. P., Cronin, T. C., and Lambright, D. G. (2003). Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci. STKE*, **2003**, re16.
- [85] Cho, W. and Stahelin, R. V. (2005). Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 119–151.
- [86] Cornell, R. B. and Taneva, S. G. (2006). Amphipathic helices as mediators of the membrane interaction of amphitropic proteins, and as modulators of bilayer physical properties. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, **7**, 539–552.
- [87] Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1462**, 55–70.
- [88] Wang, Y. and Kent, C. (1995). Identification of an inhibitory domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18948–18952.
- [89] Drobnies, A. E., van Der Ende, B., Thewalt, J. L., and Cornell, R. B. (1999). CTP:phosphocholine cytidyltransferase activation by oxidized phosphatidylcholines correlates with a decrease in lipid order: a 2H NMR analysis. *Biochemistry*, **38**, 15606–15614.
- [90] Eisenberg, D., Weiss, R. M., and Terwilliger, T. C. (1982). The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, **299**, 371–374.
- [91] Lee, M. C. S., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., and Schekman, R. (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell*, **122**, 605–617.

- [92] Johnson, J. E. and Cornell, R. B. (1994). Membrane-binding amphipathic alpha-helical peptide derived from CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. *Biochemistry*, **33**, 4327–4335.
- [93] Sigal, C. T., Zhou, W., Buser, C. A., McLaughlin, S., and Resh, M. D. (1994). Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 12253–12257.
- [94] Arbuzova, A., Murray, D., and McLaughlin, S. (1998). MARCKS, membranes, and calmodulin: kinetics of their interaction. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1376**, 369–379.
- [95] Roy, M. O., Leventis, R., and Silviu, J. R. (2000). Mutational and Biochemical Analysis of Plasma Membrane Targeting Mediated by the Farnesylated, Polybasic Carboxy Terminus of K-ras4B. *Biochemistry*, **39**, 8298–8307.
- [96] Gelb, M. H., Cho, W., and Wilton, D. C. (1999). Interfacial binding of secreted phospholipase A(2): more than electrostatics and a major role for tryptophan. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 428–432.
- [97] Dunne, S. J., Cornell, R. B., Johnson, J. E., Glover, N. R., and Tracey, A. S. (1996). Structure of the membrane binding domain of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. *Biochemistry*, **35**, 11975–11984.
- [98] Weer, P. D. (2000). A century of thinking about cell membranes. *Annu. Rev. Physiol.*, **62**, 919–926.
- [99] Feigenson, G. W. (2006). Phase behavior of lipid mixtures. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 560–563.
- [100] van Meer, G., Voelker, D. R., and Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 112–124.
- [101] Peitzsch, R. M. and McLaughlin, S. (1993). Binding of Acylated Peptides and Fatty Acids to Phospholipid Vesicles: Pertinence to Myristoylated Proteins. *Biochemistry*, **32**, 10436–10443.
- [102] McLaughlin, S. and Aderem, A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 272–276.
- [103] Mulgrew-Nesbitt, A., Diraviyam, K., Wang, J., Singh, S., Murray, P., Li, Z., Rogers, L., Mirkovic, N., and Murray, D. (2006). The role of electrostatics in protein-membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1761**, 812–826.
- [104] Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silviu, J., Kapus, A., and Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*, **319**, 210–213.
- [105] Ben-Tal, N., Honig, B., Peitzsch, R. M., Denisov, G., and McLaughlin, S. (1996). Binding of small basic peptides to membranes containing acidic lipids: theoretical models and experimental results. *Biophys. J.*, **71**, 561–575.
- [106] Murray, D., Hermida-Matsumoto, L., Buser, C. A., Tsang, J., Sigal, C. T., Ben-Tal, N., Honig, B., Resh, M. D., and McLaughlin, S. (1998). Electrostatics and the Membrane Association of Src: Theory and Experiment. *Biochemistry*, **37**, 2145–2159.
- [107] Murray, D., Ben-Tal, N., Honig, B., and McLaughlin, S. (1997). Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure*, **5**, 985–989.
- [108] McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., and Murray, D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **31**, 151–175.
- [109] Krauss, G. (2008). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Wiley-VCH.
- [110] Paolo, G. D. and Camilli, P. D. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, **443**, 651–657.
- [111] van Meer, G. and Simons, K. (1982). Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma membrane domain of MDCK cells have unique phospholipid compositions. *EMBO J.*, **1**, 847–852.

- [112] Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569–572.
- [113] Hancock, J. F. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 456–462.
- [114] Veatch, S. L. (2008). Lipids out of order. *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 225–226.
- [115] Rajendran, L. and Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.*, **118**, 1099–1102.
- [116] Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, **115**, 377–388.
- [117] Nichols, B. (2005). Cell biology: without a raft. *Nature*, **436**, 638–639.
- [118] de Almeida, R. F. M., Fedorov, A., and Prieto, M. (2003). Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J.*, **85**, 2406–2416.
- [119] Kahya, N., Brown, D. A., and Schwille, P. (2005). Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry*, **44**, 7479–7489.
- [120] Polozov, I. V., Bezrukov, L., Gawrisch, K., and Zimmerberg, J. (2008). Progressive ordering with decreasing temperature of the phospholipids of influenza virus. *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 248–255.
- [121] Simons, K. and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 31–39.
- [122] Chatterjee, S. and Mayor, S. (2001). The GPI-anchor and protein sorting. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **58**, 1969–1987.
- [123] Nicolini, C., et al. (2006). Visualizing association of N-ras in lipid microdomains: influence of domain structure and interfacial adsorption. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 192–201.
- [124] McMahon, H. T. and Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, **438**, 590–596.
- [125] McIntosh, T. J. and Simon, S. A. (2006). Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **35**, 177–198.
- [126] Pollard, T. D. and Beltzner, C. C. (2002). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 768–774.
- [127] Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J. G., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, **303**, 495–499.
- [128] Frolov, V. A. and Zimmerberg, J. (2008). Flexible scaffolding made of rigid BARs. *Cell*, **132**, 727–729.
- [129] Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E. H., Camilli, P. D., and Unger, V. M. (2008). Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell*, **132**, 807–817.
- [130] Hinshaw, J. E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 483–519.
- [131] Drin, G., Casella, J.-F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T. U., and Antony, B. (2007). A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 138–146.
- [132] Carmena, D. and Sardini, A. (2007). Lifespan regulation of conventional protein kinase C isotypes. *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 1043–1045.
- [133] Mackay, H. J. and Twelves, C. J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 554–562.

- [134] Schaloske, R. H. and Dennis, E. A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1761**, 1246–1259.
- [135] Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A. C., and Aderem, A. (1991). Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature*, **351**, 320–322.
- [136] Bivona, T. G., et al. (2006). PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol. Cell*, **21**, 481–493.
- [137] Goldberg, J. (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell*, **95**, 237–248.
- [138] Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., and Chabre, M. (1997). N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*, **36**, 4675–4684.
- [139] Nagar, B., Hantschel, O., Young, M. A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., and Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*, **112**, 859–871.
- [140] Hantschel, O., Nagar, B., Guettler, S., Kretzschmar, J., Dorey, K., Kuriyan, J., and Superti-Furga, G. (2003). A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*, **112**, 845–857.
- [141] Tang, C., Loeliger, E., Luncsford, P., Kinde, I., Beckett, D., and Summers, M. F. (2004). Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 517–522.
- [142] Duncan, J. A. and Gilman, A. G. (1998). A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J. Biol. Chem.*, **273**, 15830–15837.
- [143] Pylypenko, O., et al. (2006). Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *EMBO J.*, **25**, 13–23.
- [144] Pomorski, T. and Menon, A. K. (2006). Lipid flippases and their biological functions. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **63**, 2908–2921.
- [145] Gambhir, A., Hangyás-Mihályiné, G., Zaitseva, I., Cafiso, D. S., Wang, J., Murray, D., Pentylala, S. N., Smith, S. O., and McLaughlin, S. (2004). Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys. J.*, **86**, 2188–2207.
- [146] Golebiewska, U., Gambhir, A., Hangyás-Mihályiné, G., Zaitseva, I., Rädler, J., and McLaughlin, S. (2006). Membrane-bound basic peptides sequester multivalent (PIP2), but not monovalent (PS), acidic lipids. *Biophys. J.*, **91**, 588–599.
- [147] McLaughlin, S. and Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*, **438**, 605–611.
- [148] Kaminchik, J., Margalit, R., Yaish, S., Drummer, H., Amit, B., Sarver, N., Gorecki, M., and Panet, A. (1994). Cellular distribution of HIV type 1 Nef protein: identification of domains in Nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **10**, 1003–1010.
- [149] Coates, K., Cooke, S. J., Mann, D. A., and Harris, M. P. (1997). Protein kinase C-mediated phosphorylation of HIV-I Nef in human cell lines. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12289–12294.
- [150] Fackler, O. T., Kienzle, N., Kremmer, E., Boese, A., Schramm, B., Klimkait, T., Kücherer, C., and Mueller-Lantzsch, N. (1997). Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization. *Eur. J. Biochem.*, **247**, 843–851.
- [151] Zhang, Y. and Cremer, P. S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Curr Opin Chem Biol*, **10**, 658–663.

- [152] Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat. Protoc.*, **1**, 2527–2535.
- [153] Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Publishers.
- [154] Duronio, R. J., Jackson-Machelski, E., Heuckeroth, R. O., Olins, P. O., Devine, C. S., Yonemoto, W., Slice, L. W., Taylor, S. S., and Gordon, J. I. (1990). Protein N-myristoylation in *Escherichia coli*: reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 1506–1510.
- [155] Lodge, J. K., Jackson-Machelski, E., Devadas, B., Zupec, M. E., Getman, D. P., Kishore, N., Freeman, S. K., McWherter, C. A., Sikorski, J. A., and Gordon, J. I. (1997). N-myristoylation of Arf proteins in *Candida albicans*: an in vivo assay for evaluating antifungal inhibitors of myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase. *Microbiology*, **143** (Pt 2), 357–366.
- [156] Franco, M., Chardin, P., Chabre, M., and Paris, S. (1995). Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1337–1341.
- [157] Hoffmann, S., Jonas, E., König, S., Preusser-Kunze, A., and Willbold, D. (2007). Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 binds its own myristoylated N-terminus. *Biol Chem*, **388**, 181–183.
- [158] Ladokhin (2000). *Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis*, chap. -, p. 5762–5779. Encyclopedia of Analytical Chemistry John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- [159] Sumandea, M., Das, S., Sumandea, C., and Cho, W. (1999). Roles of Aromatic Residues in High Interfacial Activity of *Naja naja atra* Phospholipase A2. *Biochemistry*, **38**, 16290–16297.
- [160] Welker, R., Harris, M., Cardel, B., and Kräusslich, H. G. (1998). Virion incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Nef is mediated by a bipartite membrane-targeting signal: analysis of its role in enhancement of viral infectivity. *J Virol*, **72**, 8833–8840.
- [161] McLaughlin, S., Smith, S. O., Hayman, M. J., and Murray, D. (2005). An electrostatic engine model for autoinhibition and activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB) family. *J. Gen. Physiol.*, **126**, 41–53.
- [162] Zimmerberg, J. and Kozlov, M. M. (2006). How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 9–19.
- [163] Zheng, Y. H., Plemenitas, A., Linnemann, T., Fackler, O. T., and Peterlin, B. M. (2001). Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr. Biol.*, **11**, 875–879.
- [164] Alexander, M., cherng Bor, Y., Ravichandran, K. S., Hammarskjöld, M.-L., and Rekosh, D. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with lipid rafts to downmodulate cell surface CD4 and class I major histocompatibility complex expression and to increase viral infectivity. *J. Virol.*, **78**, 1685–1696.
- [165] Kooijman, E. E., Carter, K. M., van Laar, E. G., Chupin, V., Burger, K. N. J., and de Kruijff, B. (2005). What makes the bioactive lipids phosphatidic acid and lysophosphatidic acid so special? *Biochemistry*, **44**, 17007–17015.
- [166] Arbuzova, A., Wang, L., Wang, J., Hangyás-Mihályné, G., Murray, D., Honig, B., and McLaughlin, S. (2000). Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry*, **39**, 10330–10339.
- [167] Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., and White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, **37**, 14713–14718.
- [168] Whitmore, L. and Wallace, B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, **89**, 392–400.

- [169] Whitmore, L. and Wallace, B. A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res*, **32**, W668–W673.
- [170] Grzesiek, S., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., and Bax, A. (1996). The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry*, **35**, 10256–10261.
- [171] Bentham, M., Mazaleyrat, S., and Harris, M. (2003). The di-leucine motif in the cytoplasmic tail of CD4 is not required for binding to human immunodeficiency virus type 1 Nef, but is critical for CD4 down-modulation. *J. Gen. Virol.*, **84**, 2705–2713.
- [172] Lock, M., Greenberg, M. E., Iafrate, A. J., Swigut, T., Muench, J., Kirchhoff, F., Shohdy, N., and Skowronski, J. (1999). Two elements target SIV Nef to the AP-2 clathrin adaptor complex, but only one is required for the induction of CD4 endocytosis. *EMBO J*, **18**, 2722–2733.
- [173] Laumann, V. (2004). *Synthese der zytoplasmatischen Domäne von CD4 zur Analyse der Interaktion mit HIV-1 Nef*. Master’s thesis, MPI Dortmund.
- [174] Coates, J. C. (2003). Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends Cell Biol.*, **13**, 463–471.
- [175] Wang, Y. X., Catlett, N. L., and Weisman, L. S. (1998). Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole. *J Cell Biol*, **140**, 1063–1074.
- [176] Dietrich, L. E. P., LaGrassa, T. J., Rohde, J., Cristodero, M., Meiringer, C. T. A., and Ungermann, C. (2005). ATP-independent control of Vac8 palmitoylation by a SNARE subcomplex on yeast vacuoles. *J. Biol. Chem.*, **280**, 15348–15355.
- [177] Nalefski, E. A. and Newton, A. C. (2001). Membrane Binding Kinetics of Protein Kinase C β II Mediated by the C2 Domain. *Biochemistry*, **40**, 13216–13229.
- [178] Domanov, Y. A., Molotkovsky, J. G., and Gorbenko, G. P. (2005). Coverage-dependent changes of cytochrome c transverse location in phospholipid membranes revealed by FRET. *Biochim. Biophys. Acta*, **1716**, 49–58.
- [179] Nagle, J. F. and Tristram-Nagle, S. (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **1469**, 159–195.
- [180] Seidel, R. D., Amor, J. C., Kahn, R. A., and Prestegard, J. H. (2004). Conformational changes in human Arf1 on nucleotide exchange and deletion of membrane-binding elements. *J Biol Chem*, **279**, 48307–48318.
- [181] Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., and Marshall, C. J. (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, **57**, 1167–1177.
- [182] Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1451**, 1–16.
- [183] White, S. H. and Wimley, W. C. (1998). Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1376**, 339–352.
- [184] Killian, J. A. and von Heijne, G. (2000). How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 429–434.
- [185] Constantinescu, I. and Lafleur, M. (2004). Influence of the lipid composition on the kinetics of concerted insertion and folding of melittin in bilayers. *Biochim Biophys Acta*, **1667**, 26–37.
- [186] Preusser, A., Briese, L., Baur, A. S., and Willbold, D. (2001). Direct in vitro binding of full-length human immunodeficiency virus type 1 Nef protein to CD4 cytoplasmic domain. *J Virol*, **75**, 3960–3964.
- [187] Breuer, S. (2006). *Entwicklung eines gegen HIV-1 Nef_{SF2} gerichteten Inhibitors*. Ph.D. thesis, MPI Dortmund.

-
- [188] Sol-Foulon, N., Esnault, C., Percherancier, Y., Porrot, F., Metais-Cunha, P., Bachelerie, F., and Schwartz, O. (2004). The effects of HIV-1 Nef on CD4 surface expression and viral infectivity in lymphoid cells are independent of rafts. *J. Biol. Chem.*, **279**, 31398–31408.
- [189] Heller, H., Schaefer, M., and Schulten, K. (1993). Molecular Dynamics Simulation of a Bilayer of 200 Lipids in the Gel and in the Liquid Crystal Phases. *J. Phys. Chem.*, **97**, 8343–8360.
- [190] Sreerama, N., Venyaminov, S. Y., and Woody, R. W. (1999). Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.*, **8**, 370–380.

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin bzw. Alanin
Å	Angström (10^{-10} m)
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β -DPH-HPC	2-(3-(diphenylhexatrienyl)propanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
C	Cytosin bzw. Cystein
CD	Cluster of differentiation
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)] (Sodium Salt)
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine] (Sodium Salt)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTE	1,4-Dimercapto-2,3-butanediol
<i>E. coli</i>	<i>Escheria coli</i>
EDTA	ethylenedinitrilotetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
FRET	fluorescence resonance energy transfer
G	Guanin
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IPTG	Isopropyl-b-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LUV	Large unilamellar vesicle
LPA	Lysophosphatidsäure
MALDI - TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight
MCS	multiple cloning site
MS	Massenspektroskopie
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole
Nef	negative factor
NMT	N-myristoyl-Transferase
nt	Nukleotid
Ni-NTA	nickel-nitriлотriacetic acid
OD _x	Optische Dichte gemessen bei x nm
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholin
PCP	<i>pneumocystis carinii pneumonia</i>
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PIP	Phosphatidylinositolphosphat

PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SUV	small unilamellar vesicle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine
Tween 20	polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
U	Units
UV	Ultraviolett

Danksagung

Mein Dank gilt,

Priv.-Doz. Dr. Matthias Geyer, dessen Idee zu dieser Arbeit führte, die Betreuung, Diskussionsbereitschaft und die ständige Motivation.

Prof. Dr. Roger S. Goody, für die Möglichkeit an diesem Institut zu arbeiten sowie für die Einführung in die Kinetik.

Prof. Dr. Christian Becker und Vanessa Laumann für die Synthese des CD4-Peptids.

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

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

Andrea für die gemeinsamen SPR-Messungen.

Dem gesamten Labor: Janna, Diana, Sebastian, Andre, Antje, Nadine, Friederike, Florian, Barbara, Karl-Heinz, Bernhard, Karin und Santiago, sowie Sandra, Tim, Aymelt, Tina, Uyen & Janina für die schöne Zeit an diesem Institut.

Eidesstattliche Erklärung:

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

Datum / Unterschrift