

Biochemische und strukturebiologische
Untersuchungen der HIV/SIV Nef-vermittelten
Rezeptorinternalisierung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Chemie an der Technischen Universität Dortmund

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

vorgelegt von

Florian Alexander Horenkamp (M. Sc.)

aus Lübeck

Dortmund, Juni 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2006 bis Juni 2010 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung für Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Leitung von PD Dr. Matthias Geyer angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	HIV und AIDS.....	3
2.2	Aufbau und Replikation von HIV-1	5
2.2.1	Genom und Genprodukte	5
2.2.2	Viruspartikel.....	6
2.2.3	Replikationszyklus	6
2.2.4	HIV-1 Nef	8
2.2.5	Struktur des HIV-1 Nef-Proteins.....	9
2.2.6	Funktionen von HIV-1 Nef	10
2.2.7	Strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen HIV-1, HIV-2 und SIV Nef	16
2.3	Proteintransport in clathrinbeschichteten Vesikeln	18
2.3.1	Die <i>assembly polypeptide</i> Komplexe	19
2.3.2	Die Struktur der Komplexe AP-1 und AP-2.....	21
2.3.3	Die Wechselwirkungen zwischen HIV-1 Nef, CD4 und AP-2.	22
2.3.4	Die Wechselwirkung zwischen SIV _{mac239} Nef, CD3 ζ und AP-2	23
2.4	Zielsetzung	23
3	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1	Materialien	29
3.1.1	Chemikalien für Biochemie und Molekularbiologie	29
3.1.2	Chemikalien für die Proteinkristallisation.....	30
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	31
3.1.4	Molekularbiologische Kits	31
3.1.5	Säulenmaterialien	31
3.1.6	Enzyme.....	32
3.1.7	Nukleinsäuren	32
3.1.8	Mikroorganismen	33
3.1.9	Peptide.....	33
3.1.10	Nährmedien und Zusätze für prokaryotische Zellkultur.....	33
3.2	Geräte.....	34
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	35
3.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
3.3.2	Mega-Primer Mutagenese	35
3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.3.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
3.3.5	Restriktionsverdau.....	37
3.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor.....	37
3.3.7	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	38

3.4	Proteinbiochemische Methoden	39
3.4.1	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	39
3.4.2	Herstellung von Glycerindauerkulturen	40
3.4.3	Amplifikation von Plasmiden in <i>E. coli</i> -Zellen	40
3.4.4	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> -Zellen	40
3.4.5	Überexpression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> -Zellen	40
3.4.6	Reinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>E. coli</i> -Zellen	41
3.4.7	Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	42
3.4.8	Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen	43
3.4.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinen durch Absorptionsmessung	43
3.4.10	Konzentrieren von Proteinlösungen	43
3.4.11	Dialyse von Proteinlösungen	43
3.5	Biophysikalische Methoden	43
3.5.1	Analytische Größenausschlusschromatographie	43
3.5.2	ESI-Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometrie	44
3.5.3	Isothermale Titrationskalorimetrie	44
3.6	Strukturbiologische Methoden	45
3.6.1	Proteinkristallisation	45
3.6.2	Datenaufnahme	47
3.6.3	Das Phasenproblem	47
3.6.4	Molekularer Ersatz	48
3.6.5	Modellbau und Verfeinerung	49
3.6.6	Nicht-Kristallographische Symmetrie (NCS)	50
3.6.7	TLS-Verfeinerung	50
3.6.8	Graphische Darstellung von Kristallstrukturen	51
3.6.9	Röntgenkleinwinkelstreuung	51
4	ERGEBNISSE	53
4.1	Strukturbiologische und biochemische Untersuchungen an HIV-1_{SF2} Nef	53
4.1.1	Darstellung der verwendeten Proteine und Proteinkomplexe	55
4.1.2	Strukturuntersuchungen des Komplexes aus HIV-1 _{SF2} Nef und der Hck SH3 _{B6} -Mutante .	56
4.1.3	Biochemische Untersuchungen an HIV-1 _{SF2} Nef	67
4.2	Strukturbiologische und biochemische Untersuchungen an SIV_{mac239} Nef	73
4.2.1	Darstellung der verwendeten Proteine und Proteinkomplexe	73
4.2.2	Biochemische Untersuchungen zur Interaktion von SIV _{mac239} Nef und seinen Bindungspartnern	77
4.2.3	Strukturbiologische Untersuchungen an SIV _{mac239} Nef	81
4.3	Strukturbiologische und biochemische Untersuchung der Adaptorproteinkomplexe AP-1 und AP-2	95
4.3.1	Darstellung der verwendeten Proteine	95
4.3.2	Biochemische Untersuchungen der Adaptorprotein-Komplexe	103
4.3.3	Strukturbiologische Untersuchungen	104

5	DISKUSSION	105
5.1	Die Rolle von Nef in der HIV/SIV Pathogenese.....	105
5.2	Nef-abhängige Rezeptorinternalisierung	106
5.2.1	Regulation der Nef-abhängigen Rezeptorinternalisierung	106
5.2.2	Erkennung von Sortierungsmotiven durch HIV und SIV Nef.....	109
5.2.3	Modell der Nef-abhängigen Rezeptorinternalisierung	114
5.3	Interaktion zwischen Nef und SH3-Domänen	115
5.4	Weitere kristallographische Studien an HIV/SIV Nef	117
5.5	Sortierungsmotiv-Erkennung der Adaptorprotein-Komplexe	119
6	DANKSAGUNG	124
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125
8	ANHANG	128
9	LITERATURVERZEICHNIS	140
10	LEBENS LAUF	152
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	153

1 Zusammenfassung

Das akzessorische Nef-Protein ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von HIV und SIV, den Immundefizienzviren der Primaten. Nef erhöht u.a. die Produktion viraler Partikel, es erleichtert die Knospung neuer Viren von der Wirtszellmembran und es schützt die Wirtszelle vor Superinfektionen und der Erkennung durch das Immunsystem. Auf Proteinebene lassen sich die meisten Nef-vermittelten Effekte auf die Wechselwirkung mit Proteinen der zellulären Signaltransduktionskaskaden oder des intrazellulären Proteintransportsystems zurückführen. Als molekularer Adapter ohne enzymatische Aktivität bringt Nef Wirtsproteine in funktionalen Einheiten zusammen und kann so Einfluss auf mehrere unterschiedliche zelluläre Systeme nehmen. Hierfür verfügt Nef über eine Reihe konservierter Sequenzmotive, welche die Wechselwirkung mit verschiedenen zellulären Proteinen vermitteln. Nef verfügt u.a. über ein PxxP-Motiv zur Interaktion mit der SH3-Domäne von Tyrosinkinasen und über ein Dileuzinmotiv für die Bindung an die heterotetrameren Adaptorproteine der AP-Familie. Alle Funktionen von Nef erfordern die Membranlokalisierung des Proteins, welche durch eine N-terminale Myristoylierung vermittelt wird.

Die Depletion von Oberflächenrezeptoren der T-Helferzellen, wie CD4 und MHC I, zählt zu den wichtigsten Funktionen von Nef. Zudem scheint ein wesentlicher funktionaler Unterschied zwischen pathogenen und nicht-pathogenen HIV- und SIV-Stämmen in der Fähigkeit von Nef zu liegen, die CD3 ζ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors zu internalisieren. Viren, die über diese Eigenschaft verfügen, lösen in ihren natürlichen Wirten keine Immundefizienz aus. Um die Internalisierung eines Rezeptors einzuleiten, erkennt Nef bestimmte Signalmotive in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Infolge dieser Wechselwirkung rekrutiert Nef die AP-Komplexe, was den Transport in Clathrin-beschichteten Vesikeln und die anschließende lysosomale Degradation des Rezeptors einleitet.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Mechanismen der Nef-vermittelten Rezeptorinternalisierung durch strukturelle und biochemische Studien auf molekularer Ebene untersucht werden. Es wurde eine Kristallstruktur von HIV-1_{SF2} Nef im Komplex mit einer SH3-Domäne erstellt, in der erstmals die gesamte flexible Schleife von Nef, welche das für die Rekrutierung der AP-Komplexe wichtige Dileuzinmotiv beinhaltet, aufgelöst wurde. Die Schleifen zweier Nef-Proteine binden in dieser Struktur wechselseitig in die hydrophobe Tasche des jeweils anderen Nef-

Moleküls. Die hydrophobe Tasche von Nef ist für die Erkennung von Signalmotiven in Membranrezeptoren verantwortlich. Somit zeigt diese Struktur potentiell eine *in trans* autoinhibierte Konformation des Nef-Proteins.

Des Weiteren wurde eine Kristallstruktur von SIV_{mac239} Nef erstellt, in welcher das Dileuzinmotiv eines Nef-Proteins mit der hydrophobe Tasche eines zweiten Nef-Moleküls interagiert. Diese hier vorgestellte Struktur stellt das erste Modell für die Erkennung von Dileuzinmotiven durch Nef dar. Dileuzinmotive treten in einer Vielzahl von Membranrezeptoren wie CD4 auf und können durch Nef im Zuge der Nef-abhängigen Internalisierung dieser Rezeptoren erkannt werden.

Durch analytische Größenausschlusschromatographie und isothermale Titrationskalorimetrie wurde die Bindung von HIV-1_{SF2} und SIV_{mac239} Nef an unterschiedlichen Fragmente der CD3 ζ -Untereinheit und an SH3-Domänen untersucht und die Bindungsaffinitäten bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung der SH3-Domänen unabhängig vom myristoylierten N-Terminus von HIV-1_{SF2} Nef ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit CD3 ζ nicht durch die gleichzeitige Bindung von SIV_{mac239} Nef an SH3-Domänen beeinflusst wird. SH3-Domänen interagieren mit ihrer RT-Schleife, wie die Signalmotive von Membranrezeptoren, mit der hydrophoben Tasche von Nef. Da eine gleichzeitige Bindung von CD3 ζ und SH3-Domänen möglich ist, muss die hydrophobe Tasche von Nef zwei voneinander unabhängige Bindungsstellen aufweisen. Durch die in dieser Arbeit bestimmten Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass die sogenannte hydrophobe Tasche von Nef durch die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan (HIV), bzw. Tyrosin (SIV), in zwei Taschen geteilt ist, von denen eine mit der RT-Schleife der SH3-Domänen und die andere mit Transportsignalmotiven interagiert. Diese hier identifizierten hydrophoben Taschen könnten als Angriffspunkt für die Entwicklung von Nef-gerichteten antiretroviralen Wirkstoffen dienen.

Um die Bindung von Nef an die Proteinkomplexe der AP-Familie zu untersuchen, wurden die Kernstrukturen der heterotetrameren Proteinkomplexe AP-1 und AP-2, sowie eine Reihe Mutanten dieser Komplexe rekombinant exprimiert und isoliert. Diese Proteine sollen in künftigen biochemischen und strukturbiologischen Untersuchungen eingesetzt werden, um das Bindungsverhalten von Nef an die AP-Komplexe zu untersuchen.

2 Einleitung

2.1 HIV und AIDS

Die Immunschwächekrankheit AIDS (*Aquired Immunodeficiency Syndrome*) stellt das Endstadium einer Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) dar. Seit der Identifizierung von HIV als Ursache von AIDS im Jahre 1983 (Barre-Sinoussi et al. 1983; Gallo et al. 1984; Levy and Shimabukuro 1985) starben laut Jahresabschlussbericht des AIDS-Programms der Vereinten Nationen (UNAIDS 2009) 25 Millionen Menschen an den Folgen einer HIV-Infektion. Desweiteren waren im Jahre 2009 33,4 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert, es gab 2,7 Millionen Neuinfektionen und 2 Millionen Menschen starben an den Folgen der Infektion. Während in den Industrienationen die Lebenserwartung von HIV-Infizierten durch die Anwendung von antiviralen Medikamenten deutlich angestiegen ist, stellt HIV mit 1,4 Millionen Toten im Jahre 2008 eine der Haupttodesursachen in Afrika südlich der Sahara dar (siehe Abbildung 1). Auch wenn die heutzutage angewandte Kombinationstherapie HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) die virale Replikation für Jahre unterdrücken kann, ist eine Heilung, also die vollständige Eliminierung von HIV aus den menschlichen Zellen, bisher nicht möglich.

Das HI-Virus ist ein zur Gattung der Lentiviren gehörendes Virus aus der Familie der Retroviren, wobei sich der Begriff Retrovirus auf den Mechanismus der reversen Transkription bezieht. Das Genom von Retroviren besteht aus einzelsträngiger, plusstrang-orientierter RNA, welche im Laufe des viralen Lebenszykluses durch reverse Transkription in doppelsträngige DNA umgeschrieben wird. Die entstandene provirale DNA wird im Anschluss stabil in das Wirtsgenom integriert. Lentiviren zeichnen sich durch eine langsame Pathogenese (lateinisch: *lentus* = langsam) mit einem chronischen, degenerativen Krankheitsbild aus. Manche lentiviralen Infektionen führen nicht zu einer Erkrankung des Wirts.



Abbildung 1: Regionale HIV- und AIDS-Statistik der WHO für das Jahr 2009 (verändert nach UNAIDS 2009). Es sind die Anzahl der HIV-Infizierten und der auf eine HIV-Infektion zurückzuführenden Todesfälle (in Klammern) für die verschiedenen Subkontinente dargestellt.

Bei HIV unterscheidet man zwischen den Typen HIV-1 und HIV-2, welche sich jeweils in weitere Gruppen und Subtypen untergliedern. Der Hauptteil der weltweiten Pandemie ist auf eine Infektion mit dem HIV-1 Virus der Gruppe M zurückzuführen, wohingegen die Ausbreitung von HIV-2 geographisch auf Westafrika beschränkt ist. Auch weisen Infektionen mit HIV-2 generell einen langsameren Krankheitsverlauf auf und die Übertragungsrate ist im Vergleich zu HIV-1 deutlich geringer. Auf genomischer Ebene weisen HIV-1 und HIV-2 eine Sequenzhomologie von lediglich 50% auf, dies ist auf die Entstehung der unterschiedlichen HIV Typen zurückzuführen. Das HI-Virus ist durch eine Zoonose, also der Übertragung eines Krankheitserregers über die Artengrenzen hinweg, vom Affen auf den Menschen entstanden (Sharp et al. 2000; Sharp et al. 2001). Der HIV-1 Typ stammt dabei von dem Chimpansenvirus SIV_{cpz} ab, wohingegen HIV-2 auf den in Mangaben auftretenden SIV_{sm} Virus zurückzuführen ist. Kürzlich wurde zudem ein weiterer HIV-Typ identifiziert dessen Ursprünge vermutlich auf SIV_{gor}, dem SI-Virus des Gorillas, liegen (Plantier et al. 2009).

2.2 Aufbau und Replikation von HIV-1

2.2.1 Genom und Genprodukte

Das Genom des HI-Virus besteht aus einzelsträngiger, plusstrang-orientierter RNA und kodiert für insgesamt 15 Proteine (siehe Abbildung 2), die in Hüllproteine, Strukturproteine, enzymatische Proteine und akzessorische Proteine unterteilt werden (zur Übersicht siehe (Frankel and Young 1998; Turner and Summers 1999)). Die RNA-Moleküle weisen wie eukaryotische mRNAs ein 5'-Cap und eine 3'-Polyadenylierung auf. Zudem enthält die virale RNA regulatorische und strukturelle Elemente, welche die reverse Transkription und die Verpackung der RNA in das Kapsid steuern.

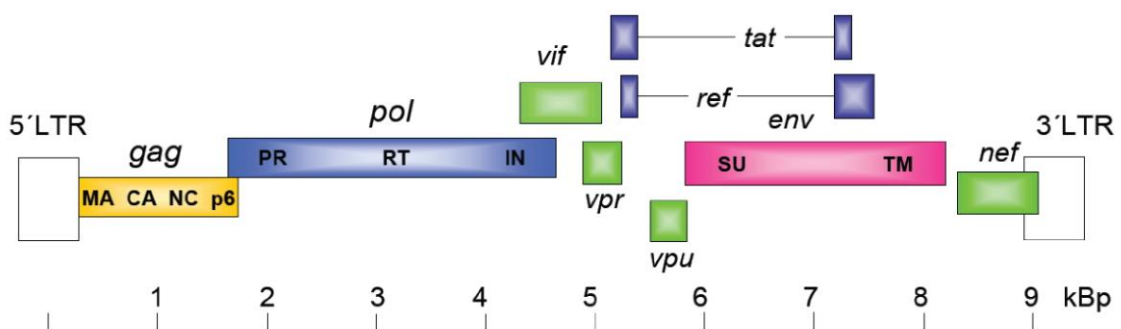


Abbildung 2: Organisation des HIV-Genoms (Frankel and Young 1998). Das gag-Gen codiert für die Strukturproteine, das pol-Gen für die viralen Enzyme und das env-Gen für die Hüllproteine. Desweiteren codiert das HIV-Genom für sechs weitere regulatorische und akzessorische Proteine.

Die Hüllproteine umfassen das Transmembranprotein (TM oder gp41) und das externe Glykoprotein (SU oder gp120). Das Matrix-Protein (MA), das Kapsid-Protein (CA), das Nucleocapsid-Protein (NC) und das Link-Protein (p6) bilden die Gruppe der Strukturproteine welche die partikulären Strukturen bilden. Diese Proteine werden in Form eines Polyproteins vom gag-Gen (Gruppenspezifische Antigene) kodiert. Bei den enzymatischen Proteinen handelt es sich um die virale Protease (PR), die Reverse Transkriptase (RT) und die Integrase (IN). Alle Proteine werden als Gag/Pol-Fusionsprotein translatiert. Die einzelnen Proteine werden anschließend durch die autokatalytisch freigesetzte HIV-Protease aus dem Vorläuferprotein prozessiert. Desweiteren kodiert das Virus für das Protein Tat (*transactivator of transcription*), ein Transkriptions-stimulierendes Protein, sowie fünf akzessorischen Proteine. Diese umfassen das Regulatorprotein Rev (*regulator of expression of virion proteins*) sowie die Hilfsproteine Vif (*viral infectivity factor*), Vpr (*viral protein R*), Vpu (*viral protein U*) und Nef (*negative factor*) (Frankel and Young 1998).

2.2.2 Viruspartikel

HIV ist ein behülltes Virus mit einem Durchmesser von ca. 100 nm (siehe Abbildung 3). Drei Proteine sind mit der vom Wirt stammenden Hüllmembran assoziiert: das Glykoproteine gp41 ist über eine transmembrane Region von 20 hydrophoben Aminosäuren in der Membran verankert; gp120 ist nichtkovalent mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des gp41 assoziiert. Die Innenseite der Hüllmembran ist mit dem Matrix-Protein bedeckt, welches über einen Myristinsäurerest mit der Membran verbunden ist. Die Membran umgibt das konische Kapsid, welches aus ca. 2000 Kopien des Kapsid-Proteins aufgebaut ist und zwei Kopien des viralen Genoms umschließt. Das aus RNA bestehende Genom wird durch Wechselwirkungen mit dem Nukleokapsidprotein stabilisiert. Innerhalb des Kapsids sind zudem die viralen Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase sowie die akzessorischen Proteine Nef, Vpr und Vif, jedoch nicht die akzessorischen Proteine Tat, Rev und Vpu enthalten (Frankel and Young 1998).

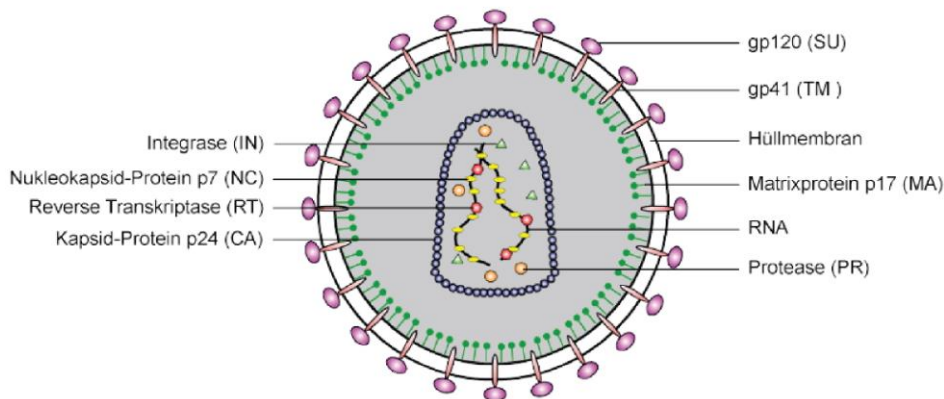
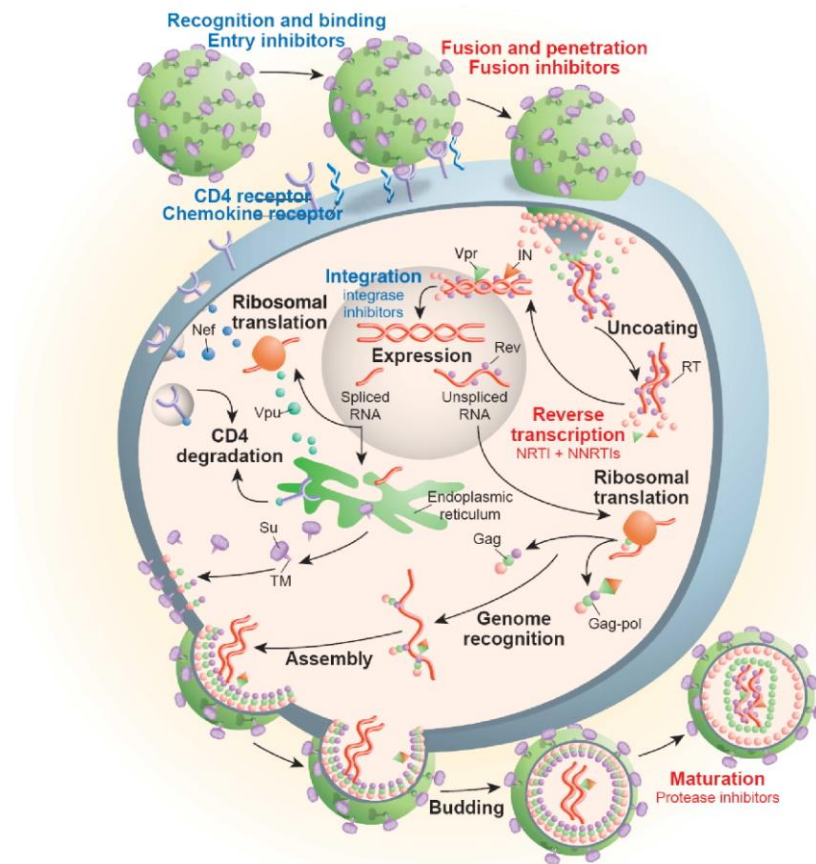


Abbildung 3: Aufbau des HIV-Partikels (Frankel and Young 1998). Das Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 100 nm.

2.2.3 Replikationszyklus

Eine schematische Darstellung der Replikation ist in Abbildung 4 gezeigt (zur Übersicht siehe (Frankel and Young 1998)). HIV erkennt seine Wirtszellen durch Wechselwirkung des viralen gp120 Proteins mit dem Oberflächenrezeptor CD4. Dieser Rezeptor wird auf Zellen des Immunsystems, wie T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten, exprimiert. Für eine erfolgreiche Infektion ist zusätzlich noch eine Wechselwirkung mit einem der zellulären Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5 nötig.



Katie Ris

Abbildung 4: Der HIV-Replikationszyklus (Pomerantz and Horn 2003).

Als Folge der gp120/CD4 Interaktion findet eine Konformationsänderung des gp41-Proteins statt, welche die Fusion der viralen und zellulären Membran unterstützt. Nach der Membranverschmelzung wird das virale Kapsid in das Zytoplasma freigesetzt, gefolgt von der Freisetzung des Nukleinsäure-Protein-Komplexes aus dem Kapsid. Im Zytosol findet zunächst die reverse Transkription statt. Die entstandene provirale DNA wird in einem Präintegrationskomplex, bestehend aus den Proteinen IN, MA, RT und Vpr, in den Kern transportiert, wobei Vpr den Kerntransport vermittelt. Das Enzym Integrase baut anschließend die provirale DNA stabil in das Wirtsgenom ein.

Die Synthese von viraler mRNA wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II, ausgehend vom Promotor im 5'-LTR (*long terminal repeat*) des HIV-Genoms, katalysiert. Die entstehenden Transkripte werden unter Beteiligung des Rev-Proteins in das Zytoplasma transportiert und dort translatiert. Die Gag- und Gag-Pol-Genprodukte gelangen nach der Translation an die Zellmembran und formen durch Selbstorganisation

ein sphärisches Kapsid welches zwei Kopien des HIV RNA-Genoms sowie mehrere virale und zelluläre Protein umschließt.

Das Env-Vorläuferprotein wird, wie der zelluläre CD4-Rezeptor, am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Dies führt zur Ausbildung von Env-CD4 Komplexen im ER und hat die Degradation dieser Komplexe zur Folge. Um den Transport von Env an die Plasmamembran zu gewährleisten, wird CD4 Vpu-vermittelt abgebaut. Die Degradation wird vermutlich von den Proteasomen durchgeführt und setzt die Vpu-abhängige Ubiquitylierung von CD4 voraus (Lindwasser et al. 2007). Durch Wechselwirkung von Gag mit dem membranständigen viralen Env-Polyprotein wird die Umhüllung des Kapsids mit der Hüllmembran vermittelt, wodurch neue unreife Virionen entstehen. Diese werden durch Knospung von der Zellmembran freigesetzt. Die Reifung erfolgt durch eine Prozessierung der Strukturproteine. Neben zwei Kopien des viralen Genoms enthält das Virion die Gag- und Gag/Pol-Polyproteine, die im weiteren Verlauf durch die virale Protease in die einzelnen Proteine gespalten werden. Eine Reinfektion der Wirtszelle wird durch vorherige Nef-abhängige Endozytose und anschließende lysosomale Degradation des CD4-Oberflächenrezeptores verhindert.

2.2.4 HIV-1 Nef

Das Nef-Protein wurde ursprünglich als 3'ORF Element beschrieben (Guy et al. 1987), welches einen negativen Einfluss auf die virale Replikation ausübt (Cheng-Mayer et al. 1989). Auf diese Beobachtung ist auch die Bezeichnung des Proteins als „*negative factor*“, Nef zurückzuführen. Weiterführende Untersuchungen zeigten jedoch, dass Nef vielmehr einen stimulatorischen Effekt auf die virale Replikation und Infektziösität ausübt (Miller et al. 1994a; Miller et al. 1994b; Munch et al. 2007). Die Bedeutung von Nef für die HIV-Pathogenese wurde durch die genetische Analyse einer Kohorte von Individuen deutlich, welche noch vor der Identifizierung des HI-Virus als Ursache für AIDS, durch Bluttransfusion mit HIV infiziert wurden. Diese HIV-Variante wies eine große Deletion im *nef*-Gen auf (Deacon et al. 1995; Kirchhoff et al. 1995). Die Individuen dieser Kohorten blieben für einen Zeitraum von über 15 Jahren ohne Symptome - auch wenn inzwischen bei einigen erste klinische Anzeichen einer Progression zu AIDS aufgetreten sind (Gorry et al. 2007a; Gorry et al. 2007b).

Nef ist zwischen 27 und 34 kDa groß und zählt zu den akzessorischen HIV bzw. SIV Proteinen. Es wird früh im viralen Replikationszyklus exprimiert und erfüllt eine Vielzahl von Funktionen. Nef erhöht die Produktion viraler Partikel und somit die Verbreitung des HI-Virus. Dies führt zu einer schnelleren Depletion der CD4-positiven T-Zellen und der dadurch bedingten Immundefizienz. Obwohl das Nef-Protein

von großer Bedeutung für die Pathogenese von HIV und SIV ist, sind die molekularen Grundlagen für dessen Wirkungsweise noch immer nicht vollständig verstanden.

Nef besitzt keine enzymatische Funktion, es wirkt vielmehr als ein Adaptorprotein, welches unterschiedlich zelluläre Proteine in funktionellen Einheiten bündelt. Es wurden eine Vielzahl von Nef-Bindungspartnern beschrieben (Benichou et al. 1997), deren Relevanz für die Funktionen von Nef *in vivo* jedoch häufig unklar geblieben ist. Im Wesentlichen werden Nef die folgenden drei Funktionen zugeschrieben: Erstens erhöht es die Infektiosität eines Viruspartikels nach dem Eintreten des Viruspartikels in die Wirtszelle (Schrager and Marsh 1999; Wang et al. 2000). Zweitens nimmt Nef Einfluss auf die zelluläre Signaltransduktion durch Wechselwirkungen mit Tyrosin- und Serin-Kinasen (Baur et al. 1997). Drittens führt Nef durch Interaktion mit Komponenten des Proteintransportsystems zur Depletion von Zelloberflächenrezeptoren wie CD4 und MHC I (Piguet et al. 1999). In dieser Arbeit wurde mit HIV-1_{SF2} Nef, dem Nef-Protein des HIV-Isolats Subtyp B SF2 (ARV2/SF2 ISOLATE Taxonomy ID: 11685), sowie dem SIV Nef_{mac239} gearbeitet und die entsprechenden Nomenklaturen verwendet.

2.2.5 Struktur des HIV-1 Nef-Proteins

Ein Modell der Nef-Struktur ist in Abbildung 5A gezeigt (Geyer and Peterlin 2001), welches aus der Kombination von NMR-Datensätzen zweier komplementärer Nef-Konstrukte entstanden ist (Grzesiek et al. 1997; Geyer et al. 1999). Desweiteren wurden Kristallstrukturen der Kerndomäne von Nef im Komplex mit SH3 Domänen gelöst (Lee et al. 1996; Arold et al. 1997). HIV-1_{SF2} Nef besteht aus einer flexiblen N-terminalen Ankerdomäne (AS 1-60) variabler Länge mit zwei α -helikalen Bereichen, sowie einer gefalteten Kerndomäne, welche aus vier α -Helices und einem β -Faltblattelement aus fünf antiparallelen β -Faltblättern besteht.

Im Detail weist die Nef-Struktur vier Regionen auf: Die flexible, myristoylierte Membranankerdomäne am N-Terminus (myr2-60), einem α -helikalen Bereich (61-70), gefolgt von einer Schleife (73-82), die aus einer Poly-Prolin-Helix Typ II besteht, die gefalteten Kerndomäne (83-210, Δ 152-184) und eine flexible Schleife (152-184). In den NMR-Studien erschienen 50% des Proteins unstrukturiert und flexibel. Aufgrund des hohen Anteils an nicht strukturierten Bereichen nehmen diese fast 70% der gesamten Proteinoberfläche ein. In der Abbildung 5B sind desweiteren eine Reihe von Sequenzmotiven in der Nef-Struktur hervorgehoben, welche für die Funktionen von Nef von Bedeutung sind und auf die im Abschnitt 2.2.6 weiter eingegangen wird.

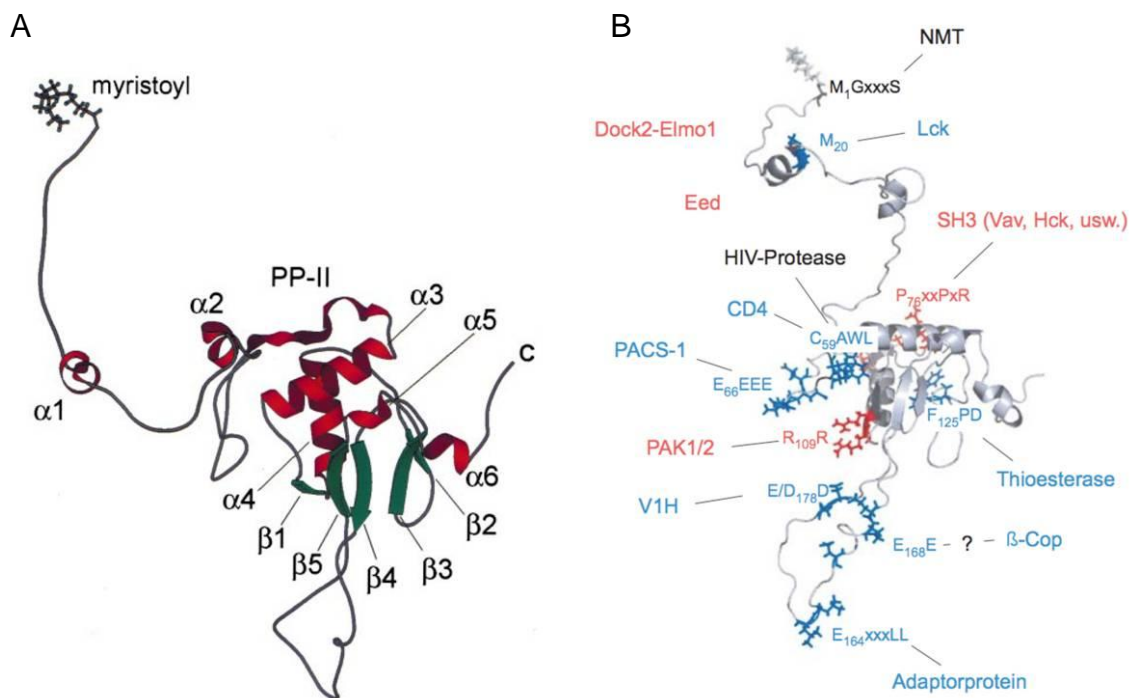


Abbildung 5: Struktur und funktionale Motive von Nef. (A) Darstellung eines Modells der HIV-1 Nef-Struktur (Geyer and Peterlin 2001) und (B) Verteilung der funktionalen Motive in der Nef-Struktur (Geyer et al. 2001). In blau dargestellte Motive sind an der Regulation des intrazellulären Proteintransports; in rot dargestellte Motive an der Regulation der Signaltransduktion beteiligt. An den in schwarz gezeigten Motiven kann Nef enzymatisch modifiziert werden.

2.2.6 Funktionen von HIV-1 Nef

Nef erfüllt seine vielfältigen Funktionen im Wesentlichen durch Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren im Bereich der Signaltransduktion und des Proteintransports. Eine Voraussetzung für die Fähigkeit von Nef mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen zu interagieren scheint der hohe Anteil an flexiblen Bereichen in Nef zu sein (Geyer et al. 2001). Für die biologische Aktivität von Nef ist zudem dessen Lokalisierung an zytosolische Membranen erforderlich. Hierfür notwendig ist die N-terminale Myristoylierung des Proteins (Harris 1995; Geyer et al. 2001). Diese findet kotranslational unter Abspaltung des initialen Methionins am Glycin des Konsensusmotivs M₁GxxxS/T (wobei x eine beliebige Aminosäure darstellt) statt. Die Myristoylierung von Nef alleine ist jedoch nicht für die Membranlokalisierung ausreichend. Der N-Terminus von Nef enthält zusätzlich hoch-konservierte Lysine und Arginine, welche an der Membranassoziation durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide in Lipidmembranen beteiligt sind (Giese et al. 2006).

Signaltransduktion:

Das Fortschreiten einer HIV-Infektion zur Krankheit AIDS zeichnet sich durch eine verstärkte, chronische Aktivierung der CD4-positiven T-Zellen aus. Das Virus findet in aktivierten T-Zellen optimale Bedingungen für die Replikation vor, gleichzeitig ist die Lebensdauer der aktivierten T-Zellen deutlich verringert. Beide Prozesse führen zu einer schnelleren Ausbreitung des Virus und zu einer verstärkten Depletion der CD4-positiven Zellpopulation und somit zur Immundefizienz. Ein möglicher Mechanismus der T-Zellaktivierung ist die Nef-abhängige Aktivierung bestimmter Signalwege, welche unabhängig vom T-Zellrezeptor (TCR) erfolgt. Nef interagiert mit einer Vielzahl zellulärer Kinasen (siehe Tabelle 1), einschließlich der Kinasen Pak2 (*p21-activated kinase 2*) und Hck (*hemopoietic cell kinase*), welche bis heute am intensivsten untersucht wurden.

Tabelle 1: Übersicht über die von Nef modulierten Signalproteine.

Protein	Funktion	Nef-Motiv	Referenz
PAK2	Kinase	RR	(Nunn and Marsh 1996; Trono and Wang 1997; Manninen et al. 1998)
Vav	GEF	PxxP	(Fackler et al. 1999)
Hck	Kinase	PxxP	(Saksela et al. 1995)
Fyn	Kinase	PxxP	(Arold et al. 1997)
Lyn	Kinase	PxxP	(Saksela et al. 1995)
Lck	Kinase	PxxP, M20	(Baur et al. 1994; Collette et al. 1996)
Dock2-Elmo1	Rac Aktivator	PxxP	(Janardhan et al. 2004)
Eed	Kinasekomplex mit Lck	?	(Witte et al. 2004)
NF-AT	Transkriptionsfaktor	?	(Fortin et al. 2004; Fenard et al. 2005)
NF-κB	Transkriptionsfaktor	?	(Fenard et al. 2005)
TCRζ	T-Zell-Rezeptorkomplex	?	(Xu et al. 1999)

Hck gehört zur Familie der Src (*sarcoma*) Tyrosinkinasen, welche eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von extrazellulären Signalen spielen, die von Rezeptoren ohne eigene enzymatische Aktivität, wie etwa dem T-Zellrezeptor vermittelt werden. Die Familie umfasst die Kinasen Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Yes und Yrk. Die Aktivierung dieser Tyrosinkinasen beruht auf der Wechselwirkung von Nef mit der SH3 (*Src homology 3*)-Domäne der Kinase.

Die Funktion und Struktur der SH3-Domäne:

SH3-Domänen sind modulare Proteinuntereinheiten, welche Protein/Protein-Wechselwirkungen zwischen Proteinen der zellulären Signaltransduktionswege vermitteln. Sie bestehen aus etwa 60 Aminosäuren und weisen eine charakteristische Faltung aus fünf Beta-Strängen auf, welche in zwei nahezu orthogonal zueinander verlaufenden Beta-Faltblättern angeordnet sind (Musacchio et al. 1992; Noble et al. 1993).

Das minimale Konsensusmotiv für Bindung an SH3-Domänen stellt das poly-Prolin-Motiv (PxxP Motiv) dar, welches die Form einer linkshändigen Helix annimmt (Cicchetti et al. 1992; Ren et al. 1993). Eine Helixwindung umfasst in diesem Strukturelement genau drei Aminosäuren, sodass die beiden Proline nebeneinander auf einer Seite der Helix liegen.

Die Nef/SH3-Domänen Interaktion:

HIV-1 Nef verfügt über eine konservierte poly-Prolin Typ II Helix (PPII) mit der Sequenz P₇₃xxPxxPxRP. Die SH3-Domäne bindet über hydrophobe Wechselwirkungen an die Proline des P₇₆xxPxR-Motivs, sowie durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen an das Arginin an Position 81. Von den bisher auf Nef-Bindung untersuchten SH3-Domänen weisen die der Tyrosinkinase Hck und Lyn die höchste Affinität zu Nef auf. Die Bindung von Hck an Nef stellt mit einem K_D von 1,5 µM die stärkste bisher beschriebene natürliche SH3/Liganden Wechselwirkung dar (Lee et al. 1995; Arold et al. 1998). In Abbildung 6A ist die Interaktion zwischen Nef_{NL4-3} und einer modifizierten Fyn SH3-Domäne gezeigt, in der das R96 durch ein Isoleuzin, wie es in der Hck SH3-Domäne auftritt, ersetzt wurde. Neben der Salzbrücke zwischen D100 der SH3-Domäne und R77 von Nef_{NL4-3} (R81 in HIV-1_{SF2} Nef) aus dem P₇₂xxPxR-Motiv, beruht diese starke Affinität auf der Wechselwirkungen zwischen I96 in der RT-Schleife der SH3-Domäne und den Aminosäuren F90 und W113 (F94 und W117 in HIV-1_{SF2} Nef), die in einer hydrophoben Tasche zwischen den beiden antiparallelen α-Helices drei und vier von Nef liegen (Lee et al. 1996; Choi and Smithgall 2004). Desweiteren wird die PPII-Helix durch die Interaktion mit dem gefalteten Nef-Kern stabilisiert, so dass die Helix auch in Abwesenheit einer SH3-Domäne stabil ist (Grzesiek et al. 1996; Lim 1996), wohingegen PxxP-Peptide in Lösung nur teilweise in der PPII-Konformation vorliegen (Viguera et al. 1994).

In dieser Arbeit wurden mutierte Hck SH3-Domänen verwendet, die von Hiipakka *et. al.* mittels der Phage-Display Methode identifiziert wurden (Hiipakka et al. 1999; Hiipakka and Saksela 2002). Die eingeführten Mutationen ersetzen die Sequenz

um das Isoleuzin, welches mit der hydrophoben Tasche von Nef interagiert. Für die Mutante SH3_{A1} wurde die Wildtypsequenz E₉₄AIHHE zu VSWSPD und für die Mutante SH3_{B6} zu YSPFSW geändert (siehe Abbildung 6B). Es wurde berichtet, dass SH3_{A1} und SH3_{B6} eine um den Faktor 8 bzw. 30 erhöhte Affinität zu Nef_{SF2} im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Breuer 2006). Nef_{mac239} zeigt keine Bindung an die Wildtyp-Hck SH3-Domäne (SH3 (wt)), sowie an SH3_{A1} und SH3_{B6} (Hiipakka and Saksela 2002). Die Mutante SH3_E, für welche die Wildtypsequenz E₉₄AIHHE zu EGWWG mutiert wurde, bindet hingegen mit einer Affinität im niedrigen μM -Bereich an Nef_{mac239} (Hiipakka and Saksela 2002).

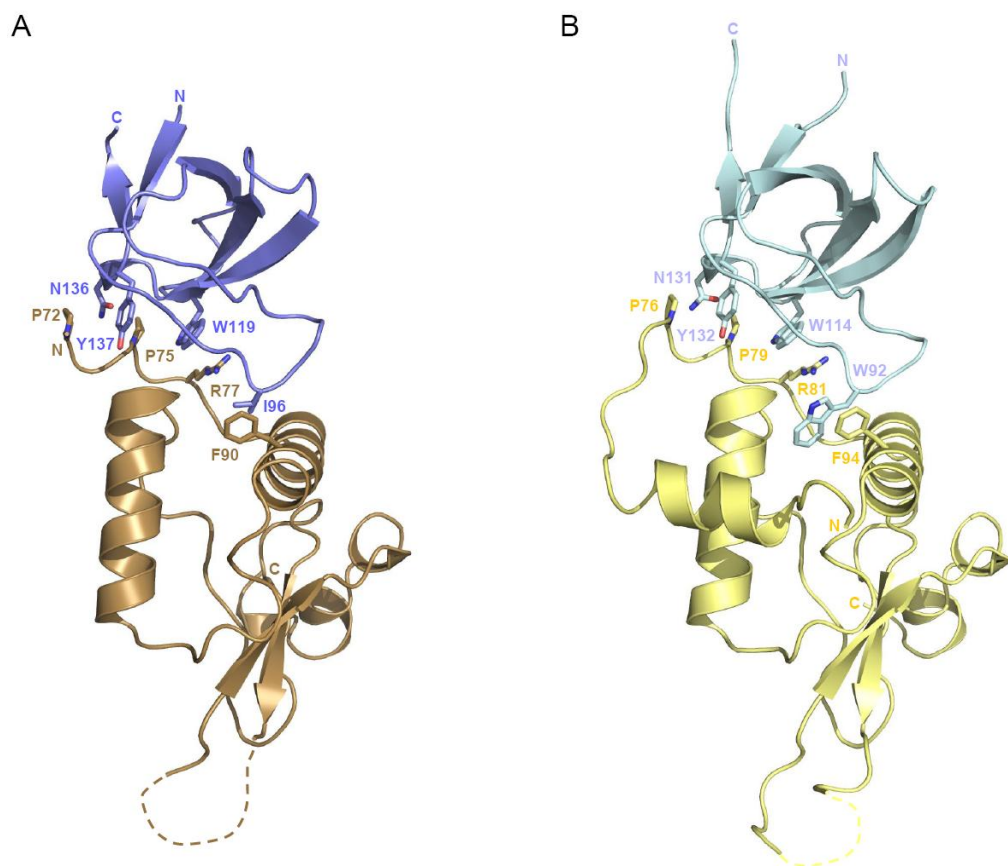


Abbildung 6: Nef/SH3-Domänen Interaktion. (A) Kristallstruktur des Komplexes aus HIV-1 Nef_{NL4-3} (beige) und der R96I Fyn SH3-Domäne (blau) (PDB: 1EFN): Das Arginin an Position 96 der SH3-Domäne wurde durch ein Isoleuzin ersetzt, wodurch die Affinität der Fyn SH3-Domäne von 20 μM auf 0,38 μM erhöht wurde. (B) Kristallstruktur des Komplexes aus HIV-1 Nef_{SF2} (gelb) und der A1 Mutante der Hck SH3-Domäne (Dr. Antje Schulte, MPI Dortmund): Die Wildtypsequenz E₉₄AIHHE wurde durch V₉₄SWSPD ersetzt, wodurch die Affinität von 1,5 μM auf 0,18 μM erhöht wurde.

Proteintransport:

Nef verringert durch Regulation des zellulären Proteintransports die Exposition von bestimmten Oberflächenrezeptoren, wie CD4 oder MHC I, an der Plasmamembran der Wirtszelle. Im Falle von CD4 bindet Nef an die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors und rekrutiert anschließend über sein Dileuzinmotiv E₁₆₄xxxLL den Adapter-Protein Komplex AP-2. Dies führt zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose des Rezeptors und zu seiner lysosomalen Degradation (Greenberg et al. 1997; Bresnahan et al. 1998; Craig et al. 1998; Greenberg et al. 1998a; Janvier et al. 2003) (siehe auch 1.2). Durch die Entfernung von CD4 von der Zelloberfläche wird die Knospung neuer Viruspartikel aus der Zelle erleichtert, da diese nicht auf die Ursprungszelle zurückbinden können. Desweiteren wird die Superinfektion einer bereits infizierten Zelle verhindert, da CD4 für den Eintritt des HI-Virus notwendig ist. Der Mechanismus der CD4 Internalisierung wird in Abschnitt 2.3.3 detailliert beschrieben.

Die Nef-abhängige Regulation des für die Antigenpräsentation wichtigen MHC I-Komplexes hingegen erfolgt nicht durch Endozytose von der Plasmamembran, sondern durch eine Unterbrechung des MHC I-Transports vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran (Greenberg et al. 1998b; Roeth et al. 2004). Die Aufgabe von MHC I ist die Präsentation von Peptidfragmenten an der Zelloberfläche. Ist die Zelle von einem Virus infiziert, werden auch Peptide (Antigene) von Virusproteinen präsentiert, die durch Zellen des Immunsystems erkannt werden und zu einer Immunantwort führen. Nef verändert den Transportweg des MHC I-Komplexes vom Golgi-Apparat: Statt zur Plasmamembran wird MHC I zum Endosomen transportiert und anschließend lysosomal abgebaut (siehe Abbildung 7).

Durch Mutationsstudien ist bekannt, dass die Nef vermittelte Repression von MHC I von den Nef-Motiven PxxP, M₂₀ und E₆₆EEE abhängt, aber nicht vom Dileuzinmotiv [E/D]xxxL[L/I], welches eigentlich für die Bindung von AP-Komplexen bekannt ist (Roeth et al. 2004). Nach dem zunächst publizierten Modell interagiert Nef über das E₆₆EEE-Motiv an das Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein-1 (PACS-1). Dieses bindet an AP-1, welches wiederum den vesikulären Transport von MHC I reguliert (Doms and Trono 2000). Neben dem E₆₆EEE-Motiv sind hierbei das P₇₆xxP-Motiv und M₂₀, eine Aminosäure in der Ankerdomäne, involviert (Blagoveshchenskaya et al. 2002; Roeth and Collins 2006). Neuere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass die MHC I-Regulierung PACS-1 unabhängig und durch eine direkte Nef/AP-1-Interaktion erfolgt (Lubben et al. 2007).

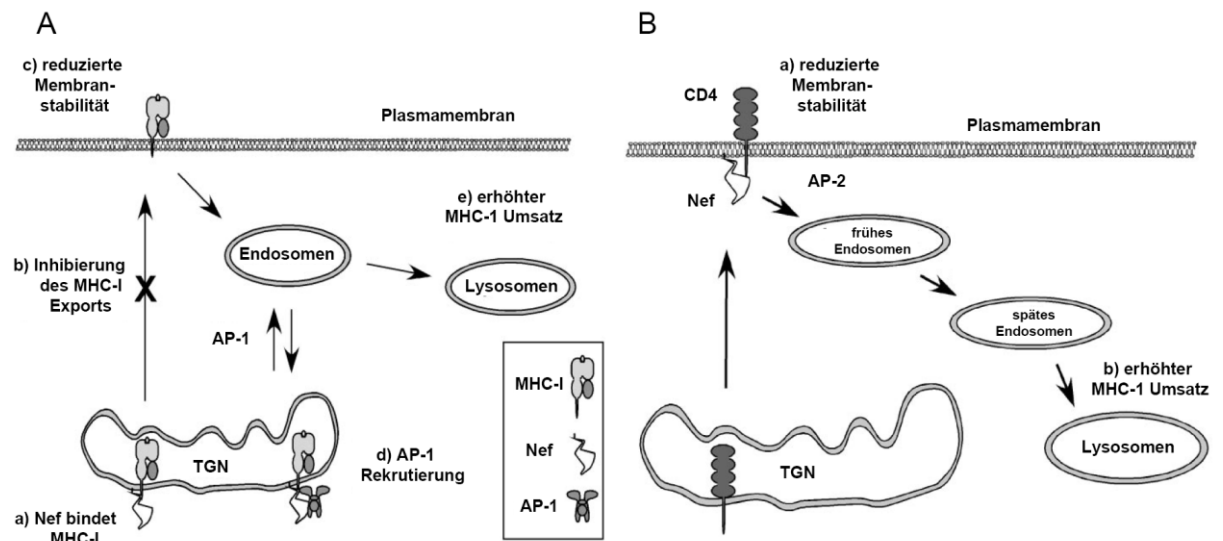


Abbildung 7: Nef-abhängige Rezeptorinternalisierung. (A) Schematische Darstellung der Nef-abhängige Depletion von MHC-I: a) Nef bindet MHC I frühzeitig im sekretorischen Weg. b) Nef inhibiert den Transport von MHC I zur Plasmamembran. c) Membranständiges MHC I kann durch Endozytose internalisiert werden. d) Nef und MHC I akkumulieren im TGN und rekrutieren AP-1 mittels eines unbekannt kooperativen Mechanismus. e) MHC I wird zum Endosomen transportiert und lysosomal degradiert. (B) Schematische Darstellung der Nef-abhängige Depletion von CD4: a) Nef bindet an CD4 und rekrutiert AP-2. Dies führt zur clathrinvermittelten Endozytose von CD4. b) CD4 wird lysosomal degradiert. (Roeth and Collins 2006).

Neben CD4 werden noch CD71 und CD72 Dileuzinmotiv-vermittelt durch Nef internalisiert. Die Regulation von CD8 und CCR5 erfolgt allerdings wie die von MHC I über das PxxP-Motiv. Für eine Übersicht der von Nef internalisierten Oberflächenrezeptoren siehe Tabelle 2. Einer der wesentlichen funktionellen Unterschiede zwischen HIV-1 Nef und den Nef-Varianten von HIV-2 sowie den meisten SIV Varianten ist, dass HIV-1 Nef nicht in der Lage ist, CD3 von der Zellmembran zu depletieren. Auf diesen Unterschied wird in Abschnitt 2.2.7 genauer eingegangen.

Tabelle 2: Übersicht über die von Nef modulierten Zelloberflächenrezeptoren.

Protein	Funktion	Nef-Motiv	Referenz
MHC-I	Antigenpräsentation	PxxP, M ₂₀ , E ₆₆ EEE	(Schwartz et al. 1996; Greenberg et al. 1998b; Lubben et al. 2007)
MHC-II	Antigenpräsentation	PxxP, ExxxLL, E ₆₆ EEE	(Torres and Johnson 1994; Stumptner-Cuvelette et al. 2001; Schindler et al. 2003)
CD1	Antigenpräsentation	PxxP, ExxxLL, E ₆₆ EEE	(Chen et al. 2006)
CD3	TCR Korezeptor	?	(Munch et al. 2002; Schaefer et al. 2002; Swigut et al. 2003)
CD4	MHC-II Korezeptor	ExxxLL	(Anderson et al. 1993; Bresnahan et al. 1998; Greenberg et al. 1998a)
CD8	MHC-I Korezeptor	PxxP	(Stove et al. 2005)
CD28	CD80 Rezeptor	?	(Swigut et al. 2001)
CD40L	CD40 Rezeptor	?	(Swingler et al. 2003)
CD71	Transferrinrezeptor	ExxxLL	(Pugliese et al. 1999)
CD74	MHCII konstante Kette	?	(Keppler et al. 2006)
CD80	Kostimulation	?	(Chaudhry et al. 2005; Chaudhry et al. 2007)
CD86	Kostimulation	?	(Chaudhry et al. 2005; Chaudhry et al. 2007)
CXCR4	Chemokinrezeptor	?	(Sloan et al. ; Venzke et al. 2006)
CCR5	Chemokinrezeptor	PxxP	(Sloan et al. ; Michel et al. 2005)

2.2.7 Strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen HIV-1, HIV-2 und SIV Nef

Die Sequenz der gefaltete Kerndomäne von HIV und SIV Nef ist relativ gut konserviert, wohingegen die flexiblen N- und C-terminalen Bereiche stärker variieren. HIV-2 und SIV Nef sind größer als HIV-1 Nef und enthalten in den terminalen Bereichen mehr Motive zur Interaktion mit anderen Proteinen. Zudem weist HIV-2 Nef eine höhere Sequenzhomologie zu SIV_{smm} Nef auf, als zu HIV-1 Nef.

Viele Funktionen wie z.B. die CD4-Internalisierung von Nef sind zwischen den verschiedenen HIV und SIV Stämmen konserviert. Der jedoch potentiell bedeutendste funktionelle Unterschied zwischen HIV-1, HIV-2 und den SIV Nefs ist die Fähigkeit, die Zelloberflächenexposition der CD3 ζ-Untereinheit des T-Zellrezeptors (TCR) zu regulieren. Die meisten SIV und HIV-2 Varianten von Nef sind in der Lage CD3 ζ von der Zellmembran zu entfernen, wohingegen HIV-1 Nef und die am nächsten verwandten

Schimpansen- und einige Meerkatzen-SIV Nefs dies nicht können (Schindler et al. 2006). Durch die Depletion der CD3 ζ -Untereinheit wird eine Aktivierung der infizierten T-Zelle durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) und der damit verbundene Mechanismus des aktivierungsinduzierten Zelltodes (*activation-induced cell death*, AICD) verhindert. HIV-1 Nef und seine SIV Gegenstücke sind hierzu nicht in der Lage und infizierte T-Zellen weisen somit eine erhöhte T-Zellaktivierung und eine verkürzte Lebensdauer auf.

Der T-Zellrezeptor:

Der T-Zellrezeptor (TCR) besteht aus einem Komplex zwischen dem α/β TCR-Heterodimer und den beiden CD3-Heterodimeren $\gamma\varepsilon$ und $\delta\varepsilon$, sowie dem CD3 $\zeta\zeta$ Homodimer (siehe Abbildung 8 A). Das TCR α/β Dimer verfügt nur über eine kleine cytoplasmatische Domäne, die keine Funktion zur Signalweiterleitung ins Zytosol aufweist. Die Signaltransduktion zwischen der extrazellulären Antigen/Rezeptor-Wechselwirkung und der T-Zell aktivierenden intrazellulären Signaltransduktions-Kaskade übernimmt die CD3 ζ -Kette.

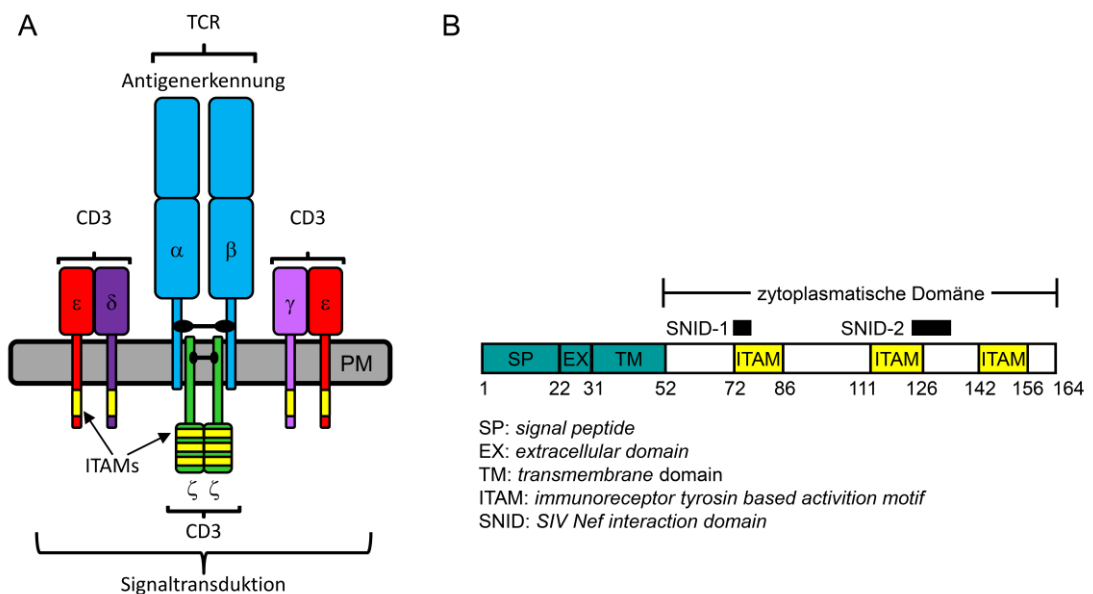


Abbildung 8: Der Aufbau des T-Zellrezeptors. (A) Aufbau des T-Zellrezeptorkomplexes an der Plasmamembran modifiziert nach (Janeway 2001). (B) Domänenarchitektur der CD3 ζ -Untereinheit modifiziert nach (Schaefer et al. 2002).

Struktur und Funktion der CD3 ζ -Untereinheit:

Das Transmembranprotein CD3 ζ besteht aus 164 AS mit einer Größe von ca. 19 kDa (siehe Abbildung 8B für eine Darstellung der Domänenarchitektur). Die Transmembranhelix erstreckt sich über die Aminosäuren 31-51. Die zytoplasmatische Domäne CD3 ζ_{cyt} umfasst die Aminosäuren 52-164. Sie ist in wässrigen Puffersystemen intrinsisch ungefaltet und beinhaltet drei ITAM Motive (*immunoreceptor tyrosin based activation motif*) mit der Konsensussequenz YxxI/Lx₆₋₈YxxI/L. Die insgesamt sechs Tyrosine dieser Motive werden, infolge einer Aktivierung des TCRs durch die Tyrosinkinase Lck, oder eine andere Kinase derselben Familie phosphoryliert. Wie dieser Mechanismus der TCR-aktivierungsabhängigen Phosphorylierung der ITAMs funktioniert ist noch nicht vollständig verstanden.

Neuste Untersuchungen zeigen, dass die ITAM Tyrosine *in vitro* in die Membran insertieren, wobei der Sekundärstrukturanteil der CD3 ζ_{cyt} -Domäne stark ansteigt (Duchardt et al. 2007). Ein entsprechendes Verhalten konnte auch für die ITAM-Motiv der CD3 ϵ -Untereinheit mittels NMR-Spektroskopie gezeigt werden (Xu et al. 2008). Insbesondere die Tyrosine in der ITAM-Sequenz dringen dabei tief in den hydrophoben Kern der Doppellipidschicht ein. Dies legt ein Modell nahe, in dem die ITAMs durch Einbettung der Tyrosine in die Membran vor der Phosphorylierung durch zytoplasmatische Kinasen geschützt sind. Eine Phosphorylierung kann erst nach Exposition der ITAM Tyrosine infolge einer aktivierungsabhängigen Konformationsänderung des TCR erfolgen.

2.3 Proteintransport in clathrinbeschichteten Vesikeln

Der Transport von Proteinen durch clathrinbeschichtete Vesikel zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten gehört zu den wichtigsten Proteintransportsystemen, sowohl im sekretorischen, als auch im endozytotischen System (Mousavi et al. 2004). Clathrin bildet dabei ein Gerüst um die Transportvesikel und ist mit diesen durch Adaptorproteine verbunden. Diese Adaptorproteine können neben Clathrin und Bestandteilen der Vesikelmembran, wie Phospholipide oder Membranproteine, auch weitere Faktoren dieses Transportsystems binden und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Transportprozesses (zur Übersicht (Owen et al. 2004; Edeling et al. 2006)).

Bei der Internalisierung von Membranrezeptoren (siehe Abbildung 9) besteht der erste Schritt in der Erkennung eines aktivierten endozytotischen Signalmotivs in der

zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors durch den AP-2 Komplex. Nachfolgend rekrutiert der AP-2 Komplex Clathrin und es kommt zu einer Quervernetzung mit anderen Rezeptor/AP-2/Clathrin-Komplexen sowie zur Rekrutierung weiterer Kofaktoren. Infolgedessen bildet sich eine clathrinbeschichtete Einstülpung (*clathrin coated pit*) in der Plasmamembran, welche durch die GTPase Dynamin von der Membran abgeschnürt wird und ein clathrinbeschichtetes Vesikel bildet (*clathrin coated vesicle, CCV*).

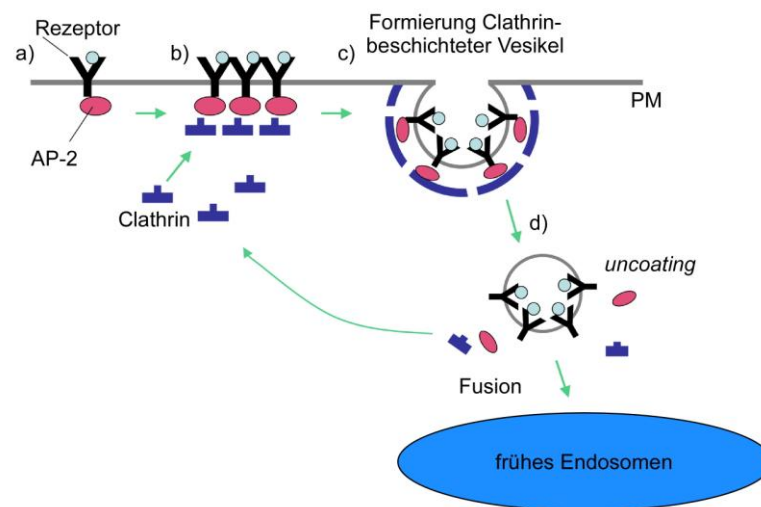


Abbildung 9: Rezeptorinternalisierung durch clathrinvermittelte Endozytose (modifiziert nach (Grant 2005)). (a) AP-2 erkennt aktivierte Internalisierungsmotive von Frachtmolekülen (Membranrezeptoren). (b) AP-2 rekrutiert Clathrin und es kommt zur Quervernetzung zwischen mehreren Fracht/AP-2/Clathrin-Komplexen. (c) Clathrin und Frachtmoleküle akkumulieren in clathrinbeschichteten Membraneinstülpungen. (d) Clathrinbeschichtete Vesikel werden internalisiert und zum Endosomen transportiert.

2.3.1 Die assembly polypeptide Komplexe

Eine eigene Klasse von Clathrin-Adaptorproteinen bildet die Familie der *assembly polypeptides* (APs). Diese heterotetrameren Adapterproteinkomplexe verbinden das Clathringestüt von clathrinbeschichteten Vesikeln mit den in der Vesikelmembran verankerten Cargo-Proteinen. Insgesamt sind vier AP-Proteine (AP-1 bis AP-4) bekannt, die alle eine ähnliche Struktur aufweisen (siehe 2.3.2). Die AP-Proteine unterscheiden sich in ihrer Verteilung in der Zelle und den Transportprozessen, die sie vermitteln (siehe Abbildung 10). AP-1, AP-3 und AP-4 sind am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) sowie an den Endosomen lokalisiert, AP-2 hingegen an der Plasmamembran.

Die Lokalisierung der AP-Proteine wird durch die Zusammensetzung der jeweiligen Membran bestimmt. AP-1 bindet Phosphoinositol-4-monophosphat (PI(4)P)

(Wang et al. 2003), das häufigste Inositol-Phosphat der TGN-Membran, während die Rekrutierung von AP-2 an die Plasmamembran durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(3,5)P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) vermittelt wird (Collins et al. 2002; Rohde et al. 2002).

Zu den Aufgaben der AP-Komplexe gehört die Sortierung der Cargo-Proteine in Transportvesikel. Die AP-Proteine erkennen drei Klassen von Sortiersignalen in den zytoplasmatischen Bereichen der Cargo-Proteine (zur Übersicht siehe (Bonifacino and Traub 2003)). Das Asn-Pro-X-Tyr Motiv, welches z.B. der Insulinrezeptor und der EGFR-Rezeptor aufweisen, wird durch AP-2 gebunden. Ein weiteres Tyrosin-basierendes Motiv, Tyr-X-X-Φ (wobei Φ eine große, hydrophobe und X eine beliebige Aminosäure ist), wird von der μ-Untereinheit aller AP-Proteine erkannt. Bei dem dritten Motiv handelt es sich um das Dileuzinmotiv [Asp/Glu]-X-X-X-Leu[Leu/Ile] ([D/E]XXXL[L/I]), welches den Transport von Proteinen zu Endosomen bzw. Lysosomen vermittelt. Die AP-Proteine 1-3 binden dieses Motiv, jedoch weisen sie unterschiedliche Affinitäten für unterschiedliche Dileuzinmotive auf (Doray et al. 2007).

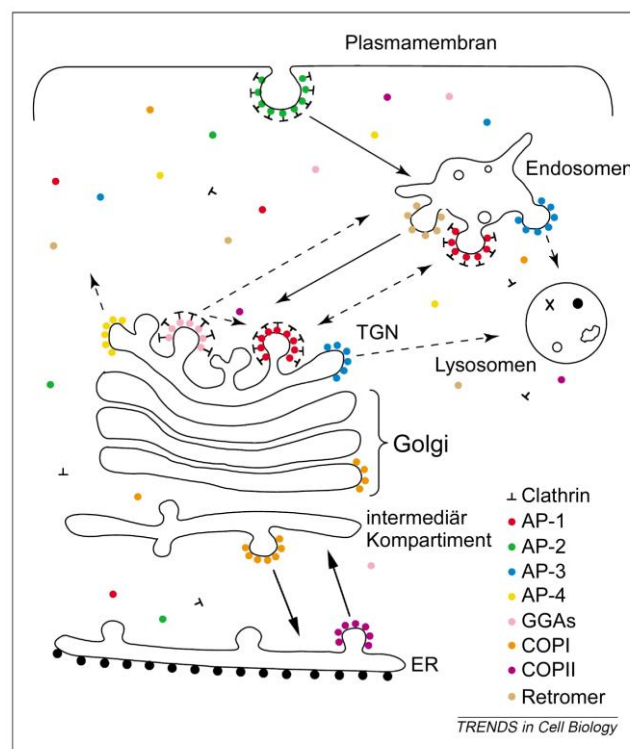


Abbildung 10: Zelluläre Proteintransportwege. Dargestellt ist die Verteilung von Hüll- und Adapterproteinen in der Zelle (verändert aus (Robinson 2004)).

2.3.2 Die Struktur der Komplexe AP-1 und AP-2

Bei den AP-Proteinen handelt es sich um heterotetramere Komplexe, bestehend aus zwei großen Untereinheiten (AP1: γ und $\beta 1$, bzw. AP2: α und $\beta 2$) mit einer Größe von 100-130 kDa, einer mittleren 50 kDa Untereinheit (μ , *medium*) und einer kleinen 17-20 kDa Untereinheit (σ , *small*) (siehe Abbildung 11). Sowohl von AP-1 als auch von AP-2 wurde die Kristallstruktur eines etwa 210 kDa großen, verkürzten Kern-Komplexes (*trunk*-Komplex) gelöst (Collins et al. 2002; Heldwein et al. 2004) (siehe Abb. 1.6). Hierfür wurden die C-terminalen *appendage*-Domänen der beiden großen Untereinheiten sowie die Linker (*hinge*), die diese mit dem restlichen Protein verbinden, entfernt.

Der *trunk*-Komplex von AP-1 bzw. AP-2 bildet eine kompakte, rechteckige Struktur von etwa 100 x 80 Å. Die Außenseiten des Rechtecks bestehen aus den N-terminalen Domänen der beiden großen Untereinheiten, die jeweils eine gebogene α -helikale Superhelix bilden. Die kleine σ -Untereinheit befindet sich im sogenannten Ellenbogen der γ - bzw. α -Untereinheit von AP-1 und AP-2. Die zur σ -Untereinheit homologe N-terminale Domäne der μ -Untereinheit (N- μ) bindet entsprechend in den Ellenbogen der jeweiligen β Untereinheit. Dieser tetramere Komplex bildet eine flache Schale auf welcher der C-terminale Teil von μ (C- μ) liegt.

Die kompakte Struktur der AP-Komplexe stellt eine inaktive Konformation dieser Adaptoren dar. Die Bindungsstelle für die Yxx Φ -Motive ist nur zugänglich wenn die μ -Untereinheit zuvor phosphoryliert wurde. Im unphosphorylierten Zustand liegt die C-terminale Domäne von μ (C- μ), welche die Yxx Φ -Bindungsstelle enthält, flach auf dem restlichen Komplex auf (siehe Abbildung 11B) und wird durch die β -Untereinheit blockiert (Owen and Evans 1998). Eine Phosphorylierung von $\mu 1$ -Thr154 in AP-1, bzw. $\mu 2$ -Thr156 in AP-2 führt vermutlich zu einer Konformationsänderung, durch die die Tyr-X-X- Φ Bindungsstelle zugänglich wird (Pauloin and Thurieau 1993; Olusanya et al. 2001; Ghosh and Kornfeld 2003). Die Phosphorylierung von $\mu 2$ -Thr156 wird durch die Kinase AAK1 (Conner and Schmid 2002; Conner et al. 2003), die von $\mu 1$ -Thr154 vermutlich durch die verwandte Kinase GAK (Auxilin2) (Umeda et al. 2000; Korolchuk and Banting 2002) vorgenommen. Die Bindung von [D/E]XXXL[L/I] Motiven hingegen ist unabhängig von der Phosphorylierung an $\mu 1$ -Thr154, bzw. $\mu 2$ -Thr156 (Honing et al. 2005).

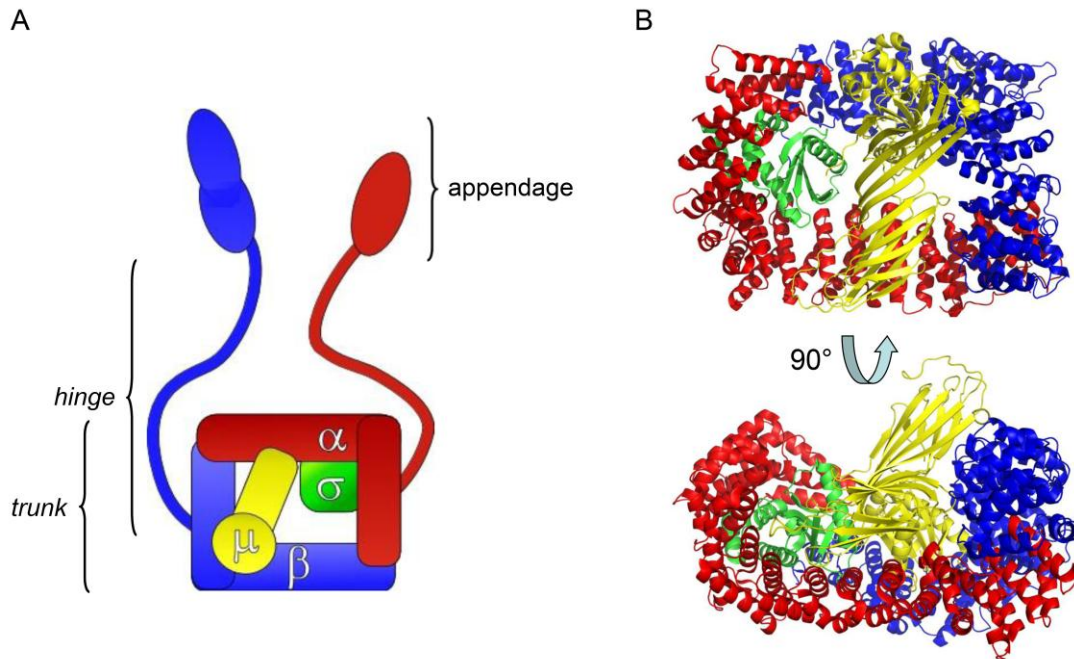


Abbildung 11: Struktur des AP-2 Adapterproteinkomplexes. (A) Schematische Darstellung des AP-2 Komplexes. (B) Kristallstruktur des AP-2 trunks: α -adaptin (rot), β -adaptin (blau), μ -adaptin (gelb) und σ -adaptin (grün). (Collins et al. 2002) (PDB: 2VGL).

2.3.3 Die Wechselwirkungen zwischen HIV-1 Nef, CD4 und AP-2.

Nef bewirkt die Internalisierung verschiedener Oberflächenrezeptoren, wie MHC I und CD4. Der Oberflächenrezeptor CD4 ist ein für die Infektion der Zelle mit dem HI-Virus notwendiger Rezeptor (siehe Abschnitt 2.2.3). Die Entfernung des CD4 Rezeptors von der Plasmamembran der infizierten Zelle ist aus mehreren Gründen vorteilhaft für die Virusreplikation: Erstens wird eine mehrfache Infektion einer bereits infizierten Zelle, eine sogenannte Superinfektion verhindert. Zweitens bildet CD4 Komplexe mit dem Env-Protein des Virus aus, was zu einer Störung des Transports beider Proteine führt. Drittens verhindert die Internalisierung die Bindung von neuen Viruspartikeln, die aus der infizierten Zelle hervorgehen.

Die Regulation des CD4 wird von den HIV-Proteinen Vpu und Nef vermittelt. Zwar hat Nef keinen Einfluss auf den Transport von CD4 zur Plasmamembran, jedoch ist die Halbwertszeit an der Membran durch Nef deutlich herabgesetzt. CD4 wird durch Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert, welche in nicht-HIV-infizierten Zellen durch Wechselwirkung von AP-2 mit dem Dileuzinmotiv in der zytoplasmatischen Domäne von CD4 eingeleitet wird. Die Bindung von AP-2 an das CD4 Dileuzinmotiv ist abhängig von der vorhergehenden Phosphorylierung des CD4. HIV Nef kann

unabhängig von der CD4 Phosphorylierung an das CD4 Dileuzinmotiv binden, sowie mit seinem eigenen, nicht phosphorylierungsabhängigen Dileuzinmotiv AP-2 rekrutieren. Dies führt zu einer verstärkten Internalisierung des CD4-Rezeptors mit anschließender lysosomaler Degradation (Bresnahan et al. 1998; Craig et al. 1998; Greenberg et al. 1998a; Janvier et al. 2003; Roeth et al. 2004).

2.3.4 Die Wechselwirkung zwischen SIV_{mac239} Nef, CD3 ζ und AP-2

HIV-1 Nef und SIV_{mac239} Nef binden über unterschiedliche Sequenzmotive an den Adaptorproteinkomplex AP-2. Die HIV-1 Nef-Sequenz beinhaltet ein Dileuzinmotiv in der flexiblen Schleife, welches AP-2 bindet. SIV_{mac239} Nef hingegen verfügt über zwei CAIDs (*constitutive high-affinity AP-2 interaction determinants*) genannte N-terminale AP-2 Bindungsdomänen (Lock et al. 1999). Bei dem N-proximalen CAID handelt es sich um ein Tyrosin-basierendes Motiv, welches an die Tyrosinmotiv-Bindungsstelle auf der μ -Untereinheit von AP-2 binden könnte. Bisher ist jedoch keine *in vivo* Funktion für dieses Motiv bekannt. Das CAID am N-Terminus umfasst kein Dileuzin- oder Tyrosin-basierendes Sortierungsmotiv und ist notwendig für die SIV_{mac239} Nef-abhängige Endozytose von CD4 und CD28 (Lock et al. 1999; Swigut et al. 2001). Swigut *et al.* haben gezeigt, dass die CD3 ζ-Internalisierung durch SIV_{mac239} Nef AP-2-abhängig erfolgt. Dabei ist die Nef/CD3 ζ-Bindung an AP-2 CAID unabhängig, stattdessen erfolgt die Bindung über einen bisher unbekannt kooperativen Mechanismus (Swigut et al. 2003).

2.4 Zielsetzung

Nach dem derzeitigen Wissensstand spielt das Nef-Protein eine herausragende Rolle in der HIV und SIV Pathogenese. Eine Vielzahl potentieller zellulärer Interaktionen wurden bis heute identifiziert und mehrere, sehr unterschiedliche Funktionen von Nef phänomenologisch beschrieben. Die am intensivsten untersuchten Funktionen von Nef sind die Modulation von Kinasen der zellulären Signaltransduktion und die Depletion von Zelloberflächenrezeptoren. Die Interaktion von Nef mit Kinasen beruht auf der Wechselwirkung der Poly-Prolin-Typ II Helix von Nef mit der SH3-Domäne der Kinasen. Auch wenn die Relevanz der Interaktion von Nef mit den einzelnen Kinasen in vielen Fällen noch unklar ist, so ist der generelle Mechanismus der Nef/SH3-Interaktion auf molekularer Ebene durch mehrere Nef/SH3-Kristallstrukturen verstanden.

Die Mechanismen der Nef-abhängigen Depletion zellulärer Oberflächenrezeptoren hingegen sind weitestgehend unverstanden. HIV-1 Nef verfügt über

mindestens zwei unterschiedliche Arten der Regulation von Membranrezeptoren. Zum einen kann Nef Rezeptoren, die sich bereits an der Zelloberfläche befinden, in Abhängigkeit von seinem Dileuzinmotiv und durch Interaktion mit dem AP-2 Komplex mittels clathrinvermittelter Endozytose internalisieren und der lysosomalen Degradation zuführen. Dieser Mechanismus findet unter anderem bei der Internalisierung von CD4 statt und verhindert die Superinfektion der Wirtszelle und erleichtert die Knospung neuer Viruspartikel aus der Zelle. Zum anderen kann Nef den Transport des MHC I Komplexes vom TGN zur Plasmamembran verhindern und stattdessen durch Interaktion mit AP-1 zum Lysosomen umleiten, wo dieser Komplex degradiert wird. Dieser Prozess dient der Immunevasion und ist unabhängig vom Nef-Dileuzinmotiv, wohingegen eine Rolle für die Aminosäuren E₆₆EEE, P₇₆xxP und M₂₀ beschrieben worden ist.

Die Depletion von CD4 und MHC-I ist eine unter den verschiedenen HIV und SIV Stämmen hoch konservierte Funktion von Nef. Die Internalisierung der CD3 ζ-Untereinheit hingegen kann von HIV-1 Nef und einigen nah verwandten SIV Stämmen nicht durchgeführt werden. Das Fehlen dieser Funktion korreliert mit einer erhöhten Aktivierung der T-Zellpopulation und einer schnelleren Progression zu AIDS und ist daher für das Verständnis der HIV Pathogenese von großer Bedeutung. Für diesen Mechanismus wurde beschrieben, dass er abhängig von der gefalteten Kernstruktur von SIV Nef ist, aber unabhängig von den Signalmotiven, die an der Rekrutierung der AP-Komplexe beteiligt sind.

Für die beschriebenen Mechanismen ist weder bekannt, wie Nef die Rezeptoren und die Proteine der Proteintransportmaschinerie bindet, noch wie und ob eine Regulation des Nef-abhängigen Proteintransport stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit sollen durch strukturelle und biochemische Studien die Nef-Rezeptor und die Nef-Adaptorproteinkomplex Interaktion sowie die molekularen Mechanismen des Nef-abhängigen Proteintransport untersucht werden. Im Einzelnen ergeben sich drei Teilprojekte:

1) Regulation der CD4 Internalisierung:

CD4 und andere Membranrezeptoren verfügen über ein Dileuzinmotiv in ihrer zytoplasmatischen Domäne. Dieses Motiv kann, nach vorheriger Phosphorylierung eines Serins N-terminal des Motivs durch den AP-2 Komplex erkannt werden. Dies führt zur Clathrin-abhängigen Endozytose des Rezeptors. Nef erkennt die Dileuzinmotive dieser Rezeptoren auch ohne vorherige Phosphorylierung und kann

mittels seines eigenen phosphorylierungsunabhängigen Dileuzinmotivs AP-2 rekrutieren und die Endozytose einleiten.

Da das Nef-Dileuzinmotiv keine Phosphorylierung voraussetzt, muss ein anderer Regulationsmechanismus existieren, der gewährleistet, dass nur Nef, welches an ein *cargo*-Protein gebunden hat, AP-2 rekrutiert und die Endozytose einleitet. Ein möglicher Regulationsmechanismus wäre, dass das Nef-Dileuzinmotiv in die Nef-Dileuzinbindungstasche bindet und erst durch die Bindung des Dileuzinmotivs eines *cargo*-Proteins, welches eine höhere Affinität zu dieser Tasche aufweist, verdrängt wird. Ein solcher Mechanismus würde einer Autoregulation entsprechen. Ein derart autoinhibiertes Nef wäre sowohl durch eine Bindung *in cis*, also durch die Bindung des Dileuzinmotivs eines Nefs in die Bindungstasche des selben Moleküls, als auch *in trans*, also durch die wechselseitige Bindung der Dileuzinmotive zweier Nef-Moleküle in die Dileuzinbindungstasche des jeweils anderen Nef-Moleküls, denkbar.

Durch Mutationsstudien ist bekannt, dass sich die Nef-Dileuzinbindungstasche in einem hydrophoben Bereich zwischen den Nef-Helices drei und vier befindet, jedoch geben diese Untersuchungen ein sehr heterogenes Bild dieser Interaktion ab. Die genaue Position ist Mangels struktureller Daten zu dieser Interaktion nicht bekannt. Eine dieser Arbeit vorangegangene strukturbiologische Untersuchung eines Nef/SH3-Komplexes (nicht veröffentlichte Daten) durch Dr. Antje Schulte (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) ergab einen Ausgangspunkt für die Identifizierung einer autoinhibierten Nef-Form. In der durch Dr. Schulte gelösten Kristallstruktur waren erstmals Teile der flexiblen Schleife des Nef-Proteins sichtbar, dabei bestand die asymmetrische Einheit des Kristalls aus einem Nef-Dimer. Die Dimerisierung erfolgte dergestalt, dass der sichtbare Teil der flexiblen Schleife eines Nef-Moleküls in der hydrophoben Tasche des zweiten Nefs lag und umgekehrt. Das an der Spitze der flexiblen Schleife befindliche Dileuzinmotiv war in dieser Struktur jedoch nicht in der Elektronendichte sichtbar.

Im Rahmen dieser Arbeit soll, ausgehend von den durch Dr. Schulte gefundenen Kristallisationsbedingungen, eine weitere Nef-Kristallstruktur des beschriebenen Nef-Homodimers gelöst werden, welche die flexible Schleife, einschließlich des Dileuzinmotivs enthält. Aus dieser Struktur sollen Nef-Mutanten abgeleitet werden, mit denen durch biochemische Experimente das Model eines autoinhibierten Nef überprüft werden kann.

2) CD3 ζ -Depletion durch SIV Nef:

Die meisten Funktionen von Nef, wie z.B. die Depletion von CD4, MHC I und CD28 oder die Modulation zellulärer Kinasen sind zwischen den verschiedenen Lentiviren der Primaten konserviert. Ein bemerkenswerter Unterschied stellt die Internalisierung der CD3 ζ -Untereinheit des T-Zellrezeptorkomplexes dar. HIV-1 Nef und einige nahe verwandte SIV-Stämme sind nicht in der Lage dieses Protein zu internalisieren, wohingegen HIV-2 Nef und andere SIV-Stämme über diese Funktion verfügen. Schindler *et al.* haben 2006 gezeigt, dass eine Korrelation zwischen dem Verlust dieser Nef-Funktion und der Pathogenität des Virus besteht (Schindler et al. 2006). Wird die CD3 ζ -Untereinheit nicht von der Zelloberfläche einer infizierten Zelle entfernt, kommt es zu einer erhöhten Aktivierung der betroffenen T-Zellen und somit zu einer verringerten Lebensdauer der T-Zellen bei gleichzeitig erhöhter Virusproduktion. Dies führt zu einer schnelleren Depletion der CD4-positiven T-Zell-Population und somit zur Immundefizienz.

Durch Mutationsstudien konnten die für die Bindung an SIV Nef wichtigen SNIDs genannten Bereiche in der CD3 ζ -Sequenz identifiziert werden (Schaefer et al. 2000). Desweiteren wurde gezeigt, dass die CD3-Internalisierung von der gefalteten Kerndomäne von Nef abhängt, jedoch nicht von den in den flexiblen Bereichen von Nef gelegenen Tyrosin- oder Dileuzin-basierenden Endozytosemotiven, welche eine Interaktion mit den AP-Komplexen vermitteln könnten (Schaefer et al. 2002; Swigut et al. 2003). Um diesen für die Pathogenese der Lentiviren wichtigen Unterschied zwischen HIV und SIV Nef zu erklären, soll im Rahmen dieser Arbeit eine Kristallstruktur von SIV Nef im Komplex mit der zytoplasmatischen Domäne der CD3 ζ -Untereinheit oder mit Peptiden, welche die SNID Motive enthalten, bestimmt werden. Darauf aufbauend soll untersucht werden, wie die Rekrutierung von AP-2 durch den Nef/CD3 ζ -Komplex erfolgt.

3) Erkennung des Nef-Dileuzinmotivs durch die AP-Komplexe:

Das Dileuzinmotiv E[D]xxxL[L/I] gehört zu den wichtigsten Signalmotiven des zellulären Proteintransports. Es vermittelt die Endozytose einer Vielzahl von Membranrezeptoren durch clathrinvermittelte Endozytose. Erkannt wird das Dileuzinmotiv nach vorheriger Phosphorylierung eines Serins durch die AP-Komplexe. Zu Beginn dieser Arbeit war die Position der Dileuzinbindungstasche der AP-Komplexe umstritten. In der Literatur finden sich Studien welche die Dileuzinbindungsstelle auf der β Untereinheit (Greenberg et al. 1998a; Rapoport et al. 1998; Geyer et al. 2002;

Schmidt et al. 2006), auf der μ Untereinheit (Rodionov and Bakke 1998; Hofmann et al. 1999; Craig et al. 2000; Rodionov et al. 2002), auf der $\alpha(\gamma)$ Untereinheit, bzw. auf dem $\alpha(\gamma)/\sigma$ Hemikomplex (Janvier et al. 2003; Coleman et al. 2005; Theos et al. 2005; Coleman et al. 2006; Doray et al. 2007) lokalisiert haben. Diese Daten beruhen auf Hefe-2-Hybrid und Kopräzipitationsexperimenten einzelner Untereinheiten, bzw. der Hemikomplexe $\alpha(\gamma)/\sigma$ und β/μ der AP-Komplexe an das Nef-Protein, oder an Peptide, welche ein Dileuzinmotiv aufweisen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es die Dileuzinbindungsstelle der AP-Komplexe durch Kokristallisation mit Nef oder einem Dileuzinmotiv enthaltenden Peptid eindeutig zu bestimmen. Falls Nef in Abwesenheit eines *cargo*-Proteins in einer autoinhibierten Form vorliegt, müsste zudem ein Weg gefunden werden, ein konstitutiv aktives Nef herzustellen, um eine Nef/AP-Interaktion zu ermöglichen. Während der Durchführung dieser Studie wurde durch Kelly *et al.* eine Kristallstruktur von AP-2 im Komplex mit einem Dileuzinpeptid veröffentlicht (Kelly et al. 2008), mit der gezeigt werden konnte, dass die AP Dileuzinbindungsstelle auf der σ Untereinheit liegt. Dennoch wäre eine Kristallstruktur des Nef/AP-Komplexes weiterhin von hohem Interesse, um zu erklären, warum das Nef-Dileuzinmotiv Phosphorylierungsunabhängig ist und ob weitere Nef/AP-Bindungs determinanten außer dem Dileuzinmotiv existieren, die die Interaktion verstärken könnten.

3 Material und Methoden

Um eine wiederholte Nennung zu vermeiden sind im Folgenden die Firmensitze der Herstellerfirmen der verwendeten Materialien und Geräte aufgeführt:

AppliChem (Darmstadt), Bandelin (Berlin), Beckmann (Fullerton, USA), Bendor und Hobein (Bruchsal), Biorad (München), Biosynthan (Berlin), Branson (Danbury, USA), Corning Life Sciences (Lowell, USA), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf), FMC Bioproducts (Vallensbaek Strand, Dänemark), GE Healthcare (Freiburg), Gerbu (Gaiberg), Haraeus Instruments (Hanau), Heidolph (Schwabach), Hewlett Packard (Wilmington, USA), Hybaid (Franklin, USA), H+P Labortechnik (Oberschleissheim), Invitrogen (Karlsruhe), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Knick (Berlin), Jena Bioscience (Jena), Merck (Darmstadt), Mettler (Giessen), Microcal (Northampton U.K.), Microfluidics Corporation (Newton, USA), Millipore Amicon (Witten), Neolab (Heidelberg), New Brunswick Scientific (New York, USA), New England Biolabs (Ipswich, USA), Peqlab (Erlangen), Promochem (Wesel), Peter Oehmen (Essen), Qiagen (Hilden), Riedel de Haën (Seelze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht), Sartorius (Aubagne, France), Schott (Mainz), Serva (Heidelberg), Spectrumlabs (Rancho Dominguez, USA), Sigma Aldrich (München), Techne (Jahnsdorf), Tip Labtech (Royston, UK), Waters (Milford, USA).

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien für Biochemie und Molekularbiologie

Chemikalie	Hersteller
2-Mercapthoethanol	Serva
Acetonitril	Promochem
Acrylamid 30%	AppliChem
Acrylamid 40%	Roth
Agar	Serva
Agarose	FMC Bioproducts
Ampicillin	Gerbu
APS	Serva
Bromphenolblau	Sigma
CHAPS	Roth
Chloramphenicol	Gerbu
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva
DTE	Gerbu
EDTA	Gerbu

Chemikalie	Hersteller
Essigsäure	J.T. Baker
Etidiumbromid	Sigma
Ethanol abs	J.T. Baker
Glycerin	Gerbu
Glycin	Roth
Guanidinium Hydrochlorid	Roth
HCl (1 mol/l)	J.T. Baker
Hepes	Gerbu
Imidazol	Merck
IPTG	AppliChem
Kanamycin	Gerbu
KCl	J.T. Baker
Lactose	Roth
LiCl	Roth
MgCl ₂	J.T. Baker
NaAc	J.T. Baker
NaCl	Fluka
NaOH (2 mol/l)	J.T. Baker
NiSO ₄	Riedel de Haën
PMSF	Serva
SDS	Gerbu
Streptomycinsulfat	Sigma
TCEP	Sigma
TEMED	Roth
Tris	Roth
K ₂ HPO ₄	AppliChem
KH ₂ PO ₄	J.T. Baker

3.1.2 Chemikalien für die Proteinkristallisation

Für die Proteinkristallisation wurden folgende Hochdurchsatzscreens der Firma Qiagen verwendet: AmSO₄, anions, cations, classics, classics II, classics lite, ComPas, JCSG+, JCSG core I-IV; PEG, PEGII, Mbclass, Mbclass II, PACT, pHClear, Protein Complex. Zudem wurde der Additive HT Screen der Firma Hampton Research verwendet.

Für die Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden ausschließlich Chemikalien der Firma Fluka in der höchsten Reinheitsstufe verwendet.

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Big-Dye Terminator Reaction mix	hausinterne Herstellung
Bradford Assay	Biorad
Dialysemembran (MWCO 1 kDa)	Spectrumlabs
Dialysemembran (MWCO 3,5 kDa)	Spectrumlabs
Dialysemembran (MWCO 6-8 kDa)	Spectrumlabs
Dialysemembran (MWCO 12-14 kDa)	Roth
Küvetten	Sarstedt
Kristallisationsplatten 96fach	Corning Life Sciences
Kristallisationsplatten 24fach (Linbro)	Jena Bioscience
Ligationspuffer	New England Biolabs
PCR-Puffer	Roche
Pipettenspitzen (0,1 - 10 µl; 2 - 200 µl; 100 - 1000 µl)	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf
Restriktionspuffer	New England Biolabs
Sequenzierungspuffer	hausinterne Herstellung
Ultrakonzentrationseinheiten 5, 10 und 30 kDa	Millipore Amicon

3.1.4 Molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Midiprep Kit	Qiagen

3.1.5 Säulenmaterialien

Säulenmaterial / Säule	Hersteller
Ni-NTA Agarose/Superflow	Qiagen
Glutathion Sepharose 4B Fast flow	GE Healthcare
Gelfiltrationssäule, 10/300 GL Superdex 75	GE Healthcare
Gelfiltrationssäule, 10/300 GL Superdex 200	GE Healthcare
Gelfiltrationssäule, HiLoad 16/60 Superdex 75	GE Healthcare
Gelfiltrationssäule, HiLoad 16/60 Superdex 200	GE Healthcare

3.1.6 Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller
BamH1	20.000 U/ml	New England Biolabs
EcoRI	20.000 U/ml	New England Biolabs
NcoI	10.000 U/ml	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	40.000 U/ml	New England Biolabs
Taq Expand High Fidelity DNA Polymerase	3.500 U/ml	Roche
TEV-Protease	5,1 mg/ml	interne Herstellung

3.1.7 Nukleinsäuren

Vektoren:

Vektor	Resistenz	Hersteller
pET Duet	Ampicillin	Merck
pACYC Duet	Chloramphenicol	Merck
pRSF Duet	Kanamycin	Merck
pCDF Duet	Streptomycin	Merck
pCOLA Duet	Kanamycin	Merck
pET23d	Ampicillin	Merck
pET30	Kanamycin	Merck
pProEX Hta	Ampicillin	Invitrogen
pGEX-4T1	Ampicillin	GE Healthcare

Primer:

Die für die Klonierungen benötigten Primer wurden von der Firma Metabion bezogen. Eine Auflistung der verwendeten Primer befindet sich im Anhang.

Plasmide:

Eine Auflistung der für diese Arbeit hergestellten Plasmide befindet sich im Anhang.

3.1.8 Mikroorganismen

Name	Hersteller	Genotyp
DH5 α		<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>
BL21(DE3)		<i>E. coli B dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) gal</i> , enthält λ DE3 Phagen
BL21(DE3)–R3/Rosetta	Structural Genomics Consortium	BL21(DE3) Derivat mit zusätzlichem pRARE Plasmid, welches für in <i>E. coli</i> seltene tRNAs codiert

3.1.9 Peptide

Name	Aminosäuresequenz	Hersteller
CD3 ζ SNID1	QLYNELNLGR	Biosynthan
CD3 ζ SNID2k	EAYSEIGMKG	Biosynthan
CD3 ζ SNID11	EAYSEIGMKGERRRG	Biosynthan

3.1.10 Nährmedien und Zusätze für prokaryotische Zellkultur

Die Nährmedien wurden in der zentralen Einrichtung Biotechnologie des MPI für molekulare Physiologie hergestellt.

LB-Medium	TB-Medium
10 g/l Bactotrypton	12 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt	24 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl	4 ml/l Glycerin
5 mM NaOH	nach Autoklavieren Zugabe von:
	100 ml/l 0,72 M KH ₂ PO ₄
	100 ml/l 0,71 M K ₂ HPO ₄

Antibiotika:

Ampicillin (Serva), Streptomycin (Gibco), Kanamycin (Serva), Chloramphenicol (Gerbu).

3.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer, DNA-SUB-Cell	Biorad
Autoklav, Varioclav	H+P Labortechnik
Brutschrank, CO ₂ Auto zero	Haraeus Instruments
Detektor, 490 E	Waters
Elektroporationsgerät, Gene Pulser	Biorad
Erlenmeyerkolben, 500 ml bzw. 5 l	Schott
ESI-Massenspektrometer Agilent 1100	Hewlett Packard
FPLC-Anlage Äkta prime	GE Healthcare
Geldokumentation	Peqlab
Heizblock DRI-BLOCK DB2A	Techne
HPLC-Anlage, 650 E	Waters
Inkubator, Incubator shaker innova 4000	New Brunswick Scientific
Magnetrührer, MR 2000	Heidolph
Microkalorimeter, VP-ITC	Microcal
Mikrokalorimeter: ITC200	Microcal
Mikroskop, Axiolab	Carl Zeiss
Mikrofluidizer, Modell 100S	Microfluidics Corporation
PCR Express-Gerät	Hybaid
pH-Meter, 766 Calimetric	Knick
Photometer, Biophotometer 1101 M	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf
Pipettierroboter, Mosquito Crystal	Tip Labtech
Reinstwasseranlage, Milli-Q Plus	Millipore
Rotor LJA 8.1000	Beckmann
Rotor JA17	Beckmann
Schreiber, REC 112	GE Healthcare
Schüttler, controlles environment incubator shaker	New Brunswick Scientific
SDS Gel system, Mini protean III Electrophoresis System	Biorad
Stromquelle, PowerPac 300	Biorad
Taumelrollenmischer	Neolab
Tischzentrifuge, 5415C	Eppendorf
Ultraschallbad, Sonorex Super RK 103H	Bandelin
Ultraschallgerät, Sonifier W-250	Branson
Vortexer, Vortex Genie2	Bender und Hobein
Waage, BP 110 S	Sartorius

Gerät	Hersteller
Waage, PC 440 Delta Range	Mettler
Wipptisch, Rocky	Peter Oehmen
Avanti TM J-20 XP Zentrifuge	Beckmann
Zentrifuge, JS-HS centrifuge	Beckmann

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation und Mutagenese von DNA-Konstrukten, sowie zur Herstellung von verkürzten DNA-Fragmenten, wurde die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt. Hierbei synthetisiert die DNA-Polymerase einen DNA-Doppelstrang aus einem DNA-Einzelstrang beginnend von einem zum Einzelstrang komplementären DNA-Oligomer (Primer). Je nach Wahl der Primer erhält man DNA-Fragmente bestimmter Länge. Ein PCR Zyklus umfasst dabei mehrere Schritte. Im ersten Schritt wird die DNA stark erhitzt, so dass es zur Trennung der doppelsträngigen Bereiche kommt. Im zweiten Schritt wird die Temperatur soweit abgesenkt, dass die Primer an die einzelsträngige DNA binden können (Hybridisierung). Im dritten Schritt, dem Elongationsschritt, vervollständigt die DNA-Polymerase beginnend vom Primer den Doppelstrang. Eine vollständige PCR umfasst 15-25 Wiederholungen des Zyklus.

PCR-Ansatz		PCR-Programm	Temperatur	Dauer
33 µl	Wasser	Vorlauf	95°C	120 s
10 µl	5x Puffer	1. Schritt	95°C	15 s
4 µl	2,5 nM dNTPs	2. Schritt	56°C	30 s
1 µl	200 ng/µl DNA-Matrize	3. Schritt	72°C	45-60 s
1 µl	10 pmol/µl 5'-Primer	Schritte 1-3 werden 15-25mal wiederholt		
1 µl	10 pmol/µl 3'-Primer	Elongation	72°C	7 min
0,5 µl	Polymerase (5000 U/ml)	Ende	4°C	

3.3.2 Mega-Primer Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen wurde die Mega-Primer Methode verwendet. In diesem Verfahren werden in einer ersten PCR in zwei getrennten Reaktionsansätzen

zwei große Oligonukleotide (Mega-Primer) hergestellt. Der erste Mega-Primer (N-terminales Fragment) codiert hierbei vom Beginn der DNA-Matrize bis zur Mutation, der zweite Mega-Primer (C-terminales Fragment) von der Mutation bis zum Ende der DNA-Matrize. Der *reverse*-Primer des ersten Ansatzes und der *forward*-Primer des zweiten Ansatzes beinhalten hierbei die veränderte Basensequenz. Die Mega-Primer enthalten beide die gewünschte Mutation und sind an der Mutationsstelle komplementär zueinander. Daher können sie miteinander hybridisieren und werden in der zweiten PCR als DNA-Matrize verwendet. Der *forward*-Primer des ersten Mega-Primers und der *reverse*-Primer des zweiten Mega-Primers aus der ersten PCR dienen in dieser Reaktion zusätzlich als Primer.

PCR-Ansatz		PCR-Programm	Temperatur	Dauer
30 µl	Wasser	1. Schritt	95°C	120 s
10 µl	5x Puffer	2. Schritt	95°C	15 s
4 µl	2,5 nM dNTPs	3. Schritt	56°C	30-120 s
2 µl	N-term. Fragment	4. Schritt	72°C	45-60 s
2 µl	C-term Fragment	Schritte 2-4 werden 15-25 mal wiederholt		
1 µl	10 pmol/µl 5'-Primer	Elongation	72°C	7 min
1 µl	10 pmol/µl 3'-Primer	Ende	4°C	
0,7 µl	Polymerase (5000 U/ml)			

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung und Isolierung von DNA-Fragmenten nach PCR-Amplifikation oder Restriktionsverdau wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Das Phosphatrückgrat von DNA-Molekülen ist negativ geladen, die Anzahl der Ladungen eines DNA-Moleküls hängt von der Länge des Moleküls ab. Somit bewegen sich DNA-Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Länge unterschiedlich schnell durch ein Agarosegel, wenn eine Spannung angelegt wird und können nach ihrer Größe getrennt werden. Es wurde das horizontale Gelsystem der Firma Biorad und, je nach Größe des DNA-Fragments, 0,9 - 1,5%ige Agarosegele verwendet. Die DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit 6x Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 130 V für 45-60 min in TBE-Puffer. Zur Zuordnung der Größe der untersuchten Fragmente wurden die Größenstandards 1 kB und 0,1 kB der Firma Invitrogen verwendet. Durch Versetzen des TBE-Puffers mit dem Interkalator Ethidiumbromid sind die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar.

10x TBE		6x Probenpuffer	
108 g/l	Tris	10%	Ficoll
55 g/l	Borsäure	0,025%	Bromphenolblau
3,35 g/l	EDTA	0,025%	Xylencyanol
60 µl	Ethidiumbromid		
	ad 1L Wasser		in TBE-Puffer

3.3.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus den Agarosegelen extrahiert.

3.3.5 Restriktionsverdau

Durch Restriktionsenzyme können DNA-Fragmente an für die Restriktionsenzyme spezifischen Sequenzen geschnitten werden. Die Restriktion erfolgte unter Verwendung des vom Hersteller der Enzyme mitgelieferten Puffers, bei 37°C für 2 Stunden (analytischer Ansatz) bzw. über Nacht (präparativer Ansatz). Die durch die Restriktion entstandenen DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese getrennt (siehe Abschnitt 2.9.3).

präparativer Ansatz		analytischer Ansatz	
32 µl	PCR-Fragment	3 µl	PCR-Fragment
4 µl	10x Puffer	1 µl	10x Puffer
1,5 µl	Enzym A	0,5 µl	Enzym A
1,5 µl	Enzym B	0,5 µl	Enzym B
		5 µl	Wasser

3.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor

Nach der Restriktion eines DNA-Fragments kann dieses mittels des Enzyms DNA-Ligase in einen Vektor, welcher mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert werden. Hierbei werden die freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden kovalent miteinander verknüpft. Die Ligationsansätze wurden für 5 Stunden bei 20°C inkubiert.

Ligationsansatz		10x Ligationspuffer	
1 µl	T4-Ligase	500 mM	Tris-HCl
2 µl	10x Ligationspuffer	100 mM	MgCl ₂
8 µl	Insert	10 mM	ATP
1 µl	Vektor	100 mM	Dithiothreitol
8 µl	Wasser		

3.3.7 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen

Viele Bakterien sind in der Lage, mit geringer Effizienz genetisches Material aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Die im Folgenden beschriebenen Verfahren erhöhen die Fähigkeit der Zellen, DNA aufzunehmen. Der Begriff der Kompetenz bezieht sich dabei auf die Fähigkeit von Bakterien, DNA durch Transformation aufzunehmen.

Herstellung von hitzekompetenten *E. coli*-Zellen:

Eine Vorkultur wurde durch Inokulation von 2 ml LB-Medium mit Bakterien aus einer Glycerindauerkultur bzw. von einer Transformationsplatte angesetzt. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Mit 1 ml der Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 in einem Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden die Zellen 20 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend mit 5000x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml kaltem (4°C) TSS-Puffer resuspendiert, mit 1,5 ml sterilem Glycerin versetzt und in Aliquots von 200 µl aufgeteilt. Die kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TSS-Puffer	
10%	PEG8000
5%	DMSO
50 mM	MgCl ₂
	in LB-Medium ohne NaOH, pH 6,5

Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen:

Eine Vorkultur wurde durch Inokulation von 3 ml LB-Medium mit Bakterien aus einer Glycerindauerkultur bzw. von einer Transformationsplatte angesetzt. Abhängig davon,

ob die Zellen, aus denen die kompetenten Zellen hergestellt werden sollten, bereits Plasmide enthielten, wurden Antibiotika, entsprechend den auf den Plasmiden codierten Resistenzgenen, zugesetzt. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Mit der Vorkultur wurden anschließend 500 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 in einem Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden die Zellen 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation sedimentiert. Das Zellpellet wurde nacheinander mit 400 und 200 ml kalten, sterilen 5 %igem Glycerin und schließlich einmal mit 20 ml kalten, sterilen 20 %igem Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde abschließend in 2,5 ml kaltem, sterilem 20 %igem Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 80 µl aufgeteilt. Die kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Vervielfältigung von Plasmiden bzw. zur Expression der auf den Plasmiden kodierten Gene müssen diese durch Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen eingebracht werden. Für die Vervielfältigung von Plasmiden wurden die *E. coli*-Stämme TG-1 und DH5α eingesetzt, für die Proteinexpression wurde der BL21(DE3)-Stamm verwendet.

Hitzetransformation:

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen mit einem Plasmid wurde die Hitzeschocktransformation eingesetzt. Hierbei wird eine Aufnahme der DNA in die Zelle durch eine kurzzeitige Permeabilisierung der Zellmembran durch einen schnellen Temperaturwechsel herbeigeführt. Es wurden entweder 20 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl 0,1 mM Plasmid-DNA in 250 µl hitzekompetente Zellen gegeben und diese für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30-60 Sekunden, anschließend wurden die Zellen sofort wieder auf Eis inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden dann auf einer Festagarplatte mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Elektrotransformation:

Für die Co-Expression von Proteinen müssen gegebenenfalls mehrere Plasmide in eine Zelle transformiert werden, hierfür wurden elektrokompente BL21(DE3) Zellen mit zwei verschiedenen Plasmiden durch Elektroporation kotransformiert. Hierbei wird die Zellmembran der Bakterien durch einen Elektroschock kurzzeitig permeabilisiert. Zu 80 μ l elektrokompenten Zellen wurde je 1 μ l der zu transformierenden Plasmide (0,1 mM) gegeben. Die Transformation erfolgte mit einem Elektrodenabstand von 2 mm bei einem Puls von 1,5 kV, 25 μ F und einer Zeitkonstante von 10 s durch einen GenePulser (Bio-Rad, München). Direkt nach dem Elektroschock wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und 45-60 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Festagarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.4.2 Herstellung von Glycerindauerkulturen

Die Herstellung erfolgt durch Versetzen von 1,2 ml Zellkultur (OD = 0,6) mit 800 μ l Glycerin. Die Ansätze wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.3 Amplifikation von Plasmiden in *E. coli*-Zellen

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden diese nach Ligation in *E. coli*-Zellen der Stämme TG-1 oder DH5 α durch Hitzetransformation eingebracht.

3.4.4 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*-Zellen

Zur Isolierung von Plasmiden wurde das QIAquick Spin Miniprep bzw. QIAquick Midiprep Kit (Qiagen, Hilden), gemäß den Herstellerangaben verwendet.

3.4.5 Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*-Zellen

Die Überexpression von Proteinen erfolgte in BL21(DE3) oder BL21(DE3)-R3/Rosetta Zellen. Eine Vorkultur wurde durch Inokulation von LB-Medium, welches mit den entsprechenden Antibiotika versetzt war, mit *E. coli*-Zellen aus einer Glycerindauerkultur oder von einer Transformationsplatte hergestellt. Diese Vorkultur wurde anschließend über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Hauptkultur wurde durch eine hundertfache Verdünnung der Vorkultur in LB-Medium hergestellt. Hieraus ergab sich eine OD₆₀₀ der Hauptkultur von ca. 0,05. Die Hauptkultur

wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0,1-0,3 mM IPTG. Nach der Induktion wurde die Hauptkultur für weitere 5 Stunden bei 30°C, oder über Nacht (17 Stunden) bei 22°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Sedimentation der Zellen mittels Zentrifugation bei 10.000x g für 15 min. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert, um das verbliebene LB-Medium zu entfernen. Die pelletierten Zellen wurden entweder zur anschließenden Isolierung des exprimierten Proteins aufgeschlossen, oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.6 Isolierung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli*-Zellen

Zur Reinigung der in *E. coli* überexprimierten Proteinen wurde zunächst das Zellpellet in Puffer A resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellen im Mikrofluidizer. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 30.000x g für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde auf eine 25 ml mit Puffer A äquilibrierte Affinitätschromatographiesäule (GSH bzw. Ni²⁺-NTA) gegeben. Anschließend wurde die Säule mit dem zehnfachen Säulenvolumen an Puffer A gewaschen. Im Falle einer GSH-Affinitätschromatographie wurde zusätzlich mit zwei Säulenvolumen eines Waschpuffers gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten an Puffer B in 3 ml Fraktionen. Sofern nicht anders angegeben wurden folgende Puffer verwendet:

	Puffer A	Waschpuffer	Puffer B
GSH-Säule	20 mM Hepes pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM TCEP	20 mM Hepes pH 8,0 1 M NaCl 1 mM TCEP	20 mM Hepes pH 8,0 100 mM NaCl 10 mM Glutathion 1 mM TCEP
Ni²⁺-NTA-Säule	20 mM Hepes pH 8,0 500 mM NaCl 30 mM Imidazol 1 mM TCEP		20 mM Hepes pH 8,0 100 mM NaCl 300 mM Imidazol 1 mM TCEP

In weiteren Reinigungsschritten wurde ggf. der Affinitäts-Anker durch Inkubation (12 h, 4°C) des Fusionsproteins mit der TEV-Protease abgespalten und eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Hierfür wurde, sofern nicht anders angegeben, 20 mM Hepes pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP als Laufpuffer verwendet.

3.4.7 Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli [53] durchgeführt. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zur Entfaltung von Proteinen und zum Zerfall von Proteinkomplexen in die einzelnen Untereinheiten. Die Anlagerung von SDS an das Protein versieht dieses zudem mit einer negativen Ladung, die die Eigenladung des Proteins effektiv überdeckt. Vertikale Gele (Mini Protean III Electrophoresis System, Biorad) bestanden aus einem 5%igen Sammelgel und einem 15%, 18% oder 20%igen Trenngel. Die Laufstrecke betrug 9 cm, wobei die Laufstrecke des Trenngels 6 cm ausmachte. Die Dicke der Gele betrug 0,75 mm. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2x Probenpuffer versehen und für 5 Minuten bei 95°C zusätzlich denaturiert. Die Elektrophorese fand in 1x Laufpuffer bei 200 V für 60 Minuten statt.

Laufpuffer		2x SDS-Auftragspuffer	
0,025 M	Tris/HCl, pH 8,3	62,5 mM	Tris/HCl, pH 6,8
0,2 M	Glycin	25% (v/v)	Glycerin
0,1% (v/v)	SDS	10% (v/v)	SDS
		25%	Bromphenolblau
		10%	β-Mercaptoethanol

	Sammelgel	Trenngel 15%	Trenngel 20%
PAA (37%, 5:1)	0,9 ml	7,5 ml	10 ml
Sammelgelpuffer	0,7 ml		
Trenngelpuffer		3,9 ml	3,9 ml
10% SDS	53 µl	157 µl	157 µl
Wasser ad	3,6 ml	3,6 ml	1,1 ml
TEMED	5,3 µl	4,7 µl	4,7 µl
10% (w/v) APS	53 µl	157 µl	157 µl

Sammelgelpuffer		Trenngelpuffer	
0,5 M	Tris, pH 6,8	1,5 M	Tris, pH 8,8
0,4% (w/v)	SDS	0,4% (w/v)	SDS

3.4.8 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden in einer Färbelösung (10% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) Coomassie Blue R 250) gefärbt. Unspezifische Hintergrundfärbung wurde durch anschließendes Waschen der Gele in einer Entfärbelösung (10% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Essigsäure) entfernt.

3.4.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinen durch Absorptionsmessung

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde durch Absorptionsmessung bestimmt. Die Proteinlösung wurde mit Wasser verdünnt, in Quarzküvetten überführt und die Absorption der Lösung bei 280 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz errechnet.

3.4.10 Konzentrieren von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Ultrafiltrationseinheiten der Firma Amicon mit einer Porengröße von 5, 10 oder 30 kDa verwendet. Die Proteinlösung wurde in die Ultrafiltrationseinheit überführt und durch Zentrifugation bei 4 000x g bei einer Temperatur von 4°C eingeeengt.

3.4.11 Dialyse von Proteinlösungen

Zur Dialyse wurden Dialyseschläuche der Firma Roth (Karlsruhe) mit einer Porengröße von 7 oder 14 kDa verwendet. Die Proteinlösung wurde für eine Stunde bei 4°C gegen 1 l Puffer dialysiert, anschließend wurde der Puffer gegen 1 l frischen Dialysepuffer ausgetauscht und über Nacht bei 4°C unter ständigem Rühren weiter dialysiert.

3.5 Biophysikalische Methoden

3.5.1 Analytische Größenausschlusschromatographie

Bei der analytischen Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) erfolgt die Trennung mit Hilfe einer HPLC (Waters, Milford) über eine Matrix (Superdex S200 (10/30), GE Healthcare bzw. BioSep-Sec-S 4000, Phenomenex) mit bestimmter Porengröße. Kleine Moleküle können tiefer in die Poren eindringen und weisen somit

eine längere Retentionszeit auf als große Moleküle, welche an den Poren vorbeifließen. Die Elution der Proteine wird anhand der Absorption bei 280 nm detektiert. Wird ein Proteinstandard als Referenz verwendet, lässt sich durch Korrelation der Retentionszeiten der Proben mit denen des Standards die Masse der analysierten Proteine bestimmen.

3.5.2 ESI-Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometrie

Die Masse der gereinigten Proteine wurde mittels eines ESI (*electron spray ionisation*) - Ionenfallen-Massenspektrometers bestimmt. Nach der Reinigung der Probe über eine C4-Säule erfolgt die Ionisation durch Versprühen der Probe durch eine Metallkapillare in eine Kammer mit hohem elektrischem Potential. Nach Verdunsten des Lösungsmittels verbleiben die geladenen Proteine in der Gasphase und werden durch die Potentialdifferenz in den Analysator geleitet. Die Analyse erfolgt über ein Quadrupol-Ionenfallen Analysator.

3.5.3 Isothermale Titrationskalorimetrie

Mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) ist es möglich die thermodynamischen Parameter einer Protein/Ligand-Wechselwirkung zu bestimmen. Die Bindung eines Liganden an ein Protein geht in der Regel mit einem messbaren energetischen Prozess einher. Die Meßzelle und Referenzzelle werden während des Titrationsexperiments mittels eines Rückkopplungssystems bei einer konstanten Temperatur gehalten. Wird durch eine Protein/Ligand-Wechselwirkung in der Meßzelle Wärme frei gesetzt, oder der Umgebung entzogen, ändert sich im Vergleich zur Referenzzelle die Energiemenge, die zum Erhalt der konstanten Temperatur benötigt wird. Durch Detektion dieser Energiedifferenz kann die Wärmeänderung indirekt bestimmt werden.

Bei einem ITC-Experiment liegt einer der Bindungspartner (meist das Protein) in der Meßzelle vor und der zweite Bindungspartner (Ligand) wird mit einer Spritze schrittweise titriert. Die bei der Titration des Injektanden entstehende Wärmeänderung wird detektiert und das Integral der Wärmetönung gegen das molare Verhältnis von Injektand/Protein aufgetragen. Aus dem Kurvenverlauf können die freie Enthalpie ΔG° , die Wärmeänderung ΔH , die Änderung der Entropie ΔS , die Stöchiometrie und der K_D bestimmt werden. Die freie Enthalpie ergibt sich hierbei durch die Gibbs-Funktion (Formel 1).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Formel 1

Die Wärmeänderung ΔH setzt sich vor allem aus den Beiträgen der nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen den Bindungspartnern (Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen, ionische Wechselwirkungen, van der Waals Kräfte), sowie dem Aufbrechen der Solvathülle zusammen. Vorhersagen über die Zusammensetzung der Entropie sind schwieriger, zum einen kann die Auflösung der Hydrathülle in der Ligandenbindungstasche die Entropie erhöhen, zum anderen kann die Beweglichkeit von Seitenketten oder ganzen Domänen durch die Ligandenbindung eingeschränkt werden und somit der Grad der Ordnung zunehmen.

Die ITC-Messungen wurden mit einem ITC₂₀₀-Gerät der Firma Micocal durchgeführt. Das Volumen der Meßzelle beträgt 200 μl , das der Spritze $\sim 60 \mu\text{l}$. Typischerweise wurden 18 Injektionen mit je 2 μl Injektand im Abstand von 2 min durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei einer konstanten Temperatur von 25°C. Vor der Messung wurden die Proben durch Dialyse in den Messpuffer überführt um Puffereffekte zu minimieren und anschließend filtriert und entgast. Die Auswertung erfolgte mittels der Auswertungssoftware LLC ITC Origin 7.0.

3.6 Strukturbiologische Methoden

3.6.1 Proteinkristallisation

Ziel der Proteinkristallisation ist es ein in wässriger Lösung befindliches Protein durch eine langsame, kontrollierte Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung in einen kristallinen Zustand zu überführen. In einem Kristall liegen die einzelnen Moleküle in einer geordneten periodischen Gitterstruktur vor. Diese Eigenschaft erlaubt es im Idealfall, mit Hilfe eines Röntgenbeugungsexperiments, die dreidimensionale Struktur des kristallisierten Moleküls mit atomarer Auflösung zu bestimmen.

Die Kristallisation eines Proteins unterteilt sich in zwei Phasen, der Keimbildung und dem Kristallwachstum. Zunächst muss eine Energiebarriere überwunden werden, um stabile, periodisch geordnete Aggregate (Kristallisationskeime) zu erhalten (siehe Abbildung 12A). Ist nun die kristalline Form energetisch günstiger als die gelöste, freie Form kommt es zum Wachstum der Kristalle. Für beide Schritte ist es notwendig einen Zustand der Übersättigung des Lösungsmittels mit dem Protein herbeizuführen. Um eine Übersättigung zu erreichen werden häufig Fällungsmittel mit geringer denaturierender Wirkung, wie Polyethylenglycole (PEGs) mit unterschiedlichen Längen, oder Ammoniumsulfat eingesetzt. In der Übersättigung kommt es dann zur Abscheidung von Protein in eine feste Phase, bis die Sättigungskonzentration oder ein Gleichgewichtszustand hergestellt ist (Abbildung 12B).

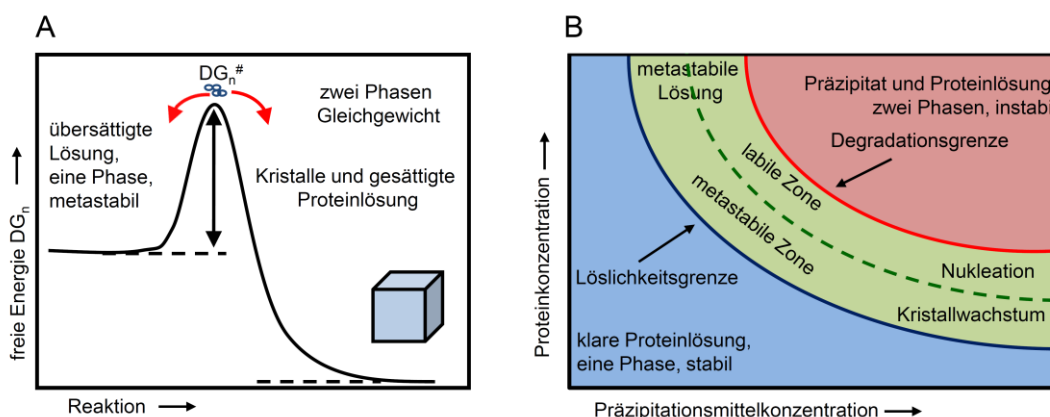


Abbildung 12: Nukleation und Kristallwachstum. (A) Phasenverhalten von Proteinlösungen in Abhängigkeit von Protein- und Fällungsmittelkonzentration (B) Um die Kristallisation herbeizuführen, muß eine Energiebarriere überwunden werden. Ist diese überwunden überwiegt während des Kristallwachstums die gewonnene Bindungsenthalpie den Verlust an Entropie.

Im Zuge dieser Arbeit wurde das Verfahren der Dampfdiffusion angewendet, um die Proteinlösung in die Übersättigung zu überführen. Bei diesem Verfahren wird eine schwach gepufferte Proteinlösung in einem bestimmten Verhältnis (in der Regel 1:1) mit der Kristallisationslösung gemischt und die Kristallisationslösung in konzentrierter Form in ein Reservoir gegeben. Aufgrund der höheren Präzipitationsmittelkonzentration in der Reservoirlösung diffundiert das Wasser durch Dampfdiffusion langsam aus der Proteinlösung in das Reservoir. Hierbei steigen sowohl die Protein- als auch die Präzipitationsmittelkonzentration in der Proteinlösung an und das System gelangt in einen Zustand der Übersättigung. Im Idealfall erreicht die Lösung eine bestimmte Protein- und Präzipitationsmittelkonzentration, in der spontan Kristallisationskeime entstehen und die Kristalle wachsen können. Durch die Abscheidung des Proteins in die feste Kristallform sinkt die Proteinkonzentration in der Lösung und die Keimbildung nimmt ab, wobei das Kristallwachstum bis zur Löslichkeitsgrenze des Proteins anhält.

Befinden sich Protein und Präzipitationsmittel nicht in einem idealen Verhältnis, so erfolgt die Keimbildung ggf. erst nah an der Degradationsgrenze. In diesem Fall entstehen in großer Anzahl Mikrokristalle, so dass kein Protein mehr für das Kristallwachstum zur Verfügung steht. Neben der kristallinen Form können zudem auch weitere feste Phasen, wie ungeordnete Präzipitate oder Gele, gebildet werden.

Die initialen Kristallisationsexperimente (*screens*) dienen dazu Bedingungen zu identifizieren, die die Kristallisation des Proteins gegenüber anderen Aggregationsformen begünstigt. Hierfür wurden kommerzielle Hochdurchsatzscreens

der Firma Qiagen im *sitting drop* Verfahren verwendet. Bei diesem Verfahren „sitzt“ der Proteinlösungstropfen in einem erhöhten *well*, welches von dem mit der Mutterlauge gefüllten Reservoir umgeben ist.

Die verwendeten *screens* enthielten 96 Bedingungen, von diesen wurden jeweils 75 μl in das Reservoir einer 96-*well* Platte (3551, Corning) vorgelegt. Von der Mutterlauge und dem zu kristallisierenden Protein wurden jeweils 0,1 μl unter Verwendung eines Mosquito Crystal Pipettierroboters (Tip Labtech) im Probenwell gemischt. Die Platte wurde anschließend luftdicht versiegelt und fortlaufend auf Kristallbildung hin überprüft.

Nach der Identifizierung einer initialen Kristallisationsbedingung, wurde diese im größeren Maßstab in einer 24 *well hanging drop* Platte (Linbro) mit zehnfachem Reservoir- und Probenvolumen reproduziert. Desweiteren wurde die initiale Bedingung mit Hinblick auf die Konzentration der Inhaltsstoffe systematisch variiert, um eine optimale Kristallisationsbedingung mit Hinblick auf Kristallgröße und Brechungseigenschaften zu identifizieren. Weitere Optimierungsparameter stellten die Inkubationstemperatur, der pH-Wert der Reservoirlösung, sowie die Proteinkonzentration dar.

Falls auf diese Weise keine Kristalle mit ausreichender Größe und Brechungseigenschaften erlangt wurden, wurden zudem Zusatzstoffe (*additives*) getestet. Dafür wurde ein 96 Bedingungen enthaltender *Additive Screen* der Firma Hampton verwendet. Von der zu diesem Zeitpunkt besten Kristallisationsbedingung wurden 96-mal je 70 μl mit jeweils 10% der Additive-Lösungen versetzt und diese Gemische als Mutterlaugen in einem 96 Proben *Screen* verwendet.

3.6.2 Datenaufnahme

Initiale Röntgenbeugungsexperimente wurden mit Hilfe des institutseigenen Röntgenstrahlengenerators (Rigaku Mar) durchgeführt. Die zur Strukturlösung verwendeten Röntgenbeugungsdatensätzen wurden am SLS-Synchrotron (*Swiss Light Source*, Villigen, Schweiz) an der SLS X10SA Röntgenquelle aufgenommen.

3.6.3 Das Phasenproblem

Zur Rekonstruktion der Elektronendichte ρ eines Moleküls werden zwei Parameter für jeden Datenpunkt (x,y,z) benötigt: Die Strukturfaktoramplitude (F_{hkl}) und der Phasenwinkel (α_{hkl}). Die im Röntgenbeugungsexperiment gemessenen Intensitäten (Reflexe bzw. Beugungspunkte) enthalten jedoch nur die Information über die

Amplitude der gebeugten Röntgenstrahlen, nicht über die Phasenbeziehung zwischen den Reflexen. Aufgrund des Fehlens der Phaseninformation, ist eine direkte Rekonstruktion der Elektronendichte mittels Fouriertransformation nicht möglich (siehe Formel 2).

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{-h}^h \sum_{-k}^k \sum_{-l}^l F_{hkl} \exp[-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{hkl})] \quad \text{Formel 2}$$

Die beiden wesentlichen Methoden zur Bestimmung der Phasen sind die experimentelle Phasenbestimmung und der molekulare Ersatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der molekulare Ersatz zur Phasenbestimmung verwendet.

3.6.4 Molekularer Ersatz

Der molekulare Ersatz (MR, engl. *molecular replacement*) ist eine Methode zur Bestimmung initialer Phasen für die Berechnung der Elektronendichte aus einem Röntgenbeugungsspektrum mittels Fouriertransformation. Hierfür wird eine bekannte Kristallstruktur, welche typischerweise mindestens eine Sequenzidentität von 35% zu der unbekanntem Struktur aufweisen sollte, als Modell verwendet. Die Modellstruktur wird durch Rotations- und Translationsoperationen in der Einheitszelle bzw. der asymmetrischen Einheit bewegt, bis eine maximale Übereinstimmung zwischen den berechneten Streuungsdaten des Modells und den gemessenen Daten der unbekanntem Struktur erlangt wird. Bei einer sechsdimensionalen Suche werden für jede Translationsoperation alle möglichen Rotationsoperationen durchgeführt. Aufgrund des geringeren Rechenaufwandes wird häufig eine initiale Rotationssuche, gefolgt von einer Translationsuche mit einer bestimmten Anzahl der Lösungen der Rotationssuche, durchgeführt. In der Regel ist es notwendig die Translationsuche mit mehreren Lösungen der Rotationssuche durchzuführen, da die Translationsfunktionen sehr empfindlich für kleine Fehler in der Orientierung der Modellstruktur sind. Einen Nachteil des molekularen Ersatzes stellt der sogenannte „*model bias*“ dar. Da die initialen Phasen aus einem bereits existierenden Model entnommen werden, ist die errechnete Elektronendichtekarte von dieser beeinflusst. Weicht das Model von der eigentlichen Struktur ab, kann dies zu Fehlinterpretationen der Elektronendichte und somit zu falschen Strukturen führen.

3.6.5 Modellbau und Verfeinerung

Für die Prozessierung der Röntgenbeugungsdaten wurde das Softwarepaket XDS (Version: 28 Dezember 2009, (Kabsch 2010)) verwendet. Die Skalierung der Intensitäten erfolgte mit dem XDS-Programm XSCALE. Die Phasen wurden durch molekularen Ersatz mit einer bereits gelösten HIV-1_{SF2} Nef-Struktur bestimmt. Hierfür und für die Erstellung eines ersten Strukturmodells wurde das Programm Phaser (Version 2.1.6) aus dem CCP4i Softwarepaket verwendet (McCoy et al. 2007).

Das nach dem molekularen Ersatz erstellte initiale Strukturmodell ist gegebenenfalls unvollständig und enthält eine Vielzahl von Fehlern, wie falsche Bindungslängen und Winkel, unwahrscheinliche Torsionswinkel und eine schlechte Proteinrückgratgeometrie. Diese Fehler werden durch eine anschließende, abwechselnd lokal im realen und global im reziproken Raum stattfindende Verfeinerung des Modells behoben. Da bei diesem Prozess auch die Phasen genauer bestimmt werden, verbessert sich die errechnete Elektronendichte, so dass gegebenenfalls dem Modell fehlende Teile hinzugefügt werden können.

Bei diesem Vorgehen handelt es sich um einen iterativen Prozess, da jede Verbesserung des Modells die Phasen verbessert, was eine weitere Verbesserung des Modells erlaubt. Dieses Vorgehen kann jedoch auch zu einer Überanpassung der Daten führen, indem Modellparameter artifiziell weiter an die gemessenen Daten angepasst werden ohne das Modell wirklich zu verbessern. Daher wird parallel eine Kreuzvalidierung mit einem kleinen Anteil nicht verwendeter (freier) Daten durchgeführt. Die Übereinstimmung zwischen dem Modell und den gemessenen Daten wird global durch den R-Wert beschrieben, die Kreuzvalidierung durch den freien R-Werts R_{free} .

$$R_{\text{work}} = \frac{\sum_{h \notin \text{free}} |F_{\text{obs}} - kF_{\text{calc}}|}{\sum_{h \notin \text{free}} F_{\text{obs}}} \quad \text{Formel 3}$$

$$R_{\text{work}} = \frac{\sum_{h \in \text{free}} |F_{\text{obs}} - kF_{\text{calc}}|}{\sum_{h \in \text{free}} F_{\text{obs}}} \quad \text{Formel 4}$$

Da die R-Werte nur ein Maß für die globale Qualität des Modells sind, wird abschließend eine lokale Validierung aller Aminosäuren vorgenommen, wobei hier

Vorwissen über Molekülgeometrie und chemische Eigenschaften der jeweiligen Aminosäuren mit einfließt. Für die automatische Verfeinerung wurde das Programm `refmac 5` des CCP4i Software Pakets oder `phenix.refine` (Version 1.5-2) (Afonine 2005) verwendet. Für die manuelle Verfeinerung wurde das Programm `Coot` (Version 0.6) eingesetzt (Emsley and Cowtan 2004; Emsley et al. 2010).

3.6.6 Nicht-Kristallographische Symmetrie (NCS)

Liegen in einer Einheitszelle mehrere identische Moleküle vor, so kann dies für die Modellverfeinerung insbesondere bei Datensätzen mit niedriger Auflösung genutzt werden. Da die Moleküle während der Kristallisation der gleichen chemischen Umgebung ausgesetzt sind, sollte die Proteinrückgratgeometrie in den gefalteten Kernregionen ähnlich sein, wohingegen Seitenketten und flexible Bereiche stärker variieren können. In der Praxis werden während der Verfeinerung Einschränkungen für die Variabilität zwischen NCS-verwandten Molekülen gesetzt, wobei die Stärke der Einschränkungen für unterschiedliche Bereiche des Proteins (NCS-Gruppen), wie die Kernregion, flexible Schleifen und Seitenketten variieren können. Innerhalb der NCS-Gruppen wird eine Durchschnittsposition für alle Atome berechnet und während der Verfeinerung die Abweichung von der Durchschnittsposition minimiert.

3.6.7 TLS-Verfeinerung

Der B-Faktor ist ein Maß für die Abweichung der streuenden Atome z.B. durch thermale Oszillation, mehrere, teilweise besetzte Konformationen welche nicht aufgelöst werden können, sowie Unregelmäßigkeiten im Kristallgitter. Dies führt im reziproken Raum zu einer Abschwächung des Struktur factors, was sich im realen Raum in einer Verbreiterung der Elektronendichteverteilung äußert. Lange Seitenketten haben mehr Bewegungsfreiheit lotrecht zur Bindungsachse als entlang der Bindungsachse. Infolgedessen ergibt sich eine anisotrope Beweglichkeit der Atome und somit anisotrope B-Faktoren. Die Verfeinerung mit anisotropen B-Faktoren erfordert jedoch die Beschreibung des B-Faktors mit sechs Parametern gegenüber einem Parameter für isotrope B-Faktoren und ist daher häufig nicht durchführbar. Eine effizientere Methode um die anisotrope Beweglichkeit der Atome einzubeziehen ist die TLS (*translation-libration-screw*) Parametrisierung, in der die gemeinschaftliche Bewegung von Gruppen von Atomen durch *rigid body* Bewegungen beschrieben wird. Die Größe der Gruppen kann dabei von Phenylringen bis hin zu Proteindomänen oder ganzen Proteinen in Multiproteinkomplexen variieren.

3.6.8 Graphische Darstellung von Kristallstrukturen

Zur graphischen Darstellung von Kristallstrukturen wurde die Software PyMOL (Version 1.2r1, DeLano Scientific) verwendet. Die Berechnung von elektrostatischen Oberflächenpotentialen erfolgte mit der Software APBS (Baker et al. 2001) in der APBS-Erweiterung für PyMOL (Michael Lerner, 2004).

3.6.9 Röntgenkleinwinkelstreuung

Röntgenkleinwinkelstreuung erlaubt die Untersuchung der Struktur von Makromolekülen in Lösung. Es lassen sich Informationen über die Größe und die Form der untersuchten Moleküle gewinnen, jedoch nicht mit atomarer Auflösung (zur Übersicht siehe (Koch et al. 2003; Putnam et al. 2007)). In Bezug auf die Untersuchung von Proteinen sind Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimente insbesondere nützlich um Proteine zu untersuchen, welche sich nicht kristallisieren lassen, und um die physiologische Relevanz von Proteinkristallstrukturen in Lösung zu überprüfen.

Proteinkristalle stellen keine native Umgebung für ein Protein dar. Die hohen Protein-, Salz- und Fällungsmittelkonzentrationen in einem Proteinkristallisationsansatz können zur Ausbildung artifizieller Konformationen und Proteinanordnungen führen. Insbesondere die Frage nach einer möglichen Homooligomerisierung eines Proteins lässt sich mit der Proteinkristallisation nur schwer beantworten, da jeder Kristall in seinem Aufbau notwendigerweise aus der periodischen Anordnung desselben Proteins besteht. Es ist daher nicht immer möglich zu unterscheiden, ob eine Proteinanordnung in einer Kristallstruktur durch die Kristallpackung entstanden ist, oder eine physiologisch relevante Oligomerisierung darstellt.

Da während eines Röntgenkleinwinkelstreuungsexperiments die untersuchten Proteine nicht in einem periodischen Gitter, wie bei einem Proteinkristall, sondern frei in Lösung vorliegen wird anstelle eines Musters aus einer Vielzahl distinkter Beugungsreflexe ein diffuses Streubild aufgenommen. Es wird die Differenz aus dem Streuungssignal der Probe und des Lösungsmittels (Puffer) gebildet, um den Beitrag des untersuchten Proteins zur Gesamtstreuung der Probe zu ermitteln. Es ergibt sich aufgrund der randomisierten Molekülorientierung eine isotrope Streuungskurve. Aufgenommen wird die Intensität der Streuung $I(q)$ in Abhängigkeit vom Streuwinkel und der Wellenlänge der Strahlung. Wobei $q = (4\pi \sin \theta) / \lambda$ ist und 2θ dem Streuwinkel und λ der Wellenlänge des Röntgenstrahls entspricht. Im Falle einer homogenen, monodispersen Probe kann die Streuungskurve von der Elektronenverteilung in dem Probenmolekül nach Formel 5 abgeleitet werden:

$$I(q) = \int_0^{D_{\max}} P(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr, \quad \text{Formel 5}$$

wobei D_{\max} der größte mögliche Abstand innerhalb des streuenden Partikels ist.

Die Paarverteilungsfunktion $P(r)$ (siehe Formel 6) ist eine Autokorrelationsfunktion, die direkt mittels Fouriertransformation aus der Streuungskurve errechnet werden kann und Informationen über die Abstände der Elektronen voneinander innerhalb des streuenden Partikels ergibt. Die Paarverteilungsfunktion enthält somit Information über die Form des streuenden Moleküls und erlaubt die Berechnung von theoretischen Streuungskurven aus einer Proteinkristallstruktur. Diese kann mit den gemessenen Streuungskurven verglichen werden, um die Übereinstimmung des Kristallstrukturmodells mit den gemessenen Streuungskurven des Proteins in Lösung zu überprüfen.

$$P(r) = r^2 \left\langle \int_V \Delta\rho(r) \Delta\rho(u+r) dr \right\rangle_{\Omega} \quad \text{Formel 6}$$

Des Weiteren können aus den Streuungskurven *ab initio* Strukturen des Proteins mit niedriger Auflösung berechnet werden (Franke and Svergun 2009). In diese kann mittels *rigid-body modelling* die hochaufgelöste Kristallstruktur gefittet werden um die Übertragbarkeit einer bestimmten Kristallstruktur für das Protein in Lösung zu überprüfen.

4 Ergebnisse

4.1 Strukturbiologische und biochemische Untersuchungen an HIV-1_{SF2} Nef

Zu den Hauptfunktionen des Nef-Proteins gehört die Manipulation der zellulären Signaltransduktionswege einer infizierten Zelle. Hierfür interagiert Nef mit einer Vielzahl zellulärer Kinasen, wie z.B. den zytoplasmatischen Tyrosinkinasen der Src-Familie. Die Aktivierung dieser Kinasenfamilie beruht auf der Wechselwirkung von Nef mit der SH3-Domäne der Kinasen. Nef verfügt für die Bindung an SH3-Domänen über eine konservierte poly-Prolin Typ II Helix (P_{76xxPxR}). Am stärksten bindet Nef an die Tyrosinkinase Hck mit einem K_D von 1,5 μ M. Dies stellt die stärkste bisher beschriebene natürliche SH3/Ligand-Wechselwirkung dar (Lee et al. 1995; Arold et al. 1998).

Diese starke Affinität beruht auf einer Interaktion zwischen Aminosäuren in der RT-Schleife der SH3-Domäne und der hydrophoben Tasche von Nef, welche zwischen den beiden antiparallelen α -Helices drei und vier liegt (Lee et al. 1996). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Hck SH3_{B6}-Mutante verwendet. Bei dieser Mutante wurde die Sequenz im Bereich des Isoleuzin 92 (E₉₀AIHHE), welches mit der hydrophoben Tasche von Nef interagiert, durch die Aminosäuresequenz Y₉₀SPFSW ersetzt, um eine höhere Affinität zu erreichen (Hiipakka et al. 1999). Die SH3_{B6}-Mutante diente in einer von Dr. Sebastian Breuer (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) durchgeführten Studie als Grundlage für die Entwicklung eines Nef-Inhibitors mit nanomolarer Affinität (Breuer 2006).

Um die erhöhte Affinität der SH3_{B6}-Mutante zu erklären, wurde zunächst durch Dr. Antje Schulte (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) eine strukturbiologische Untersuchung des Nef/SH3_{B6}-Komplexes durchgeführt. Es konnten Kristallisationsbedingungen identifiziert werden und es wurde eine erste Struktur dieses Komplexes mit einer Auflösung von 2,0 Å bestimmt. Diese initiale Struktur umfasste auch Teile der flexiblen Schleife des Nef-Proteins, jedoch nicht die Aminosäuren 155-176, welche das funktional wichtige Dileuzinmotiv beinhalten (siehe Abbildung 13).

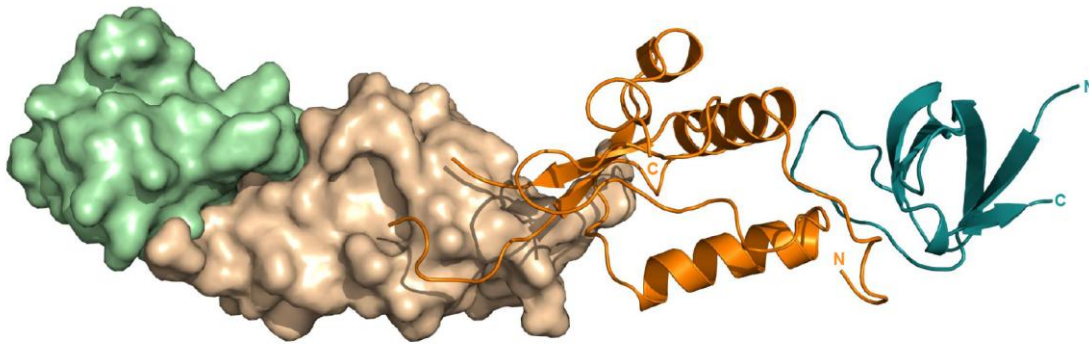


Abbildung 13: Kristallstruktur des Komplexes aus Nef_{45-210,C59S} (beige/ orange) und SH3_{B6} (grün/ cyan) nach Schulte, 2008. Die asymmetrische Einheit des Kristalls besteht aus einem Dimer aus Nef/SH3-Heterodimeren.

Das Dileuzinmotiv in der großen C-terminalen flexiblen Schleife von Nef spielt eine wichtige Rolle bei der Nef-abhängigen Internalisierung von zellulären Oberflächenrezeptoren. Hierbei bindet Nef mit seiner hydrophoben Tasche an Dileuzin-Signalmotive in der zytoplasmatischen Domäne solcher Rezeptoren. Infolge dieser Bindung rekrutiert Nef mit seinem eigenen Dileuzinmotiv den AP-2-Komplex, was die Clathrin-abhängige Endozytose des Oberflächenrezeptors einleitet (Greenberg et al. 1997; Bresnahan et al. 1998; Craig et al. 1998; Greenberg et al. 1998a; Janvier et al. 2003). Im Unterschied zu den Dileuzinmotiven der Oberflächenrezeptoren, welche für die Rekrutierung von AP-2 phosphoryliert werden müssen, ist das Dileuzinmotiv des Nef-Proteins phosphorylierungsunabhängig. Auf diese Weise kann es die Internalisierung von Membranrezeptoren einleiten, deren eigene Internalisierungsmotive nicht durch Phosphorylierung aktiviert wurden.

Nef interagiert nur an der Plasmamembran mit AP-2 und nur wenn es an ein *cargo*-Protein gebunden hat. Da das Dileuzinmotiv des Nef-Proteins phosphorylierungsunabhängig ist, muss ein anderer Regulationsmechanismus existieren, welcher gewährleistet, dass die AP-2 Rekrutierung und somit die Clathrin-abhängige Endozytose erst eingeleitet wird, wenn Nef an einen Zielrezeptor gebunden hat. Würde ein solcher Mechanismus nicht existieren, würde Nef AP-2 auch ohne die Bindung an ein *cargo*-Protein rekrutieren und somit zur seine eigene Internalisierung einleiten.

Ein möglicher Regulationsmechanismus wäre, dass die Dileuzinmotiv-Bindungstasche von Nef das Nef-eigene Dileuzinmotiv bindet und dieses erst durch die Bindung an das Dileuzinmotiv eines Oberflächenrezeptors freisetzt. Ein solcher Autoregulationsmechanismus wäre sowohl *in cis*, also innerhalb eines Nef-Moleküls,

als auch *in trans* durch die Bindung des Dileuzinmotiv eines Nef-Moleküls in die hydrophobe Tasche eines zweiten Nefs und umgekehrt denkbar.

In der von Dr. Antje Schulte bestimmten Kristallstruktur des Nef/SH3_{B6}-Komplexes verläuft die flexible Schleife eines Nef-Moleküls in Richtung der hydrophoben Tasche eines zweiten Nef-Moleküls. Die Struktur umfasste jedoch nicht das Dileuzinmotiv von Nef, welches im Bereich der hydrophoben Tasche des zweiten Nef-Moleküls liegen müsste (siehe Abbildung 13).

Im Rahmen der hier beschriebenen Studien sollte durch Optimierung der Proteinreinigung, der Variation der Kristallisationsbedingungen, sowie durch die Aufnahme eines Röntgenbeugungsdatensatzes mit hoher Redundanz, ein neues Modell des Nef/SH3_{B6}-Komplexes erstellt werden, welches die gesamte flexible Schleife des Nef-Proteins einschließlich des Dileuzinmotivs zeigt. Sollte das Dileuzinmotiv von Nef in dieser Struktur in die hydrophobe Tasche eines zweiten Nef-Moleküls binden, könnten aus dieser Struktur biochemische Experimente abgeleitet werden, um die Hypothese der Autoregulation von Nef zu überprüfen.

4.1.1 Darstellung der verwendeten Proteine und Proteinkomplexe

Der für die Kristallisation verwendete binäre Komplex aus HIV-1_{SF2} Nef und der Hck SH3_{B6}-Mutante wurde mittels Koexpression in BL21(DE3)-R3/Rosetta Zellen dargestellt (siehe Abschnitt 3.4.5). Das Nef-Protein wurde hierfür N-terminal verkürzt und umfasste die Aminosäuren 45-210, wobei die Cysteine an Position 59 und 210 zu Serin mutiert wurden (Nef_{45-210,C59S}), um eine Oligomerisierung des Proteins durch Ausbildung von Disulfidbrücken, bedingt durch die für die Kristallisation benötigten hohen Proteinkonzentrationen und langen Inkubationszeiten, zu verhindern. Die SH3-Domäne umfasste die Aminosäuren 78-138 der Hck-Tyrosinkinase, wobei die Aminosäuresequenz E₉₀AIHHE durch die Aminosäuresequenz Y₉₀SPFSW ersetzt wurde (SH3_{B6}).

Das Nef-Protein wurde als N-terminales GST-Fusionsprotein zusammen mit der SH3_{B6}-Domäne, welche keinen Affinitätsanker aufweist, koexprimiert. GST-Nef_{45-210,C59S} und SH3_{B6} konnten aufgrund der hohen Affinität von Nef zu der SH3_{B6}-Domäne als Komplex isoliert werden. Die Reinigung (siehe hierzu Abschnitt 3.4.6) erfolgte durch GSH-Affinitätschromatographie und, nach proteolytischer Abspaltung des GST-Ankers durch die TEV-Protease, mittels Größenausschlusschromatographie. Die Gelfiltrationsfraktionen, welche eine 1:1 Stöchiometrie von Nef_{45-210,C59S} und SH3_{B6} und

keine Verunreinigungen zeigten (siehe Abbildung 14), wurden vereinigt, konzentriert und für die folgenden Experimente verwendet.

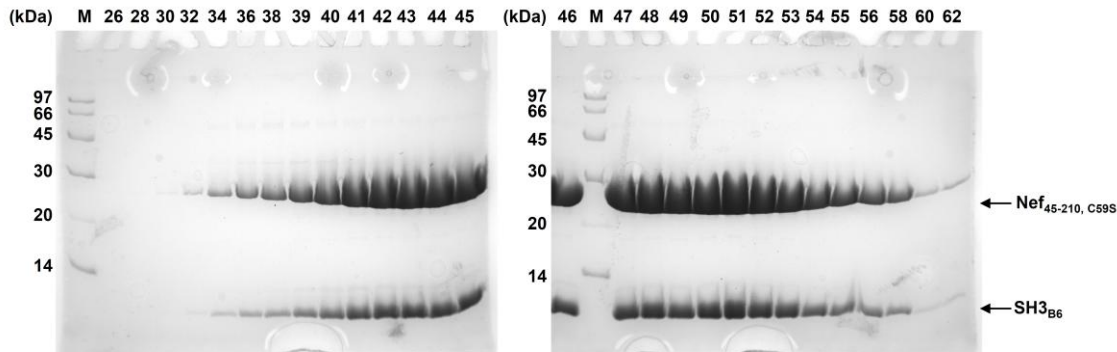


Abbildung 14: SDS-PAGE des Komplexes aus Nef_{45-210, C59S} und SH3_{B6}. Dargestellt sind die Protein-haltigen Fraktionen einer präparativen Gelfiltration (16/60 Superdex 75, GE Healthcare) von Nef_{45-210, C59S} und SH3_{B6}. Die Spuren 26-62 zeigen die Protein-haltigen Fraktionen, M den LMW-Marker. Die Fraktionen 45-58 wurden vereinigt, konzentriert und für die nachfolgenden Experimente verwendet. Es wurde ein 20%iges Trenngel verwendet.

Um den Einfluss der N-terminalen Myristoylierung auf die Ligandenbindungseigenschaften von Nef zu untersuchen, wurde myristoyliertes Nef hergestellt. Hierzu wurde ein mit einem C-terminalen His-Anker versehenes Nef mit der humanen N-Myristoyltransferase (hNMT) in BL21(DE3)-R3/Rosetta Zellen koexprimiert (siehe Abschnitt 3.4.5). Vor Induktion der Expression mit IPTG wurden je Liter Zellkultur 10 ml einer 5 mM Myristinsäure-, 600 μ M BSA-Lösung zugegeben. Die Isolierung des Proteins erfolgte mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie und anschließender präparativer Gelfiltration (16/60 Superdex 75, GE Healthcare) (siehe Abschnitt 3.4.6). Der Grad der Myristoylierung wurde mittels ESI-Massenspektrometrie überprüft (siehe Abschnitt 3.5.2). Es konnte kein unmyristoyliertes Nef detektiert werden, was auf eine vollständige Myristoylierung des isolierten Proteins schließen lässt.

4.1.2 Strukturuntersuchungen des Komplexes aus HIV-1_{SF2} Nef und der Hck SH3_{B6}-Mutante

Die Nef_{45-210, C59S}/SH3_{B6}-Kristalle wurden im *hangig drop* Verfahren in 24 well Linbro-Platten gezüchtet. Salz und Fällungsmittelkonzentration sowie der pH-Wert wurden in den verschiedenen Ansätzen, ausgehend von der durch Dr. Antje Schulte identifizierten Bedingungen (20% PEG 8000, 10% Ethylenglycol, 0,1 M HEPES pH 7,5) systematisch variiert. Die Kristallisationsbedingung 22% PEG 8000, 8% Ethylenglycol, 0,1 M HEPES

pH 7,5 bei einer anfänglichen Proteinkonzentration von 18 mg/ml ergab einen Kristall, mit dem am SLS-Synchrotron (Villingen, Schweiz) ein Röntgenbeugungsdatensatz mit einer Auflösung von 2,35 Å aufgenommen werden konnte. Der Kristall gehörte zur Raumgruppe $P2_12_12_1$, die Einheitszelle hatte die Abmessungen $a = 43,19$ Å, $b = 90,88$ Å, $c = 169,53$ Å mit den Winkeln $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Die Struktur des Komplexes wurde durch molekularen Ersatz mit dem durch Dr. Antje Schulte erstellten Modell gelöst. Der molekulare Ersatz wurde mittels der Software phaser (Version 2.1.6) und die automatische Verfeinerung mit dem Programm refmac (Version 5.5) durchgeführt, welche beide Teil des CCP4 Software-Pakets sind. Die manuelle Verfeinerung erfolgte mit Hilfe der Software Coot (Version 0.6). In Tabelle 3 sind die Kristallparameter, sowie die Statistiken der Datenaufnahme und der Modellverfeinerung zusammengefasst.

Tabelle 3: Kristallographische Statistik der HIV-1_{SF2} Nef/SH3_{B6}-Struktur.

Datenaufnahme und Kristall	
Röntgenquelle	SLS X10SA
Wellenlänge (λ)	0,977032
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
a, b, c, (Å); α , β , γ ($^\circ$)	$a = 43,19$; $b = 90,88$; $c = 169,53$; $\alpha = \beta = \gamma = 90$
Auflösung (Å)	48-2,35
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da)	3,19
Lösungsmittelgehalt (%)	61,43
Anzahl der Reflexe	203748
Anzahl der einzigartigen Reflexe	28573
Vollständigkeit (%)	99,5
Redundanz	7,1
R_{sym}^a	7,5
$I/\sigma(I)$	22,18
Verfeinerung	
Auflösungsbereich	48-2,35 Å
R-Faktor (%)	21,25
R_{free} (%)	25,19
Anzahl der Atome (Protein, Lösungsmittel)	3324
Anzahl der Wassermoleküle	172
Durchschnittlicher B-Wert	14,905
Rmsd vom Idealwert	
Bindung	0,016
Winkel	1,49
Ramachandran Plot	
Favorisiert (%)	94,44
Erlaubt (%)	4,17
Verboten (%)	1,39
Fehlende Aminosäuren	79

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, besteht die asymmetrische Einheit des Kristalls aus einem Dimer von Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}-Heterodimeren. Für eines der beiden in der asymmetrischen Einheit auftretenden Nef_{45-210,C59S}-Moleküle (orange) konnte ein Modell für die Aminosäuren 72-208 erstellt werden. Dieses Modell umfasst somit die gesamte flexible Schleife. Für das zweite Nef-Molekül (beige) konnte die Elektronendichte im Bereich der flexiblen Schleife nur teilweise interpretiert werden. Das Modell umfasst die Aminosäuren 69-206, Δ 157-166 und Δ 173-178. Somit konnten die Aminosäuren um das Dileuzinmotiv S₁₆₇LLHPM in das Modell integriert werden, jedoch nicht die flankierenden Bereiche. Die Strukturmodelle der SH3_{B6}-Domänen zeigen die Aminosäuren 79-138. Da das exprimierte Konstrukt die Aminosäuren 78-138 von Hck umfasste, konnte somit lediglich die erste N-terminale Aminosäure nicht in das Modell integriert werden.

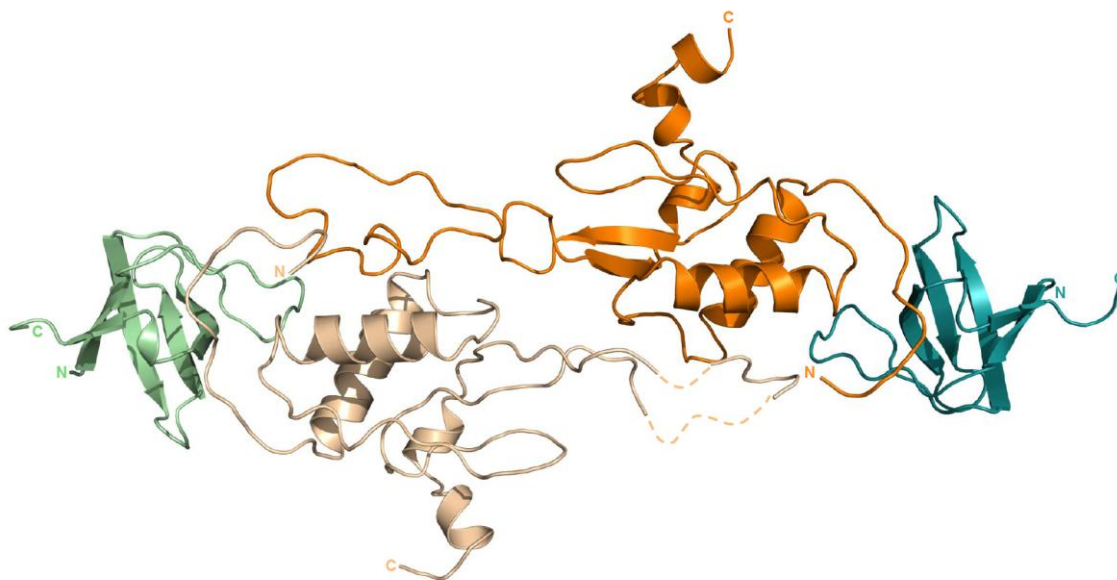


Abbildung 15: Struktur des Komplexes aus HIV-1_{SF2} Nef (45-210, C59S, C210S) (orange/beige) und der Hck-SH3_{B6}-Domäne (78-138, Y₉₀SPFSW) (cyan/grün). Das hier dargestellte Tetramer aus zwei Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}-Heterodimeren bildet die asymmetrische Einheit des Kristalls.

Das Modell von Nef (orange) im Komplex mit der SH3_{B6}-Domäne (cyan), welches die gesamte flexible Schleife umfasst, ist in Abbildung 16A dargestellt. Die flexible Schleife nimmt in der vorliegenden Struktur eine relativ gestreckte Konformation ein, mit dem Ansatz eines helikalen Bereichs um das Dileuzinmotiv. Abbildung 16 zeigt die Elektronendichtekarte (2Fo-Fc) mit einem σ -Level von 1 im Bereich der flexiblen Schleife. Für die Mehrzahl der Aminosäuren konnte die Elektronendichte auch für die Seitenketten identifiziert werden. Lediglich für die dem

Lösungsmittel zugewandeten Aminosäuren Arg156, Glu158, Glu159, sowie His175 war nur die Elektronendichte für das Proteinrückgrat zu sehen. Daher konnten für diese Aminosäuren die Seitenketten nicht in das Modell integriert werden.

Abbildung 16C zeigt eine Darstellung der Oberflächenladung des Nef-Moleküls. Es ist deutlich zu sehen, dass die Oberfläche des Nef-Proteins im Bereich der gefalteten Kerndomäne auf der einen Seite hauptsächlich positiv und auf der anderen Seite hauptsächlich negativ geladenen ist. Die flexible Schleife hingegen ist hauptsächlich negativ geladen. Deutlich zu sehen ist auch die ungeladene hydrophobe Tasche zwischen den Nef-Helices drei und vier. Diese hydrophobe Region wird durch die Aminosäuren F94 und W117 in einen oberen und einen unteren Bereich unterteilt.

Wie in Abbildung 16A zu sehen findet die Wechselwirkung zwischen Nef und der SH3_{B6}-Domäne an mehreren Kontaktflächen statt. Zum einen bindet Nef mittels seines PxxP-Motivs an die SH3-Domäne, wobei die Aminosäuren N131_{SH3} und Y132_{SH3} der SH3-Domäne zwischen die zentralen Proline des Nef-typischen P₇₃xxPxxPxRP-Motivs insertieren. Zum anderen bindet das W114_{SH3} zwischen das P79_{Nef} und das R81_{Nef} des Nef-Moleküls. Das R81_{Nef} interagiert weiterhin über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem D94_{SH3} der SH3-Domäne.

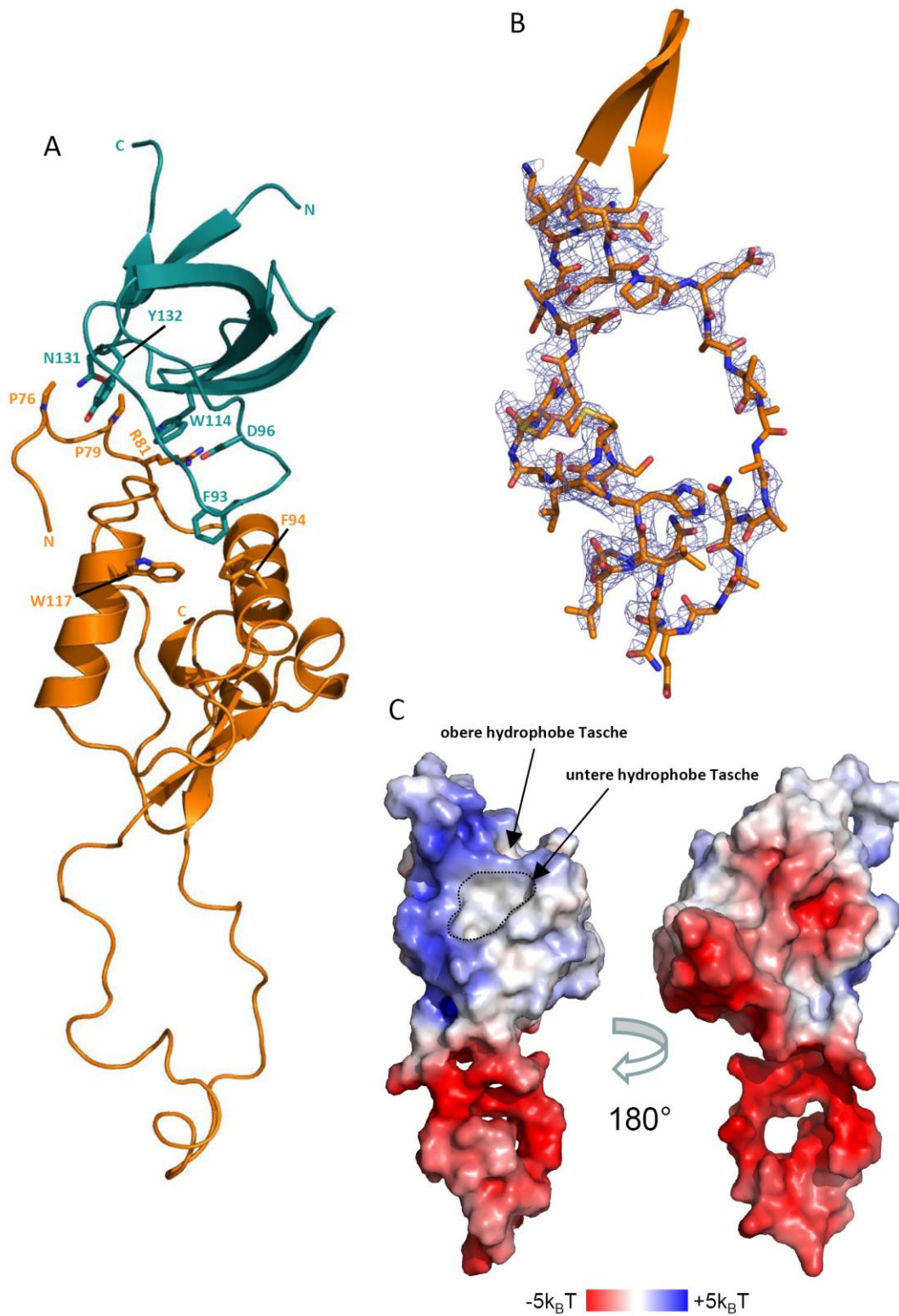


Abbildung 16: Struktur des Nef/SH3_{B6}-Komplexes einschließlich der vollständigen flexiblen Schleife von Nef. (A) Struktur von HIV-1_{SF2} Nef (orange) im Komplex mit der SH3_{B6}-Mutante (cyan). (B) Darstellung der Elektronendichte im Bereich der flexiblen Schleife von HIV-1_{SF2} Nef (2Fo-Fc-Karte, σ -Level = 1). (C) Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials von HIV-1_{SF2} Nef.

Eine zweite, hydrophobe Interaktion findet zwischen dem Phenylalanin (F93_{SH3}) der SH3_{B6}-Domäne und den Aminosäuren I91_{Nef}, F94_{Nef} und W117_{Nef} in der hydrophoben Tasche des Nef-Proteins zwischen den Helices drei und vier statt (siehe Abbildung 17A und B). Abbildung 17C zeigt die Überlagerung der Struktur des Nef_{SF2}/SH3_{B6}-Komplexes (orange/cyan) mit dem Nef_{NL4-3}/Fyn SH3-Komplex (braun/lila, PDB: 1EFN). Es ist zu sehen, dass die SH3_{B6}-Domäne, bedingt durch die tiefere Insertion des F93_{SH3} in die hydrophobe Tasche von Nef, im Vergleich zu der Fyn SH3-Domäne um etwa 25° gedreht ist.

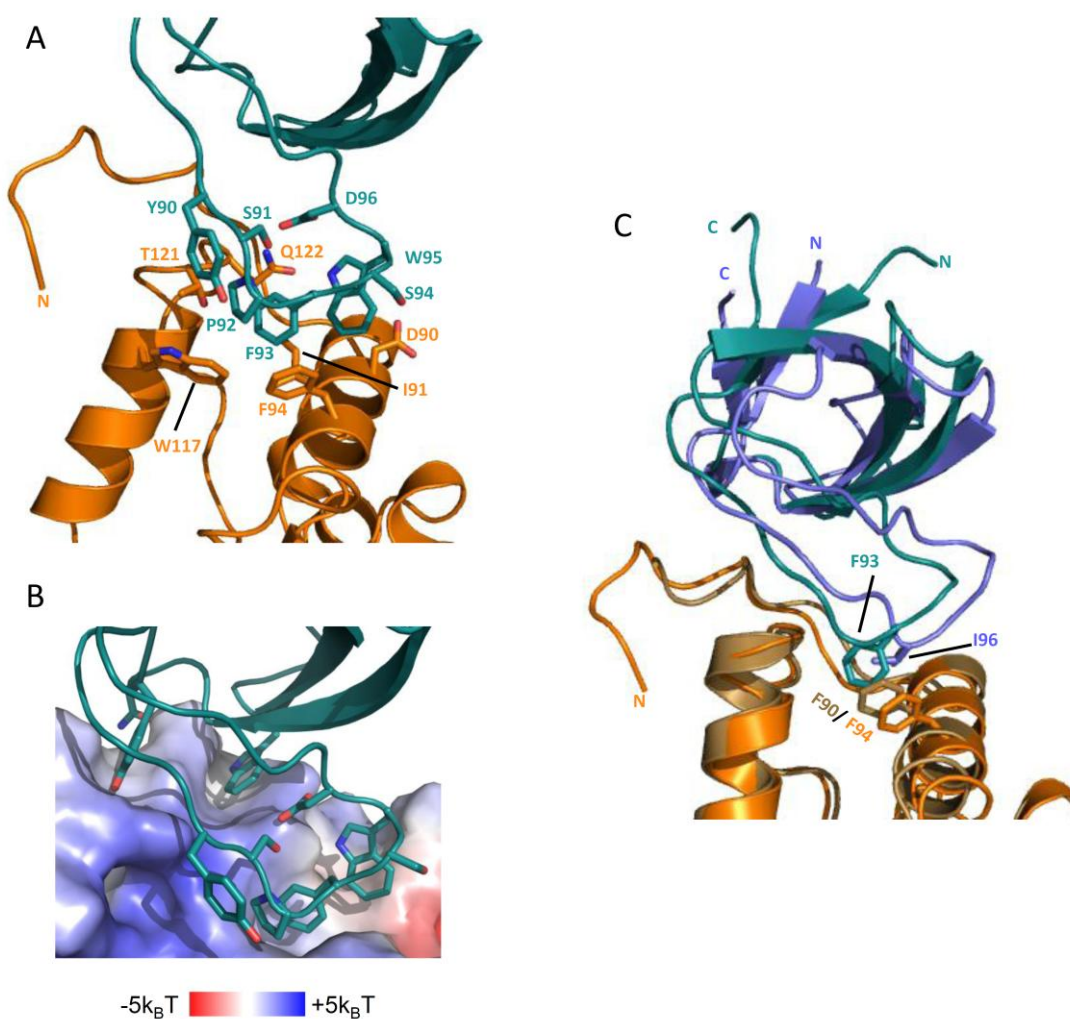


Abbildung 17: Die Nef/SH3_{B6}-Interaktion. (A) Darstellung der Nef/SH3_{B6}-Kontaktfläche (orange: Nef, cyan: SH3_{B6}). (B) Darstellung der HIV-1_{SF2} Nef (elektrostatische Oberflächendarstellung) SH3_{B6} (cyan) Kontaktfläche im Bereich der hydrophoben Tasche von Nef. (C) Überlagerung der Strukturen des Nef/SH3_{B6}-Komplexes (orange: Nef, cyan: SH3_{B6}) und eines Nef_{NL4-3}/Fyn SH3-Komplexes (beige: Nef, blau: Fyn SH3, PDB: 1EFN).

In Abbildung 18A ist eine der beiden SH3_{B6}-Nef/Nef-SH3_{B6}-Dimerinteraktionsflächen dargestellt. Die Dimerisierung wird durch die Interaktion der hydrophoben Tasche zwischen den Helices drei und vier eines Nef-Moleküls (Nef A, beige) mit der flexiblen Schleife eines zweiten Nef-Moleküls (Nef B, orange) vermittelt. Von der flexiblen Schleife tragen insbesondere das Prolin 171 (P171_{Nef B}), welches mit dem Tryptophan 117 (W117_{Nef A}) des ersten Nefs interagiert, das Leuzin L174_{Nef B} welches zwischen das W117_{Nef A} und das I113_{Nef A} bindet, sowie die Methionine 172 und 177 (M172_{Nef B} und M177_{Nef B}), welche in die hydrophobe Tasche zwischen den Helices 3 und 4 des ersten Nefs insertieren, zur Bindung bei (Abbildung 18C und D). Die hydrophobe Tasche von Nef A wird hierbei von den Aminosäuren F94_{Nef A}, I95_{Nef A} der Helix 3, den Aminosäuren R109_{Nef A}, R110_{Nef A}, I113_{Nef A}, L114_{Nef A} und W117_{Nef A} in der vierten α -Helix, sowie den Leuzinen L101_{Nef A} und L104_{Nef A} in der Linkerregion zwischen den Helices gebildet (siehe Abbildung 18B). Tabelle 4 zeigt die Protein/Protein-Kontakte der flexiblen Schleife von Nef für die Aminosäuren 164-179 mit der Kerndomäne von Nef A und der an Nef A gebundenen SH3_{B6}-Domäne innerhalb von 4,0 Å. Eine tabellarische Zusammenfassung aller Protein/Protein-Kontakte innerhalb von 3,8 Å in dieser Komplexstruktur befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Desweiteren ist zu sehen, dass das Tyrosin Y90_{SH3} der SH3_{B6}-Domäne mit den beiden Leuzinen L168_{Nef B} und L169_{Nef B} des Dileuzinmotivs in der flexiblen Schleife des zweiten Nef-Moleküls in der asymmetrischen Einheit interagiert. Somit wechselwirkt jede SH3_{B6}-Domäne mit dem F93_{SH3} in der RT-Schleife und den Aminosäuren welche mit dem PxxP-Motiv von Nef interagieren mit einem Nef-Molekül und mit dem Y90_{SH3} mit dem Dileuzinmotiv des zweiten Nef-Moleküls. Abbildung 18E zeigt die Elektronendichte mit einem σ -Level von 1 um die Aminosäuren L₁₆₈LHPMSLHGM in der flexiblen Schleife des zweiten Nefs. Bei der gezeigten Elektronendichtekarte handelt es sich um eine Omitkarte, in welcher die vom Modell unbeeinflusste Elektronendichte dargestellt ist. Die Omitkarte zeigt, dass die Elektronendichte für die Aminosäuren in der flexiblen Schleife, einschließlich der Seitenketten, welche die Interaktion mit der hydrophoben Tasche vermitteln, auch in der vom Modell unbeeinflussten Elektronendichte zu sehen ist.

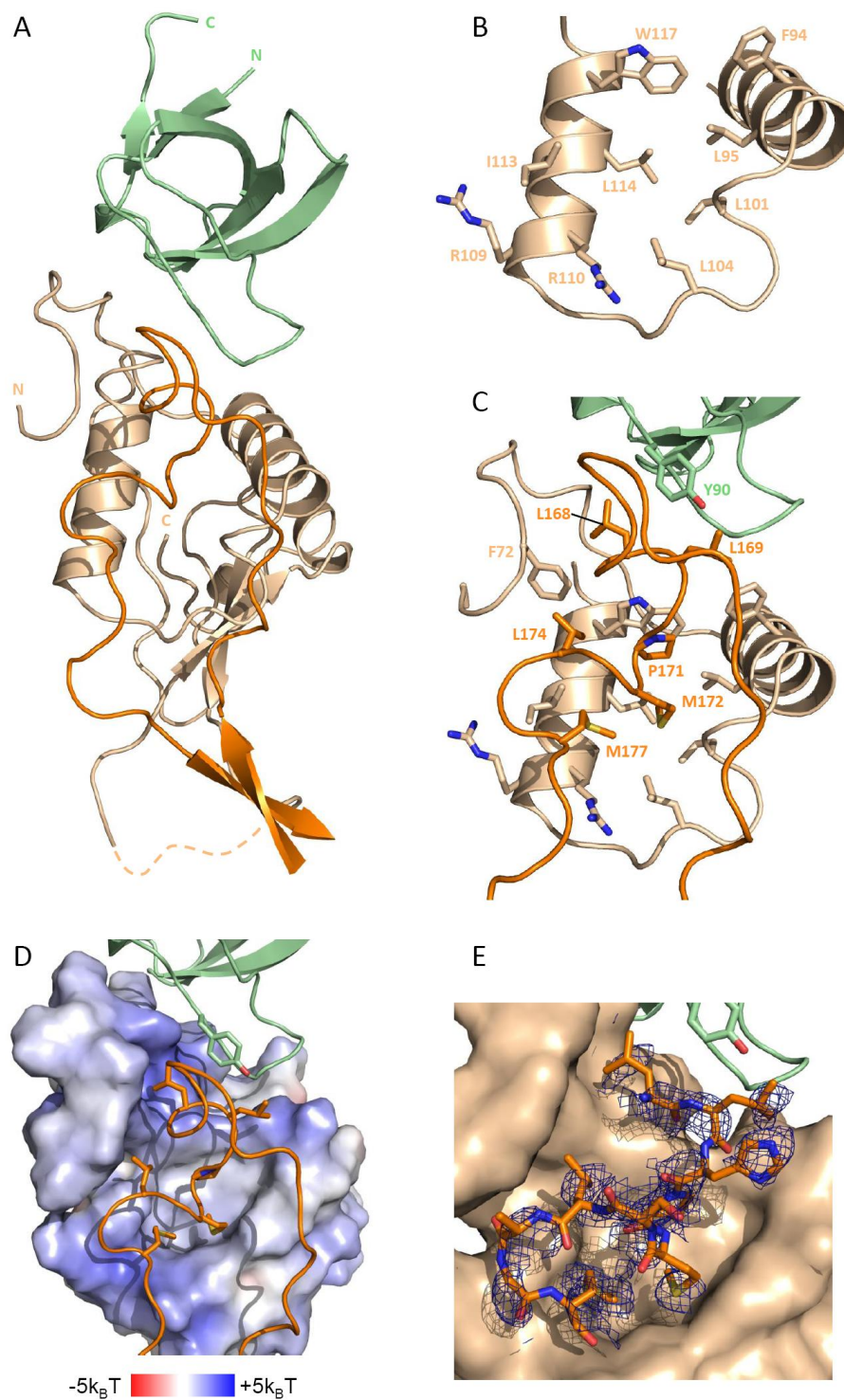


Abbildung 18: Das Nef/Nef-Homodimer in der Nef/SH3_{B6}-Struktur (grün: SH3_{B6}, beige: Nef A, orange: Nef B). (A) Die Dimerisierung von Nef wird durch die Interaktion der flexiblen Schleife von Nef B mit der hydrophoben Tasche von Nef A vermittelt. (B) Darstellung der hydrophoben Tasche von Nef A. (C) Interaktion der Aminosäuren in der Nef A/Nef B-Homodimer-grenzfläche. (D) Elektrostatisches Oberflächenpotential der hydrophoben Tasche von Nef A in der Nef A/Nef B-Homodimer-Kontaktfläche. (E) Elektronendichte (Omitkarte, $\sigma = 1$) der flexiblen Schleife von Nef B in der hydrophoben Tasche von Nef A.

Tabelle 4: Protein/Protein-Kontakte in der Nef-Dimerkontaktfläche. Interaktion der Aminosäuren 164-179 in der flexiblen Schleife von Nef (Nef B) mit der Kerndomäne des zweiten Nefs (Nef A) und der an Nef A gebundenen SH3_{B6}-Domäne (SH3B6 A) innerhalb von 4.0 Å.

Flexible Schleife von Nef (Nef B)			Bindungspartner				Distanz (Å)
Aminosäure	Position	Atom	Protein	Aminosäure	Position	Atom	
Asn	165	CB	SH3B6 A	Tyr	90	CG	3,78
Asn	165	CB	SH3B6 A	Tyr	90	CE2	3,95
Asn	165	CB	SH3B6 A	Tyr	90	CD2	3,64
Asn	165	CG	SH3B6 A	Tyr	90	CB	3,69
Asn	165	CG	SH3B6 A	Tyr	90	CG	3,72
Asn	165	CG	SH3B6 A	Tyr	90	CD2	3,94
Asn	165	ND2	SH3B6 A	Tyr	90	CB	3,41
Asn	165	ND2	SH3B6 A	Tyr	90	CG	3,63
Asn	165	ND2	SH3B6 A	Tyr	90	CD1	3,97
Asn	165	O	SH3B6 A	Tyr	90	CE2	3,88
Ser	167	O	Nef A	Trp	117	NE1	3,99
Leu	168	CA	Nef A	Trp	117	NE1	3,88
Leu	168	CD2	Nef A	His	120	ND1B	3,46
Leu	168	CD2	Nef A	His	120	CE1B	3,74
Leu	168	C	Nef A	Trp	117	NE1	3,61
Leu	168	O	Nef A	Trp	117	CD1	3,91
Leu	168	O	Nef A	Trp	117	NE1	2,76
Leu	168	O	Nef A	Trp	117	CE2	3,51
Leu	168	O	Nef A	Trp	117	CZ2	3,61
Leu	168	CB	SH3B6 A	Tyr	90	CE2	3,96
Leu	168	CB	SH3B6 A	Tyr	90	CD2	3,97
Leu	168	CD1	SH3B6 A	Tyr	90	CD2	3,72
Leu	168	CD1	SH3B6 A	Tyr	90	O	3,84
Leu	168	O	SH3B6 A	Pro	92	CB	3,8
Leu	168	O	SH3B6 A	Pro	92	CG	3,33
Leu	168	O	SH3B6 A	Pro	92	CD	3,96
Leu	169	O	Nef A	Phe	94	CZ	3,83
Leu	169	CA	SH3B6 A	Pro	92	CB	3,7
Leu	169	CB	SH3B6 A	Tyr	90	OH	3,17
Leu	169	CG	SH3B6 A	Tyr	90	OH	3,68
Leu	169	CD2	SH3B6 A	Tyr	90	OH	3,33
Pro	171	CB	Nef A	Trp	117	CG	4
Pro	171	CB	Nef A	Trp	117	CE2	3,83
Pro	171	CB	Nef A	Trp	117	CD2	3,67
Pro	171	CB	Nef A	Trp	117	CE3	3,93
Pro	171	CG	Nef A	Leu	95	CD2	3,82
Pro	171	CG	Nef A	Trp	117	CE2	3,9
Pro	171	CG	Nef A	Trp	117	CZ3	3,99
Pro	171	CG	Nef A	Trp	117	CH2	3,86
Pro	171	CG	Nef A	Trp	117	CZ2	3,82
Pro	171	CD	Nef A	Trp	117	CE2	3,93
Pro	171	CD	Nef A	Trp	117	CZ2	3,74
Met	172	CG	Nef A	Gly	100	CA	3,15
Met	172	CG	Nef A	Gly	100	C	3,51
Met	172	CG	Nef A	Gly	100	O	3,65
Met	172	SD	Nef A	Gly	100	CA	3,82
Met	172	SD	Nef A	Gly	100	C	3,41
Met	172	SD	Nef A	Gly	100	O	3,19
Met	172	SD	Nef A	Leu	101	N	3,99
Met	172	SD	Nef A	Leu	104	CD2	3,97
Leu	174	CD1	Nef A	Trp	117	CB	3,94

Flexible Schleife von Nef (Nef B)			Bindungspartner				Distanz (Å)
Aminosäure	Position	Atom	Protein	Aminosäure	Position	Atom	
Leu	174	CD1	Nef A	Trp	117	CD1	3,98
Gly	176	N	Nef A	Ile	113	CD1	3,5
Gly	176	C	Nef A	Ile	113	CD1	3,49
Gly	176	O	Nef A	Ile	113	CD1	3,42
Met	177	N	Nef A	Ile	113	CD1	3,88
Met	177	CG	Nef A	Ile	113	CG2	3,83
Met	177	SD	Nef A	Arg	110	O	3,87
Met	177	SD	Nef A	Ile	113	CB	3,61
Met	177	SD	Nef A	Ile	113	CD1	3,99
Met	177	SD	Nef A	Ile	113	CG2	3,48
Met	177	CE	Nef A	Leu	104	CD2	3,73
Met	177	O	Nef A	Arg	110	NE	3,33
Met	177	O	Nef A	Arg	110	CZ	3,71
Met	177	O	Nef A	Arg	110	NH2	3,24
Glu	178	C	Nef A	Arg	110	NH2	3,66
Glu	178	O	Nef A	Arg	110	NH2	3,4
Asp	179	N	Nef A	Arg	110	NH2	3,63
Asp	179	CA	Nef A	Arg	110	NH2	3,43
Asp	179	OD1	Nef A	Arg	110	NH2	3,35

Die hier gelöste Struktur des HIV-1_{SF2} Nef/SH3_{B6}-Komplexes zeigt eine Homodimerisierung von Nef. In der Literatur finden sich mehrere Studien, die die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von Nef beschreiben (Kienzle et al. 1993; Grzesiek et al. 1996; Arold et al. 2000; Ye et al. 2004; Poe and Smithgall 2009). Abbildung 19 zeigt das von Arold *et al.* vorgeschlagene Nef-Homodimer ((Arold et al. 1997; Arold et al. 2000); PDB: 1EFN, 1AVZ). Die Dimerisierungsgrenzfläche liegt nach diesem Modell auf der Außenseite der Helix 4 und der anschließenden Schleife. Die Interaktion wird durch vier hydrophobe Wechselwirkungen jeweils zwischen F121 und Y115 eines Nef-Proteins und dem I109 und L112 des anderen Nef-Proteins sowie zwei Salzbrücken zwischen dem R105 des ersten mit dem D123 des zweiten Nefs und umgekehrt vermittelt (Nummerierung der Nef_{NL4-3} Nomenklatur entsprechend).

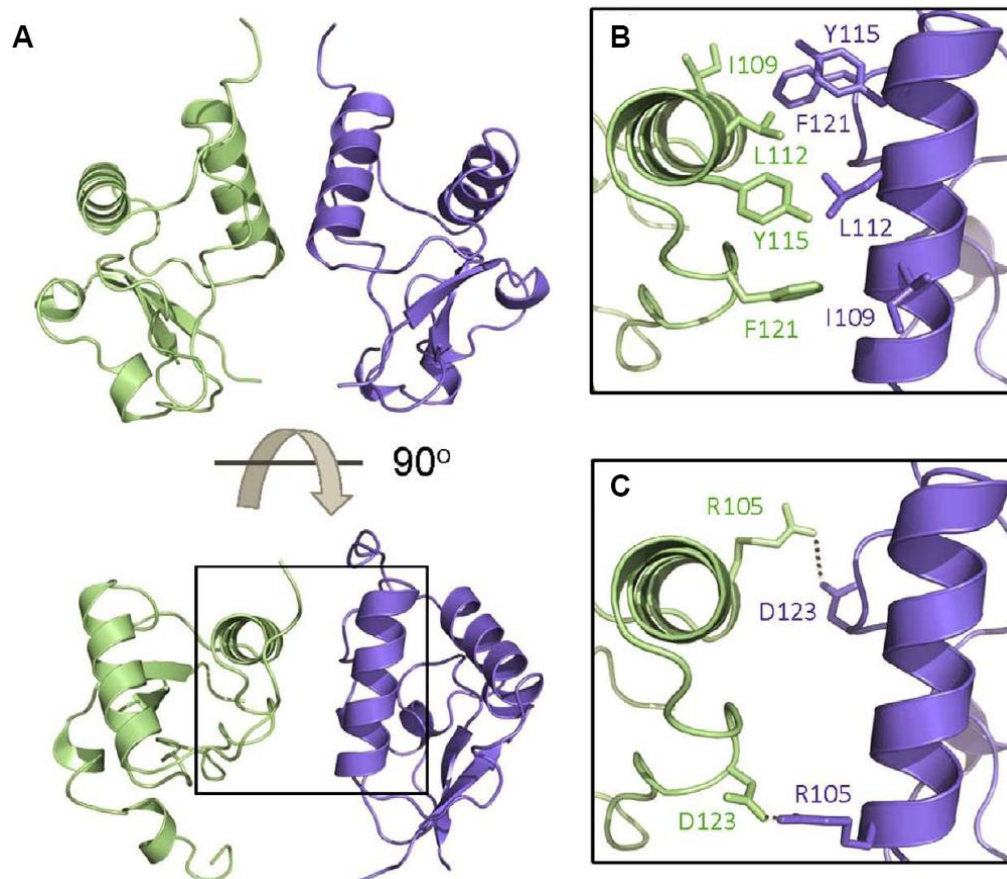


Abbildung 19: Nef-Dimermodell nach Arold *et al.* (A) Modell des Nef_{NL4-3} Homodimers ((Lee *et al.* 1996) PDB: 1EFN). (B) Darstellung der hydrophoben Wechselwirkungen in der Nef-Dimergrenzfläche (C) Darstellung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen R105 und D123. Abbildung modifiziert aus (Poe and Smithgall 2009).

Bei der Beobachtung von Proteinmultimeren in Proteinkristallstrukturen ist zu beachten, dass die Wechselwirkung unter Umständen auf die Kristallpackung zurückzuführen ist und somit als artifiziell betrachtet werden muss. Eine erste Abschätzung, ob eine potentiell biologisch relevante Protein/Protein-Wechselwirkung vorliegt, kann durch die Analyse der Kristallstruktur mittels des PISA-Servers (*Protein Interface, Surface and Assemblies*) vorgenommen werden (Krissinel and Henrick 2007). Hierbei wird die zu untersuchende Struktur mit bekannten, strukturell ähnlichen Proteinkomplexen verglichen und berechnet, ob der hypothetische Proteinkomplex stabil in wässriger Lösung vorliegen kann. Eine Analyse der Nef/SH3_{B6}-Struktur und der 1AVZ Struktur mittels dieses Servers ergab, dass das Nef/Nef-Homodimer aus der Nef/SH3_{B6}-Struktur stabil in Lösung vorliegen könnte, wohingegen das von Arold *et al.* vorgeschlagene Dimer als instabil und somit als kristallographisches Artefakt eingeordnet wurde (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Analyse der Nef/Nef-Homodimerkontaktfläche. Es wurden das Nef/SH3_{B6}-Dimer und das Nef/Fyn SH3-Dimer (PDB: 1AVZ) (Arold et al. 1997) mittels des PISA Servers analysiert (Krissinel and Henrick 2007). Theoretisch ist ein Komplex mit einem positiven ΔG^{diss} stabil. Da der Fehler für ΔG^{diss} bei dieser Methode bei ± 5 kcal/mol liegt, wird ein Komplex ab einem $\Delta G^{diss} > 5$ kcal/mol als stabil angenommen. Die angegebenen Werte beziehen sich auf das jeweilige Nef/Nef-Homodimer ohne die jeweils gebundenen SH3-Domänen.

Struktur	Nef/SH3 _{B6} -Dimer	Nef/Fyn SH3 (1AVZ)
Oberfläche (Å ²) des Nef/Nef-Dimers	15480	11257,6
Kontaktfläche (Å ²) des Nef/Nef-Dimers	3390	885,1
ΔG^{int} (kcal/mol)	-21,0	-5,5
ΔG^{diss} (kcal/mol)	19,3	-3,7
$T\Delta S^{diss}$ (kcal/mol)	12,2	11,1

4.1.3 Biochemische Untersuchungen an HIV-1_{SF2} Nef

Um die Vorhersagen der PISA-Analyse zu testen und die biologische Relevanz des in der Kristallstruktur beobachteten Nef-Dimers zu überprüfen, wurden Nef-Mutanten hergestellt. Es wurden die Aminosäuren M172 und M177 in Nef_{45-210,C59S} zu Alanin (Nef_{MAMA}) bzw. zu Glutamat (Nef_{MEME}) mutiert, um die Affinität der flexiblen Schleife zur hydrophoben Tasche zu reduzieren. Der Oligomerisierungszustand von Nef soll in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen mittels analytischer Gelfiltration und Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, engl.: *small angle x-ray scattering*) untersucht werden.

Analytische Größenausschlusschromatographie:

In Abbildung 20 sind die Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration des Komplexes aus Nef_{45-210,C59S} und der SH3_{B6}-Domäne bei einer Konzentration von 0,1 mM und 1 mM dargestellt. In der Literatur ist beschrieben, dass Nef bei einer Konzentration von 0,1 mM hauptsächlich als Monomer und bei 1 mM hauptsächlich als Dimer vorliegt (Arold et al. 2000). In der hier durchgeführten analytischen Gelfiltration konnte jedoch keine Verschiebung des Elutionspeaks beobachtet werden, welche auf unterschiedliche Oligomerisierungszustände des Komplexes in den verwendeten Konzentrationen schließen lassen würde. Der Komplex eluiert als einzelner Peak bei einer Retentionszeit, die einem globulären Protein von etwa 50 kDa entspricht, wie der Vergleich mit dem verwendeten Größenstandard zeigt. Der Komplex von Nef_{45-210,C59S} und SH3_{B6} hat ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa, so dass die Elution demnach bei einer Masse

erfolgt, die einem Dimer entsprechen würde. Da das Nef-Protein große flexible Bereiche aufweist, welche das Elutionsverhalten des Proteins beeinflussen könnten, lässt sich durch den Vergleich mit dem Größenstandard jedoch nicht auf den Oligomerisierungszustand schließen.

Abbildung 20B zeigt die Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration von Nef₄₅₋₂₁₀ in unterschiedlichen Konzentrationen. Als Laufpuffer wurde 20 mM Hepes pH 8,0 und 100 mM NaCl verwendet. Da das Cystein an Position 59 in diesem Protein nicht wie bei den für die Kristallisation verwendeten Proteinen durch Serin ersetzt wurde und der Laufpuffer zudem kein Reduktionsmittel enthält, ist eine Oligomerisierung des Proteins durch Ausbildung einer Disulfidbrücke möglich. Das Protein eluiert in zwei Peaks, einem kleineren Peak nach einem Retentionsvolumen von ~10,5 ml und einem größeren Peak nach ~12 ml. Wird das Experiment mit einem Laufpuffer, welcher 2 mM TCEP als Reduktionsmittel enthält wiederholt, sinkt die Größe des Elutionspeaks bei 10,5 ml. Dies zeigt, dass die Elution des Proteins in zwei Peaks auf die Formierung einer Disulfidbrücke (S-S) zwischen zwei Nef-Molekülen zurückzuführen ist. Das nur zwei Peaks beobachtet werden deutet darauf hin, dass in dem Peak bei 12 ml das Nef-Monomer und in dem Peak bei 10,5 ml das Nef-S-S-Nef-Dimer eluiert. Würde in dem Peak bei 12 ml ein Nef/Nef-Dimer eluieren müssten durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwei neue Peaks, ein Nef/Nef-S-S-Nef-Trimer- und ein Nef-S-S-Nef/Nef-S-S-Nef-Tetramerpeak entstehen. Neben den beiden Peaks bei 10,5 und 12 ml, wird zudem noch ein Peak im Ausschlussvolumen beobachtet. Dies lässt auf einen geringen Anteil an Aggregation schließen. Diese Aggregate wurden nicht beobachtet, wenn Nef im Komplex mit der SH3_{B6}-Domäne vorliegt.

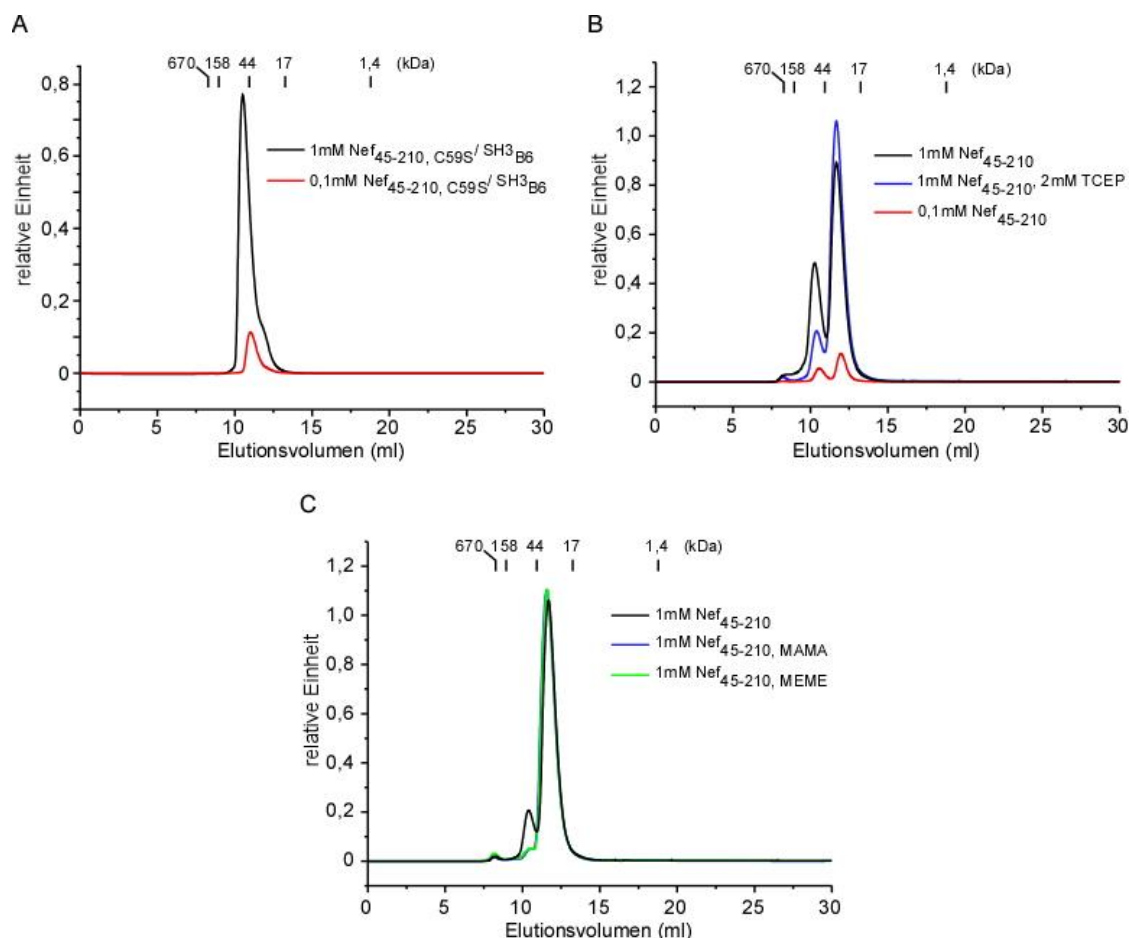


Abbildung 20: Analytische Größenausschlusschromatographie von Nef und Nef-Mutanten.
 (A) Komplex aus Nef_{45-210,C59S} und SH3_{B6}. (B) Nef₄₅₋₂₁₀. (C) Nef-Mutanten: Nef₄₅₋₂₁₀ M_{172A}, M_{177A} und M_{172E}, M_{177E}. Es wurde eine 10/30 Superdex 75 (GE Healthcare) Säule und 20 mM Hepes, pH 8,0, 100mM NaCl als Laufpuffer verwendet.

Um den Einfluss der Aminosäuren in der flexiblen Schleife, welche in der hier gelösten Kristallstruktur die Komplexbildung vermitteln, auf eine mögliche Dimerisierung zu untersuchen, wurden die Methionine 172 und 177 durch Alanin (Nef_{MAMA}) bzw. Glutamat (Nef_{MEME}) ersetzt. Da diese Aminosäuren weniger hydrophob als Methionin und im Fall von Glutamat sogar negativ geladen sind, sollte die Affinität zu der hydrophoben Tasche von Nef reduziert sein. Wie in Abbildung 20C zu sehen ist, eluieren diese Nef-Varianten wie der Nef-Wildtyp. Auch wird ein geringer Anteil an Nef-Dimer sowie der Aggregationspeak beobachtet, obwohl in den untersuchten Konstrukten die zugänglichen Cysteine durch Serine ersetzt wurden.

SAXS-Experimente:

Da die bisherigen Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand des Nef-Proteins widersprüchliche Ergebnisse ergaben, sollte dessen Verhalten in Lösung mittels Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht werden. Aus den resultierenden Streuungskurven kann eine Struktur des Nef-Proteins mit niedriger Auflösung *ab initio* errechnet werden, in die die verschiedenen hochaufgelösten Nef-Strukturmodelle mittels *rigid body modeling* angepasst werden können. Hierzu wurden SAXS-Messungen am DESY-Synchrotron (Hamburg, Deutschland) an der X33 Röntgenquelle (Hasylab) aufgenommen. Die SAXS-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Weifeng Shang (Arbeitsgruppe Svergun, EMBL Hamburg) durchgeführt. Es wurden Kleinwinkelstreuungskurven von Nef_{45-210,C59S} sowie dem Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}-Komplex in unterschiedlichen Konzentrationen aufgenommen. Als Puffer wurde 20 mM Hepes pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP verwendet. Die Experimente mit dem Nef-Protein alleine ergaben, dass das Protein teilweise aggregiert oder in Oligomeren vorliegt, was die Berechnung einer *ab initio* Struktur unmöglich macht. Diese Beobachtung ist konsistent mit den in Gelfiltrationsexperimenten gemachten Beobachtungen, in denen Nef_{45-210,C59S} ebenfalls zu einem kleineren Anteil in höheren Oligomerisierungszuständen bzw. aggregiert vorliegt. Der Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}-Komplex hingegen liegt in den gemessenen Proben monodispers vor, was die Berechnung einer *ab initio* Struktur ermöglicht.

In Abbildung 21 ist die Streuungskurve des Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}-Komplexes bei einer Konzentration von 2 mg/ml dargestellt. Die Anpassung der gemessenen Nef/SH3_{B6}-Streuungskurve mit aus der Kristallstruktur des Nef/SH3_{B6}-Komplexes berechneten theoretischen Streuungskurven sowohl des Nef/SH3_{B6}-Dimers als auch eines Nef/SH3_{B6}-Monomers stimmen mit den gemessenen Kurven gut überein. Die Korrelation der Messkurve mit der 1EFN Struktur, welche die von Arold *et al.* vorgeschlagene Nef-Dimersierung zeigt bzw. einem Modell, welches durch die Überlagerung des 1EFN Komplexes mit der Nef/SH3_{B6}-Struktur erstellt wurde, ergaben hingegen eine geringere Übereinstimmung. Die Berechnung der *ab initio* Struktur ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

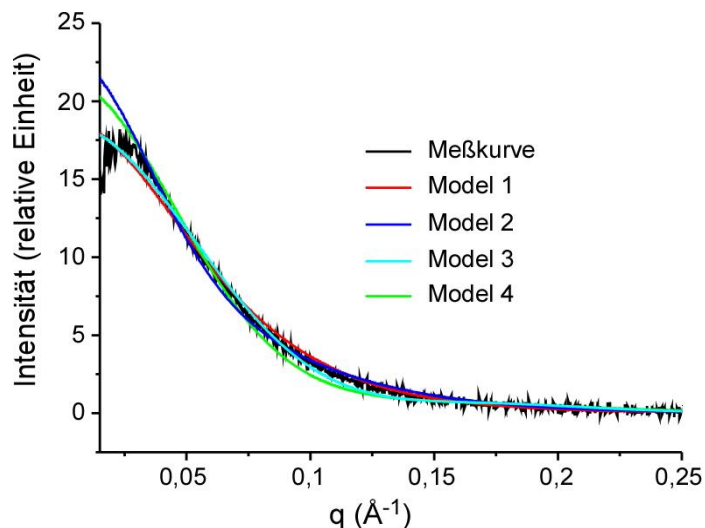
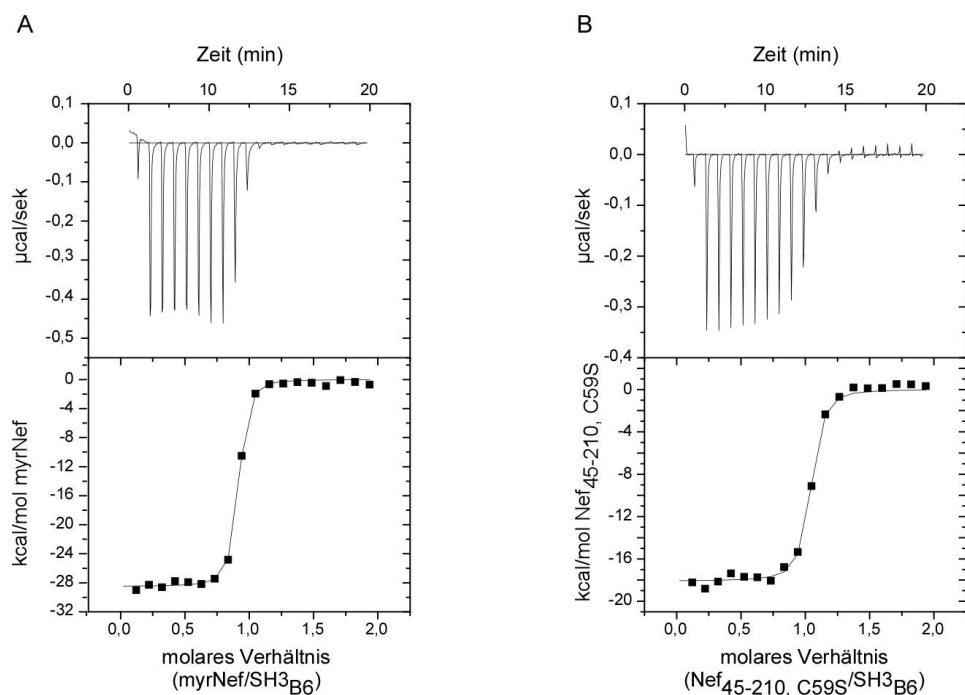


Abbildung 21: Experimentelle und theoretische Kleinwinkelstreuungskurven des $Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}$ -Komplexes. Es wurden die berechneten theoretischen SAXS-Streuungskurven verschiedener $Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}$ -Modelle auf die gemessene Streuungskurve des $Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}$ -Komplexes ($c = 2 \text{ mg/ml}$) angepasst. Hierfür wurde die Software CRY SOL (Version 2.7) verwendet (Svergun et al. 1995). Modell 1: $Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}$ -Monomer. Modell 2: $Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}$ -Dimer. Modell 3: 1EFN Dimer. Modell 4: Durch SSM-Überlagerung erstelltes Dimermodell des $Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}$ -Komplexes in der Dimerisierungsform der 1EFN-Struktur.

ITC-Experimente:

Um die Affinität der $SH3_{B6}$ -Mutante zu Nef_{SF2} zu bestimmen und um den Einfluss des N-Terminus einschließlich der N-terminalen Myristoylierung auf die Bindung der $SH3$ -Domäne zu untersuchen, wurden isothermale Titrationsexperimente mit unterschiedlichen Nef-Konstrukten und der $SH3_{B6}$ -Domäne durchgeführt. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Messungen dargestellt. Der K_D von myristoyliertem Nef (myrNef) und $SH3_{B6}$ beträgt 20 nM, der von $Nef_{45-210,C59S}$ und $SH3_{B6}$ beträgt 12 nM und liegt somit in derselben Größenordnung. Die Affinität von Nef zu der modifizierten $SH3$ -Domäne ist demnach nicht von den N-terminalen 45 Aminosäuren und der Myristoylierung abhängig.



	K_D	ΔH°	$T\Delta S^\circ$	ΔG°	molares
	(μM)	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(kcal/mol)	Verhältnis
myrNef/ SH3_{B6}	0,020	-18,09	-7,57	-10,52	0,998
	$\pm 0,004$	$\pm 0,17$			$\pm 0,005$
Nef _{45-210, C59S} / SH3_{B6}	0,012	-28,49	-17,71	-10,78	0,869
	$\pm 0,002$	$\pm 0,17$			$\pm 0,00263$

Abbildung 22: Abhängigkeit der Affinität zwischen der SH3_{B6} -Domäne und Nef vom myristoyliertem N-Terminus von Nef. ITC-Messung der Affinität von Nef_{45-210, C59S} und myrNef zu der SH3_{B6} -Domäne. (A) Titration von 0,1 mM myrNef in 0,01 mM SH3_{B6} . (B) Titration von 0,1 mM Nef_{45-210, C59S} in 0,01 mM SH3_{B6} . Es wurden je 19 Injektionen mit 4 μl pro Injektion durchgeführt. Als Puffer wurde 20 mM HEPES pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP verwendet. Die Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

4.2 Strukturbiologische und biochemische Untersuchungen an SIV_{mac239} Nef

Eine Infektion mit einem pathogenen HIV oder SIV Stamm zeichnet sich durch eine chronische Überaktivierung der $CD4^+$ T-Zellen aus (Stevenson 2003). Dieses hat zwei Auswirkungen: Zum einen findet das Virus in diesen aktivierten Zellen optimale Replikationsbedingungen vor, zum anderen ist die Lebensdauer der T-Zellen deutlich reduziert. Beide Faktoren führen zu einer verstärkten Depletion der $CD4^+$ T-Zell-Population und somit zur Immundefizienz. Für die Aktivierung von T-Zellen ist die Erkennung von Antigen/MHC-Komplexen an der Oberfläche anderer Zellen durch den TCR verantwortlich. Die Nef-Proteine von nicht pathogenen SIV und HIV Stämmen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, die T-Zellaktivierung durch den TCR mittels Internalisierung der $CD3 \zeta$ -Untereinheit des TCR zu verhindern, wohingegen diese Funktion von Nef bei den pathogenen Stämmen evolutionär verloren gegangen ist (Schindler et al. 2006).

Die bisher gelösten Nef-Strukturen basieren auf den Genotypen HIV-1_{NL4-3} oder HIV-1_{SF2} welche beide $CD3 \zeta$ nicht internalisieren können. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die Struktur von SIV_{mac239} Nef, welches über diese Fähigkeit verfügt, gelöst werden. Ein weiteres Ziel ist die Bestimmung der Kristallstruktur von SIV_{mac239} Nef im Komplex mit der $CD3 \zeta$ -Untereinheit, sowie die Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Nef/ $CD3 \zeta$ -Interaktion mittels ITC-Experimenten. Die nachfolgenden Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Santiago Manrique (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund; Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt und sind zum Teil in dessen Bachelorarbeit beschrieben.

4.2.1 Darstellung der verwendeten Proteine und Proteinkomplexe

Für die vorliegende Studie wurden unterschiedliche SIV_{mac239} Nef und $CD3 \zeta$ -Konstrukte verwendet. Abbildung 23 zeigt die Domänenarchitektur von $CD3 \zeta$ sowie die verwendeten Konstrukte der zytoplasmatischen Domäne von $CD3 \zeta$. Die Proteinfragmente $CD3 \zeta_{59-164}$ und ζ_{71-135} wurden als GST-Fusionsprotein in BL21(DE3)-R3/Rosetta Zellen exprimiert und durch GST-Affinitätschromatographie isoliert. Anschließend wurde der GST-Affinitätsanker durch Verdau mit der TEV-Protease abgespalten und mittels Größenausschlusschromatographie gefolgt von einer weiteren Affinitätssäule von $CD3 \zeta$ getrennt. Die $CD3 \zeta$ -Peptide SNID1, SNID2k und

SNID21 wurden bei der Firma Biosynthan gekauft. Die zytoplasmatische Domäne von CD3 ζ beinhaltet zwei als SIV Nef *interaction domain* (SNID) bezeichnete Bereiche, welche an der Bindung an Nef beteiligt sein sollen (Schaefer et al. 2000). Die CD3 ζ -Konstrukte ζ_{59-164} und ζ_{71-135} umfassen beide SNIDs, wohingegen das SNID1 Peptid das N-distale und SNID2k und SNID2l das C-distale SNID-Motiv beinhalten.

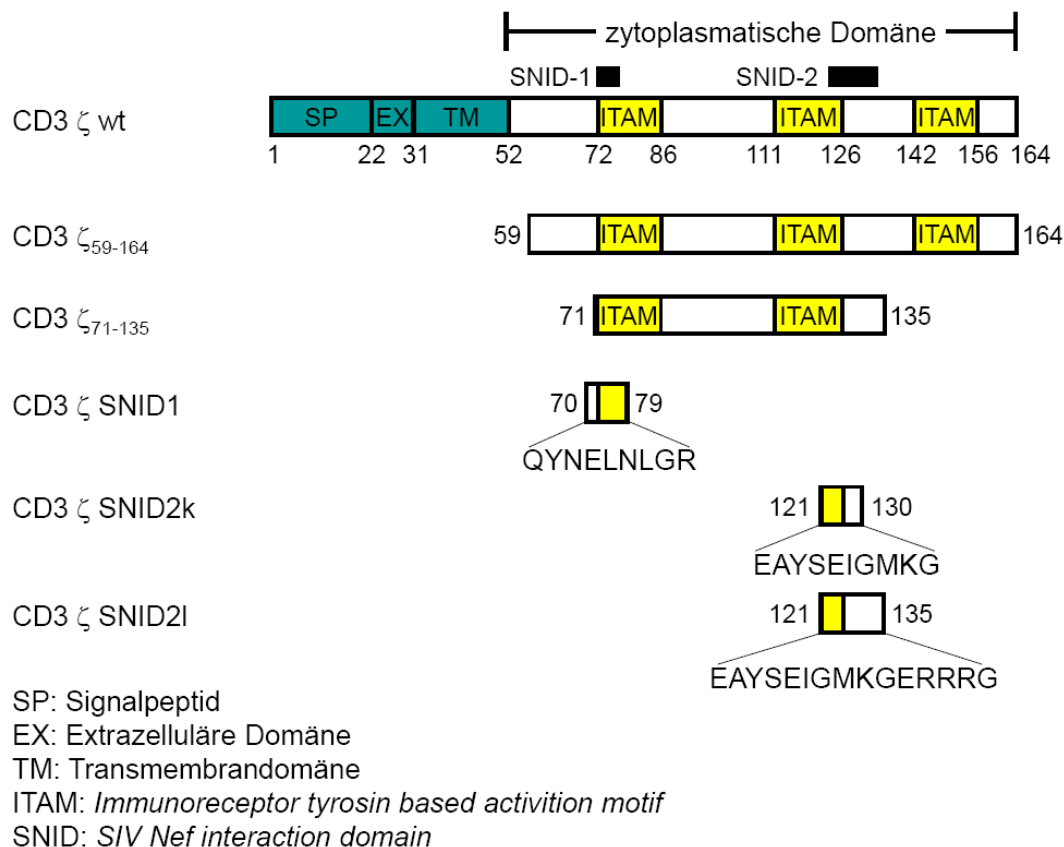


Abbildung 23: Domänenstruktur von CD3 ζ und schematische Darstellung der verwendeten CD3 ζ -Konstrukte.

Abbildung 24 zeigt ein Sequenzalignment der Aminosäuresequenz von HIV-1_{SF2} Nef und SIV_{mac239} Nef. Es ist zu sehen, dass SIV_{mac239} Nef 53 Aminosäuren länger als HIV Nef ist, wobei sich die zusätzlichen Aminosäuren ausschließlich in den flexiblen terminalen Bereichen befinden. Die Kerndomäne ist hingegen in Größe und Aminosäuresequenz stärker konserviert. Da bekannt ist, dass die Interaktion von SIV_{mac239} Nef und CD3 ζ durch die gefaltete Kerndomäne von Nef vermittelt wird (Schaefer et al. 2002), konnte das SIV Nef-Protein N- und C-terminal verkürzt werden. Dies ist für die durchgeführten Kristallisationsexperimente vorteilhaft, da die Termini flexibel und somit für die Proteinkristallisation hinderlich sind. Desweiteren sind große

unstrukturierte Bereich in Proteinen anfälliger für proteolytische Degradation während der Proteinisolierung, was die Darstellung homogener Proteinproben erschwert.

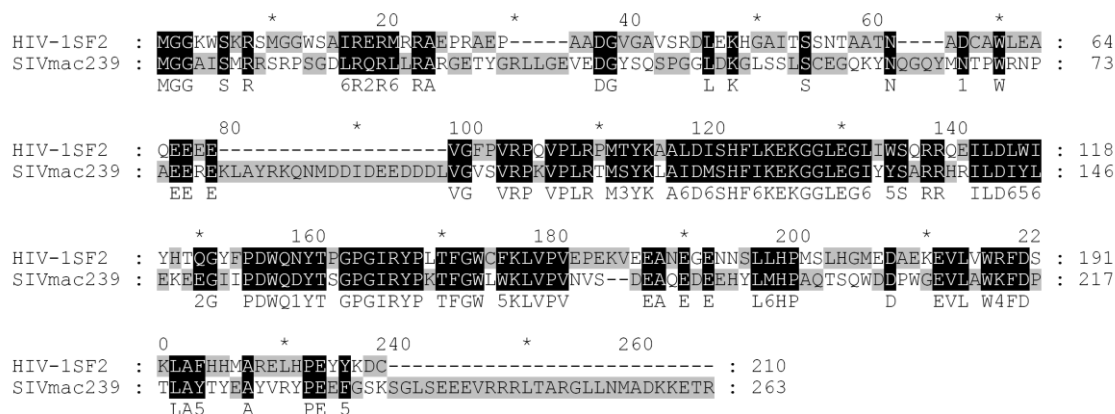


Abbildung 24: Sequenzalignment zwischen den Aminosäuresequenzen von HIV-1_{SF2} Nef und SIV_{mac239} Nef. Das Alignment wurde mit Hilfe von ClustalW2 durchgeführt (Thompson et al. 2002).

Das für die Experimente verwendete SIV_{mac239} Nef-Konstrukt umfasste die Aminosäuren 66-235 und wird im weiteren Verlauf als SIV B bezeichnet. Durch die Klonierung des offenen Leserasters mit NcoI und EcoRI in den Expressionsvektor (pGEX-4T1 tev) musste zudem die Aminosäure an Position zu 67 Alanin mutiert werden. Die Expression erfolgte als N-terminales GST-Fusionsprotein in BL21(DE3)-R3/Rosetta Zellen wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben. Die Reinigung (siehe Abschnitt 3.4.6) erfolgte mittels Affinitätschromatographie, wobei der GST-Anker anschließend durch Verdau mit der TEV-Protease abgespalten und mittels Größenausschlusschromatographie, gefolgt von einer weiteren Affinitätssäule von SIV B, getrennt wurde. Abbildung 25 zeigt die Analyse der verschiedenen Reinigungsschritte mittels SDS-PAGE.

Nach Abspaltung des GST-Ankers mit der TEV-Protease verbleiben vor der Aminosäure Met 66 des Nef-Proteins noch die Reste Gly und Ala. Mittels Koexpression wurden zudem binäre Komplexe aus SIV B und CD3 ζ -Konstrukten unterschiedlicher Länge formiert. Die Reinigung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die Reinigung des SIV B (siehe Abbildung 25B). Die CD3 ζ -Konstrukte umfassten die Aminosäuren 59-164 (CD3 ζ_{59-164}) bzw. 71-135 (CD3 ζ_{71-135}) und enthielten somit beide für die Bindung an Nef wichtigen SNID-Domänen.

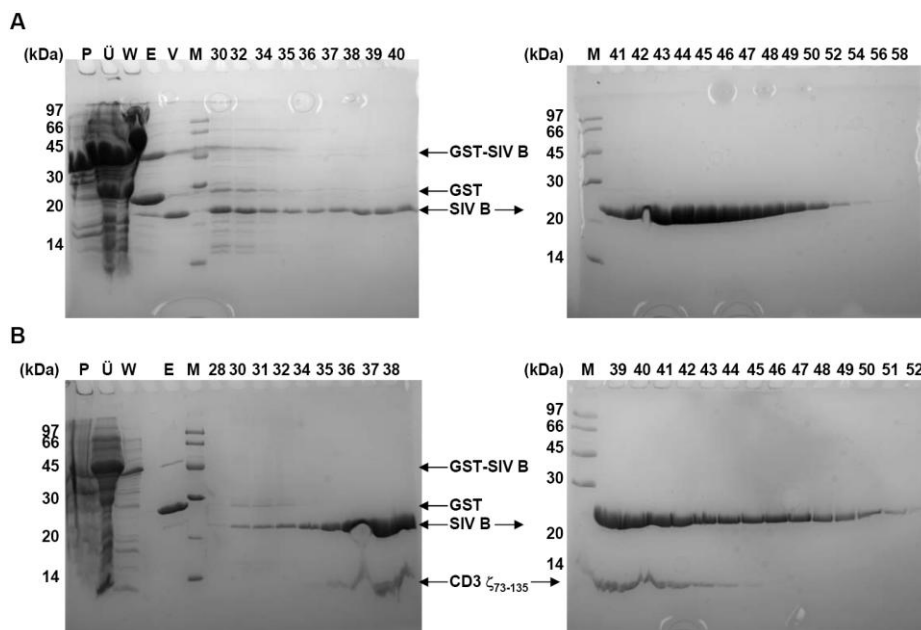


Abbildung 25: SDS-PAGE von SIV B und des Komplexes aus SIV B und CD3 ζ_{73-135} . Dargestellt sind die Reinigungsschritte der Isolierung von (A) SIV B und (B) des Komplexes aus SIV B und CD3 ζ_{73-135} . P: Zelltrümmersediment, Ü: Zellüberstand, W: Waschschrift, E: Elution des nichtverdauten Proteins, V: Protein nach TEV-Verdau, M: LMW-Marker, 30-58 (bzw. 28-52): Protein-haltige Fraktionen der präparativen Gelfiltration (16/60 Superdex 75, GE Healthcare). Für das Reinigungsprotokoll siehe Abschnitt 3.4.6.. Es wurden 20%ige Trenngele verwendet.

Das SIV B-Konstrukt beinhaltet das P_{104xxPxR}-Motiv von SIV_{mac239} Nef welches die Interaktion mit SH3-Domänen vermittelt. Die Affinität von SIV_{mac239} Nef und SH3-Domänen ist allgemein jedoch relativ schwach. Durch Hippakka *et al.* wurde mittels Phagedisplay eine mit höherer Affinität bindende Mutante (SH3_E) der Hck SH3-Domäne identifiziert (Hiipakka and Saksela 2002). In dieser Mutante wurde die Wildtyp Sequenz E₉₄AIHHE zu E₉₄GWVG verändert. Da die Kristallisation von Nef/SH3-Komplexen in der Vergangenheit bereits mehrfach erfolgreich war und der nichtgebundene Bereich um die Polyprolinhelix in SIV B für die Kristallisation eventuell zu flexibel sein könnte, wurde die SH3_E-Domäne als weiterer Nef-Bindungspartner exprimiert und isoliert. Die Expression erfolgte in BL21(DE3)-R3/Rosetta Zellen als N-terminales GST-Fusionsprotein. SH3_E wurde durch Affinitätschromatographie isoliert und der GST-Anker mit der TEV-Protease abgespalten. Anschließend wurde ein zweifacher molarer Überschuss der SH3_E-Domäne zu SIV B bzw. den SIV B/CD3 ζ -Komplexen zugegeben und der 1:1 bzw. 1:1:1 Komplex mittels Größenausschlusschromatographie (16/60 Superdex 75, GE Healthcare) isoliert. Zuvor wurde mittels analytischer

Größenausschlusschromatographie gezeigt, dass die Formierung eines ternären Komplexes aus SIV B, SH3_E und CD3 ζ möglich ist (siehe Abschnitt 4.2.2).



Abbildung 26: SDS-PAGE des Komplexes aus SIV B und SH3_E. Dargestellt sind die Protein-haltigen Fraktionen einer präparativen Gelfiltration (16/60 Superdex 75, GE Healthcare) von SIV B und SH3_E. Die Fraktionen 45-49 wurden vereinigt, konzentriert und für die nachfolgenden Experimente verwendet (M: LMW-Marker, 39-52: Fraktionen). Es wurde ein 20%iges Trenngel verwendet.

4.2.2 Biochemische Untersuchungen zur Interaktion von SIV_{mac239} Nef und seinen Bindungspartnern

Bestimmung der Bindungseigenschaften von SIV_{mac239} Nef an SH3_E und CD3 ζ mittels analytischer Gelfiltration:

Das in dieser Studie verwendete Nef-Konstrukt SIV B umfasst die Aminosäuren 66-235. Somit umfasst SIV B N-terminal einen flexiblen Bereich von 38 Aminosäuren vor dem PxxP Motiv von Nef. Folglich besteht die Möglichkeit die N-terminale flexible Region durch Bindung einer SH3-Domäne zu stabilisieren. SIV Nef hat im Gegensatz zu HIV Nef nur eine niedrige Affinität zu der Hck SH3-Domäne. Durch Hiipakka *et al.* wurde jedoch mittels Phage-Display eine modifizierte Hck SH3-Domäne identifiziert welche eine erhöhte Affinität zu SIV_{mac239} Nef aufweist. Um die Eignung der im weiteren SH3_E genannten Domäne für die geplanten Kristallisationsexperimente zu untersuchen, wurden die Bindungseigenschaften mittels analytischer Gelfiltration und ITC untersucht. Da eines der Ziele dieser Arbeit die Lösung einer Kristallstruktur von SIV Nef im Komplex mit der zytoplasmatischen Domäne von CD3 ζ ist, sollte zudem untersucht werden, ob eine gleichzeitige Bindung von CD3 ζ und SH3_E an SIV_{mac239} Nef möglich ist.

Um die Bindungseigenschaften von SIV Nef zu SH3_E und CD3 ζ zu charakterisieren, wurde das Elutionsverhalten experimentell in einer Größenausschlusschromatographie untersucht. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 1 mg/ml und als Laufpuffer wurde 20 mM Hepes, 100 mM NaCl und 1 mM TCEP verwendet. Abbildung 27 zeigt die Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration von SIV B, den Heterodimeren SIV B/SH3_E und SIV B/CD3 ζ_{71-135} , sowie dem ternären SIV B/SH3_E/CD3 ζ_{71-135} Komplex. SIV B eluiert mit einer Retentionszeit von 12,5 ml von der Säule, wohingegen die Heterodimere SIV B/SH3_E und SIV B/CD3 ζ_{71-135} früher bei 12,25 bzw. 11 ml eluieren. Der ternäre SIV B/SH3_E/CD3 ζ_{71-135} Komplex eluiert noch früher bei 10,4 ml. Dies zeigt, dass eine gleichzeitige Bindung von Nef an die SH3_E-Domäne und an CD3 ζ_{71-135} möglich ist. Die Gelfiltrationsexperimente zeigen zudem, dass CD3 ζ_{71-135} im Unterschuss zu SIV B vorliegt, da weiterhin ein kleinerer Peak nach 12,5 (SIV B/CD3 ζ_{71-135}) bzw. 12,25 ml (SIV B/SH3_E/CD3 ζ_{71-135}) auftritt.

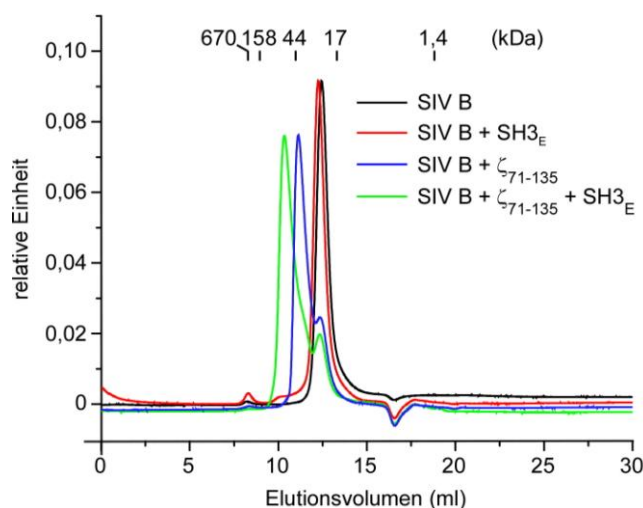


Abbildung 27: Analytische Größenausschlusschromatographie zur Analyse der Komplexbildung zwischen SIV B, SH3_E und CD3 ζ_{71-135} Es wurde eine analytische Gelfiltration (10/30 Superdex 75, GE Healthcare) von je 1 mM SIV B (schwarz), SIV B/SH3_E (rot), SIV B/ ζ_{71-135} (blau), SIV B/ ζ_{71-135} /SH3_E (grün) durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 20 mM Hepes pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP verwendet.

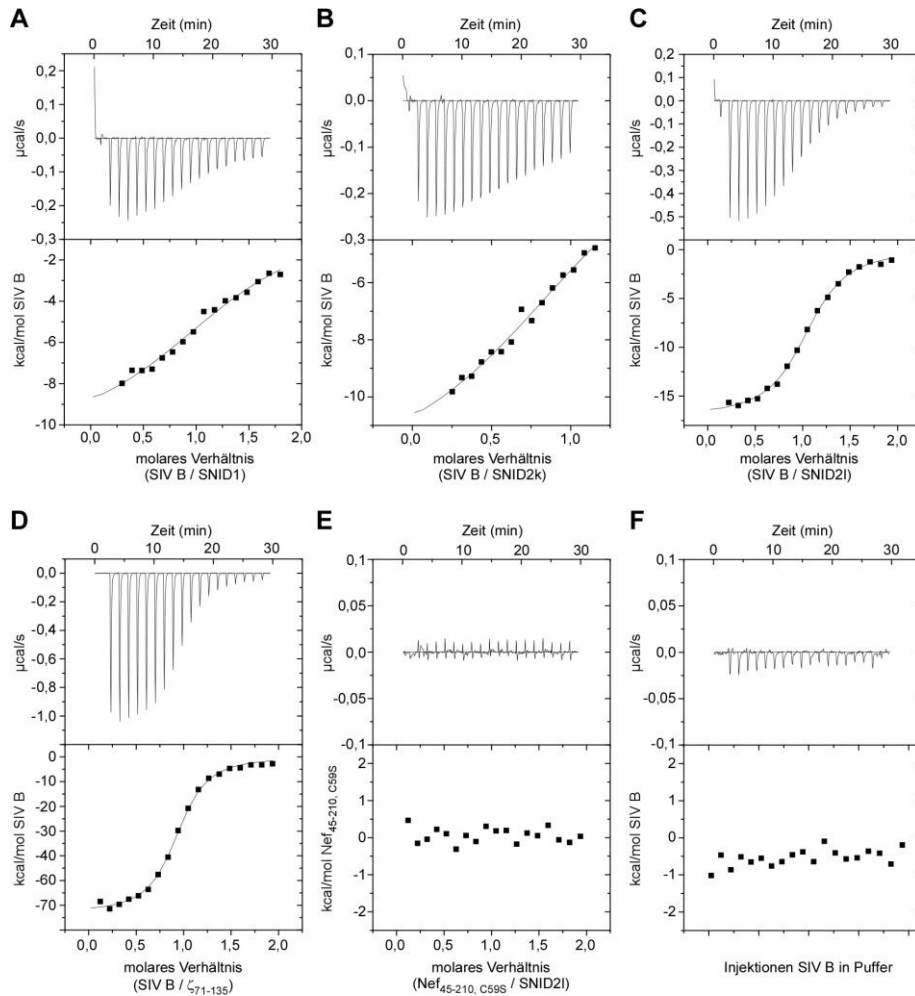
Bestimmung der Affinität zwischen CD3 ζ und HIV/SIV Nef mittels ITC:

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Affinität von SIV und HIV Nef zur zytoplasmatischen Domäne der CD3 ζ -Untereinheit bestimmt werden. Hierfür wurden ITC-Messungen mit SIV B bzw. HIV Nef und unterschiedlichen CD3 ζ -Peptiden

durchgeführt. Die synthetischen CD3 ζ -Peptide wurden als TFA-Salz bezogen und mit einer Konzentration von ~50 mg/ml in Wasser aufgenommen. Für ITC-Messungen ist es von großer Bedeutung, dass die beiden Bindungspartner in identischen Pufferbedingungen vorliegen, um während der Titration eine Wärmetönung durch Pufferunterschied zu vermeiden. Da diese Peptide aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts (1-1,7 kDa) nicht mit kommerziell erhältlichen Dialysemembranen ohne hohen Verlust dialysiert werden können, wurden die Peptide bei den ITC-Messungen in möglichst hoher Verdünnung eingesetzt um den TFA-Gehalt in der Probe so gering wie möglich zu halten. Die Peptide wurden mit einer Konzentration von 20 μ M in die ITC-Kammer vorgelegt und das Nef-Protein in einer Konzentration von 200 μ M titriert.

Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der ITC Titrationsexperimente zwischen SIV_{mac239} bzw. HIV_{SF2} Nef und unterschiedlichen CD3 ζ -Konstrukten. Die Affinität des CD3 ζ -Peptids, welches das N-distale SNID-Motiv beinhaltet, zu SIV B (SNID1) liegt bei 4,8 μ M. Die Affinität des kürzeren der beiden Peptide, welche das C-distale SNID beinhaltet (SNID2k), liegt bei 6,94 μ M, wohingegen das längere Peptid (SNID2l) eine erhöhte Affinität von 0,83 μ M aufweist. Die Affinität des CD3 ζ_{71-135} -Konstrukts, welches beide SNIDs umfasst beträgt 0,3 μ M und weist somit eine Affinität in derselben Größenordnung wie das SNID2l-Peptid auf. Die Stöchiometrie der Bindung zwischen SIV_{mac239} Nef und CD3 ζ beträgt in allen Fällen ungefähr 1:1. Wie in Abbildung 28E zu sehen, zeigt HIV-1_{SF2} Nef_{45-210,C59S} erwartungsgemäß keine Affinität zu SNID2l.

Die Anpassungen der in Abbildung 28A und B gezeigten Titrationsexperimente weisen nicht den erwarteten sigmoidalen Kurvenverlauf auf. Des Weiteren wird in beiden Fällen ein molares Verhältnis errechnet, welches im Vergleich zu den anderen durchgeführten Experimenten stärker von dem erwarteten Wert 1 abweicht. Dies lässt darauf schließen, dass die Konzentration der Peptide SNID1 und SNID2k unter der nominellen Konzentration von 20 μ M liegt. Dies könnte auf die Präzipitation einer Teilmenge des eingesetzten Peptids während der Probenpräparation zurückzuführen sein.



	K_D (μM)	ΔH° (kcal/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kcal/mol)	ΔG° (kcal/mol)	molares Verhältnis
SIV B/SNID1	4,81	-14,13	-6,87	-7,26	0,753
	$\pm 0,96$	$\pm 0,72$			$\pm 0,024$
SIV B/SNID2k	6,94	-14,95	-7,90	-7,05	0,857
	$\pm 1,58$	$\pm 1,2$			$\pm 0,02$
SIV B/SNIDl	0,83	-17,77	-9,48	-8,29	0,959
	$\pm 0,06$	$\pm 0,154$			$\pm 0,069$
SIV B/ ζ_{71-135}	0,30	-57,48	-48,60	-8,88	1,09
	$\pm 0,02$	$\pm 0,515$			$\pm 0,08$

Abbildung 28: Untersuchung der Wechselwirkung von SIV/HIV Nef und CD3 ζ mittels ITC.

(A) Titration von 200 μM SIV B in 20 μM CD3 ζ SNID1. (B) Titration von 200 μM SIV B in 20 μM CD3 ζ SNID2k. (C) Titration von 200 μM SIV B in 20 μM CD3 ζ SNID2l. (D) Titration von 200 μM SIV B in 20 μM CD3 ζ_{71-135} . (E) Titration von 200 μM HIV-1_{SF2} Nef_{45-210, C59S} in 20 μM CD3 ζ SNID2l. (F) Titration von 200 μM SIV B in Puffer. Es wurden je 19 Injektionen mit 4 μl pro Injektion durchgeführt. Als Puffer wurde 20 mM Hepes pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP verwendet. Die Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

4.2.3 Strukturbiologische Untersuchungen an SIV_{mac239} Nef

Wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, wurden zur Identifizierung initialer Kristallisationsbedingungen Hochdurchsatzscreens der Firma Qiagen verwendet. In 96-well sitting drop Platten (Corning 3553) wurden je 70 μl der jeweiligen Pufferbedingungen in das Reservoir vorgelegt und mit Hilfe eines Mosquito Pipettierroboters je 0,1 μl Proteinlösung mit 0,1 μl Reserviirlösung vermischt. Die Platten wurden versiegelt, bei 20°C inkubiert und fortlaufend auf Kristallbildung hin untersucht. Es wurden die Screens JCSG+, JCSG core I-IV, PEG, PEG II, *protein complex* und AmSO₄ verwendet.

Es wurden Kristallisationsexperimente mit SIV B, einem Komplex aus SIV B und SH3_E, einem Komplex aus SIV B und dem CD3 ζ_{75-135} , sowie einem ternären Komplex aus SIV B, SH3_E und CD3 ζ_{75-135} durchgeführt. Je Protein bzw. Proteinkomplex wurden 9 mg/ml und 18 mg/ml Gesamtproteinkonzentration in die Versuchsreihen eingesetzt. Für SIV B alleine und die Komplexe, welche CD3 ζ_{75-135} beinhalten, konnten keine Bedingungen identifiziert werden, die die Kristallisation der Proteine ermöglichten. Zudem wiesen die Kristallisationsexperimente mit den CD3 ζ_{75-135} beinhaltenen Proteinkomplexen einen hohen Anteil an Bedingungen auf in denen Phasentrennung auftrat.

Für den 1:1 Komplex aus SIV B und SH3_E konnten erste Kristalle unter der Bedingung 20% PEG3350, 0,2 M Tri-Lithium-Citrat hergestellt werden. In nachfolgenden Experimenten wurden die PEG3350 und Tri-Lithium-Citrat Konzentration systematisch variiert um die Kristallisationsbedingung zu optimieren. Desweiteren wurden unterschiedliche pH-Wert/ PEG-Verhältnisse und Additive getestet (siehe Abbildung 29). In der Bedingung 12% PEG3350, 0,15 M Tri-Lithium-Citrat, 1% 1,6 Hexandiol konnten bei einer Proteinkonzentration von 9 mg/ml Kristalle gezüchtet werden, die am SLS-Synchrotron (Villingen, Schweiz) bis zu einer Auflösung von 3,0 Å streuten. Die Kristalle wuchsen innerhalb von einer Woche zu ihrer finalen Größe 150 μm x 150 μm an und gehörten zur Raumgruppe P3₂.

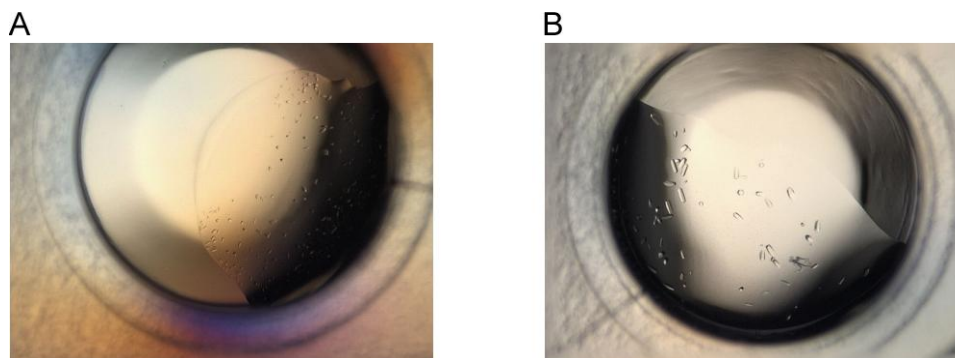


Abbildung 29: Kristalle des Komplexes aus SIV B und der SH3_E-Domäne. (A) SIV B/SH3_E-Kristalle aus dem PEG Screen (Qiagen) (20% PEG3350, 0,2 M Tri-Lithium-Citrat). (B) SIV B/SH3_E-Kristalle aus dem HT Additive Screen (Hampton) (23% PEG3350, 0,27 M Tri-Lithium-Citrat, 0,27 % 1,6 Hexandiol).

Tabelle 6: Kristallographische Statistik der SIV_{mac239} Nef/SH3_E-Struktur.

Datenaufnahme und Kristall	
Röntgenquelle	SLS X10SA
Wellenlänge (λ)	0,99999
Raumgruppe	P3 ₂
a, b, c, (Å); α, β, γ (°)	a = b = 103,66; c = 53,141; α = β = 90, γ = 120
Auflösung (Å)	3,0 Å
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da)	3,11
Lösungsmittelgehalt (%)	60,42
Anzahl der Reflexe	71874
Anzahl der einzigartigen Reflexe	12797
Vollständigkeit (%)	100
Redundanz	5,6
R _{sym} ^a	13,2
I/σ(I)	11,98
Verfeinerung	
Auflösungsbereich	45-3,0 Å
R-Faktor (%)	19,19
R _{free} (%)	22,51
Atome (Protein, Lösungsmittel)	3179
Wasser	100
Durchschnittlicher B-Wert	52,97
Rmsd vom Idealwert	
Bindung	0,009
Winkel	1,159
Ramachandran Plot	
Favorisiert (%)	93,02
Erlaubt (%)	5,03
Verboten (%)	1,96
Fehlende Aminosäuren	94

Die Struktur des SIV B/SH3_E-Komplexes wurde mittels molekularem Ersatz mit der durch Kim et al. publizierten SIV Nef-Struktur ((Kim et al. 2010), PDB: 3IK5) gelöst. Der molekulare Ersatz wurde mit dem Programm phaser (Version 2.1.4) aus dem CCP4 Softwarepaket durchgeführt. Die anschließende automatische Verfeinerung wurde mit dem Programm phenix.refine (Version 1.5-2) und die manuelle Verfeinerung mit Hilfe des Programms Coot (Version 0.6) durchgeführt. Die Kristallparameter, sowie die Statistiken der Datenaufnahme und der Modelverfeinerung sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Abbildung 30 zeigt die asymmetrische Einheit des Komplexes, welche aus einem Dimer aus Nef/SH3_E-Heterodimeren besteht. Das Strukturmodell umfasst die Aminosäuren 103 bis 233 des eingesetzten SIV_{mac239} Nef₆₆₋₂₃₅ (SIV B), sowie die Aminosäuren 80 bis 134 der SH3_E-Domäne. Alle weiteren in den Proteinkonstrukten enthaltenen Aminosäuren konnten nicht in das Modell integriert werden und liegen im Kristall vermutlich ungeordnet vor. Insbesondere der unstrukturierte N-terminale Teil von Nef, welcher die Aminosäuren 66 bis 102 umfasst, könnte dafür verantwortlich sein, dass trotz umfassender Experimente zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen keine Kristalle mit besseren Röntgenbeugungseigenschaften als 3,0 Å hergestellt werden konnten.

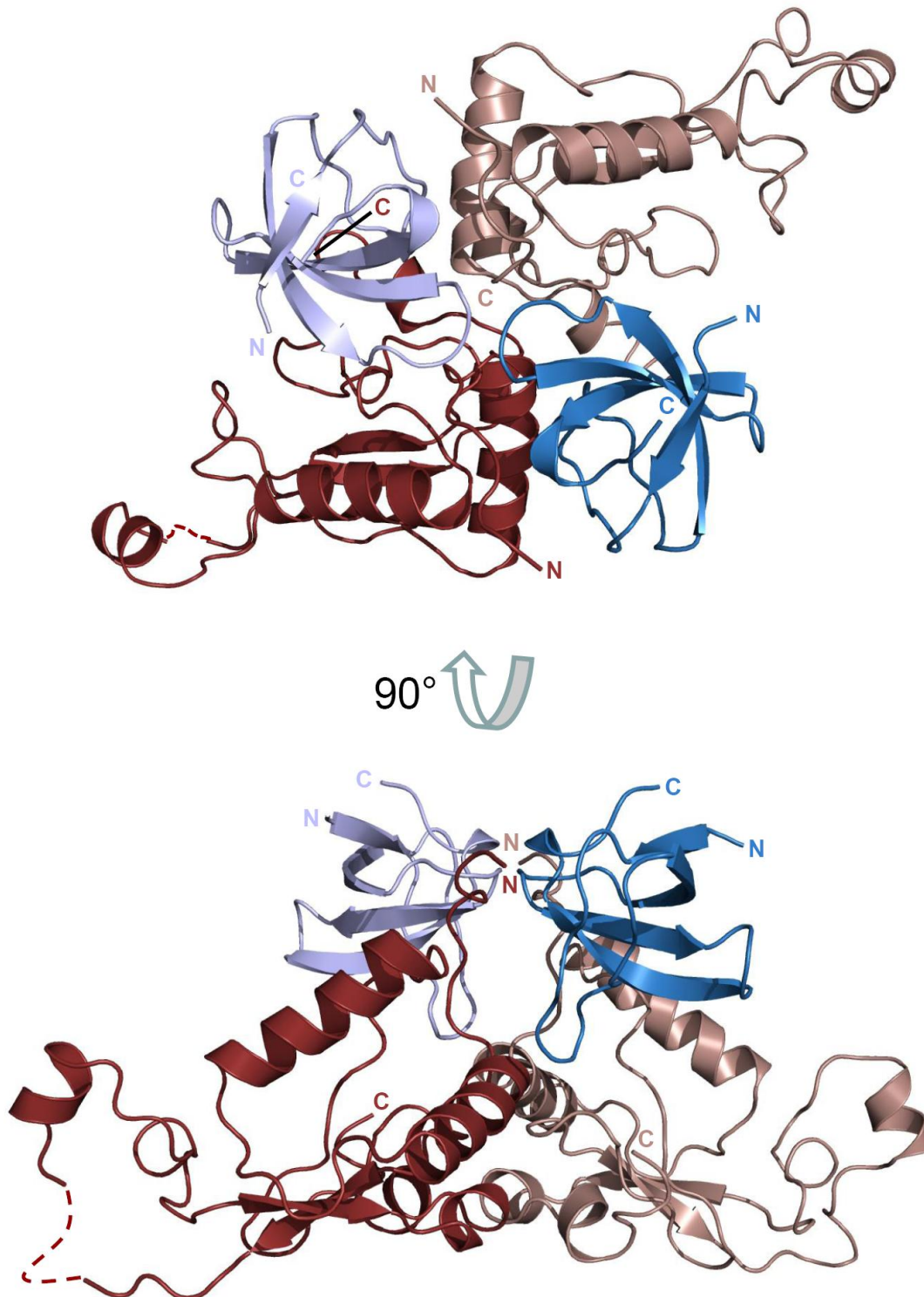


Abbildung 30: *Asymmetrische Einheit des SIV_{mac239} Nef/SH3_E-Kristalls.* Gezeigt ist die Kristallstruktur des Komplexes aus SIV B (rot/weinrot) und der SH3_E-Mutante (blau/lila). Das hier dargestellte Tetramer aus zwei SIV B/SH3_E-Heterodimeren stellt die asymmetrische Einheit des Kristalls dar.

Abbildung 31A und C zeigen die Kontaktflächen des Komplexes aus SIV_{mac239} Nef₆₆₋₂₃₅ (SIV B) und der Hck SH3_E-Mutante. Die Wechselwirkung zwischen SIV_{mac239} Nef und der SH3_E-Domäne findet an zwei Grenzflächen statt. Zum einen bindet Nef mittels seines P_{104xxPxR}-Motivs an die Aminosäuren Tryptophan 113, Asparagin 130 und Tyrosin 131 in der SH3-Domäne. Das Arginin des P_{104xxPxR}-Motivs geht zudem elektrostatische Wechselwirkungen mit dem D95 der SH3-Domäne ein. Zum anderen insertiert das Tryptophan 91 (W91) in der RT-Schleife der SH3_E-Domäne, oberhalb der Aminosäuren Tyrosin Y145 und Phenylalanin F122 von Nef, in die hydrophobe Tasche zwischen den Helices drei und vier, während das nachfolgende Tryptophan 92 (W92) mit der äußeren Seite der Helix drei interagiert. Der Raum zwischen den Helices drei und vier bildet die sogenannte hydrophobe Tasche von Nef. Diese wird in SIV Nef durch die Aminosäuren F122 und Y145 und in HIV_{SF2} Nef durch die Aminosäuren F94 und W117 in einen oberen und einen unteren Bereich geteilt. Die Seitenkette von F122_{SIV} ist in dieser Struktur durch die Wechselwirkung mit dem W91 der SH3-Domäne im Vergleich zu der Position des F94 in der HIV-1_{SF2} Nef-Struktur verschoben (siehe Abbildung 31B). Da zudem die Y145_{SIV} Seitenkette kleiner ist als die des W117_{HIV}, vergrößert sich der Abstand zwischen den Aminosäureseitenketten von 3,7 Å für F94/W117 in HIV-1 Nef auf 5,6 Å für F122/Y145 in SIV Nef. Eine tabellarische Zusammenfassung der Protein/Protein-Kontakte innerhalb von 3,8 Å in der asymmetrischen Einheit der SIV B/SH3_E-Struktur, befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

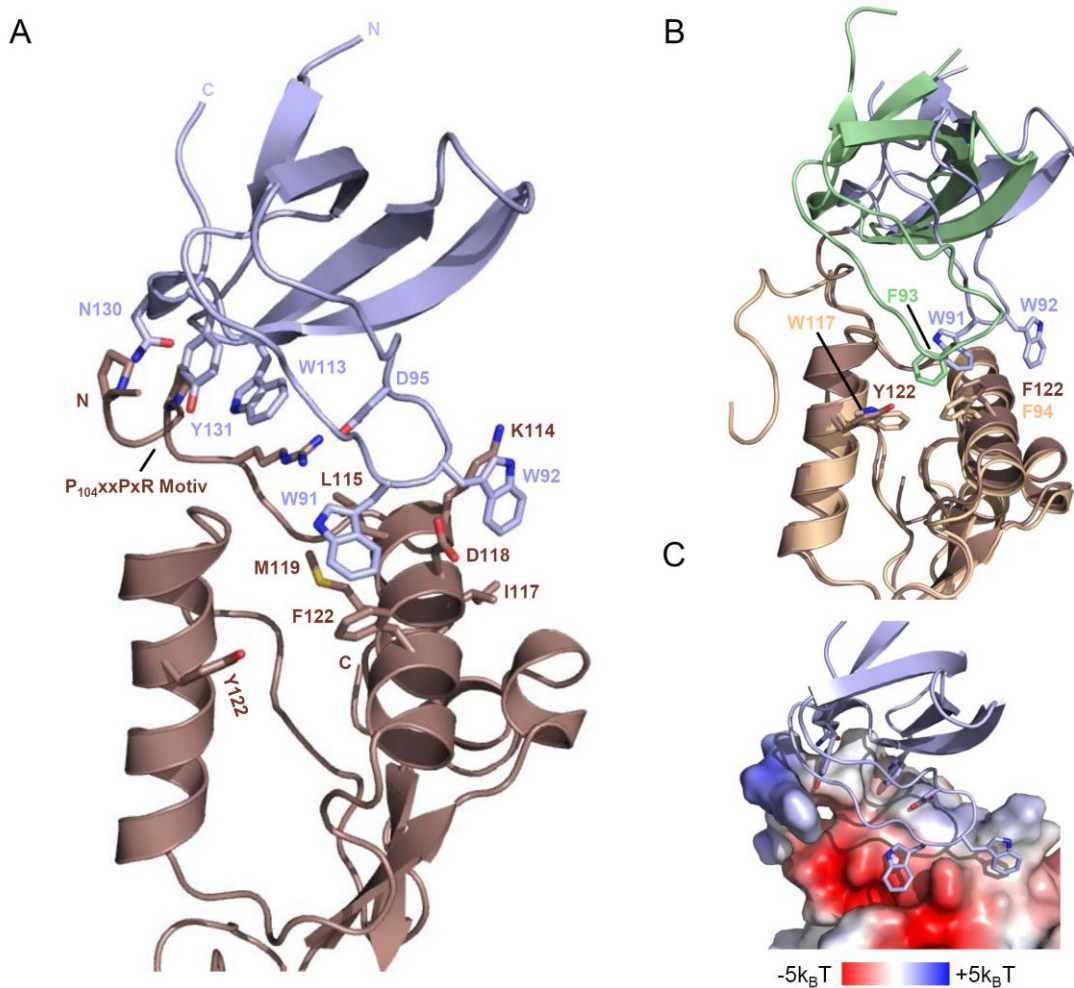


Abbildung 31: Darstellung der SIV B/SH3_E-Kontaktfläche (weinrot/lila). (A) Eingezeichnet sind die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren. (B) Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials von SIV B im Bereich der SH3_E-Kontaktfläche. (C) Überlagerung der SIV B/SH3_E-Struktur mit der HIV-1_{SF2} Nef/SH3_{B6}-Struktur (beige/grün).

Die Überlagerung der SIV_{mac239} SH3_E-Struktur mit der HIV-1_{SF2} Nef/SH3_{B6}-Komplexstruktur zeigt zudem, dass die Position der SH3_E-Domäne im Vergleich zu der SH3_{B6}-Domäne stark verändert ist (Abbildung 31B). Die Wechselwirkung des Tryptophan 92 der SH3_E-Domäne findet mit der Außenseite der Helix drei statt, zugleich ist die RT-Schleife im Vergleich zu Hck SH3_{wt} bzw. SH3_{B6} um eine Aminosäure verkürzt. Hierdurch ist die Position der RT-Schleife und somit der ganzen SH3-Domäne zur Helix drei hin verschoben. Das PxxP-Motiv von Nef folgt dieser Bewegung und ist ebenfalls verschoben. Dies zeigt, dass die Wechselwirkung der modifizierten SH3_E-Domäne mit SIV_{mac239} Nef hauptsächlich durch die Interaktion der modifizierten Aminosäuren in der RT-Schleife der SH3_E mit der hydrophoben Tasche von Nef und nicht durch die klassische PxxP/SH3-Wechselwirkung bestimmt wird.

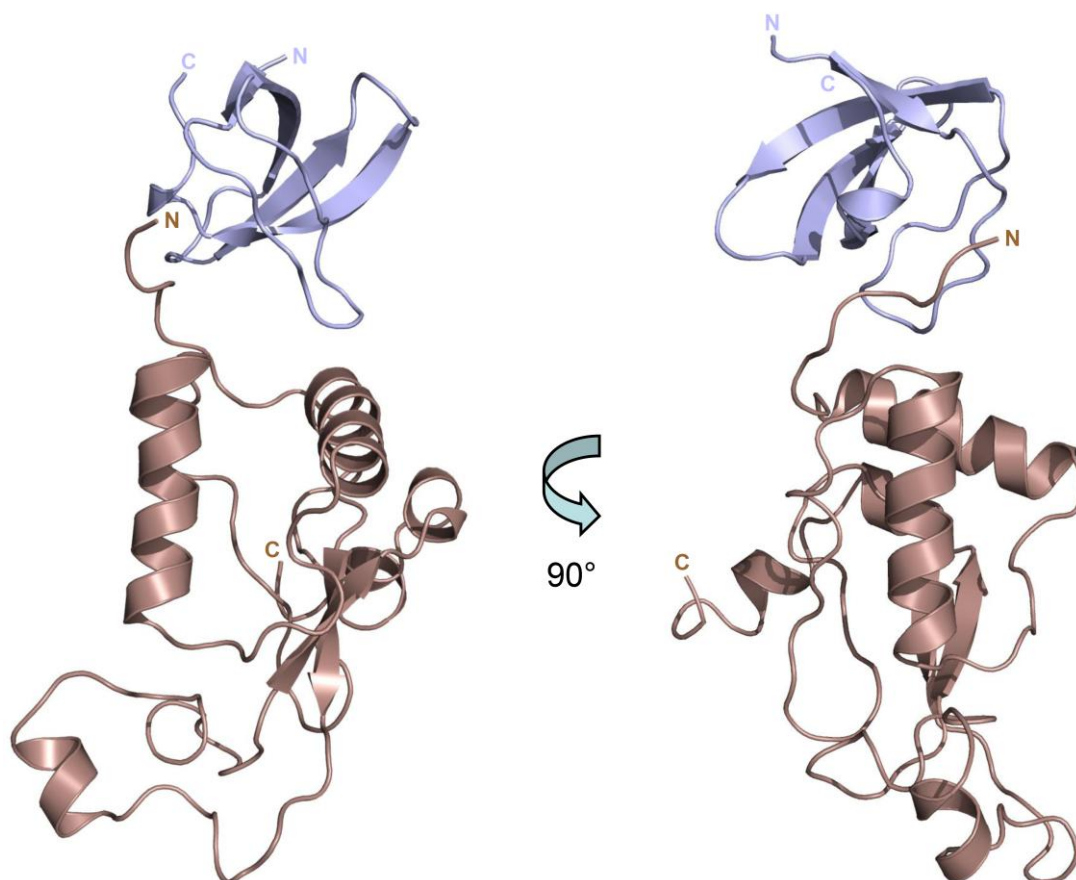


Abbildung 32: Kristallstruktur des Komplexes aus SIVB (weinrot) und SH3_E (lila). Die flexible Schleife des Nef-Proteins konnte für eines der beiden Nef-Moleküle vollständig in das Strukturmodell integriert werden. An der Spitze der flexiblen Schleife im Bereich des Dileuzinmotivs, wurde eine bisher noch nicht beschriebene α -Helix beobachtet.

Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, konnte für eines der beiden Nef-Moleküle in der asymmetrischen Einheit ein Modell erstellt werden, welches die vollständige flexible Schleife des Proteins beinhaltet. Im Vergleich zu der in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen HIV-1_{SF2} Nef-Struktur, in welcher die Schleife in einer gestreckten Konformation beobachtet werden konnte, ist die flexible Schleife in dieser Struktur um etwa 60° geknickt. Im Bereich des Dileuzinmotivs, welches sich an der Spitze der flexiblen Schleife befindet, konnte zudem eine bisher noch nicht beschriebene α -Helix beobachtet werden.

Abbildung 33 zeigt eine Darstellung des Kristallgitters entlang der 3₂ Drehsymmetrieachse des Kristalls. Insgesamt sechs asymmetrische Einheiten formen ein Hexagon, wobei die Orientierung der asymmetrischen Einheiten alternierend um

180° gedreht ist. Infolge dieser Anordnung ragen die unstrukturierten N-Termini von je drei asymmetrischen Einheiten in die Mitte des Hexagons, in der keine Elektronendichte bestimmt werden konnte. Die Abbildung 33B und C zeigen den Blickwinkel auf die bzw. entlang der 3_2 Schraubenachse des Kristalls. Es ist zu sehen, dass die erstmalig beobachtete α -Helix um das Dileuzinmotiv in der flexiblen Schleife eines Nef-Moleküls in die hydrophobe Tasche eines symmetrieverwandten, um 120° entlang der 3_2 Schraubenachse versetzten Nef-Moleküls bindet. Dies erklärt auch den 60° Knick, den die flexible Schleife in der SIV_{mac239} Nef-Struktur, im Vergleich zu der geraden Ausrichtung der Schleife in der HIV_{SF2} Nef-Struktur, zeigt. Diese Torsion entsteht, da das Nef, welches die Bindungsstelle für die flexible Schleife stellt, nun nicht um 180°, sondern um 120° gegenüber dem ersten Nef versetzt ist.

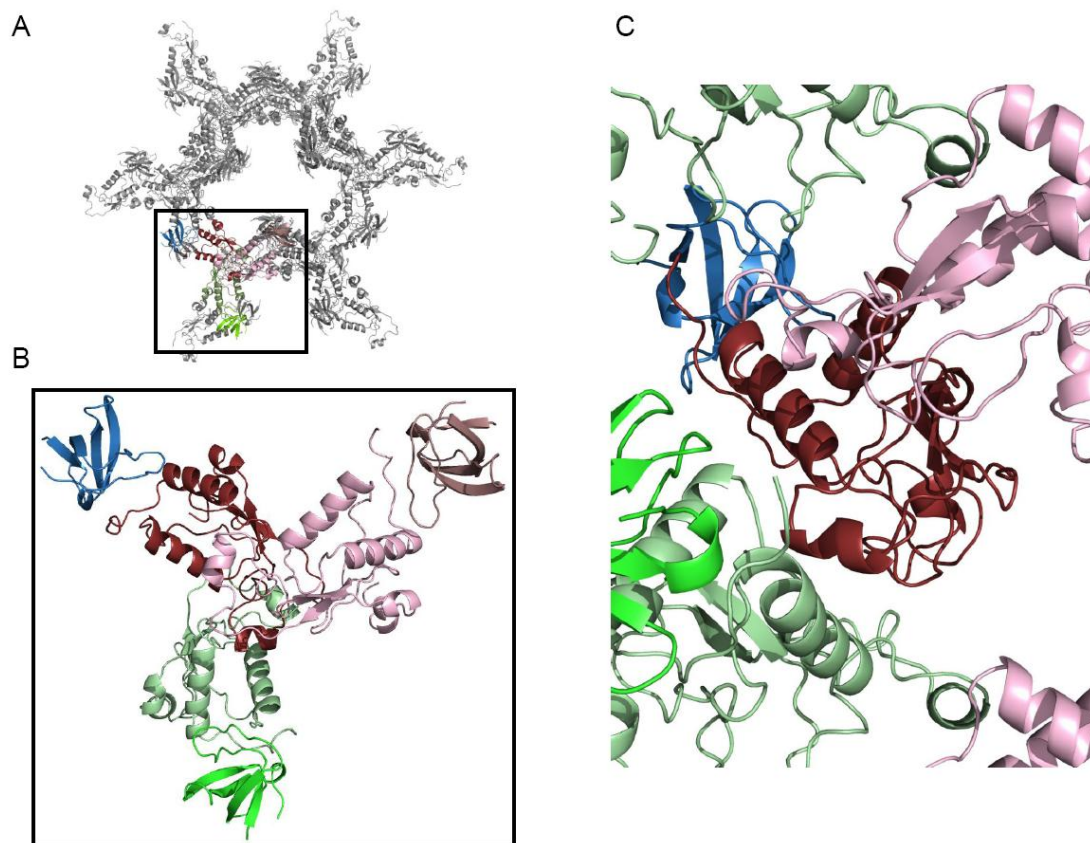


Abbildung 33: Kristallgitter und Symmetrieachsen des SIV B/SH3_E-Kristalls. (A) Darstellung des SIV B/SH3_E-Kristallgitters. (B) Aufsicht auf die 3_2 -Schraubenachse (C) Seitenansicht entlang der 3_2 -Schraubenachse.

Der Bereich zwischen den Helices drei und vier von Nef, in dem die flexible Schleife des symmetrieverwandten Nef-Moleküls bindet, ist für die Interaktion mit Membranrezeptoren von Bedeutung. Hierbei handelt es sich um den unteren Bereich zwischen den beiden Helices von SIV_{mac239} Nef, welcher in Abbildung 34A dargestellt ist. Die obere Begrenzung dieser Tasche stellen die Aminosäuren F122 in der dritten Helix und Y145 in der vierten Helix von SIV_{mac239} Nef dar, wobei die Position des F122 durch die Interaktion mit dem W92 von $SH3_E$, im Vergleich zu der Position des F94 in HIV_{SF2} Nef nach außen verschoben ist. Desweiteren sind die Leuzine 129 und 142 sowie durch die Isoleuzine 123, 132, 141 und 142 und ein Argininpaar (R137, R138) Teil der hydrophoben Tasche (siehe Abbildung 34A).

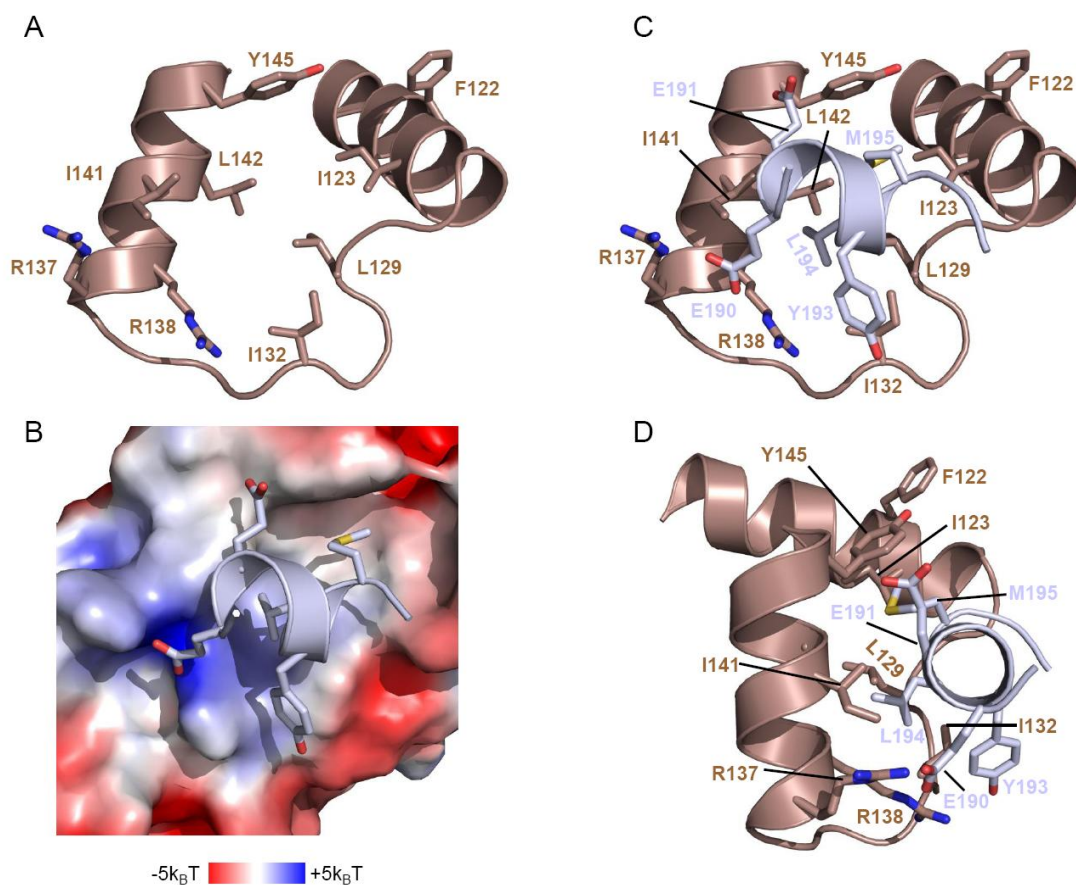


Abbildung 34: Die Interaktion der hydrophoben Tasche von SIV_{mac239} Nef mit dem Dileuzinmotiv von SIV_{mac239} Nef. (A) Struktur der hydrophoben Tasche von SIV_{mac239} Nef. (B) Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials der hydrophoben Tasche von SIV_{mac239} Nef mit der gebundenen flexiblen Schleife eines zweiten SIV_{mac239} Nef. (C) und (D) Darstellung der hydrophoben Tasche von SIV_{mac239} Nef mit der gebundenen flexiblen Schleife eines zweiten SIV_{mac239} Nefs aus unterschiedlichen Perspektiven.

Abbildung 34B zeigt das Dileuzinmotiv eines Nef-Moleküls (blauweiß), welches an die hydrophobe Tasche eines symmetrieverwandten Nefs gebunden ist. Die Aminosäuren L194 und M195 des ExxxLM-Motivs binden ins Zentrum der hydrophoben Tasche. Es wurde das elektrostatische Oberflächenpotential von SIV_{mac239} Nef im Bereich der hydrophoben Tasche dargestellt (siehe Abbildung 34B). Das Dileuzinmotiv von SIV_{mac239} Nef stellt eine Variation des ExxxLL-Motivs dar, dessen Sequenz E₁₉₀EHYLM lautet, wobei das zweite Leuzin durch ein Methionin ersetzt ist. Wie in Abbildung 34C zu sehen ist, insertieren das Leuzin und das Methionin in die hydrophobe Tasche, wohingegen die Aminosäuren E190, E191 und das Y193 mit den Rändern der Tasche wechselwirken. Deutlich zu sehen ist auch die elektrostatische Wechselwirkung der negativen Ladung der E190 Seitenkette mit einem positiv geladenen Bereich auf der Oberfläche von Nef.

Abbildung 34C und D zeigen die Einzelheiten der Interaktion des Nef-Dileuzinmotivs mit der hydrophoben Tasche von Nef. Die elektrostatische Wechselwirkung des E190 findet mit dem Argininpaar R137, R138 am Beginn der vierten Nef-Helix, am unteren Ende der hydrophoben Tasche statt. Die Aminosäure E191 interagiert mit den Aminosäuren I141 und Y145 in der vierten Helix von Nef. Das Tyrosin an Position 193 in der flexiblen Schleife wechselwirkt mit dem I132 in der Schleife zwischen den beiden Helices drei und vier und dem Arginin R138 in der vierten Helix. Das L194 und das M195 insertieren in den zentralen Bereich der hydrophoben Tasche. L194 wechselwirkt mit den Aminosäuren G128, L129, I132 sowie mit dem hydrophoben unteren Teil der Seitenkette des R138. M195 bindet zwischen die Aminosäuren I123, G128, L142 und Y145. Diese Anordnung des polaren E190 und des hydrophoben Motivs L₁₉₄M wird durch die Ausbildung der in dieser Kristallstruktur zum ersten Mal beobachteten α -Helix ermöglicht. Der größte Teil der Interaktion findet mit der vierten α -Helix von Nef und der Schleife zwischen den Helices drei und vier statt. Lediglich I123 in der dritten Helix interagiert mit dem M195 in der flexiblen Schleife. F122, welches die Wechselwirkung mit der SH3_E vermittelt, nimmt nicht an der Interaktion mit der flexiblen Schleife teil. In Tabelle 7 befindet sich eine Zusammenfassung der Protein/Proteinkontakte des SIV Nef-Dileuzinmotivs (SIV Nef A) mit der flexiblen Tasche des zweiten Nef-Moleküls (SIV Nef B) innerhalb von 4 Å.

Tabelle 7: Protein/Protein-Kontakte zwischen dem SIV Nef-Dileuzinmotiv und der hydrophoben Tasche von SIV Nef in der SIV B/SH3_E-Struktur. Intramolekulare Wechselwirkungen zwischen der flexiblen Schleife eines SIV Nef-Moleküls (SIV Nef A) und der hydrophoben Tasche eines symmetrieverwandeten SIV Nef-Moleküls (SIV Nef B) innerhalb von 4 Å.

SIV Nef A			SIV Nef B			Abstand (Å)
Aminosäure	Position	Atom	Aminosäure	Position	Atom	
Glu	190	CD	Ile	141	CD1	3.95
Glu	190	OE1	Ara	137	NE	3.09
Glu	190	OE1	Arq	137	CZ	3.46
Glu	190	OE1	Arq	137	NH2	2.96
Glu	190	OE1	Ile	141	CD1	3.72
Glu	190	OE2	Ara	138	CG	3.85
Glu	190	OE2	Ara	138	NE	3.05
Glu	190	OE2	Arq	138	CZ	3.74
Glu	190	OE2	Arq	138	NH2	3.52
Glu	191	CA	Ile	141	CG2	3.37
Glu	191	CB	Ile	141	CG2	3.63
Glu	191	CD	Tyr	145	CD1	3.68
Glu	191	OE2	Tyr	145	CA	3.62
Glu	191	OE2	Tyr	145	CB	3.35
Glu	191	OE2	Tyr	145	CG	3.83
Glu	191	OE2	Tyr	145	CD1	3.4
Tyr	193	O	Ile	132	CD1	3.86
Tyr	193	CE2	Ile	132	CG1	3.99
Tyr	193	CE2	Ile	132	CG2	3.5
Tyr	193	CE2	Ile	132	CD1	3.87
Tyr	193	CE2	Ara	138	CZ	3.91
Tyr	193	CE2	Ara	138	NH1	3.91
Tyr	193	CE2	Ara	138	NH2	3.84
Tyr	193	CZ	Ile	132	CG1	3.99
Tyr	193	OH	Ile	132	CG1	3.79
Leu	194	O	Gly	128	CA	3.42
Leu	194	O	Gly	128	C	3.62
Leu	194	O	Leu	129	N	2.84
Leu	194	O	Leu	129	CA	3.81
Leu	194	O	Leu	129	CD2	3.67
Leu	194	O	Ile	132	CD1	3.54
Leu	194	CA	Ile	132	CD1	3.63
Leu	194	C	Ile	132	CD1	3.98
Leu	194	CD1	Ara	138	O	3.88
Leu	194	CD2	Ile	132	CG2	3.88
Leu	194	CD2	Ile	132	CD1	3.78
Met	195	O	Gly	128	CA	3.76
Met	195	C	Gly	128	CA	3.9
Met	195	SD	Leu	142	CD1	3.85
Met	195	CE	Ile	123	CG2	4
Met	195	CE	Tyr	145	CE2	3.9
His	196	O	Gly	127	O	3.15
His	196	N	Gly	127	O	3.94
His	196	CA	Gly	127	O	3.33
His	196	C	Gly	127	O	2.94
His	196	ND1	Lys	126	O	3.94
Pro	197	N	Gly	127	O	3.23
Pro	197	CA	Gly	127	O	3.89
Pro	197	CG	Gly	127	O	3.76
Pro	197	CD	Lys	126	O	3.87
Pro	197	CD	Gly	127	O	3.41

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde durch Kim *et al.* eine Kristallstruktur des Komplexes von SIV_{mac239} Nef und eines CD3 ζ -Fragments veröffentlicht, welches das N-distale SNID beinhaltet (Kim *et al.* 2010) (siehe Abbildung 35A). In Abbildung 35B ist eine Überlagerung der Struktur von Kim *et al.*, und der im Rahmen dieser Arbeit gelösten SIV Nef-Struktur mit dem in der hydrophoben Tasche gebundenen Dileuzinmotiv gezeigt. Beide Signalmotive das Y₇₁NELNL-Motiv der SNID-Sequenz und das E₁₉₀EHYLM-Motiv auf SIV Nef binden in die hydrophobe Tasche zwischen den Helices drei und vier. Wie in der Überlagerung in Abbildung 35B zu sehen ist, besetzen dabei Seitenketten beider Signalmotive dieselben Positionen in der hydrophoben Tasche von Nef. Das Y₇₁SNID bindet wie das E₁₉₁SIV zwischen die Aminosäuren Y145 und I142. Die Position zwischen den beiden Argininen R137 und R138 wird durch das E₁₉₀SIV und das E₇₃SNID besetzt. Die Seitenketten kommen dabei aus unterschiedlichen Richtungen, wobei die Enden der Seitenketten an derselben Position zu liegen kommen. Auch das L₁₉₄SIV und L₇₄SNID, sowie das M₁₉₅SIV und das L₇₆SNID binden in die gleichen Positionen in die hydrophobe Tasche.

Eine Überlagerung der in Abschnitt 4.1.2 dieser Arbeit beschriebenen HIV-1_{SF2} Nef-Struktur mit der in diesem Abschnitt beschriebenen SIV_{mac239} Nef-Struktur zeigt, dass auch die flexible Schleife des HIV-1_{SF2} Nefs mit der Aminosäuresequenz P₁₇₁MSLHGM an die selben Stellen in der hydrophoben Tasche von Nef bindet wie das SIV Nef-Dileuzinmotiv und das CD3 ζ SNID-Motiv (siehe Abbildung 35C). Hier nimmt P₁₇₁HIV dieselbe Position ein wie M₁₉₅SIV und L₇₆SNID, während L₁₇₄HIV wie E₁₉₁SIV und Y₇₁SNID bindet. Die zentrale Position in der hydrophoben Tasche, welche vom L₁₉₄SIV und L₇₄SNID eingenommen wird, nehmen in der HIV Nef-Struktur die Methionine M₁₇₂HIV und M₁₇₇HIV ein. M₁₇₇HIV befindet sich dabei eigentlich in derselben Position wie E₁₉₀SIV und E₇₃SNID, welche zwischen die beiden Arginine binden. Da M₁₇₇HIV nicht dieselben elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Argininen eingehen kann wie ein Glutamat und aufgrund seiner hohen Hydrophobizität inseriert es stattdessen zusätzlich in die hydrophobe Tasche. In Abbildung 35D sind die diskutierten Bindungsstellen, mit denen alle hier beschriebenen Bindungspartner der hydrophoben Tasche von Nef wechselwirken, dargestellt und den entsprechenden Aminosäuren der Liganden farblich zugeordnet.

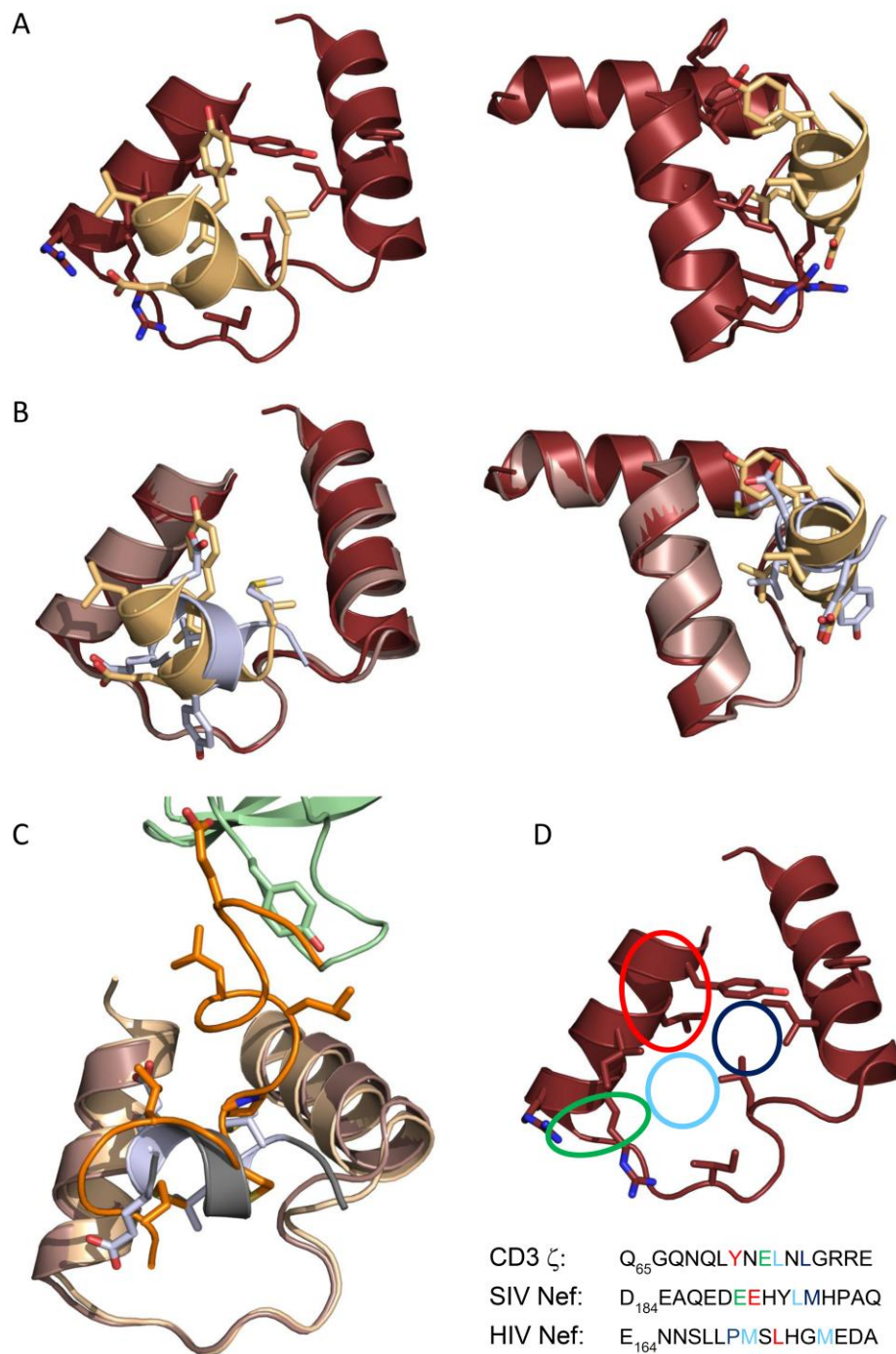


Abbildung 35: Vergleich der Bindung unterschiedlicher Liganden in die hydrophoben Taschen von HIV und SIV Nef. (A) Front- und Seitenansicht der hydrophoben Tasche von SIV Nef (braun) im Komplex mit dem N-distalen SNID-Motiv von CD3 ζ (grün (PDB: 3IK5)). (B) Front- und Seitenansicht der Überlagerung von SIV Nef (rot) / ExxxLM (blauweiß) und der SIV Nef (braun) / CD3 ζ-Struktur (grün). Nur die Seitenketten der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren sind dargestellt. (C) Überlagerung der hydrophoben Tasche von HIV Nef (beige) und SIV Nef (bordeaux) mit der gebundenen flexiblen Schleife eines zweiten HIV (orange) bzw. SIV (blauweiß) Nefs. (D) Zuordnung der Aminosäuren der Liganden zu den zugehörigen Bindungsstellen in der hydrophoben Tasche von Nef.

Unter bestimmten Bedingungen ist es möglich in bereits existierende Kristalle nachträglich einen Liganden einzuführen. In diesen sogenannten *soaking*-Experimenten wird der Kristall in seiner Kristallisationslösung inkubiert, welche zuvor mit einer hohen Konzentration des Liganden versetzt wurde. Der Ligand kann dann durch die Lösungsmittelkanäle in den Kristallen bis zu seiner Bindungsstelle im Kristall diffundieren. Eine Voraussetzung für das Gelingen dieser Experimente ist, dass durch die Bindung des Liganden nicht die Protein/Proteinkontakte, welche das Kristallgitter formen, zerstört werden. Auch große konformelle Änderungen des Proteins in Folge der Ligandenbindung können zum Zerfallen des Kristalls führen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Strategie angewandt werden, um Fragmente der zytoplasmatischen Domäne von CD3 ζ in SIV_{mac239} Nef-Kristalle einzuführen und somit die Nef/CD3-Komplexstruktur zu bestimmen. In der vorliegenden SIV B/SH3_E-Struktur ist einer der wesentlichen Kristallkontakte die Interaktion der flexiblen Schleife eines Nef-Moleküls mit der hydrophoben Tasche, also der potentiellen CD3 ζ -Bindungsstelle, eines symmetrieverwandten Nef-Moleküls. Ein Einbringen der CD3 ζ -Fragmente in diese Bindungsstelle hätte die Verdrängung der flexiblen Schleife und somit den Verlust dieses kritischen Kristallkontakts zur Folge, womit folglich diese Kristalle nicht für *soaking*-Experimente geeignet sind. Da mit dem SIV B Konstrukt alleine, sowie in Kombination mit der SH3_E und der CD3 ζ -Kette keine anderen Kristalle außer der beschriebenen Kristallform erlangt werden konnten, wurden weitere SIV_{mac239} Nef-Konstrukte in Kristallisationsexperimenten getestet.

Um eine neue Kristallform zu erhalten und die Erfolgswahrscheinlichkeit der Kristallisationsexperimente zu erhöhen, wurden SIV_{mac239} Nef-Konstrukte dargestellt, welche gegenüber dem SIV B Konstrukt einen reduzierten Anteil an flexiblen Bereichen aufweisen. Hierfür wurden zum einen weitere N-terminale Verkürzungen vorgenommen, zum anderen die flexible Schleife des Nef-Proteins deletiert. Bisher haben diese Experimente jedoch nicht zu neuen Kristallen geführt. Das SIV Nef-Konstrukt mit der Deletion in der flexiblen Schleife konnte nicht isoliert werden. Das SIV_{mac239} Nef₉₇₋₂₃₅-Protein hingegen konnte isoliert und in Kristallisationsexperimenten eingesetzt werden. Die Löslichkeitseigenschaften dieses Konstrukts sind jedoch im Vergleich zu dem SIV B Konstrukt deutlich herabgesetzt und es zeigte einen erhöhten Anteil an Präzipitation in den Kristallisationsexperimenten.

4.3 Strukturbiologische und biochemische Untersuchung der Adaptorproteinkomplexe AP-1 und AP-2

Nef bewirkt die Internalisierung verschiedener Oberflächenrezeptoren u. a. von MHC I und CD4. CD4 wird durch Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert, welche in nichtinfizierten Zellen durch die Wechselwirkung von AP-2 mit dem Dileuzinmotiv in der zytoplasmatischen Domäne von CD4 eingeleitet wird. Die Bindung von AP-2 an das CD4-Dileuzinmotiv ist abhängig von der vorhergehenden Phosphorylierung dieser Signalsequenz. HIV-1 Nef kann unabhängig von der CD4 Phosphorylierung an das CD4-Dileuzinmotiv binden, sowie mit seinem eigenen nicht phosphorylierungsabhängigen Dileuzinmotiv AP-2 rekrutieren, was zu einer verstärkten Internalisierung des CD4-Rezeptors und anschließender lysosomaler Degradation führt (Bresnahan et al. 1998; Craig et al. 1998; Greenberg et al. 1998a; Janvier et al. 2003; Roeth et al. 2004). Die Position der Dileuzinmotivbindungsstelle war zu Beginn der hier durchgeführten Studie umstritten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bindungsstelle durch die Bestimmung einer Kristallstruktur des Komplexes aus AP-2 bzw. dem homologen AP-1 mit einem Dileuzinmotiv-enthaltendem Peptid oder dem Nef-Protein identifiziert werden.

4.3.1 Darstellung der verwendeten Proteine

Bei den AP-Komplexen handelt es sich um heterotetramere Proteinkomplexe, die aus zwei großen Untereinheiten (α bzw. γ und β) mit einem Molekulargewicht von 130 kDa, einer mittleren Untereinheit (μ) mit etwa 45 kDa und einer kleinen Untereinheit (σ) von 14 kDa bestehen. Die großen Untereinheiten setzen sich aus zwei Domänen (*core* und *appendage*) zusammen, welche durch einen flexiblen Linker (*hinge*) miteinander verbunden sind. Da flexible Bereiche in Proteinen zum einen anfällig für proteolytische Degradation und zum anderen hinderlich für Kristallisationsexperimente sind, wurden die beiden großen Untereinheiten für die rekombinante Expression in *E. coli* C-terminal verkürzt und umfassen nur die *core*-Domäne mit einem Molekulargewicht von ~70 kDa. Aufgrund der hohen Affinität der verschiedenen Untereinheiten zueinander sollte die Darstellung des Komplexes durch Koexpression aller Untereinheiten und anschließender Koreinigung mittels des His-Ankers an den beiden großen Untereinheiten erfolgen.

Für die Koexpression wurde das Duet Koexpressions-Vektorsystem von Merck verwendet. Dieses System erlaubt die Koexpression von bis zu acht Proteinen mittels

vier bicistronischen Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Antibiotika-Resistenzgenen. Um bei der Darstellung der Proteinkomplexe eine möglichst große Ausbeute, bei gleichzeitiger 1:1:1:1 Stöchiometrie der vier Untereinheiten zueinander zu erhalten, wurden verschiedene Expressions- und Reinigungsstrategien getestet. Zunächst wurden die Gene der vier Untereinheiten in die erste *multiple cloning site* (MCS) von vier verschiedenen Expressionsvektoren (pET Duet, pCDF Duet bzw. pCOLA Duet, pACYC Duet und pRSF Duet) des Duet Systems kloniert. Da die Transformation von *E. coli*-Zellen mit vier Plasmiden gleichzeitig nicht möglich war, musste die Transformation in zwei Schritten erfolgen. Deshalb wurden zunächst zwei Plasmide in elektrokompetente BL21(DE3) Zellen mittels Elektroporation kotransformiert. Aus diesen Zellen wurden neue elektrokompetente Zellen hergestellt, welche ebenfalls durch Elektroporation mit den beiden fehlenden Plasmiden kotransformiert wurden. Für diese Strategie konnten keine BL21(DE3)-R/Rosetta Zellen verwendet werden, da diese bereits ein Plasmid mit einem Chloramphenicolresistenzgen enthalten und daher nicht nach pACYC Duet positiven Zellen selektiert werden kann, da dieser Vektor ebenfalls ein Chloramphenicolresistenzgen aufweist.

In einem zweiten Ansatz wurden je zwei Untereinheiten der AP-Komplexe in die erste und zweite MCS eines Vektors kloniert, so dass für die Expression nur zwei Plasmide benötigt wurden. Diese konnten in einem einzelnen Transformationsschritt mittels Elektroporation in elektrokompetente BL21(DE3)-R/Rosetta Zellen transformiert werden. Es wurden verschiedene Expressionszeiten, Inkubationstemperaturen, Induktionsarten und Expressionsmedien getestet.

Tabelle 8: Zusammenfassung der hergestellten AP-Expressionsplasmide.

Name	Vektor	Konstruktbeschreibung
AP-1 γ	pET Duet	MCS1: His- γ ₁₋₆₁₆
AP-1 β 1	pCOLA Duet	MCS1: His- β 1 ₁₋₅₈₄
AP-1 μ 1	pACYC Duet	MCS1: μ 1 ₁₋₄₂₃
AP-1 μ 1DD	pACYC Duet	MCS1: μ 1 ₁₋₄₂₃ , T154DD
AP-1 σ 1	pCDF Duet	MCS1: σ 1 ₁₋₁₅₈
AP-1 σ 1-Nef	pCDF Duet	MCS1: σ 1 ₁₋₁₅₈ -Nef ₁₋₂₁₀
AP-1 γ/σ 1	pET Duet	MCS1: His- γ ₁₋₆₁₆ , MCS2: σ 1 ₁₋₁₅₈
AP-1 β 1/ μ 1	pCOLA Duet	MCS1: His- β 1 ₁₋₅₈₄ , MCS2: μ 1 ₁₋₄₂₃
AP-2 α	pET Duet	MCS1: His- α ₁₋₆₁₆
AP-2 β 2	pCOLA Duet	MCS1: His- β 1 ₁₋₅₉₁
AP-2 μ 2	pACYC Duet	MCS1: μ 2 ₁₋₄₃₅
AP-2 GST- μ 2 ₁₆₀₊	pGex4T1 tev	GST-tev- μ 2 ₁₆₀₋₄₃₅
AP-2 σ 2	pCDF Duet	MCS1: σ 2 ₁₋₁₄₂
AP-2 α/σ 2	pET Duet	MCS1: His- α ₁₋₆₂₀ , MCS2: σ 1 ₁₋₁₄₂
AP-2 β 2/ μ 2	pCOLA Duet	MCS1: His- β 1 ₁₋₅₉₁ , MCS2: μ 1 ₁₋₄₃₅

Darstellung des AP-1 *trunk* Komplexes:

Für AP-1 wurde die höchste Ausbeute bei gleichzeitiger idealer Stöchiometrie nach einer 24 stündigen Expression unter Verwendung von TB-Medium mit Autoinduktion durch Laktose erlangt. Zur Expression wurden BL21(DE3)-R/Rosetta Zellen verwendet, welche die Plasmide γ/σ 1 pET Duet (MCS1: γ (1-616)-His-tag, MCS2: σ 1 (1-158) und β 1/ μ 1 pCOLA Duet (MCS1: β 1 (1-591)-His-tag, MCS2: μ 1 (1-435)) enthielten. Die Isolierung des Komplexes erfolgte durch eine Ammoniumsulfatfällung des Zellüberstandes, gefolgt von einer Ni²⁺-Affinitätschromatographie (siehe Abbildung 36A) und einer anschließenden präparativen Gelfiltration mit einer 16/60 Superdex 200 Größenausschlusschromatographiesäule (GE Healthcare). Die proteinhaltigen Fraktionen, welche eine 1:1:1:1 Stöchiometrie der Untereinheiten zueinander, bei gleichzeitig möglichst geringem Gehalt an Verunreinigungen zeigten, wurden vereinigt und bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml konzentriert (siehe Abbildung 36B). Die Ausbeute nach diesem Protokoll betrug etwa 8-10 mg Protein/Liter Expressionsmedium. Die Expression in BL21(DE3) Zellen von vier Plasmiden war bezüglich der Ausbeute und Reinheit an AP-1 ähnlich effizient wie das zuvor beschriebene Verfahren. Die Verwendung des BL21(DE3)-R/Rosetta *E. coli*-Stammes, welcher für *E. coli* seltene tRNAs exprimiert, war somit für die Darstellung

des AP-1 Komplexes nicht erforderlich. Die Expression mit den BL21(DE3)-R/Rosetta Zellen wurde dennoch aufgrund der Phagenresistenz dieser Zellen bevorzugt.

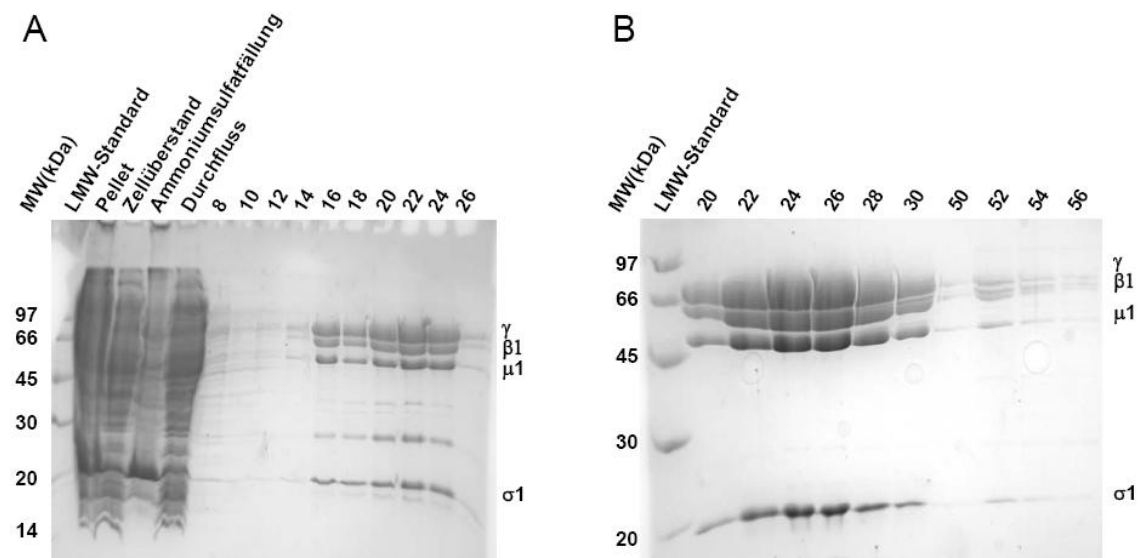


Abbildung 36: SDS-PAGE des AP-1 trunk Komplexes. (A) Dargestellt sind die Reinigungsschritte während der Isolierung des AP-1 trunk Komplexes mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie. (B) Proteinhaltige Fraktionen der präparativen Gelfiltration (16/60 Superdex 200, GE Healthcare), welche im Anschluss an die Affinitätschromatographie durchgeführt wurde. Die Fraktionen 20-30 wurden vereinigt, konzentriert und für die anschließenden Experimente verwendet. Es wurden 20%ige SDS-Trenngele verwendet.

Darstellung des AP-2 trunk Komplexes:

Eine Expression und Isolierung des vollständigen AP-2 trunk-Komplexes mit einer vergleichbaren Ausbeute und Reinheit wie für AP-1, war im Rahmen dieser Studie nicht möglich. Unter Verwendung derselben Strategie wie für den AP-1 Komplex konnte nur eine geringe Ausbeute von $\sim 0,3$ mg AP-2 Komplex je Liter Expressionskultur erhalten werden. Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, treten nach der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie neben den Gelbanden der AP-2 Untereinheiten noch eine Kontaminationsbanden bei ~ 70 kDa und mehrere Banden zwischen 25 und 40 kDa auf. Auch werden die AP-2 Untereinheiten nicht in einem 1:1:1:1 Verhältnis zueinander exprimiert. Wie insbesondere in den Fraktionen 17-25 in Abbildung 37B zu sehen ist, liegt der $\beta 2/\mu 2$ Hemikomplex im Überschuss vor. Aufgrund der unterschiedlichen Größen der Kontaminationen und der schlechten Komplexstöchiometrie, war die Trennung des AP-2 Komplexes mittels Größenausschlusschromatographie weniger effektiv als bei der Isolierung des AP-1 Komplexes (siehe Abbildung 37B). Lediglich die Fraktionen 36-38 wiesen einen hohen Reinheitsgrad bei gleichzeitiger annähernder

1:1:1:1 Stöchiometrie der Untereinheiten auf. Die Ausbeute an isoliertem AP-2-Komplex nach der Gelfiltration betrug 0,2-0,4 mg Protein/Liter Expressionskultur, obwohl mit der Affinitätschromatographie 8-10 mg Protein/Liter Expressionskultur gewonnen wurden.

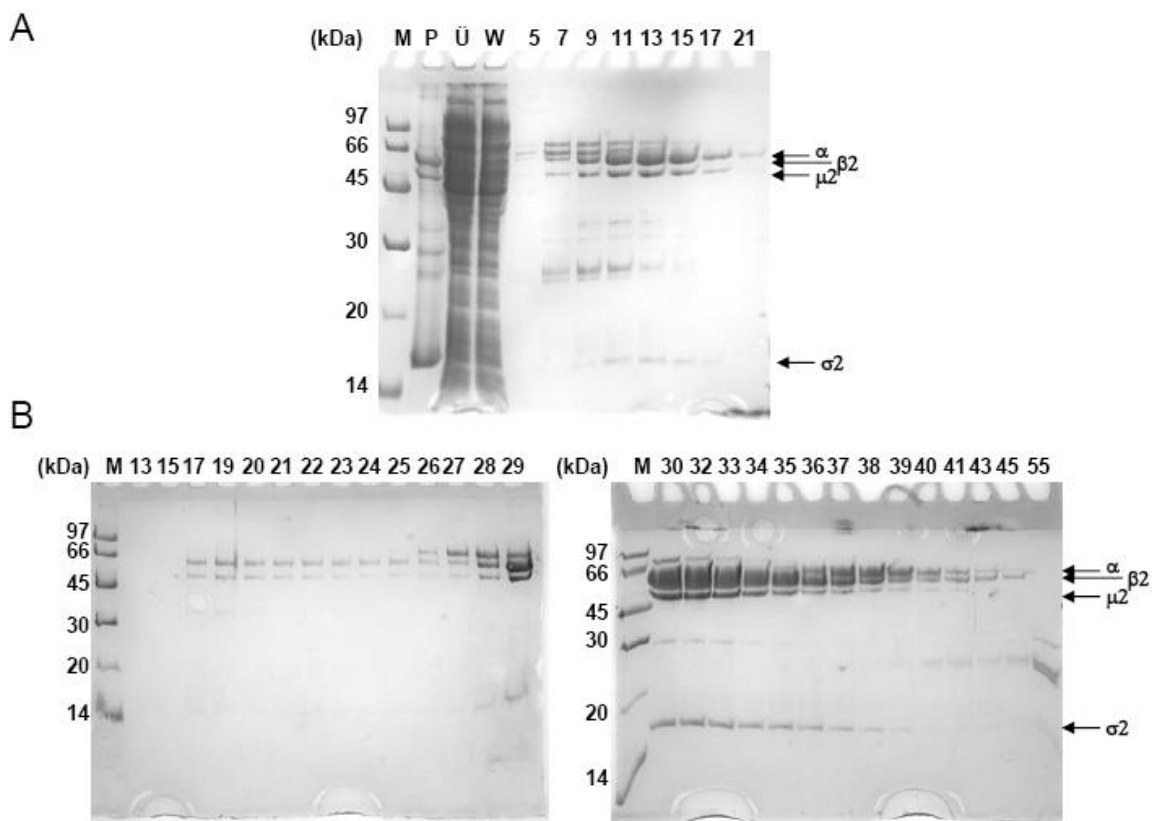


Abbildung 37: SDS-PAGE des AP-2 trunk Komplexes. (A) Dargestellt sind die Reinigungsschritte während der Isolierung des AP-2 trunk Komplexes mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie. (B) Proteinhaltige Fraktionen der präparativen Gelfiltration (16/60 Superdex 200, GE Healthcare), welche im Anschluss an die Affinitätschromatographie durchgeführt wurde. M: LMW-Marker, P: Zelldebris pellet, Ü: Zellüberstand, W: Waschschrift, Nummerierung: Fraktionsnummer. Die Fraktionen 36-38 wurden vereinigt, konzentriert und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Es wurden 20%ige SDS-Trenngele verwendet.

Darstellung des AP-1 trunk σ-Nef Fusionsprotein-Komplexes:

Ein Ziel dieser Arbeit war es die Bindungsstelle von Dileuzinmotiven auf den AP-Komplexen zu identifizieren. Es ist bekannt, dass der K_D dieser Interaktion im μM Bereich liegt und die Wechselwirkung *in vitro* zudem stark von der Salzkonzentration im Puffer abhängt. Bei einer Salzkonzentration über 150 mM NaCl kann eine

Interaktion von Peptiden, die ein Dileuzinmotiv enthalten, und den AP-Komplexen nicht mehr mittels Kopräzipitations-Experimenten gezeigt werden.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion des Nef-Dileuzinmotivs mit seiner Bindungsstelle, auf den AP-Komplexen zu erhöhen, wurde ein AP-1-Nef Fusionsprotein hergestellt. Hierzu wurde das *nef*-Gen mit dem C-terminalen Ende der σ -Untereinheit von AP-1 fusioniert. In einer ersten PCR wurden die Stopp-Codons der AP σ -Untereinheiten durch PCR-Mutagenese entfernt und durch eine C-terminale BamH1-Schnittstelle ersetzt. Desweiteren wurde eine N-terminale NcoI-Schnittstelle eingeführt. In das *nef*-Gen wurde mittels PCR-Mutagenese eine N-terminale BamH1- und eine C-terminale EcoRI-Schnittstelle eingeführt. Alle entstandenen Fragmente wurden isoliert und mit BamH1 geschnitten. Anschließend erfolgte eine Ligation der AP-Fragmente mit dem Nef-Fragment über die BamH1-Schnittstelle. Mit den ligierten Konstrukten als Matrize wurde eine erneute PCR durchgeführt, wobei der N-terminale Primer des AP-Fragments und der C-terminale Primer des Nef-Fragments verwendet wurden. In Folge der Ligation über die BamH1-Schnittstelle können die drei mögliche Konstrukte *ap-ap*, *nef-nef* und *ap-nef* entstehen. Die PCR-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt und die *ap-nef* Fragmente anhand ihrer Größe identifiziert und isoliert. Anschließend wurden die fusionierten Konstrukte über ihre N-terminale NcoI und ihre C-terminale EcoRI-Schnittstelle in den pCDF Vektor des pET Duet Systems kloniert.

Die Amplifikation der Konstrukte, die Co-Transformation in das Expressionssystem und die Proteinexpression erfolgte wie für den AP-1 Komplex beschrieben. Die Ausbeute betrug 8 mg/L Zellkultur. Wie in Abbildung 38 zu sehen ist, konnten alle vier Untereinheiten des AP-1 σ -Nef Komplexes zusammen exprimiert und zu hoher Reinheit isoliert werden (Abbildung 38A). Das Protein konnte bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml konzentriert werden. Die Intensität der Gelbanden im SDS-Gel lässt auf einen Überschuss des α/σ 1-Nef-Hemikomplexes gegenüber dem β 1/ μ 1-Hemikomplex schließen.

Darstellung von AP-Komplexen mit zugänglicher Yxx Φ -Bindungstasche:

Neben dem Dileuzinmotiv erkennen die AP-Komplexe ein weiteres Tyrosin-basierendes Proteinsortierungssignal mit der Konsensussequenz Yxx Φ (wobei x eine beliebige und Φ eine große hydrophobe Aminosäure darstellt). Die Bindungstasche für

dieses Motiv befindet sich in der C-terminalen Domäne der μ -Untereinheit und ist nur nach der Phosphorylierung des Threonin 154 (AP-2: T156) in der Linkerregion zwischen der N- und der C-terminalen Domäne der μ -Untereinheit zugänglich (Pauloin and Thurieau 1993; Olusanya et al. 2001; Ghosh and Kornfeld 2003). Im unphosphorylierten Zustand liegt die C-terminale Domäne von μ flach auf dem AP-*trunk* Komplex und die Yxx Φ -Bindungstasche ist durch die β -Untereinheit verdeckt. Durch die Phosphorylierung klappt die C-terminale Domäne auf und steht senkrecht auf dem *trunk*-Komplex, wobei die Yxx Φ -Bindungstasche zugänglich wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt, um AP-Konstrukte mit zugänglicher Yxx Φ -Bindungstasche herzustellen. Zum einen wurde versucht einen vollständigen AP-1 Komplex mit einer modifizierten $\mu 1$ -Untereinheit herzustellen, in welcher der Effekt der Phosphorylierung durch einen Austausch des Threonins durch zwei Asparaginsäuren im Zuge einer sogenannten Phosphomimikry nachgestellt wird (AP-1 $\mu 1$ DD). Zum anderen wurde versucht die C-terminale Domäne von AP-2 μ einzeln zu exprimieren.

Darstellung des phosphomimikry AP-1 Komplexes:

Die Mutationen wurden mittels Megaprimer-Mutagenese in das $\mu 1$ Gen eingeführt. Das $\mu 1$ -DD Gen wurde mittels Nco1/Xho1 Schnittstellen in das $\beta 1$ pCOLA Duet Plasmid kloniert und das entstandene $\beta 1/\mu 1$ pCOLA Duet Plasmid mittels Elektroporation zusammen mit dem Plasmid $\alpha/\sigma 1$ pET Duet in BL21(DE3)-R3/Rosetta Zellen transformiert. Die Expression erfolgte in TB-Medium, wobei die Induktion durch Zugabe von 0,2 % Laktose induziert wurde. Die Proteinreinigung erfolgte wie für den AP-1 Komplex beschrieben. Abbildung 38B zeigt ein 20%iges SDS-Gel der vereinigten und konzentrierten Gelfiltrationsfraktionen 30-41 und 42-54. Es ist zu sehen, dass in den früheren Fraktionen (30-41) ein hoher Anteil an Kontaminationen im Bereich zwischen 45 und 70 kDa zu finden ist. Die stark überladene Probe der Fraktionen 42-54 zeigt zudem weitere Kontaminationen zwischen 25 und 45 kDa. Die Fraktionen 42-52 weisen dennoch eine relativ hohe Reinheit und annähernde 1:1:1:1 Stöchiometrie der Untereinheiten auf (siehe Abbildung 38C). Die Ausbeute an AP-1 $\mu 1$ DD betrug etwa 1mg Protein/Liter Expressionskultur.

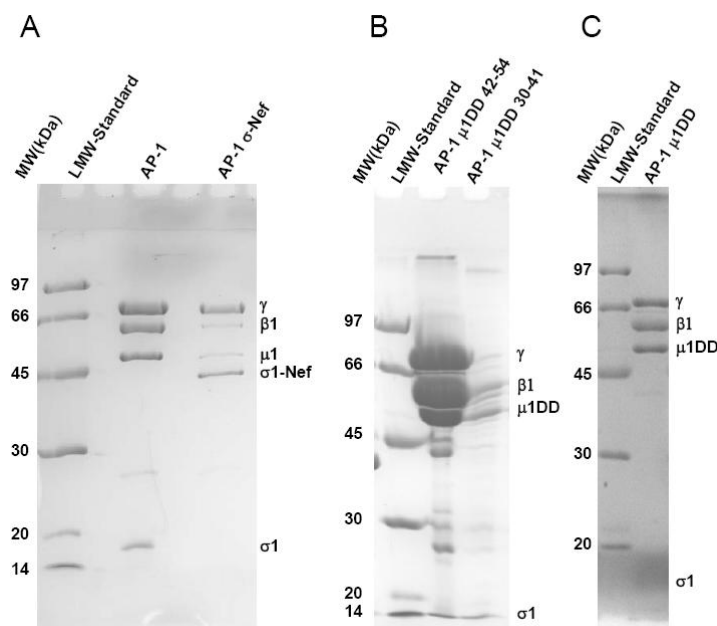


Abbildung 38: SDS-PAGE unterschiedlicher AP-1 Konstrukte. (A) AP-1 und das AP-1 σ -Nef Fusionsprotein nach der Proteinisolierung mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie. (B) Proben der vereinigten und konzentrierten Gelfiltrationsfraktionen 30-41 und 42-54 im Zuge der Isolierung des AP-1 μ 1DD Komplexes. (C) SDS-PAGE von 5 μ g des AP-1 μ 1DD-Komplexes. Es wurden 20%ige Trenngele verwendet.

Darstellung der C-terminalen Domäne von AP-2 μ (μ 2₁₆₀₋₄₃₅):

Die C-terminale Domäne von μ 2, von Aminosäure 160-435, wurde als N-terminales His-Anker-Fusionsprotein in BL21(DE3)-R3/Rosetta Zellen exprimiert. Die Isolierung erfolgte mittels Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie. Wie in Abbildung 39 zu sehen, konnte das Protein mit hoher Ausbeute und Reinheit exprimiert und isoliert werden. Nach der Elution von der Ni^{2+} -NTA Säule, wurde das Protein für 24 Stunden bei 4°C in einen Puffer mit 20 mM Hepes pH 8,0 und 100 mM NaCl dialysiert und zugleich der His-Anker mittels der TEV-Protease proteolytisch abgespalten. Nach der Dialyse lag das Protein zu 90 % präzipitiert vor und präzipitierte bei dem Versuch die Proteinkonzentration mittels Ultrafiltration zu erhöhen weiter.

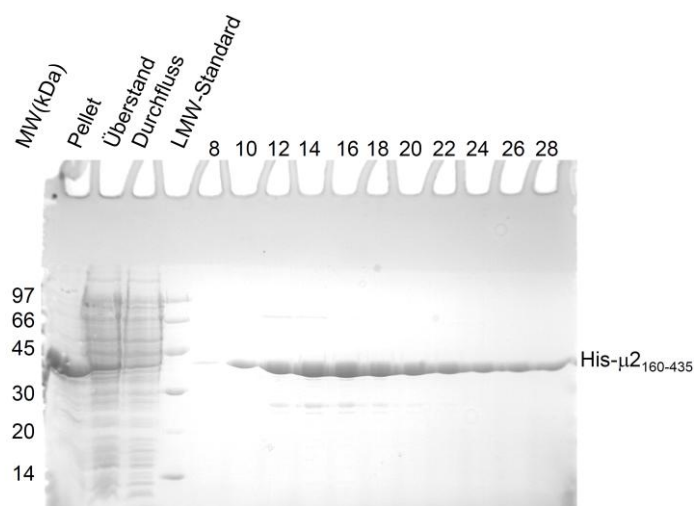


Abbildung 39: SDS-PAGE der C-terminalen Domäne der AP-2 μ -Untereinheit. Dargestellt sind Proben der Reinigungsschritte der Isolierung von His- $\mu 2_{160-435}$. Die nummerierten Bahnen enthalten die entsprechenden Elutionsfraktionen der Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie. Es wurde ein 15%iges Trenngel verwendet.

Es wurde daher in einer zweiten Isolierung der Versuch unternommen Pufferbedingungen zu identifizieren, in denen die Löslichkeit des Proteins erhalten bleibt. Hierzu wurde das Protein nach der Elution von der Ni^{2+} -NTA Säule gegen unterschiedliche Pufferbedingungen dialysiert. Es konnte die Pufferbedingung 20 mM Hepes pH 6,5, 500 mM LiCl, 5mM TCEP, 10% Glycerol als Löslichkeits-erhaltende Pufferbedingung identifiziert werden. Das Protein präzipitierte allerdings auch unter diesen Pufferbedingungen, wenn es aufgetaut wurde.

4.3.2 Biochemische Untersuchungen der Adaptorprotein-Komplexe

Um die Affinität des Nef-Proteins zu den isolierten AP-Komplexen zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Studie die Dissoziationskonstante mittels ITC bestimmt werden. Weil die ITC-Experimente einen relativen hohen Proteineinsatz erfordern und die AP-2 Isolierungen bisher nicht die erforderlichen Proteinmengen ergaben, konnten lediglich Experimente mit dem AP-1 Komplex durchgeführt werden.

In Abbildung 40 ist die Wärmetönung der Titration von 200 μM Nef_{45-210,C59S} zu 20 μM AP-1 *trunk* Komplex gezeigt. Es konnte keine Bindung von Nef an den AP-1 *trunk* Komplex beobachtet werden.

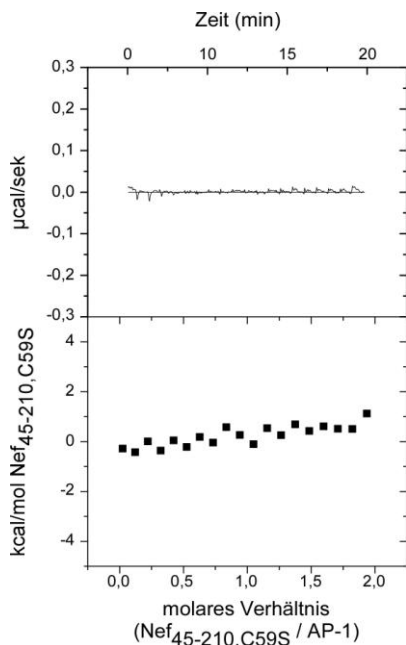


Abbildung 40: Untersuchung der Wechselwirkung von AP-1 trunk und Nef_{45-210,C59S} mittels ITC.
 Wärmetönung während der Titration von 200 µM Nef_{45-210,C59S} zu 20 µM AP-1 trunk in 19
 Titrationsschritten von je 4 µl. (Puffer: 20 mM Hepes pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP).

4.3.3 Strukturbiologische Untersuchungen

Um die Dileuzinmotiv-Bindungsstelle auf den AP-Komplexen zu identifizieren, sollte die Struktur eines AP-Komplexes im Komplex mit einem Dileuzinmotiv beinhaltenden Peptid oder mit dem Nef-Protein bestimmt werden. Um initiale Kristallisationsbedingungen zu identifizieren, wurden Hochdurchsatzscreens der Firma Qiagen verwendet. In 96 *well sitting drop* Platten (Corning 3553) wurden je 70 µl der jeweiligen Pufferbedingungen in das Reservoir vorgelegt und mit Hilfe eines Mosquito Pipettierroboters je 0,1 µl Proteinlösung mit 0,1 µl Reservoirlösung vermischt. Die Platten wurden versiegelt, inkubiert und fortlaufend auf Kristallbildung hin untersucht. Es wurden die Screens JCSG+, JCSG core I-IV, PEG, PEG II, Proteinkomplex, AmSO₄, Cations, Anions und PACT verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kristallisationsexperimente mit AP-1, AP-1 σ-Nef und dem AP-2 Komplex, sowohl bei 4°C also auch bei 20°C, durchgeführt. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen betragen 18 mg/ml und 9 mg/ml. Es konnte für keines der getesteten Proteine Kristallisationsbedingungen identifiziert werden. Generell ist zu beobachten, dass die Proteine in den meisten Kristallisationsbedingungen schon nach kurzer Zeit stark präzipitieren.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle von Nef in der HIV/SIV Pathogenese

Eine Infektion mit dem HI-Virus Typ 1 stellt eine chronischen Infektion dar, die in einer schweren Defizienz des Immunsystems mündet, welche als AIDS bezeichnet wird. Ausgelöst wird diese Immundefizienz durch einen Rückgang der CD4⁺ T-Zell-Population, was eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber opportunistischen Infektionen zur Folge hat. Das HIV-1 Nef-Protein wurde als wichtiger HIV-Pathogenitätsfaktor identifiziert, welcher eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Zellhomöostase der infizierten Zellen durch das HI-Virus einnimmt (Arendt and Littman 2001; Arien and Verhasselt 2008; Kirchhoff et al. 2008). Zu diesem Zweck interagiert Nef mit einer Vielzahl an zellulären Proteinen, insbesondere mit solchen, die an der zellulären Signaltransduktion und an Proteintransportprozessen beteiligt sind. Nef verfügt über keine enzymatische Aktivität, sondern stellt einen molekularen Adapter dar, der zelluläre Proteine zu funktionalen Einheiten zusammenführt.

Es existiert eine Fülle von Studien, in denen die Funktionen und Interaktionspartner von Nef *in vivo* oder *in vitro* mit biochemischen Experimenten, wie Kopräzipitation mit potentiellen Bindungspartnern, untersucht wurden. Auf diese Weise ist eine Vielzahl von Bindungspartnern und Funktionen von Nef beschrieben worden, deren Relevanz für die HIV-Pathogenese häufig jedoch unklar bleibt. Mit Ausnahme der Nef/SH3-Domänen Wechselwirkung existierten zu Beginn dieser Studie zudem keine strukturellen Informationen über Nef/Ligand Interaktionen und es sind nur für wenige Interaktionen kinetische oder thermodynamische Parameter bekannt. Diese Art der Information wäre insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von Nef-Inhibitoren für die AIDS-Therapie von Bedeutung.

Zu den am intensivsten untersuchten Funktionen von Nef, welche zudem einen großen Einfluss auf die Pathogenität des Virus hat, gehört die Internalisierung von Oberflächenrezeptoren, insbesondere von CD4 und MHC I. Dennoch sind die Mechanismen der Nef-abhängigen Depletion zellulärer Oberflächenrezeptoren auf molekularer Ebene noch immer unverstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden strukturbiologische und biochemische Studien unternommen, um die Mechanismen der Nef-vermittelten, AP-2 abhängigen Rezeptorinternalisierung am Beispiel von CD4 und CD3 ζ auf molekularer Ebene zu beschreiben.

5.2 Nef-abhängige Rezeptorinternalisierung

Nef verfügt über mindestens zwei verschiedene Mechanismen, um den zellulären Proteintransport zu beeinflussen. MHC I wird von Nef bereits im Trans-Golgi-Netzwerk erkannt. In einem AP-1 abhängigen Prozess wird MHC I statt zur Plasmamembran zu Endosomen transportiert und anschließend lysosomal degradiert (Roeth et al. 2004). In einem vorgeschlagenen Modell wird eine Rolle für PACS-1/2 in diesem Prozess berichtet (Blagoveshchenskaya et al. 2002; Atkins et al. 2008). Eine andere Studien legt jedoch nahe, dass die MHC I Regulation PACS-unabhängig erfolgt (Lubben et al. 2007). Stattdessen wird ein Modell vorgeschlagen, in dem die Bindung von Nef die Affinität eines in MHC I vorliegenden schwachen YxxΦ-Sortierungsmotiv zu der $\mu 1$ Untereinheit von AP-1 erhöht. Dabei soll es sich um einen kooperativen Bindungsmechanismus von Nef und MHC I an AP-1 handeln (Wonderlich et al. 2008).

Im Fall von CD 4 und einer Reihe weiterer Rezeptoren der Immunglobulin-Rezeptorsuperfamilie, erkennt Nef das Dileuzinmotiv in der zytoplasmatischen Domäne dieser Rezeptoren. Dieses Sortierungsmotiv dient, nach Phosphorylierung eines Serins N-terminal vom Dileuzinmotiv, zur Rekrutierung von AP-2, was die Internalisierung des *cargo*-Proteins mittels Clathrin-vermittelter Endozytose einleitet.

Nef rekrutiert infolge der Bindung an das unphosphorylierte Dileuzinmotiv der Membranrezeptoren den AP-2 Komplex, was die Clathrin-abhängige Endozytose und anschließende lysosomale Degradation der Rezeptoren einleitet. Die Rekrutierung von AP-2 erfolgt hierbei durch das Nef-eigene Dileuzinmotiv, welches im Gegensatz zu den Dileuzinmotiven der Membranrezeptoren nicht phosphorylierungsabhängig ist. Auf diese Weise kann Nef die vollständige Depletion von Oberflächenrezeptoren von der Zellmembran vermitteln. Die Unabhängigkeit des Nef-Dileuzinmotivs von posttranslationalen Modifikationen legt jedoch nahe, dass ein anderer Regulationsmechanismus existieren muss, um zu gewährleisten, dass Nef nur dann AP-2 rekrutiert und die Endozytose einleitet, wenn es einen Rezeptor gebunden hat. Sollte Nef unabhängig von einem *cargo*-Protein bereits AP-2 binden können, so müsste bereits dies die Endozytose einleiten und zur Internalisierung von Vesikeln ohne *cargo*-Protein führen.

5.2.1 Regulation der Nef-abhängigen Rezeptorinternalisierung

Ein möglicher Regulationsmechanismus wäre, dass das Dileuzinmotiv des Nef-Proteins in die Dileuzinmotiv-Bindungstasche von Nef bindet und erst verdrängt wird, wenn Nef mit dem Dileuzinmotiv eines *cargo*-Proteins, welches eine höhere Affinität zu dieser

Tasche aufweist, interagiert. Eine solches autoinhibiertes Nef wäre sowohl durch eine Bindung *in cis*, also durch die Bindung des Dileuzinmotivs eines Nefs in die Bindungstasche des selben Moleküls, als auch *in trans*, also durch die Bindung in die Dileuzinmotiv-Bindungstasche eines zweiten Nef-Moleküls, denkbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur eines Komplexes aus HIV-1 Nef und einer modifizierten SH3-Domäne bestimmt. Diese Struktur enthielt erstmals die vollständige flexible Schleife des Proteins. Die asymmetrische Einheit der in dieser Arbeit gelösten Kristallstruktur des Nef/SH3_{B6}-Komplexes besteht aus einem Dimer von Nef/SH3_{B6}-Heterodimeren. Die Komplexbildung erfolgt hierbei durch die Bindung jeweils der flexiblen Schleife eines Nef-Moleküls in die hydrophobe Tasche eines zweiten Nef-Moleküls und umgekehrt. Dies könnte eine *in trans* autoinhibierte Konformation von Nef darstellen.

Die Analyse der Nef/SH3_{B6}-Struktur ergab, dass Nef nicht wie erwartet mit dem Dileuzinmotiv E₁₆₄xxxLL mit der hydrophoben Tasche des zweiten Nef-Moleküls interagiert, sondern mit einer Gruppe hydrophober Aminosäuren unmittelbar C-terminal zum Dileuzinmotiv. Die Aminosäuren P171, M172, L174 und M177 insertieren in dieser Struktur in eine hydrophobe Tasche. Dabei interagiert das Prolin über eine π -Elektronenwechselwirkung mit dem Tryptophan W117 in der hydrophoben Tasche von Nef. Die beiden Methionine insertieren in das Zentrum der hydrophoben Tasche, wohingegen das Leuzin am Rand der hydrophoben Tasche mit dem W117 und dem Leuzin an Position 114 interagiert. Das eigentliche Dileuzinmotiv liegt N-terminal dieser Aminosäuren. Dennoch könnte eine solche Anordnung gegebenenfalls eine *in trans* autoinhibierte Konformation von Nef darstellen, da die flexible Schleife dicht auf dem Proteinkern aufliegt und somit die Zugänglichkeit des Dileuzinmotivs eingeschränkt ist.

Eine Autoinhibition von Nef *in trans* würde eine Dimerisierung von Nef, entsprechend der in der Nef/SH3_{B6}-Struktur beobachteten oder einer ähnlichen Form, voraussetzen. Es existiert eine Reihe von Studien, in denen untersucht wurde, ob Nef als Dimer oder in höheren Oligomerisierungszuständen vorliegen kann und welche physiologischen Funktionen damit einhergehen (Arold et al. 2000; Ye et al. 2004; Poe and Smithgall 2009). Die in diesen Studien vorgeschlagene Dimerisierungsgrenzfläche beruht auf der von Arold *et al.* gelösten Kristallstruktur eines Nef/Fyn SH3-Komplexes. Nach diesem Modell befindet sich die Dimerisierungskontaktfläche auf der Außenseite der vierten α -helix und der nachfolgenden Schleifenregion. Es gibt Mutationsstudien, die in *in vivo* Experimenten zeigen, dass die Mutation dieser Aminosäuren einige Nef-Funktionen verhindert und dies auf eine Dimerisierungsdefizienz dieser Mutanten

zurückführen (Ye et al. 2004; Poe and Smithgall 2009). Es existiert jedoch auch eine Studie, die nahe legt, dass diese Aminosäuren von Nef an der Interaktion mit der Thioesterase beteiligt sind, so dass die beobachteten Effekte auch auf eine Unterbindung der Interaktion von Nef mit diesem Protein zurückzuführen sein könnten (Liu et al. 2000). Zudem existieren keine biochemischen Experimente, die direkt zeigen, dass diese Mutationen einen Einfluss auf die Dimerisierung von Nef haben.

Bei der Beobachtung von Proteinanordnungen in Kristallstrukturen ist zu beachten, dass diese durch die Packung der Proteine im Kristall zustande kommen können und somit artifiziell sind und nicht in Lösung auftreten. Eine erste Abschätzung ob dies der Fall ist kann mit Hilfe des PISA-Webserver vorgenommen werden. Diese Analyse ergab, dass die in der Nef/SH3_{B6}-Struktur gefundene Dimerisierungsform stabil in Lösung vorliegen könnte, wohingegen das von Arold *et al.* vorgeschlagene Modell als instabil und somit als kristallographisches Artefakt eingeordnet wurde (Arold et al. 2000).

Dennoch ist eine funktionelle Rolle der Aminosäuren P171, M172, L174 und M177 in einer möglichen Nef-Dimerisierung unwahrscheinlich, da die beiden Methionine sowie das L174 zwischen verschiedenen HIV und SIV Typen nicht konserviert sind.

Um den Einfluss der beiden Methionine auf das Oligomerisierungsverhalten zu untersuchen, wurden analytische Gelfiltrationsexperimente mit Nef-Mutanten durchgeführt, in denen die Methionine M172 und M177 durch Alanin bzw. Glutamat ersetzt wurden, um die Interaktion mit der hydrophoben Tasche zu schwächen bzw. durch das Einführen einer negativen Ladung zu unterbinden. Hierbei konnten keine Unterschiede zum Elutionsverhalten des Wildtyp-Proteins festgestellt werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Aminosäuren P171, M172, L174 und M177 keine funktionale Rolle in einer potentiellen Dimerisierung von Nef spielen. Somit würde das in der Nef/SH3_{B6}-Struktur beobachtete Nef A/Nef B-Dimer, bei dem die Dimerisierung durch die Wechselwirkung der flexiblen Schleife von Nef A mit der hydrophoben Tasche von Nef B und umgekehrt, vermittelt wird, keine physiologisch relevante Form von Nef darstellen. Es besteht jedoch weiterhin die Möglichkeit, dass in Lösung eine Interaktion der flexiblen Schleife mit der hydrophoben Tasche, wie ursprünglich angenommen, durch das Dileuzinmotiv von Nef vermittelt wird. Eine solche Interaktion wurde in einer weiteren in dieser Arbeit bestimmten Struktur von SIV_{mac239} Nef beobachtet (siehe Abschnitt 5.2.2).

Die Frage des Oligomerisierungszustands von Nef konnte mit der analytischen Gelfiltration nicht eindeutig beantwortet werden. Nef eluiert in einem Elutionsvolumen, das dem eines globulären Proteins mit etwa doppelter Masse entspricht, wie der Vergleich mit dem Größenstandard ergibt. Dies könnte jedoch sowohl durch die große Anzahl flexibler Bereiche in Nef erklärt werden, die das Elutionsverhalten des Proteins beeinflussen, als auch durch die Formierung eines stabilen Dimers, in der die Flexibilität des Proteins durch die Interaktion eingeschränkt ist.

Um die Frage des Nef-Oligomerisierungszustands und des Verhaltens der flexiblen Schleife in Lösung zu untersuchen, wurden Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimente durchgeführt. Mit Hilfe von Röntgenkleinwinkelstreuung ist es möglich eine *ab initio* Struktur eines Proteins in Lösung mit niedriger Auflösung zu berechnen und anschließend die hochaufgelöste Kristallstruktur des Proteins mittels *rigid body modeling* in die *ab initio* Struktur zu fitten. Die Berechnung der *ab initio* Struktur ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Eine erste Analyse der Streuspektren lässt jedoch auf eine elongierte Form des Proteins in Lösung schließen. Aus der *ab initio* Struktur lassen sich gegebenenfalls zusätzlich Informationen über das Verhalten der flexiblen Schleife des Nef-Proteins gewinnen. Sollte Nef nicht über eine Dimerisierung *in trans* inhibiert werden, könnte mit diesen Informationen das Modell der Nef-Autoinhibition *in cis*, also der Bindung der flexiblen Schleife von Nef in die hydrophobe Tasche desselben Nef-Moleküls überprüft werden.

5.2.2 Erkennung von Sortierungsmotiven durch HIV und SIV Nef

Viele der in der Literatur beschriebenen Funktionen von Nef sind zwischen den unterschiedlichen HIV- und SIV-Typen konserviert. Zu den wenigen Ausnahmen gehört die Eigenschaft der meisten SIV-Stämme die CD3 ζ -Untereinheit des TCR von der Zellmembran zu depletieren, um die Aktivierung der infizierten T-Zelle und den damit verbundenen programmierten Zelltod zu verhindern (Silvestri et al. 2007; Pandrea et al. 2008). Schindler *et al.* haben gezeigt, dass der Verlust dieser Eigenschaft mit einer erhöhten Pathogenität des Virus korreliert (Schindler et al. 2006; Schindler et al. 2008). Virus-Stämme, wie HIV-2 und die meisten SIV-Stämme, die über die Fähigkeit zur TCR-Regulation verfügen, verursachen entweder keine Immundefizienz in ihren Wirten, oder erst nach einer langen asymptomatischen Phase. SIV_{cpz} und das von ihm abstammende HIV-1 haben diese Eigenschaft vermutlich evolutionär verloren (Kirchhoff 2009).

Um die strukturellen Grundlagen dieser unterschiedlichen Liganden-Bindungseigenschaften von HIV-1 und SIV Nef zu verstehen, sollte im Rahmen dieser

Arbeit eine Kristallstruktur von SIV_{mac239} Nef bestimmt werden. Darauf aufbauend sollte, falls möglich, die Komplexstruktur aus SIV_{mac239} Nef und eines Fragments der CD3 ζ -Untereinheit gelöst werden. Zusätzlich wurden ITC- und analytische Gelfiltrationsexperimente durchgeführt, um die Bindungseigenschaften unterschiedlicher CD3 ζ -Fragmente an SIV_{mac239} Nef zu charakterisieren. Während der Durchführung dieser Studien wurde durch Kim *et al.* eine Struktur von SIV_{mac239} Nef veröffentlicht, welches ein Peptid des N-distalen SNID Motivs von CD3 ζ gebunden hat (Kim *et al.* 2010).

Die Interaktion von SIV_{mac239} Nef und CD3 ζ wird durch zwei als SNIDs bezeichnete Motive in der zytoplasmatischen Domäne von CD3 ζ vermittelt (Schaefer *et al.* 2000). Das N-distale SNID (YNELNL) ist Teil des ersten und das C-distale SNID (YSEIGM) Teil des zweiten der drei ITAM-Motive von CD3 ζ , welche für die Signaltransduktionsfunktion von CD3 ζ verantwortlich sind. Auffällig ist, dass die SNID-Sequenzen bzw. die ITAM-Konsensussequenz (YxxI/L) generell die Bedingungen für ein Tyrosin-basierendes Sortierungsmotiv vom Typ Yxx Φ erfüllen, welches neben dem Dileuzinmotiv das zweite wichtige Sortierungsmotiv für den Transport von integralen Membranproteinen darstellt.

Da bekannt ist, dass die Interaktion von CD3 ζ mit der gefalteten Kernstruktur von Nef stattfindet (Schaefer *et al.* 2002), konnte SIV_{mac239} Nef N- und C-terminal verkürzt werden, um die Kristallisation zu ermöglichen und die Stabilität des Proteins zu erhöhen. Die Grenzen wurden durch ein Sequenzalignment mit dem bereits zuvor erfolgreich kristallisierten HIV-1 Nef_{45-210,C59S} festgelegt und umfasste die Aminosäuren 66-235. Da die bisher kristallisierten Nef-Strukturen im Komplex mit einer SH3-Domäne bestimmt wurden, wurde auch für diese Untersuchung eine mit erhöhter Affinität an SIV Nef bindende SH3-Domäne (SH3_E) verwendet. Die Interaktion mit der SH3-Domäne erleichtert die Kristallisation vermutlich durch eine Stabilisierung des flexiblen N-Terminus durch die Interaktion mit dem PxxP-Motiv von Nef. Eine Verkürzung des N-Terminus von Nef um die ersten 97 Aminosäuren bis kurz vor das PxxP-Motiv, die den N-terminalen flexiblen Bereich auf ein Minimum begrenzen sollte, hatte eine Verschlechterung der Löslichkeitseigenschaften des Proteins zur Folge.

In den durchgeführten Kristallisationsexperimenten gelang es Kristalle eines SIV Nef/SH3_E-Komplexes herzustellen und eine Komplexstruktur mit einer Auflösung von 3 Å zu bestimmen. Auch für diese Struktur konnte ein vollständiges Modell der flexiblen Schleife von Nef erstellt werden. Wie schon in der HIV-1 Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6}-Struktur wird die flexible Schleife durch die Interaktion mit der hydrophoben Tasche eines zweiten Nef-Moleküls stabilisiert. Bei dem Interaktionspartner handelt es sich in

der SIV Nef-Struktur nicht um das zweite Nef-Molekül in der asymmetrischen Einheit, sondern um ein symmetrieverwandtes Nef. Im Unterschied zu der HIV-1 Nef_{45-210,59S}/SH3_{B6}-Struktur findet die Interaktion in der SIV Nef-Struktur zwischen dem Dileuzinmotiv von SIV Nef und der hydrophoben Tasche statt.

Es konnte mittels analytischer Gelfiltration gezeigt werden, dass SIV Nef gleichzeitig an die SH3_E-Domäne sowie, an CD3 ζ binden kann. Dies beutet, dass zwei unabhängige Bindungsstellen existieren müssen. Dies wurde durch die Bestimmung der Kristallstrukturen des SIV Nef/SH3_E-Komplexes und der durch Kim *et al.* veröffentlichten SIV Nef/CD3 ζ -Struktur (Kim et al. 2010) bestätigt.

Der hydrophobe Bereich zwischen den Helices drei und vier von Nef wird in der Literatur generell als hydrophobe Tasche von Nef bezeichnet. Wie in Abbildung 41 zu sehen ist handelt es sich jedoch vielmehr um zwei Taschen, welche durch die großen Seitenketten der Aminosäuren F122 und Y145 (in HIV-1 Nef: F94 und W117) getrennt werden. Der Bereich oberhalb dieser Aminosäuren, welcher mit der RT-Schleife von SH3-Domänen interagiert, wird im folgenden RT-Bindungstasche genannt. Dagegen bindet der Bereich unterhalb dieser Aminosäuren an das Dileuzinmotiv von SIV Nef bzw. das SNID-Motiv von CD3 ζ , welches einem Yxx Φ -Motiv entspricht. Daher wird diese Tasche im weiteren als Sortierungsmotiv-Bindungstasche bzw. SM-Bindungstasche bezeichnet.

Auffällig ist, dass die Trennung der beiden Taschen in SIV Nef durch F122 und Y145 nicht so vollständig erfolgt, wie durch die entsprechenden Aminosäuren in der HIV-Struktur. Das F122_{SIV} ist im Vergleich zu dem F94_{HIV} weiter von der gegenüberliegenden Seitenkette des Y145 (W117 in HIV) entfernt. Dies ist zum Teil auf die Bindung des F122 an das W91 in der SH3_E-Domäne zurückzuführen, mit der das SIV Nef-Protein kokristallisiert wurde. Zudem ist die Seitenkette des Y145 in SIV Nef kleiner als die des W117 in HIV Nef. Der Abstand zwischen den beiden Seitenketten steigt infolgedessen von 3,7 Å auf 5,6 Å an.

Das Dileuzinmotiv von SIV_{mac239} Nef EEHYLM stellt eine Variation der Dileuzinmotiv-Konsensussequenz ExxxLL dar, in der das zweite Leuzin durch ein Methionin ersetzt ist. Das Dileuzinmotiv bindet in Form einer α -Helix in die SM-Bindungstasche des zweiten Nef-Moleküls. Ein Vergleich der Bindung des SIV Nef-Dileuzinmotivs (SIV Nef/SH3_E-Struktur), des CD3 ζ -Peptids (SIV Nef/CD3 ζ , PDB: 3IK5) sowie der Interaktion der flexiblen Schleife von HIV-1 Nef in die SM-Bindungstasche von HIV-1 Nef (HIV-1/SH3_{B6}-Struktur) zeigt, dass in allen Strukturen vier Positionen in der SM-Bindungstasche von Nef durch Aminosäuren des jeweiligen

Liganden gebunden werden. Die SM-Bindungstasche weist demnach drei Interaktionsflächen für hydrophobe Wechselwirkungen, sowie das Diargininmotiv an Position R137, R138 in der SIV_{mac239} Nef Sequenz (HIV-1_{SF2} Nef: R109, R110) für die Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen auf.

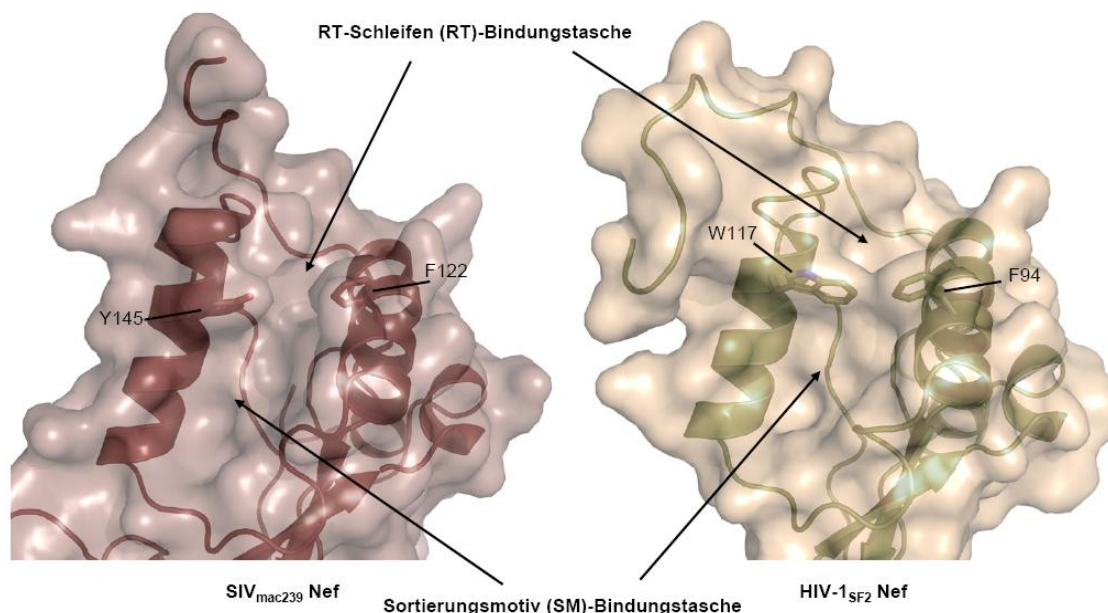


Abbildung 41: Darstellung der hydrophoben Tasche von SIV und HIV Nef. .

HIV Nef und SIV Nef unterscheiden sich in Bezug auf diese Bindungsstellen lediglich in zwei Aminosäuren. Trotz dieses geringen Unterschieds bindet SIV Nef die CD3 ζ -Untereinheit in den durchgeführten ITC-Experimenten mit einem K_D von 0,3 μM , wohingegen für HIV Nef keine Bindung detektiert werden konnte. Eine der beiden unterschiedlichen Positionen ist das Isoleuzin 132 in der Linkerregion zwischen den Helices drei und vier in SIV Nef, welches ein Leuzin (L104) in HIV-1 Nef ist. Diese Mutation ist sehr konservativ und erklärt nicht die beobachtete stark unterschiedliche CD3 ζ -Affinität von SIV und HIV Nef. Der zweite Unterschied ist ein Tyrosin (Y145) in SIV, welches in HIV-1 durch ein Tryptophan (W117) ersetzt ist. Diese Aminosäure befindet sich auf der Innenseite der Helix vier und bildet zusammen mit dem gegenüberliegenden Phenylalanin (F122_{SIV}/F94_{HIV}) in der dritten Helix die obere Begrenzung der SM-Bindungstasche.

Die hier gemachten Beobachtungen legen nahe, dass die Mutation von Tyrosin zu Tryptophan die Ursache für die fehlende CD3 ζ -Affinität von HIV Nef ist. Diese Tyrosin zu Tryptophan Mutation findet sich auch in SIV_{cpz}, welches CD3 ζ ebenfalls

nicht regulieren kann. Das Tyrosin ist hingegen in den SIV-Stämmen MAC, SMM, BLU und SAB, sowie in HIV-2, welche alle CD3 ζ regulieren können, konserviert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden im Anschluss an diese Arbeit HIV-1 Nef-Mutanten hergestellt, in denen die Mutationen W117Y bzw. L104I vorgenommen wurden. Diese Experimente sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Affinität von SIV_{mac239} Nef zu Peptiden, welche die einzelnen SNIDs beinhalten, als auch zu einem größeren Konstrukt, welches beide SNIDs umfasste, mittels ITC bestimmt. Die Affinität für die zwei Peptide, welche die von Schaefer *et al.* als notwendig beschriebene N bzw. C-distale SNID-Sequenz beinhalten, lag bei 4,8 μ M bzw. 8,8 μ M. Die Affinität einer verlängerten Version des C-distalen SNIDs, welches zusätzliche C-terminale Aminosäuren einschließlich dreier aufeinanderfolgender Arginine umfasste, hatte hingegen eine ~5-10-fach höhere Affinität von 0,8 μ M. Das Konstrukt welches beide SNIDs beinhalten, zeigte eine ähnlich hohe Affinität von 0,3 μ M. Dies zeigt, dass neben den laut Schaefer *et al.* für die Nef-Interaktion notwendigen Aminosäuren der SNID-Sequenz, auch die nachfolgenden Reste für die Affinität von Bedeutung sind. Wie erwartet zeigte CD3 ζ keine Affinität zu HIV-1 Nef_{45-210,C59S}.

Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Nef-abhängige Internalisierung von CD3 ζ unabhängig von den bekannten AP-2 Bindungselementen in SIV Nef erfolgt (Schaefer *et al.* 2002; Swigut *et al.* 2003; Brenner *et al.* 2006). Weder das Dileuzinmotiv, noch die in der SIV Nef-Sequenz auftretenden Yxx Φ -Motive werden für die CD3 ζ -Internalisierung benötigt. Zudem soll die AP-2 Bindung von SIV Nef und CD3 ζ kooperativ erfolgen (Swigut *et al.* 2003). Diese Beobachtungen weisen starke Parallelen zu einem Modell der HIV-1 Nef/AP-1-abhängigen MHC I Regulation auf. Auch dieser Prozess soll unabhängig von Nefs Dileuzinmotiv erfolgen und ein kooperatives Bindungsverhalten von Nef und MHC I an den AP-1-Komplex zeigen (Wonderlich *et al.* 2008). Demnach wird die Affinität eines schwachen Yxx Φ -Motivs in MHC I zu der μ 1-Untereinheit von AP-1 durch die Interaktion von MHC I mit Nef erhöht. Dies führt dann zum Nef und AP-1-abhängigen Transport von MHC I zum Endosomen.

Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die SIV Nef abhängige Internalisierung von CD3 ζ denkbar. Die Tyrosine in den drei ITAM-Motiven von CD3 ζ werden in Folge einer Aktivierung des TCR phosphoryliert. Im unphosphorylierten Zustand insertieren sie vermutlich in die Plasmamembran (Duchardt *et al.* 2007), wie dies auch für die ITAM Motive in der CD3 ϵ -Untereinheit gezeigt wurde (Xu *et al.* 2008) und stehen somit nicht für die Interaktion mit anderen Proteinen

zur Verfügung. Die YxxL/I-Motive in der ITAM-Sequenz erfüllen die Voraussetzungen für ein Tyrosin-basierendes Sortierungsmotiv vom Typ YxxΦ, welches von der μ -Untereinheit von AP-2 erkannt werden könnte. Diese Motive sind jedoch für AP-2 nicht zugänglich, da sie erst im Zuge der Signaltransduktionsfunktion von CD3 ζ aus der Membran freigesetzt werden, wobei Sie jedoch phosphoryliert werden und wiederum nicht für die Interaktion mit AP-2 zur Verfügung stehen. Ein möglicher Mechanismus der SIV Nef-abhängigen CD3 ζ -Internalisierung wäre somit, dass Nef durch die Interaktion mit CD3 ζ eines oder mehrere der potentiellen YxxΦ-Motive in der CD3 ζ -Sequenz aus der Membran freisetzt. Da dieses Motiv jedoch nicht, wie bei der Freisetzung infolge der TCR-Aktivierung, gleichzeitig phosphoryliert wird, könnte es durch AP-2 erkannt werden, wodurch die CD3 ζ -Internalisierung eingeleitet werden würde.

Die YxxΦ-Bindungstasche der AP-Komplexe liegt auf der μ -Untereinheit und ist ohne vorherige Phosphorylierung der μ -Untereinheit nicht zugänglich. Um die beschriebenen alternativen, Dileuzinmotiv-unabhängigen Nef/AP-Komplex/Rezeptor Wechselwirkungen untersuchen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit AP-1/AP-2 Komplexe bzw. Untereinheiten mit zugänglicher YxxΦ-Bindungstasche hergestellt werden. Es konnte eine Phosphomimikry-Variante des AP-1 Komplexes isoliert werden. In dieser wird die Threonin-Phosphorylierung der $\mu 1$ -Untereinheit durch Ersetzung des Threonin durch zwei Glutamate nachgestellt. Die Zugänglichkeit der YxxΦ-Bindungstasche in diesem Komplex muss jedoch noch gezeigt werden.

5.2.3 Modell der Nef-abhängigen Rezeptorinternalisierung

Die Internalisierung membranständiger Rezeptoren gehört zu den wichtigsten Funktionen von Nef und ist abhängig von der Lokalisation Nefs an der entsprechenden Membran. Hierfür weist Nef eine N-terminale Myristoylierung, sowie eine Anhäufung basischer Aminosäuren auf, die die Bindung an negativ geladene Lipidmembranen vermitteln (Bentham et al. 2006; Gerlach et al. 2010). Trotz dieser beiden Membranbindungs determinanten liegt Nef in der Zelle zu einem großen Teil zytosolisch vor. Dieses könnte durch die Existenz unterschiedlicher Nef-Konformationen erklärt werden. Andere myristoylierte Proteine, wie die kleine GTPase Arf (Helms et al. 1993; Liu et al. 2009) oder das HIV Matrix-Protein (Paillart and Gottlinger 1999; Tang et al. 2004) können ebenfalls unterschiedliche Konformationen einnehmen. Entweder ist die Myristoylierung versteckt und das Protein somit zytosolisch lokalisiert oder die Myristoylierung wird durch einen Schaltermechanismus exponiert und das Protein bindet an die Membran.

Es wurde berichtet, dass die Myristoylierung von Nef einen Einfluss auf die Konformation des Proteins in Lösung hat (Dennis et al. 2005; Breuer et al. 2006) und dass HIV-1 Nef seinen eigenen myristoylierten N-Terminus binden kann (Hoffmann et al. 2007). Nef könnte also in Lösung ebenfalls eine geschlossene Konformation einnehmen, in der die Myristoylierung von der wässrigen Umgebung abgeschirmt ist. Dies würde auch die für ein lipidiertes Protein erstaunlich gute Löslichkeit von myristoyliertem Nef in wässrigen Puffersystemen erklären. Es existieren jedoch bisher keine strukturellen Informationen über eine solche Interaktion.

Wie in dieser Arbeit mittels ITC-Bindungsstudien gezeigt wurde, wird die Bindung der SH3_{B6}-Domäne an Nef nicht durch die Gegenwart des myristoylierten N-Terminus beeinflusst. Da die Nef/SH3_{B6}-Interaktion auch die RT-Bindungstasche einschließt, verbleibt als einzige weitere hydrophobe Tasche in der Nef-Struktur, in welche die Myristoylierung binden könnte, die SM-Bindungstasche. Ob und wie eine solche Interaktion mit dem Modell des autoinhibierten Nefs kompatibel sein könnte, kann ohne strukturelle Informationen jedoch nicht beantwortet werden.

Neben einer geschlossenen zytosolischen Konformation müsste es nach dem Modell des autoinhibierten Nefs, eine membranständige halbgeöffnete Konformation geben. In dieser bindet der N-Terminus des Proteins mit dem Myristin und dem basischen Ladungscluster in bzw. an die Membran. Das Dileuzinmotiv in der flexiblen Schleife des Proteins bindet in die SM-Bindungstasche und steht somit nicht für die Interaktion mit den AP-Komplexen zur Verfügung. Die endozytotisch aktive Konformation nimmt das membranständige Nef erst durch die Bindung an ein Sortierungsmotiv in der zytoplasmatischen Domäne eines seiner Zielrezeptoren ein. Durch die Bindung des Sortierungsmotivs in die SM-Tasche wird das Nef-eigene Dileuzinmotiv aus der SM-Tasche verdrängt und rekrutiert AP-2, wodurch der Clathrin-abhängige Transport eingeleitet wird.

Diese Hypothese stellt ein Modell des Nef-abhängigen Proteintransports dar, der, wie im Falle der CD4-Internalisierung, von Nefs Dileuzinmotiv vermittelt wird. Neben diesem Transportmechanismus scheint Nef jedoch mindestens einen weiteren, mit dem Zielrezeptor kooperativen Bindungsmechanismus an die AP-Komplexe zu verfügen, wie er bei dem Transport von MHC I oder CD3 ζ auftritt.

5.3 Interaktion zwischen Nef und SH3-Domänen

Die Hck SH3-Domäne bindet nicht nur an das P₇₆xxPxR-Motiv von Nef, sondern zusätzlich noch mit dem Isoleuzin 96 in dessen RT-Schleife in die RT-Bindungstasche

von Nef. Diese Nef-spezifische Interaktion ist für die hohe Affinität von 1,5 μM der Hck SH3-Domäne zu HIV-1 Nef verantwortlich (Lee et al. 1995; Lee et al. 1996; Arold et al. 1998). Die RT-Bindungstasche stellt neben der SM-Bindungstasche das einzige erfolgsversprechende Ziel für niedermolekulare Therapeutika dar, mit dem eine für die Pathogenität von HIV-1 wesentliche Nef-Funktion inhibiert werden könnte. Der überwiegende Teil der funktional wichtigen Motive von Nef, wie das Myristoylierungsmotiv, das P₇₆xxPxR-Motiv oder das Dileuzinmotiv, befinden sich in den großen flexiblen Domänen des Proteins und stellen somit keine geeigneten Oberflächen für die Bindung von potentiellen Inhibitoren zur Verfügung.

In den im Rahmen dieser Arbeit gelösten Kristallstrukturen von HIV und SIV Nef wurde jeweils die Struktur eines Komplexes aus HIV bzw. SIV Nef und einer für die Bindung an das jeweilige Nef optimierten Hck SH3-Domäne bestimmt, welche im Labor von Kalle Saksela identifiziert wurden (Hiipakka et al. 1999; Hiipakka and Saksela 2002). Bei diesen SH3-Domänen wurde die Sequenz um das Isoleuzin 96 in der RT-Schleife verändert, welches in die RT-Tasche von Nef inseriert. Die Affinität dieser Mutanten zu Nef wurde in dieser Arbeit mittels ITC bestimmt. Demnach liegt die Affinität der SH3_{B6} zu HIV-1 Nef bei 20 nM und ist somit gegenüber dem Wildtyp 75x erhöht. Obwohl SIV Nef nur schwach an SH3-Domänen bindet, konnte für die SH3_E-Mutante hingegen eine Affinität von 7,6 μM bestimmt werden.

Wie in Abschnitt 4.1.2 bzw. 4.2.3 beschrieben wird, erfolgt die Interaktion von HIV bzw. SIV Nef mit der jeweils kokristallisierten SH3-Domäne, sowohl über das PxxPxR-Motiv, als auch über die RT-Bindungstasche von Nef. F93 in der RT-Schleife der SH3_{B6}-Domäne inseriert in die RT-Bindungstasche und wechselwirkt insbesondere mit F94 in der dritten α -Helix von HIV-1 Nef. Selbiges gilt für das W91 in der RT-Schleife der SH3_E-Domäne, welche mit SIV Nef interagiert. Die Bindungsarten der beiden SH3-Domänen unterscheiden sich insofern, als dass die SH3_E-Domäne mit einem weiteren Tryptophan an Position 92 eine zusätzliche Interaktion mit der Außenseite der dritten α -Helix von Nef eingeht. Diese Interaktion und der Umstand, dass die RT-Schleife von SH3_E ein Aminosäure kürzer als die von SH3_{B6} ist, zieht die gesamte SH3_E-Domäne weit in Richtung der dritten α -Helix von Nef. Das PxxP-Motiv von SIV Nef folgt dieser Bewegung, um die Interaktion mit der SH3-Domäne aufrechtzuerhalten. Auch die SH3_{B6}-Domäne zeigt eine um etwa 25° veränderte Orientierung im Vergleich zu der Position der Fyn SH3-Domäne in der Struktur von Arold *et al.* (Arold et al. 1997), dennoch verbleibt die PPII-Helix in der selben Position wie in der Nef_{NL4-3}/Fyn SH3-Struktur. Diese Beobachtung zeigt zum einen, dass die Wechselwirkung von Nef mit den modifizierten SH3-Domänen stark durch die

Interaktion zwischen RT-Schleife und RT-Bindungstasche dominiert wird. Desweiteren deutet es darauf hin, dass die PPII-Helix in SIV Nef weniger durch den Kern stabilisiert wird, als dies in HIV-1 Nef der Fall ist. Da angenommen wird, dass die zusätzliche Stabilisierung der PPII-Helix durch die Kernstruktur von HIV-1 Nef zu der erhöhten Affinität von HIV-1 Nef zu SH3-Domänen beiträgt (Lim 1996), könnte dies eine Erklärung sein, warum SIV Nef nur eine geringe Affinität zu unmodifizierten SH3 zeigt.

Die Formierung eines Komplexes aus Nef und einer SH3-Domäne erleichtert die Kristallisation der verwendeten Nef-Konstrukte vermutlich durch eine Stabilisierung des flexiblen N-Terminus im Bereich des PxxP-Motivs und durch den insgesamt erhöhten Anteil an gefalteten Bereichen, welche für zusätzliche Kristallkontakte zur Verfügung stehen. Desweiteren zeigte sich in analytischen Gelfiltrationsexperimenten, dass die Bindung der SH3-Domäne die Formierung von höheren Nef-Oligomeren verhindert und zu einer monodispersen Probe führt, was die Kristallisation ebenfalls erleichtert.

5.4 Weitere kristallographische Studien an HIV/SIV Nef

Es ist im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen SIV_{mac239} Nef₆₆₋₂₃₅ alleine oder im Komplex mit der CD3 ζ -Untereinheit zu kristallisieren. Nef verfügt über einen langen flexiblen N-Terminus und eine flexible Schleife, welche die Kristallisation des Proteins erschweren. Um die Flexibilität zu reduzieren, wurde HIV-1 Nef N-terminal um 44 Aminosäuren und SIV_{mac239} Nef um 65 Aminosäuren verkürzt. Alle im Vorfeld dieser Arbeit getesteten Nef-Konstrukte, welche N-terminal über diese Grenzen hinaus verkürzt wurden, wiesen verschlechterte Löslichkeitseigenschaften auf. Da von HIV Nef eine Kristallstruktur bestimmt werden sollte, welche die gesamte flexible Schleife umfasst, konnte diese ebenfalls nicht zur Reduktion der Flexibilität deletiert werden. Im Fall von SIV Nef führte die Deletion der flexiblen Schleife zur Präzipitation des Proteins.

Die Kokristallisationsexperimente mit SIV Nef im Komplex mit einem CD3 ζ -Fragment, welches die Aminosäuren 66-235 umfasste, bzw. eines ternären Komplexes aus SIV Nef, SH3_E und CD3 ζ , führte nicht zu Kristallen. Die Screens ergaben jedoch einen hohen Anteil an Bedingungen in denen Phasentrennung auftrat. Das keine Kristallisationsbedingung identifiziert werden konnte, könnte auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein: 1. Wie die analytischen Gelfiltrationsexperimente ergaben, konnte mit der Koexpressionsstrategie bei der Darstellung des Nef/CD3 ζ -Komplexes keine 1:1

Stöchiometrie erzielt werden. Das Nef-Protein lag in einem leichten Überschuss vor. Eine solche Inhomogenität der Probe kann die Ausbildung von Kristallisationskeimen verhindern. 2. Sowohl das Nef-Protein als auch die verwendete CD3 ζ -Untereinheit weisen große flexible Bereiche auf, welche die Kristallisation erschweren. Zudem kann durch die Interaktion der CD3 ζ -Untereinheit mit der SM-Bindungstasche nicht länger die flexible Schleife von Nef durch eine Interaktion mit dieser Tasche stabilisiert werden. Eine weitere Verkürzung des N-Terminus von Nef oder eine Deletion der flexiblen Schleife könnte die Kristallisation ermöglichen. Es wurden bereits Nef-Varianten mit derartigen Modifikationen getestet, diese wiesen jedoch stark verschlechterte Löslichkeitseigenschaften auf. 3. Könnte durch die Verwendung des SNID₇₁₋₂₃₅-Konstrukts eine heterogene Probe entstehen, da dieses Konstrukt beide SNID-Motive umfasst, welche um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren. Die Kokristallisation mit Peptiden, welche nur ein SNID-Motiv beinhalten, würde dieses verhindern und zudem den Anteil an flexiblen Bereichen reduzieren.

Im Anschluss an diese Arbeit wurden durch Santiago Manrique neue N-terminal verkürzte Konstrukte (SIV_{mac239} Nef₈₇₋₂₃₅ und SIV_{mac239} Nef_{66-235, Δ 79-96}) hergestellt, welche gute Löslichkeitseigenschaften aufweisen und für Kokristallisationsexperimente mit CD3 ζ oder anderen Liganden verwendet werden können.

Außer durch Kokristallisation können kleine Bindungspartner wie Peptide auch durch *soaking*-Experimente in einen Kristall eingebracht werden. In den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Kristallen von HIV bzw. SIV Nef war die SM-Bindungstasche von Nef durch die flexible Schleife eines zweiten Nef-Moleküls besetzt. Da es sich bei dieser Interaktion jeweils um ein für die Integrität des Kristallgitters kritischen Kristallkontakt handelte, waren diese Kristalle nicht für das Einbringen von Liganden der SM-Bindungstasche durch *soaking*-Experimenten geeignet. In künftigen Experimenten sollte daher versucht werden neue Kristallformen zu erhalten. Da mit den in dieser Studie verwendeten Konstrukten intensive *Screening*-Experimente durchgeführt wurden, sollten hierfür neue Konstruktgrenzen getestet werden. Mit den neuen N-terminal verkürzten SIV Nef-Konstrukten SIV_{mac239} Nef₈₇₋₂₃₅ und SIV_{mac239} Nef_{66-235, Δ 79-96} soll, parallel zur Kokristallisation, versucht werden Kristalle zu erhalten, welche für *soaking*-Experimente mit Liganden für die SM-Bindungstasche geeignet sind.

Desweiteren wurde durch Sebastian Luelf (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) ein HIV-1 Nef-Konstrukt kristallisiert, in welchem die flexible Schleife größtenteils deletiert wurde. In diesem Konstrukt kann daher die flexible Schleife nicht mehr die SM-Bindungstasche blockieren. Dieses Konstrukt ergab Kristalle in mehreren

Kristallisationsbedingungen und es konnte ein erster Datensatz mit einer Auflösung von 2,6 Å aufgenommen werden. Diese Kristalle könnten ebenfalls für *soaking*-Experimente mit unterschiedlichen Liganden verwendet werden, um die Struktur eines Komplexes aus HIV-1 Nef und Liganden, wie CD4- oder MHC I-Peptiden zu bestimmen. Auch die Interaktionsstellen von Nef bindenden niedermolekularen Substanzen, welche potentielle *lead*-Substanzen für die Entwicklung von Nef-gerichteten Inhibitoren darstellen, könnte durch *soaking* Experimente mit diesen Kristallen bestimmt werden.

5.5 Sortierungsmotiv-Erkennung der Adaptorprotein-Komplexe

Die heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexe der *assembly polypeptide* Familie spielen eine zentrale Rolle in der Vermittlung des Proteintransports in Clathrin-beschichteten Vesikeln. Sie erkennen Sortierungsmotive in der zytoplasmatischen Domäne von Transmembranproteinen, welche für den Transport vorgesehen sind. Durch die anschließende Rekrutierung von Clathrin zu diesen *cargo*-Proteinen, leiten sie die Formierung der Clathrin-beschichteten Vesikel und somit den Transport dieser Proteine ein.

Die AP-Komplexe erkennen unterschiedliche Arten von Sortierungssignalen, welche sich in zwei Gruppen einteilen lassen: Die Tyrosin-basierenden Signalmotive (YxxΦ) und die Dileuzinmotiv-basierenden Signalmotive [D/E]xxxL[L/I] (Owen et al. 2004; Edeling et al. 2006). Das YxxΦ-Signal wird von der μ-Untereinheit aller AP-Proteine erkannt. Im Fall des sogenannten Dileuzinmotivs [D/E]xxxL[L/I], welches den Transport von Proteinen zum Endosomen bzw. Lysosomen vermittelt und von den AP Komplexen 1-3 erkannt wird, war die Position der Bindungsstelle bei Beginn dieser Studie umstritten. In der Literatur finden sich Studien, welche die Dileuzinbindungsstelle auf der β-Untereinheit von AP-1 und AP-2 lokalisiert haben (Greenberg et al. 1998a; Rapoport et al. 1998; Geyer et al. 2002; Schmidt et al. 2006), auf der μ-Untereinheit von AP-1 und AP-2 (Rodionov and Bakke 1998; Hofmann et al. 1999; Craig et al. 2000; Rodionov et al. 2002), sowohl auf dem γ/σ1-Hemikomplex von AP-1 (Janvier et al. 2003; Coleman et al. 2005; Theos et al. 2005; Coleman et al. 2006) als auch auf dem γ/σ1 und dem α/σ2-Hemikomplex von AP-1 bzw. AP-2 (Doray et al. 2007). Diese Ergebnisse beruhen auf einer Analyse der Bindung einzelner Untereinheiten bzw. der Hemikomplexe α(γ)/σ und β/μ der AP-Komplexe an Peptide, die ein Dileuzinmotiv aufweisen, oder an das Nef-Protein.

Die Sonderstellung des Nef-Proteins liegt darin begründet, dass es das einzige bekannte Protein ist, dessen intrazellulärer Transport über ein Dileuzinmotiv vermittelt wird, welches aber zudem zytosolisch vorliegen kann. Alle anderen Proteine, welche ein funktionales Dileuzinmotiv aufweisen, sind integrale Membranproteine. HIV-1 Nef bindet direkt über sein Dileuzinmotiv an AP-2 und vermittelt auf diese Weise die Internalisierung verschiedener Membranproteine (Greenberg et al. 1997; Bresnahan et al. 1998; Craig et al. 1998; Greenberg et al. 1998a; Coleman et al. 2005; Jin et al. 2005; Roeth and Collins 2006). Obwohl keine *in vivo* Funktion von Nef bekannt ist, die eine direkte Wechselwirkung von Nef mit AP-1 über das Nef-Dileuzinmotiv beinhaltet, bindet Nef *in vitro* Dileuzinmotiv-spezifisch an den AP-1 Komplex (Janvier et al. 2003; Coleman et al. 2005; Chaudhuri et al. 2007). Daher kann die *in vitro* Nef/AP-1 Wechselwirkung als Modellsystem für die Bindung von Dileuzinmotiven an Proteine der Familie der heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexe angesehen werden.

Die Kristallstruktur eines Komplexes aus AP-1 bzw. AP-2 mit einem Liganden, der ein Dileuzinmotiv aufweist, würde voraussichtlich die eindeutige Identifizierung der Dileuzinmotiv-Bindungsstelle ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, die AP-Komplexe AP-1 und AP-2 im Komplex mit HIV-1_{SF2} Nef zu kristallisieren und somit die Dileuzinmotiv-Bindungsstelle der AP-Komplexe zu identifizieren.

Da zur Kristallisation größere Mengen reinen Proteins benötigt werden, wurde versucht, die AP-Komplexe rekombinant in *E. coli* zu exprimieren. Die einzige bisher beschriebene Expression des AP-1 Komplexes mit allen vier Untereinheiten von Heldwein *et al.* fand mittels eines Baculovirus-Expressionssystems in Insektenzellen statt und führte zur Lösung der Kristallstruktur des AP-Komplexes (Heldwein et al. 2004). Hierbei wurde ein AP-1 Konstrukt verwendet, welches C-terminal verkürzte großen Untereinheiten (*trunk*-Komplex) aufweist. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, den AP-1 *trunk* Komplex in denselben Grenzen rekombinant, mit einer Ausbeute von 6-7 mg Protein je Liter Zellkultur, in *E. coli* zu exprimieren. Zudem war es möglich, ein AP-Nef Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* zu exprimieren.

Die Wechselwirkungen der AP-Komplexe mit ihren Liganden sind vergleichsweise schwach (K_D im μM -Bereich). Eine Fusion der beiden Interaktionspartner könnte die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion des Nef-Dileuzinmotivs mit seiner Bindungsstelle auf den AP-Komplexen wesentlich erhöhen. Hierfür wurde das Nef-Protein mit dem C-Terminus der σ -Untereinheit fusioniert.

Auffällig war bei der Reinigung des AP-1 σ -Nef Komplexes, dass das Fusionsprotein entweder die Expression, oder die Stabilität des α/σ 1-Nef Hemikomplexes positiv oder die Expression bzw. Stabilität des β 1/ μ 1 Hemikomplex negativ beeinflusst, da bei der Reinigung des AP-1 σ -Nef Komplexes der α/σ 1-Nef Hemikomplex deutlich im Überschuss im Vergleich zum β 1/ μ 1 Hemikomplex vorlag.

Der AP-2 Komplex wurde bereits zuvor durch Collins *et al.* rekombinant in *E. coli* exprimiert und die Kristallstruktur des AP-2 *trunk* Komplexes bestimmt (Collins et al. 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Expression und Isolierung des rekombinanten AP-2 Komplexes war deutlich weniger ergiebig als die AP-1 Isolierung. Neben den AP-2 Untereinheiten konnten nach der Affinitätschromatographie mehrere Banden von *E. coli*-Proteinen im SDS-Gel identifiziert werden, welche mit dem AP-2 Komplex kogereinigt wurden. Da die AP-2 Untereinheiten nicht in einem 1:1:1:1 Verhältnis koexprimiert werden konnten, handelt es sich bei den kontaminierenden Proteinen vermutlich um *E. coli*-Chaperone, welche an überschüssige einzelne Untereinheiten oder Hemikomplexe von AP-2 gebunden haben. Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte der Kontaminationsproteine war die weitere Isolierung mittels analytischer Gelfiltration weniger ergiebig, da die Kontaminationen sowohl vor als auch nach dem Zielprotein eluieren und sich ihre Elution mit der des Zielproteins überschneidet.

Das in dieser Arbeit verwendete Expressionsprotokoll unterscheidet sich von dem von Collins *et al.* insofern, als dass die α -Untereinheit nicht als GST-Fusionsprotein, sondern, wie die β 2-Untereinheit, mit einem His-tag exprimiert wurde. In einem zukünftigen Versuch sollte der Affinitätstag einer der beiden großen Untereinheiten durch einen GST-Anker ersetzt werden, um die Isolierung des Proteins mittels zweier Affinitätschromatographiesäulen zu ermöglichen. Auf diese Weise könnten die überschüssigen Hemikomplexe und einzelne Untereinheiten und die an sie gebundenen Chaperone vom Holo-Komplex getrennt werden.

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit Kristallisationsexperimente sowohl mit dem AP-1, dem AP-1 σ -Nef Komplex und dem AP-2 Komplex durchgeführt. Diese Experimente haben bisher nicht zu Kristallen geführt. Neben der Lösung der Kristallstruktur von AP-1 bzw. AP-2 im Komplex mit Nef sollen in zusätzlichen Experimenten die biochemischen und thermodynamischen Eigenschaften der AP/Nef-Wechselwirkung untersucht werden. Aufgrund des hohen Proteinbedarfs dieser Technik war es bisher jedoch nicht möglich ITC-Messungen mit AP-2, dem natürlichen

Liganden für Nefs-Dileuzinmotiv durchzuführen. Da der AP-1 Komplex jedoch ebenfalls eine Affinität zu Dileuzinmotiven aufweist, wurden ITC-Bindungsstudien mit AP-1 und dem Nef-Protein durchgeführt, wobei jedoch keine Bindung des Nef-Proteins an AP-1 detektiert werden konnte.

Für diese Beobachtung gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen könnte die Dileuzinmotiv-Bindungstasche von AP-1 sich von der von AP-2 soweit unterscheiden, dass sie keine Affinität zu Nefs-Dileuzinmotiv aufweist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Nef/AP-2-Wechselwirkung nicht nur über das Dileuzinmotiv sondern zusätzlich noch über andere Bindungsstellen vermittelt wird. Es wurde berichtet, dass Nef nicht nur mit dem Dileuzinmotiv sondern zusätzlich noch mit einem azidischen Motiv gebildet aus den Aminosäuren D174 und D175 mit AP-2 wechselwirkt (Lindwasser et al. 2008; Chaudhuri et al. 2009). Chaudhuri *et al.* haben zudem gezeigt, dass diese Interaktion mit den basischen Aminosäuren K297 und R340 auf der α -Untereinheit von AP-2 stattfindet und kooperativ mit der CD4-Bindung von Nef ist (Chaudhuri et al. 2009). Dieses basische Motiv ist auf den homologen AP-1 und AP-3 Komplexen nicht konserviert. Es existieren jedoch keine Studien, die den Einfluss dieser zusätzlichen Interaktionsfläche auf die Dissoziationskonstanten der Nef/AP-2-Wechselwirkung näher charakterisieren. Daher ist es schwierig ihre Bedeutung für die Dileuzinmotiv-abhängige Interaktion von Nef und den AP-Komplexen einzuschätzen.

Eine weitere Erklärung dafür, dass keine Bindung von Nef an AP-1 beobachtet werden konnte, ist das in dieser Arbeit diskutierte Modell des autoinhibierten Nef-Proteins. In dieser Studie wurden Kristallstrukturen sowohl von HIV als auch von SIV Nef bestimmt, in denen jeweils die flexible Schleife von Nef, welche das Dileuzinmotiv beinhaltet, in die Ligandenbindungstasche eines zweiten Nef-Moleküls gebunden war. Eine solche Konformation könnte einen autoinhibierten Zustand von Nef darstellen, in dem das Dileuzinmotiv von Nef nicht mit den AP-Komplexen interagieren kann, solange es nicht durch das Dileuzinmotiv eines Liganden aus der Dileuzinmotiv-Bindungstasche von Nef verdrängt wird.

Um eine Interaktion von Nef mit den AP-Komplexen zu ermöglichen, wäre es somit notwendig zuvor ein aktiviertes Nef herzustellen, in dem das Dileuzinmotiv durch die Bindung eines Liganden freigesetzt wird. Versuche dies durch Zugabe eines CD4-Peptids zu HIV Nef zu erreichen führten jedoch zur Präzipitation des Proteins. Ein für künftige Untersuchungen besser geeignetes Modellsystem wäre eventuell der SIV

Nef/CD3 ζ -Komplex, da dieser wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stabil in Lösung vorliegt.

Während der Durchführung dieser Arbeit wurde durch Kelly *et al.* die Kristallstruktur eines Komplexes aus AP-2 und einem ein Dileuzinmotiv enthaltendem Peptid bestimmt (Kelly *et al.* 2008). Mit dieser Struktur war es möglich die Dileuzinmotiv-Bindungsstelle auf der $\sigma 2$ -Untereinheit zu lokalisieren. Obwohl die Position der Dileuzinmotiv-Bindungstasche nun bekannt ist, ist die Lösung einer Komplexstruktur aus Nef und AP-2 dennoch weiterhin von hohem Interesse. Die Nef-abhängige Internalisierung von Oberflächenrezeptoren spielt eine wichtige Rolle in der HIV-Pathogenität. Es ist weiterhin unbekannt welche Bedeutung die zweite Interaktionsflächen von Nef neben dem Dileuzinmotiv mit AP-2 hat. Eine Nef-spezifischen Interaktionsfläche auf AP-2 könnte aus zwei Gründen ein attraktives therapeutisches Ziel sein. Zum eine könnte eine der wichtigsten Nef-Funktionen spezifisch inhibiert werden ohne die eigentliche Dileuzinmotiv-Bindungseigenschaften der AP-Komplexe zu beeinflussen. Zum anderen wäre das Zielmolekül ein Wirtsprotein, womit es dem HI-Virus unmöglich gemacht wird den Wirkstoff durch die Entwicklung von Resistenzmutationen zu unterlaufen.

Die besondere Herausforderung bei der Entwicklung von antiretroviralen Medikamenten liegt in der hohen Mutationsrate des Virusgenoms. Dies führt zu der raschen Ausbildung von Resistenzmutationen unter dem Selektionsdruck eines in Monotherapie verwendeten Wirkstoffes. Der Einsatz der heute verwendeten Kombinationstherapie, in der mehrere verschiedene Wirkstoffe gegen unterschiedliche Ziel verwendeten werden, zögert die Ausbildung von Resistenzen hinaus, kann Sie jedoch nicht dauerhaft verhindern.

6 Danksagung

Großer Dank gilt:

PD Dr. Matthias Geyer für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die interessante und herausfordernde Fragestellung und die Freiheiten, die ich bei der Durchführung meiner Arbeit hatte.

Prof. Dr. Martin Engelhard und Prof. Dr. Roland Winter, die die Begutachtung meiner Dissertation übernommen haben.

Prof. Dr. Roger Goody für Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Dr. Holger Gerlach und Dr. Sebastian Breuer dafür, dass sie mich in die biochemische Arbeit mit dem Nef-Protein eingeführt haben.

Dr. Michael Weyand und Dr. Antje Schulte für die Einführung in die praktischen und theoretischen Grundlagen der Proteinkristallisation und Strukturbestimmung.

Den Mitgliedern der Kristallographie-Gemeinschaft der MPIs Dortmund und Heidelberg für die Aufnahme der Röntgenbeugungsdatensätzen am Synchrotron.

Santiago Manrique für die tolle Zusammenarbeit im Rahmen des SIV Nef Projekts und die technische Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeit.

Diana Ludwig für die Hilfe bei der Expression vieler Nef-Mutanten und dafür, dass sie nicht zulässt, dass unser Labor im Chaos versinkt.

Karin Vogel-Bachmeyer für die unzähligen Klonierungen, die Sie für mich durchgeführt hat.

Dr. Andre Schönichen, Dr. Nadine Czudnochowski, Friederike Vollmuth, Janna Bigalke, Sonja Kühn, Tim Bommersbach, Sebastian Luelf, Christian Boesken und Dr. Aymelt Itzen für Diskussions- und Hilfsbereitschaft in vielen großen und kleinen Fragen und die tolle Zeit, die ich mit euch als Kollegen hatte.

Dr. Ingrid Vetter dafür, dass Sie stets ein offenes Ohr für Fragen und Probleme zur Proteinkristallisation und Strukturlösung hat.

Dr. Waltraud Goody dafür, dass Sie diese Arbeit Korrektur gelesen hat.

Weifeng Shang und Christoph Jeworrek für die praktische und theoretische Einführung in die Röntgenkleinwinkelstreuung.

Meinen Freunden, meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für ihre Unterstützung und den Rückhalt den sie mir gegeben haben.

Zum Schluss aber nicht zuletzt möchte ich mich bei Andrea Gohlke bedanken, für die liebevolle Unterstützung, dafür dass Sie mich in schwierigen Phasen immer wieder aufgebaut hat und dafür, dass sie es immer noch mit mir aushält.

7 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10} m)
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>engl. acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AP	<i>engl. assembly poly-peptide</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
β-ME	β-Mercaptoethanol
Bp	Basenpaar
BSA	<i>engl. bovine serum Albumin</i>
CAID	<i>engl. constitutive high-affinity AP-2 interaction determinat</i>
CD	<i>engl. cluster of differentiation</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
ΔG°	Änderung der Gibb'schen freien Energie
ΔH	Änderung der Enthalpie
ΔS	Änderung der Entropie
Da	Dalton (1u, 1/12 der Masse von ^{12}C)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTE	Dithioerythritol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. deoxyribonucleic acid</i>)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Ethylenglykol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie
EtBr	Ethidiumbromid
FPLC	Schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie (<i>engl. Fast protein liquid chromatography</i>)
Gag	Gruppenspezifische Antigene
gp41	Glykoprotein 41
gp120	Glykoprotein 120
GSH	Glutathion

GST	Glutathion-S-Transferase
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie (<i>engl. Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
Hck	<i>engl. hemopoietic cell kinase</i>
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>engl. high performance liquid chromatography</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hNMT	humane N-Myristoyltransferase
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
ITAM	<i>engl. immunoreceptor tyrosin based activation motif</i>
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie (<i>engl. isothermal titration calorimetry</i>)
K_D	Dissoziationskonstante
LTR	<i>engl. long terminal repeat</i>
MA	Matrixprotein
MCS	<i>engl. multiple cloning site</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl. Major Histocompatibility Complex</i>)
MWCO	Ausschlussgröße (<i>engl. molecular weight cut-off</i>)
NCS	<i>engl. non crystallographic symmetry</i>
Nef	<i>engl. negative factor</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-triessigsäure (<i>engl. nickel nitrilo tri acetic acid</i>)
nt	Nukleotid(e)
N-Terminus	Aminoterminus
OD_x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
PISA	<i>engl. Protein Interface, Surface and Assemblies</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Protease
Rev	<i>engl. regulator of expression of virion proteins</i>

rms	Wurzel des quadratischen Mittelwerts (<i>engl. root mean square</i>)
rmsd	Wurzel des mittleren Abstandsquadrats (<i>engl. root mean square deviation</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl. revolution per minute</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl. ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transkriptase
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (<i>engl. small angle x-ray scattering</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>)
SH3	<i>Src homology 3</i>
SIV	Immundefizienz-Virus der Affen
SNID	<i>engl. SIV Nef interaction domain</i>
TAR	Transaktivationsresponselement
Tat	Transaktivator der Transkription
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>engl. tobacco etch virus</i>
TGN	trans-Golgi Netzwerk
TLS	<i>engl. translation libration screw</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
Vif	<i>engl. viral infectivity factor</i>
Vpr	<i>engl. viral protein R</i>
Vpu	<i>engl. viral protein U</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>engl. weight per volume</i>)

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt. Zur Bezeichnung von Aminosäuren wurden der Drei- und der Einbuchstabencode gemäß den Empfehlungen von IUPAC und IUB verwendet (IUPAC-IUB 1984; 1993).

8 Anhang

Tabelle 9: Verzeichnis der verwendeten Expressionsplasmide: Steht vor dem Namen des Genprodukts ein His- bzw. GST- wurde das Protein als N-terminales Fusionsprotein mit einem His- bzw. GST-Anker exprimiert. Steht ein -His hinter dem Namen des Proteins wurde es als C-terminales His-Anker Fusionsprotein exprimiert. Für die eigenhändig klonierten Plasmide sind die verwendeten Primer angegeben. Für die zur Verfügung gestellten Plasmide wurde angegeben durch wen diese erstellt wurden. HG: Holger Gerlach, KVB: Karin Vogel-Bachmayer, MG: Matthias Geyer, SM: Santiago Manrique. Die Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich in Tabelle 10. *: Für die Mutagenese wurden weitere Primer verwendet (siehe hierfür Tabelle 10) **: Es wurden stille Mutationen eingeführt um vorhandene Restriktionsschnittstellen zu verändern (für Primer siehe Tabelle 10).

Name des (der) Genprodukt(e)	Organismus	Genotyp	Vektor	Erstellt durch bzw. Primer:
His-Nef _{45-210,C59S}	HIV-1 _{SF2}	Nef, 45-210, I47M, T48A, C59S, C210S	pProEx HTa	MG
His-Nef ₄₅₋₂₁₀	HIV-1 _{SF2}	Nef, 45-210, I47M, T48A, C210S	pProEx HTa	MG
Nef _{wt} -His	HIV-1 _{SF2}	Nef, 1-210, C210S, C-term. His	pET23d	MG
GST-Nef _{MAMA}	HIV-1 _{SF2}	Nef, 1-210, C59S, M172A, M177A, C210S	pGEX-4T1 tev	KVB
GST-Nef _{MEME}	HIV-1 _{SF2}	Nef, 1-210, C59S, M172E, M177E, C210S	pGEX-4T1 tev	KVB
hNMT	Human	hNMT 81-496	pET30a	HG
GST-SIV B	SIV _{mac239}	Nef, 66-235 N67A	pGEX-4T1 tev	SM
GST-SIV ₉₈₋₂₃₅	SIV _{mac239}	GST-Nef, 98-235	pGEX-4T1 tev	KVB
GST-SIV B Δfl	SIV _{mac239}	Nef 66-235, N67A, D184-204	pGEX-4T1	KVB
CD3 ζ ₇₁₋₁₃₅	Human	CD3 ζ, 71-135	pCDF Duet	KVB
GST-CD3 ζ ₇₁₋₁₃₅	Human	CD3 ζ, 71-135	pGEX-4T1 tev	KVB
GST-CD3 ζ ₅₉₋₁₆₄	Human	CD3 ζ, 59-164	pGEX-4T1 tev	KVB
GST-SH3 _E	Human	Hck 78-138, EGWWG	pGEX-4T1 tev	KVB
SH3 _{B6}	Human	Hck 78-138 YSPFSW	pET28a	KVB
GST-SH3 _{B6}	Human	Hck 78-138 YSPFSW	pGEX 2T tev	KVB
His-β1 und μ1	Maus	MCS1 His-β1, 1-584; MCS2: μ1, 1-423	pRSF Duet	AP30/AP31
His-β1 und μ1DD	Maus	MCS1: His-β1, 1-584; MCS2: μ1, 1-423, T154DD	pRSF Duet	KVB
His-γ und σ1	Maus	MCS1 His-γ, 1-616; MCS2 σ1, 1-	pET Duet	AP34/AP35
His-β2 und μ2	Ratte	MCS1 His-β2, 1-591; MCS2 μ2, I2V, C435S	pRSF Duet	AP36/AP37
His-α und σ2	Maus	MCS1 His-α, 1-620; MCS2 σ2, 1-142, I2V	pET Duet	AP38/AP39
His-γ	Maus	His-γ 1, 1-618	pET Duet	AP01/AP02
His-β1	Maus	His-β1, 1-584	pRSF Duet	AP03/AP04
His-β1	Maus	His-β1, 1-584	pCOLA Duet	AP03/AP04
His-α	Maus	His-α1, 1-620	pET Duet	AP11/AP12
His-β2	Ratte	His-β2, 1-591	pCOLA Duet	AP25/AP26
μ1	Maus	μ1, 1-423, I2V, C435S	pACYC Duet	AP07/AP08
σ1	Maus	σ1, 1-158, M2V	pCDF Duet	AP10/AP11
σ1-Nef	Maus	σ1, 1-158, M2V	pCDF Duet	AP10/Nef90*
μ2	Ratte	μ2,1-435, I2V, C435S	pACYC Duet	AP15/AP16**
σ2	Ratte	σ2, 1-142, I2V	pCDF Duet	AP19/AP20
His-μ2 ₁₆₀₋₄₃₅	Ratte	His-μ2, 160-435, C435S	pGEX-4T1 tev	KVB

Tabelle 10: Verzeichnis der verwendeten Primer:

Name	Sequenz	Beschreibung
AP01	5'cgcgatccgatgccagccccatcagattgcgagg3'	AP-1 γ , BamH1,1+, BamH1-Schnittstelle im Leseraster für pDUET/pACYC
AP02	5'cggaattctcatttagtctctagggcgctggttctgtc3'	AP-1 γ , EcoR1, 616-, Stoppcodon
AP03	5'cgcgatccgatgactgactcaaaatacttcacaacaacc3'	AP-1 β 1, BamH1, 1+, BamH1-Schnittstelle im Leseraster für pDUET/pACYC
AP04	5'cggaattctcaGCCCTCCACAAAGGCATTGGGTGGCTTG3'	AP-1 β 1, EcoR1, 584-, Stoppcodon
AP05	5'catgccatggctatgtccgccagcgccgtctacgtactg3'	AP-1 μ 1, Nco1, 1+
AP06	5'cggaattctcactgggtccggagctgataatctcc3'	AP-1 μ 1, EcoR1, 423-, Stoppcodon
AP07	5'ctgtcacctatcttggccacggtggc3'	AP-1 μ 1, Nco1 ausbauen, <i>forward</i> -Primer
AP08	5'catgaaacgaacgccaccgtgggcca3'	AP-1 μ 1, Nco1 ausbauen, reverse
AP09	5'catgccatggctgcgattcatgctactgttcagccgg3'	AP-1 σ 1, Nco1, 1+, Startcodon
AP10	5'cggaattctcattgccagggccatctcctccaggacact3'	AP-1 σ 1, EcoR1, 158-, Stoppcodon
AP11	5'cgcgatccgatgccggccgtatccaaggggacggg3'	AP-1 α , BamH1, 1+ BamH1-Schnittstelle im Leseraster für pDUET/pACYC
AP12	5'cggaattctcaGCCCTTCTTCTTCTCAGCTTGCCAAAG3'	AP-1 α , EcoR1, 620-, Stoppcodon
AP13	5'cgcgatccgatgactgactccaagtacttcacaacc3'	AP-2 β 2, BamH1, 1+, BamH1-Schnittstelle im Leseraster für pDUET/pACYC
AP14	5'cggaattctcaCCCTTCCACAAAAGCATTCGGAGGTTTATG3'	AP-2 β 2, EcoR1, 584-, Stoppcodon
AP15	5'catgccatggctcggagcttattcatctataatcac3'	AP-2 μ 2, Nco1, 1+, I2V, Startcodon
AP16	5'cggaattctcaGGAGCGGGTTTCGTAATGCCACTTCG3'	AP-2 μ 2, EcoR1, 435-, C435S, Stoppcodon
AP17	5'aatgtcaatgcccgatggctcttcgagttcctc3'	AP-2 μ 2, Nco1/EcoR1, ausbauen <i>forward</i> -Primer
AP18	5'CATCTTG TAGGA AACTCGAAGACCATCGCGCA3'	AP-2 μ 2, Nco1/EcoR1, ausbauen reverse
AP19	5'catgccatggctccgattcattctcatccagaac3'	AP-2 σ 2, Nco1, 1+, I2V Startcodon
AP20	5'cggaattctcactccagcgactgcagcatcagcag3'	AP-2 σ 2, EcoR1, 142-, Stoppcodon
AP21	5'cggatcctgccaggccatctcctccaggacact3'	σ 1, BamH1, 158-, kein Stoppcodon
AP22	5'cggatcctccagcgactgcagcatcagcag3'	AP-2 σ 2, BamH1, 142-, kein Stoppcodon
AP25	5'cgcgatccgatgactgactccaagtacttcacaacc3'	AP-2 β 2, BamH1, 1+, BamH1-Schnittstelle im Leseraster für pDUET/pACYC
AP26	5'cggaattctcaTTTGGCATGAATGCCATGGCTCCCTTC3'	AP-2 β 2, EcoR1, 591-, Stoppcodon
AP-30	5'ggaattccatattggctatgtccgccagcgccgtctactg3'	AP-1 μ 1, Nde1, 1+, Startcodon
AP-31	5'ccgctcgagtcactgggtccggagctgataatctcc3'	AP-1 μ 1, Xho1, 423-, Stoppcodon
AP-32	5'gaaggatgaagaccataCgtgccc3'	AP-1 β 1, Nde1 ausbauen, <i>forward</i> -Primer
AP-33	5'gaaggatgaagaccataCgtgccc3'	AP-1 β 1, Nde1 ausbauen, reverse-Primer
AP-34	5'ggaattccatattggctcggattcatgctactgttcagccgg3'	AP-1 σ 1, Nde1, 1+, Startcodon
AP-35	5'ccgctcgagtcattgccagggccatctcctccaggacact3'	AP-1 σ 1, Xho1, 158-, Stoppcodon
AP-36	5'ggaattccatattggctcggaggcttattcatctataatcac3'	AP-2 μ 2, Nde1, 1+, I2V, Startcodon
AP-37	5'ccgctcgagtcaggAGCGGGTTTCGTAATGCCACTTCG3'	AP-2 μ 2, Xho1, 435-, C435S, Stoppcodon
AP-38	5'ggaattccatattggctcggattcattctcatccagaac3'	AP-2 σ 2, Nde1, 1+, I2V, Startcodon
AP-39	5'ccgctcgagtcactccagcgactgcagcatcagcag3'	AP-2 σ 2, Xho1, 142-, Stoppcodon
AP-54	5'catgccatgggtggaggcgggaaggcatcaagtatcgt3'	AP-2 μ 2, Nco1, 160+, Startcodon
AP-55	5'ccagccaggtggacgatgggcaaatggctggaggcgggaagg3'	μ 2, 152+, T156DD-Mutagenese
AP-56	5'ccaatttggccatcgctccacctggctggtgatctgggactgct3'	μ 2, 160-, T156DD Mutagenese

Name	Sequenz	Beschreibung
Nef39	5' cccaagcttgaggagtctttgtagtactccgg3'	HIV-1 _{SF2} Nef, HindIII, 210-, C210S-Mutagenese, kein Stoppcodon,
Nef 45	5' actaatgctgattctgcctgg3'	HIV-1 _{SF2} Nef, 55+, für C59S Mutagenese
Nef 46	5' ttctagccaggcagaatcagc3'	HIV-1 _{SF2} Nef, 63-, für C59S Mutagenese
Nef 90	5' cggaattctcaggagtctttgtagtactccgg3'	HIV-1 _{SF2} Nef, EcoR1, 210-, C210S-Mutagenese, Stoppcodon,
Nef 122	5' cgcggatccggtggcaagtggtaaaacgtagtatg3'	HIV-1 _{SF2} Nef, BamH I, Startcodon
Nef 132	5' catgccatggctactccttggcgtaaccagctgaag3'	SIV _{mac239} Nef, Nco I, 66+, N67A-Mutagenese
Nef 135	5' cggaattctcagcttccaaactcttctgggtatctaac3'	SIV _{mac239} Nef, EcoRI, 235-, Stoppcodon,
Nef147	5' cggaattctcaGCGAGGGGGCAGGGCCTGCATGTGAAGGGCGTCGT3'	CD 3 ζ, EcoRI, 164-, Stoppcodon,
Nef148	5' catgccatggaggacatcatcggttgccctgtatgattacgagggctgggtgggagacctcagcttcagaagggg3'	Hck-SH3 _E , NcoI, 61+, EAIHHE zu EGWWG Mutagenese, Startcodon,
Nef153	5' catgccatgGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGC3'	CD 3 ζ, NcoI, 59+, Startcodon,
Nef173	5' catgccatggCGCTCTATAACGAGCTCAATCTTGGACGA3'	CD 3 ζ, NcoI, 71+, Startcodon
Nef 174	5' cggaattctcaGCCGCGCCGGCGCTCGCCTTTCATCCCA3'	CD 3 ζ, EcoR1, 135-, Stoppcodon,
Nef183	5' aacagcttgttacaccctgcgagcctgcatggggcggaggacgcg3'	HIV-1 _{SF2} Nef Mutagenese <i>forward</i> -Primer für M172A,M177A Mutagenese
Nef184	5' TTTCTCCGCTCCTCCGCCCATGCAGGCTCGCAGGGTGTAACAA3'	HIV-1 _{SF2} Nef <i>reverse</i> -Primer für M172A,M177A Mutagenese
Nef190	5' aacagcttgttacaccctgagagcctgcatggggcggaggacgcg3'	HIV-1 _{SF2} Nef <i>forward</i> -Primer für M172E,M177E Mutagenese
Nef191	5' TTTCTCCGCTCCTCCTCCCATGCAGGCTCTCAGGGTGTAACAA3'	HIV-1 _{SF2} Nef <i>reverse</i> -Primer für M172E,M177E Mutagenese
Nef192	5' catgccatggtaggggtatcagtgaggccaaaagtcc3'	SIV _{mac239} Nef, NcoI, 98+, Startcodon,

Tabelle 11: Protein/Protein-Kontakte innerhalb von 3,8 Å in der asymmetrischen Einheit des HIV-1_{SF2} Nef_{45-210,C59S}/SH3_{B6} Kristalls.

Protein 1	Aminosäure	Atom	Protein 2	Aminosäure	Atom	Abst. (Å)
Nef A	Val70	O	Nef B	Leu174	CD2	3.78
Nef A	Val70	CG1	Nef B	His175	O	3.18
Nef A	Val70	CG2	Nef B	His175	CB	3.78
Nef A	Val70	CG2	Nef B	His175	O	3.56
Nef A	Val70	O	Nef B	His175	O	3.08
Nef A	Gly71	O	Nef B	Ser167	CB	3.79
Nef A	Gly71	O	Nef B	Ser167	OG	3.58
Nef A	Phe72	CD1	Nef B	Leu168	CD2	3.33
Nef A	Phe72	CE1	Nef B	Leu168	CD2	3.75
Nef A	Phe72	CE1	Nef B	Leu174	CD2	3.71
Nef A	Pro73	CG	Nef B	Glu164	O	3.71
Nef A	Pro73	CD	Nef B	Ser167	OG	3.7
Nef A	Arg75	NH1	SH3B6 A	Tyr89	CD1	3.57
Nef A	Arg75	NH1	SH3B6 A	Tyr89	CE1	3.77
Nef A	Arg75	NH2	SH3B6 A	Tyr89	CE1	3.77
Nef A	Arg75	NH1	SH3B6 A	Tyr90	O	3.02
Nef A	Arg75	CB	SH3B6 A	Tyr132	OH	3.58
Nef A	Arg75	CG	SH3B6 A	Tyr132	OH	3.38
Nef A	Arg75	CD	SH3B6 A	Tyr132	OH	3.11
Nef A	Arg75	NE	SH3B6 A	Tyr132	OH	3.32
Nef A	Pro76	CG	SH3B6 A	Tyr87	CD2	3.79
Nef A	Pro76	C	SH3B6 A	Tyr132	OH	3.75
Nef A	Pro76	O	SH3B6 A	Tyr132	CE1	3.36
Nef A	Pro76	O	SH3B6 A	Tyr132	CZ	3.44
Nef A	Pro76	O	SH3B6 A	Tyr132	OH	2.66
Nef A	Gln77	O	SH3B6 A	Asn131	ND2	2.76
Nef A	Val78	CB	SH3B6 A	Trp114	CZ2	3.6
Nef A	Val78	CG1	SH3B6 A	Trp114	CZ2	3.59
Nef A	Pro79	CB	SH3B6 A	Glu113	CB	3.46
Nef A	Pro79	CB	SH3B6 A	Glu113	OE1	3.3
Nef A	Pro79	CG	SH3B6 A	Glu113	CB	3.76
Nef A	Pro79	CG	SH3B6 A	Glu113	O	3.67
Nef A	Pro79	CD	SH3B6 A	Trp114	NE1	3.5
Nef A	Pro79	CD	SH3B6 A	Trp114	CE2	3.79
Nef A	Pro79	O	SH3B6 A	Trp114	CD1	3.7
Nef A	Pro79	O	SH3B6 A	Trp114	NE1	2.92
Nef A	Pro79	CD	SH3B6 A	Pro129	CB	3.4
Nef A	Pro79	CG	SH3B6 A	Asn131	OD1	3.69
Nef A	Pro79	CD	SH3B6 A	Asn131	OD1	3.54
Nef A	Arg81	CD	SH3B6 A	Trp114	CD1	3.63
Nef A	Arg81	NE	SH3B6 A	Trp114	CD1	3.48
Nef A	Arg81	NE	SH3B6 A	Trp114	NE1	3.36
Nef A	Arg81	CZ	SH3B6 A	Trp114	CG	3.66
Nef A	Arg81	CZ	SH3B6 A	Trp114	CD1	3.61
Nef A	Arg81	CZ	SH3B6 A	Trp114	NE1	3.62
Nef A	Arg81	CZ	SH3B6 A	Trp114	CE2	3.67
Nef A	Arg81	CZ	SH3B6 A	Trp114	CD2	3.68
Nef A	Arg81	NH1	SH3B6 A	Trp114	CG	3.59
Nef A	Arg81	NH2	SH3B6 A	Trp114	CE2	3.49
Nef A	Arg81	NH2	SH3B6 A	Trp114	CD2	3.59
Nef A	Arg81	NH2	SH3B6 A	Trp114	CZ2	3.75
Nef A	Asp90	CB	SH3B6 A	Trp95	CZ3	3.59
Nef A	Asp90	CB	SH3B6 A	Trp95	CH2	3.54
Nef A	Asp90	C	SH3B6 A	Trp95	CH2	3.69
Nef A	Asp90	O	SH3B6 A	Trp95	CH2	3.66
Nef A	Phe94	CE1	SH3B6 A	Pro92	O	3.53
Nef A	Phe94	CG	SH3B6 A	Phe93	CE1	3.79
Nef A	Phe94	CD1	SH3B6 A	Phe93	CD1	3.79
Nef A	Phe94	CD2	SH3B6 A	Phe93	CE1	3.65
Nef A	Gly100	CA	Nef B	Met172	CG	3.15
Nef A	Gly100	C	Nef B	Met172	CG	3.51
Nef A	Gly100	C	Nef B	Met172	SD	3.41
Nef A	Gly100	O	Nef B	Met172	CG	3.65
Nef A	Gly100	O	Nef B	Met172	SD	3.19
Nef A	Glu102	O	Nef B	Pro154	CG	3.41
Nef A	Gly103	C	Nef B	Pro154	CD	3.57
Nef A	Gly103	O	Nef B	Pro154	CD	3.17
Nef A	Leu104	CD2	Nef B	Met177	CE	3.73
Nef A	Ile105	CG1	Nef B	Val152	CG1	3.73
Nef A	Ile105	N	Nef B	Glu153	OE2	3.17
Nef A	Ile105	CB	Nef B	Glu153	OE2	3.62
Nef A	Ile105	CG1	Nef B	Glu153	OE2	3.37
Nef A	Ile105	CD1	Nef B	Glu153	CD	3.75
Nef A	Ile105	CD1	Nef B	Glu153	OE2	3.55
Nef A	Ile105	CD1	Nef B	Val184	CB	3.68
Nef A	Arg110	CZ	Nef B	Glu153	OE1	3.29
Nef A	Arg110	NH1	Nef B	Glu153	CD	3.73
Nef A	Arg110	NH1	Nef B	Glu153	OE1	2.94
Nef A	Arg110	NH1	Nef B	Glu153	OE2	3.71
Nef A	Arg110	NH2	Nef B	Glu153	OE1	2.83
Nef A	Arg110	NE	Nef B	Met177	O	3.33
Nef A	Arg110	CZ	Nef B	Met177	O	3.71
Nef A	Arg110	NH2	Nef B	Met177	O	3.24
Nef A	Arg110	NH2	Nef B	Glu178	C	3.66
Nef A	Arg110	NH2	Nef B	Glu178	O	3.4
Nef A	Arg110	NH2	Nef B	Asp179	N	3.63
Nef A	Arg110	NH2	Nef B	Asp179	CA	3.43
Nef A	Arg110	NH2	Nef B	Asp179	OD1	3.35
Nef A	Ile113	CD1	Nef B	Gly176	N	3.5
Nef A	Ile113	CD1	Nef B	Gly176	C	3.49
Nef A	Ile113	CD1	Nef B	Gly176	O	3.42
Nef A	Ile113	CB	Nef B	Met177	SD	3.61
Nef A	Ile113	CG2	Nef B	Met177	SD	3.48
Nef A	Trp117	CH2	SH3B6 A	Phe93	CZ	3.72
Nef A	Trp117	CZ2	SH3B6 A	Phe93	CZ	3.79
Nef A	Trp117	NE1	Nef B	Leu168	C	3.61
Nef A	Trp117	NE1	Nef B	Leu168	O	2.76
Nef A	Trp117	CE2	Nef B	Leu168	O	3.51
Nef A	Trp117	CZ2	Nef B	Leu168	O	3.61
Nef A	Trp117	CD2	Nef B	Pro171	CB	3.67
Nef A	Trp117	CZ2	Nef B	Pro171	CD	3.74
Nef A	His120	ND1B	Nef B	Leu168	CD2	3.46
Nef A	His120	CE1B	Nef B	Leu168	CD2	3.74
Nef A	Thr121	O	SH3B6 A	Tyr89	OH	3.42
Nef A	Thr121	OG1	SH3B6 A	Phe93	CE2	3.6
Nef A	Thr121	O	SH3B6 A	Trp114	CH2	3.78
Nef A	Gln122	NE2	SH3B6 A	Tyr89	OH	3.42
Nef A	Gln122	CG	SH3B6 A	Phe93	CE2	3.49
Nef A	Gln122	CD	SH3B6 A	Phe93	CE2	3.6
Nef A	Gln122	CD	SH3B6 A	Phe93	CD2	3.55
Nef A	Gln122	NE2	SH3B6 A	Phe93	CD2	3.62
Nef A	Gln122	OE1	SH3B6 A	Trp95	NE1	2.95
Nef A	Gln122	NE2	SH3B6 A	Asp96	OD2	2.85
Nef A	Gln122	O	SH3B6 A	Trp114	NE1	3.74
Nef A	Gln122	O	SH3B6 A	Trp114	CE2	3.77
Nef A	Gln122	O	SH3B6 A	Trp114	CZ2	3.54
Nef A	Val152	CG1	Nef B	Ile105	CD1	3.49
Nef A	Val152	O	Nef B	Ile105	CG1	3.78
Nef A	Val152	CG1	Nef B	Val186	CG1	3.54
Nef A	Glu153	N	Nef B	Gly103	O	3.51
Nef A	Glu153	CA	Nef B	Gly103	O	3.31
Nef A	Glu153	C	Nef B	Gly103	O	3.24

Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)	Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)
Nef A	Glu153	O	Nef B	Gly103	O	3.59	SH3B6 A	Glu113	CB	Nef A	Pro79	CG	3.76
Nef A	Pro154	CG	Nef B	Gly100	O	3.55	SH3B6 A	Glu113	OE1	Nef A	Pro79	CB	3.3
Nef A	Pro154	CA	Nef B	Glu102	O	3.33	SH3B6 A	Glu113	O	Nef A	Pro79	CG	3.67
Nef A	Pro154	CB	Nef B	Glu102	O	3.52	SH3B6 A	Trp114	CZ2	Nef A	Val78	CB	3.6
Nef A	Pro154	N	Nef B	Gly103	O	3.58	SH3B6 A	Trp114	CZ2	Nef A	Val78	CG1	3.59
Nef A	Pro154	CD	Nef B	Leu104	CD1	3.8	SH3B6 A	Trp114	CD1	Nef A	Pro79	O	3.7
Nef A	Leu168	CB	SH3B6 B	Tyr90	CE2	3.79	SH3B6 A	Trp114	NE1	Nef A	Pro79	CD	3.5
Nef A	Leu168	CD1	SH3B6 B	Tyr90	CD2	3.66	SH3B6 A	Trp114	NE1	Nef A	Pro79	O	2.92
Nef A	Leu168	O	SH3B6 B	Pro92	CB	3.73	SH3B6 A	Trp114	CE2	Nef A	Pro79	CD	3.79
Nef A	Leu168	O	SH3B6 B	Pro92	CG	3.42	SH3B6 A	Trp114	CG	Nef A	Arg81	CZ	3.66
Nef A	Leu168	C	Nef B	Trp117	NE1	3.5	SH3B6 A	Trp114	CG	Nef A	Arg81	NH1	3.59
Nef A	Leu168	O	Nef B	Trp117	NE1	2.84	SH3B6 A	Trp114	CD1	Nef A	Arg81	CD	3.63
Nef A	Leu168	O	Nef B	Trp117	CE2	3.5	SH3B6 A	Trp114	CD1	Nef A	Arg81	NE	3.48
Nef A	Leu168	O	Nef B	Trp117	CZ2	3.52	SH3B6 A	Trp114	CD1	Nef A	Arg81	CZ	3.61
Nef A	Leu169	CD1	SH3B6 B	Tyr90	OH	3.14	SH3B6 A	Trp114	NE1	Nef A	Arg81	NE	3.36
Nef A	Pro171	CB	Nef B	Trp117	CB	3.79	SH3B6 A	Trp114	NE1	Nef A	Arg81	CZ	3.62
Nef A	Pro171	CB	Nef B	Trp117	CG	3.61	SH3B6 A	Trp114	CE2	Nef A	Arg81	CZ	3.67
Nef A	Pro171	CB	Nef B	Trp117	CD1	3.78	SH3B6 A	Trp114	CE2	Nef A	Arg81	NH2	3.49
Nef A	Pro171	CG	Nef B	Trp117	CG	3.63	SH3B6 A	Trp114	CD2	Nef A	Arg81	CZ	3.68
Nef A	Pro171	CG	Nef B	Trp117	CE2	3.79	SH3B6 A	Trp114	CD2	Nef A	Arg81	NH2	3.59
Nef A	Pro171	CG	Nef B	Trp117	CD2	3.53	SH3B6 A	Trp114	CZ2	Nef A	Arg81	NH2	3.75
Nef A	Pro171	CD	Nef B	Trp117	NE1	3.6	SH3B6 A	Trp114	CH2	Nef A	Thr121	O	3.78
Nef A	Pro171	CD	Nef B	Trp117	CE2	3.63	SH3B6 A	Trp114	NE1	Nef A	Gln122	O	3.74
Nef A	Met172	CG	Nef B	Leu104	CD2	3.76	SH3B6 A	Trp114	CE2	Nef A	Gln122	O	3.77
Nef A	Met172	SD	Nef B	Arg110	O	3.65	SH3B6 A	Trp114	CZ2	Nef A	Gln122	O	3.54
Nef A	Ala180	CB	Nef B	Arg110	NH2	3.8	SH3B6 A	Pro129	CB	Nef A	Pro79	CD	3.4
Nef A	Glu181	CG	Nef B	Ser107	OG	3.4	SH3B6 A	Asn131	ND2	Nef A	Gln77	O	2.76
Nef A	Glu181	CD	Nef B	Ser107	CB	3.47	SH3B6 A	Asn131	OD1	Nef A	Pro79	CG	3.69
Nef A	Glu181	CD	Nef B	Ser107	OG	3.44	SH3B6 A	Asn131	OD1	Nef A	Pro79	CD	3.54
Nef A	Glu181	OE2	Nef B	Ser107	CB	3.34	SH3B6 A	Tyr132	OH	Nef A	Arg75	CB	3.58
Nef A	Glu181	OE2	Nef B	Ser107	OG	3.14	SH3B6 A	Tyr132	OH	Nef A	Arg75	CG	3.38
Nef A	Glu181	OE2	Nef B	Arg109	CB	3.51	SH3B6 A	Tyr132	OH	Nef A	Arg75	CD	3.11
SH3B6 A	Tyr87	CD2	Nef A	Pro76	CG	3.79	SH3B6 A	Tyr132	OH	Nef A	Arg75	NE	3.32
SH3B6 A	Tyr89	CD1	Nef A	Arg75	NH1	3.57	SH3B6 A	Tyr132	CE1	Nef A	Pro76	O	3.36
SH3B6 A	Tyr89	CE1	Nef A	Arg75	NH1	3.77	SH3B6 A	Tyr132	CZ	Nef A	Pro76	O	3.44
SH3B6 A	Tyr89	CE1	Nef A	Arg75	NH2	3.77	SH3B6 A	Tyr132	OH	Nef A	Pro76	C	3.75
SH3B6 A	Tyr89	OH	Nef A	Thr121	O	3.42	SH3B6 A	Tyr132	OH	Nef A	Pro76	O	2.66
SH3B6 A	Tyr89	OH	Nef A	Gln122	NE2	3.42	Nef B	Arg75	NH1	SH3B6 B	Tyr89	CD1	3.46
SH3B6 A	Tyr90	O	Nef A	Arg75	NH1	3.02	Nef B	Arg75	NH1	SH3B6 B	Tyr89	CE1	3.65
SH3B6 A	Tyr90	CB	Nef B	Asn165	CG	3.69	Nef B	Arg75	NH1	SH3B6 B	Tyr90	O	3.29
SH3B6 A	Tyr90	CB	Nef B	Asn165	ND2	3.41	Nef B	Arg75	CB	SH3B6 B	Tyr132	OH	3.31
SH3B6 A	Tyr90	CG	Nef B	Asn165	CB	3.78	Nef B	Arg75	CG	SH3B6 B	Tyr132	OH	3.33
SH3B6 A	Tyr90	CG	Nef B	Asn165	CG	3.72	Nef B	Arg75	CD	SH3B6 B	Tyr132	OH	3.07
SH3B6 A	Tyr90	CG	Nef B	Asn165	ND2	3.63	Nef B	Arg75	NE	SH3B6 B	Tyr132	OH	3.22
SH3B6 A	Tyr90	CD2	Nef B	Asn165	CB	3.64	Nef B	Pro76	CG	SH3B6 B	Tyr87	CZ	3.74
SH3B6 A	Tyr90	CD2	Nef B	Leu168	CD1	3.72	Nef B	Pro76	CG	SH3B6 B	Tyr87	CE2	3.55
SH3B6 A	Tyr90	OH	Nef B	Leu169	CB	3.17	Nef B	Pro76	CG	SH3B6 B	Tyr87	CD2	3.75
SH3B6 A	Tyr90	OH	Nef B	Leu169	CG	3.68	Nef B	Pro76	N	SH3B6 B	Tyr132	OH	3.72
SH3B6 A	Tyr90	OH	Nef B	Leu169	CD2	3.33	Nef B	Pro76	C	SH3B6 B	Tyr132	OH	3.63
SH3B6 A	Pro92	O	Nef A	Phe94	CE1	3.53	Nef B	Pro76	O	SH3B6 B	Tyr132	CE1	3.27
SH3B6 A	Pro92	CG	Nef B	Leu168	O	3.33	Nef B	Pro76	O	SH3B6 B	Tyr132	CZ	3.3
SH3B6 A	Pro92	CB	Nef B	Leu169	CA	3.7	Nef B	Pro76	O	SH3B6 B	Tyr132	OH	2.54
SH3B6 A	Phe93	CD1	Nef A	Phe94	CD1	3.79	Nef B	Gln77	O	SH3B6 B	Asn131	ND2	2.95
SH3B6 A	Phe93	CE1	Nef A	Phe94	CG	3.79	Nef B	Val78	CB	SH3B6 B	Trp114	CZ2	3.54
SH3B6 A	Phe93	CE1	Nef A	Phe94	CD2	3.65	Nef B	Val78	CG1	SH3B6 B	Trp114	CZ2	3.53
SH3B6 A	Phe93	CZ	Nef A	Trp117	CH2	3.72	Nef B	Val78	CG2	SH3B6 B	Tyr132	CE1	3.75
SH3B6 A	Phe93	CZ	Nef A	Trp117	CZ2	3.79	Nef B	Pro79	CB	SH3B6 B	Glu113	CB	3.65
SH3B6 A	Phe93	CE2	Nef A	Thr121	OG1	3.6	Nef B	Pro79	CG	SH3B6 B	Glu113	O	3.78
SH3B6 A	Phe93	CE2	Nef A	Gln122	CG	3.49	Nef B	Pro79	CB	SH3B6 B	Trp114	NE1	3.72
SH3B6 A	Phe93	CE2	Nef A	Gln122	CD	3.6	Nef B	Pro79	CD	SH3B6 B	Trp114	NE1	3.73
SH3B6 A	Phe93	CD2	Nef A	Gln122	CD	3.55	Nef B	Pro79	C	SH3B6 B	Trp114	NE1	3.79
SH3B6 A	Phe93	CD2	Nef A	Gln122	NE2	3.62	Nef B	Pro79	O	SH3B6 B	Trp114	NE1	2.98
SH3B6 A	Trp95	CZ3	Nef A	Asp90	CB	3.59	Nef B	Pro79	CD	SH3B6 B	Pro129	CB	3.45
SH3B6 A	Trp95	CH2	Nef A	Asp90	CB	3.54	Nef B	Pro79	CG	SH3B6 B	Asn131	OD1	3.54
SH3B6 A	Trp95	CH2	Nef A	Asp90	C	3.69	Nef B	Pro79	CD	SH3B6 B	Asn131	OD1	3.38
SH3B6 A	Trp95	CH2	Nef A	Asp90	O	3.66	Nef B	Arg81	CD	SH3B6 B	Trp114	CD1	3.66
SH3B6 A	Trp95	NE1	Nef A	Gln122	OE1	2.95	Nef B	Arg81	NE	SH3B6 B	Trp114	CD1	3.54
SH3B6 A	Asp96	OD2	Nef A	Gln122	NE2	2.85	Nef B	Arg81	NE	SH3B6 B	Trp114	NE1	3.41
SH3B6 A	Glu113	CB	Nef A	Pro79	CB	3.46	Nef B	Arg81	NE	SH3B6 B	Trp114	CE2	3.78

Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)	Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)
Nef B	Arg81	CZ	SH3B6 B	Trp114	CG	3.57	Nef B	Gln122	O	SH3B6 B	Trp114	NE1	3.75
Nef B	Arg81	CZ	SH3B6 B	Trp114	CD1	3.61	Nef B	Gln122	O	SH3B6 B	Trp114	CE2	3.63
Nef B	Arg81	CZ	SH3B6 B	Trp114	NE1	3.62	Nef B	Gln122	O	SH3B6 B	Trp114	CZ2	3.28
Nef B	Arg81	CZ	SH3B6 B	Trp114	CE2	3.56	Nef B	Val152	CG1	Nef A	Ile105	CG1	3.73
Nef B	Arg81	CZ	SH3B6 B	Trp114	CD2	3.55	Nef B	Glu153	CD	Nef A	Ile105	CD1	3.75
Nef B	Arg81	NH1	SH3B6 B	Trp114	CB	3.67	Nef B	Glu153	OE2	Nef A	Ile105	N	3.17
Nef B	Arg81	NH1	SH3B6 B	Trp114	CG	3.41	Nef B	Glu153	OE2	Nef A	Ile105	CB	3.62
Nef B	Arg81	NH1	SH3B6 B	Trp114	CD1	3.74	Nef B	Glu153	OE2	Nef A	Ile105	CG1	3.37
Nef B	Arg81	NH1	SH3B6 B	Trp114	CD2	3.72	Nef B	Glu153	OE2	Nef A	Ile105	CD1	3.55
Nef B	Arg81	NH2	SH3B6 B	Trp114	CE2	3.41	Nef B	Glu153	CD	Nef A	Arg110	NH1	3.73
Nef B	Arg81	NH2	SH3B6 B	Trp114	CD2	3.48	Nef B	Glu153	OE1	Nef A	Arg110	CZ	3.29
Nef B	Arg81	NH2	SH3B6 B	Trp114	CE3	3.74	Nef B	Glu153	OE1	Nef A	Arg110	NH1	2.94
Nef B	Arg81	NH2	SH3B6 B	Trp114	CZ2	3.64	Nef B	Glu153	OE1	Nef A	Arg110	NH2	2.83
Nef B	Asp90	CB	SH3B6 B	Trp95	CZ3	3.66	Nef B	Glu153	OE2	Nef A	Arg110	NH1	3.71
Nef B	Asp90	CB	SH3B6 B	Trp95	CH2	3.66	Nef B	Pro154	CG	Nef A	Glu102	O	3.41
Nef B	Asp90	C	SH3B6 B	Trp95	CH2	3.78	Nef B	Pro154	CD	Nef A	Gly103	C	3.57
Nef B	Asp90	O	SH3B6 B	Trp95	CH2	3.63	Nef B	Pro154	CD	Nef A	Gly103	O	3.17
Nef B	Phe94	CE1	SH3B6 B	Pro92	O	3.32	Nef B	Glu164	O	Nef A	Pro73	CG	3.71
Nef B	Phe94	CG	SH3B6 B	Phe93	CD1	3.76	Nef B	Asn165	CB	SH3B6 A	Tyr90	CG	3.78
Nef B	Phe94	CG	SH3B6 B	Phe93	CE1	3.78	Nef B	Asn165	CB	SH3B6 A	Tyr90	CD2	3.64
Nef B	Phe94	CD1	SH3B6 B	Phe93	CD1	3.63	Nef B	Asn165	CG	SH3B6 A	Tyr90	CB	3.69
Nef B	Phe94	CD2	SH3B6 B	Phe93	CE1	3.66	Nef B	Asn165	CG	SH3B6 A	Tyr90	CG	3.72
Nef B	Gly100	O	Nef A	Pro154	CG	3.55	Nef B	Asn165	ND2	SH3B6 A	Tyr90	CB	3.41
Nef B	Glu102	O	Nef A	Pro154	CA	3.33	Nef B	Asn165	ND2	SH3B6 A	Tyr90	CG	3.63
Nef B	Glu102	O	Nef A	Pro154	CB	3.52	Nef B	Ser167	CB	Nef A	Gly71	O	3.79
Nef B	Gly103	O	Nef A	Glu153	N	3.51	Nef B	Ser167	OG	Nef A	Gly71	O	3.58
Nef B	Gly103	O	Nef A	Glu153	CA	3.31	Nef B	Ser167	OG	Nef A	Pro73	CD	3.7
Nef B	Gly103	O	Nef A	Glu153	C	3.24	Nef B	Leu168	CD2	Nef A	Phe72	CD1	3.33
Nef B	Gly103	O	Nef A	Glu153	O	3.59	Nef B	Leu168	CD2	Nef A	Phe72	CE1	3.75
Nef B	Gly103	O	Nef A	Pro154	N	3.58	Nef B	Leu168	CD1	SH3B6 A	Tyr90	CD2	3.72
Nef B	Leu104	CD1	Nef A	Pro154	CD	3.8	Nef B	Leu168	O	SH3B6 A	Pro92	CG	3.33
Nef B	Leu104	CD2	Nef A	Met172	CG	3.76	Nef B	Leu168	C	Nef A	Trp117	NE1	3.61
Nef B	Ile105	CG1	Nef A	Val152	O	3.78	Nef B	Leu168	O	Nef A	Trp117	NE1	2.76
Nef B	Ile105	CD1	Nef A	Val152	CG1	3.49	Nef B	Leu168	O	Nef A	Trp117	CE2	3.51
Nef B	Ser107	CB	Nef A	Glu181	CD	3.47	Nef B	Leu168	O	Nef A	Trp117	CZ2	3.61
Nef B	Ser107	CB	Nef A	Glu181	OE2	3.34	Nef B	Leu168	CD2	Nef A	His120	ND1B	3.46
Nef B	Ser107	OG	Nef A	Glu181	CG	3.4	Nef B	Leu168	CD2	Nef A	His120	CE1B	3.74
Nef B	Ser107	OG	Nef A	Glu181	CD	3.44	Nef B	Leu168	CD2	Nef A	His120	CE1B	3.74
Nef B	Ser107	OG	Nef A	Glu181	OE2	3.14	Nef B	Leu169	CB	SH3B6 A	Tyr90	OH	3.17
Nef B	Arg109	CB	Nef A	Glu181	OE2	3.51	Nef B	Leu169	CG	SH3B6 A	Tyr90	OH	3.68
Nef B	Arg110	O	Nef A	Met172	SD	3.65	Nef B	Leu169	CD2	SH3B6 A	Tyr90	OH	3.33
Nef B	Arg110	NH2	Nef A	Ala180	CB	3.8	Nef B	Leu169	CA	SH3B6 A	Pro92	CB	3.7
Nef B	Trp117	CH2	SH3B6 B	Phe93	CE1	3.69	Nef B	Pro171	CB	Nef A	Trp117	CD2	3.67
Nef B	Trp117	CH2	SH3B6 B	Phe93	CZ	3.4	Nef B	Pro171	CD	Nef A	Trp117	CZ2	3.74
Nef B	Trp117	NE1	Nef A	Leu168	C	3.5	Nef B	Met172	CG	Nef A	Gly100	CA	3.15
Nef B	Trp117	NE1	Nef A	Leu168	O	2.84	Nef B	Met172	CG	Nef A	Gly100	C	3.51
Nef B	Trp117	CE2	Nef A	Leu168	O	3.5	Nef B	Met172	CG	Nef A	Gly100	O	3.65
Nef B	Trp117	CZ2	Nef A	Leu168	O	3.52	Nef B	Met172	SD	Nef A	Gly100	C	3.41
Nef B	Trp117	CB	Nef A	Pro171	CB	3.79	Nef B	Met172	SD	Nef A	Gly100	O	3.19
Nef B	Trp117	CG	Nef A	Pro171	CB	3.61	Nef B	Leu174	CD2	Nef A	Val70	O	3.78
Nef B	Trp117	CG	Nef A	Pro171	CG	3.63	Nef B	Leu174	CD2	Nef A	Phe72	CE1	3.71
Nef B	Trp117	CD1	Nef A	Pro171	CB	3.78	Nef B	His175	CB	Nef A	Val70	CG2	3.78
Nef B	Trp117	NE1	Nef A	Pro171	CD	3.6	Nef B	His175	O	Nef A	Val70	CG1	3.18
Nef B	Trp117	CE2	Nef A	Pro171	CG	3.79	Nef B	His175	O	Nef A	Val70	CG2	3.56
Nef B	Trp117	CE2	Nef A	Pro171	CD	3.63	Nef B	His175	O	Nef A	Val70	O	3.08
Nef B	Trp117	CD2	Nef A	Pro171	CG	3.53	Nef B	Gly176	N	Nef A	Ile113	CD1	3.5
Nef B	Thr121	O	SH3B6 B	Tyr89	OH	3.28	Nef B	Gly176	C	Nef A	Ile113	CD1	3.49
Nef B	Thr121	OG1	SH3B6 B	Phe93	CE2	3.72	Nef B	Gly176	O	Nef A	Ile113	CD1	3.42
Nef B	Thr121	O	SH3B6 B	Trp114	CH2	3.67	Nef B	Met177	CE	Nef A	Leu104	CD2	3.73
Nef B	Gln122	NE2	SH3B6 B	Tyr89	OH	3.48	Nef B	Met177	O	Nef A	Arg110	NE	3.33
Nef B	Gln122	CG	SH3B6 B	Phe93	CE2	3.45	Nef B	Met177	O	Nef A	Arg110	CZ	3.71
Nef B	Gln122	CD	SH3B6 B	Phe93	CE2	3.65	Nef B	Met177	O	Nef A	Arg110	NH2	3.24
Nef B	Gln122	CD	SH3B6 B	Phe93	CD2	3.57	Nef B	Met177	SD	Nef A	Ile113	CB	3.61
Nef B	Gln122	NE2	SH3B6 B	Phe93	CD2	3.55	Nef B	Met177	SD	Nef A	Ile113	CG2	3.48
Nef B	Gln122	OE1	SH3B6 B	Trp95	NE1	2.84	Nef B	Glu178	C	Nef A	Arg110	NH2	3.66
Nef B	Gln122	OE1	SH3B6 B	Trp95	CE2	3.74	Nef B	Glu178	O	Nef A	Arg110	NH2	3.4
Nef B	Gln122	NE2	SH3B6 B	Asp96	CG	3.61	Nef B	Asp179	N	Nef A	Arg110	NH2	3.63
Nef B	Gln122	NE2	SH3B6 B	Asp96	OD2	2.68	Nef B	Asp179	CA	Nef A	Arg110	NH2	3.43
Nef B	Gln122	C	SH3B6 B	Trp114	CZ2	3.65	Nef B	Asp179	OD1	Nef A	Arg110	NH2	3.35
Nef B	Gln122	C	SH3B6 B	Trp114	CZ2	3.65	Nef B	Val184	CB	Nef A	Ile105	CD1	3.68

Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)	Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)
Nef B	Val186	CG1	Nef A	Val152	CG1	3.54	SH3B6 B	Trp114	NE1	Nef B	Pro79	C	3.79
SH3B6 B	Tyr87	CZ	Nef B	Pro76	CG	3.74	SH3B6 B	Trp114	NE1	Nef B	Pro79	O	2.98
SH3B6 B	Tyr87	CE2	Nef B	Pro76	CG	3.55	SH3B6 B	Trp114	CB	Nef B	Arg81	NH1	3.67
SH3B6 B	Tyr87	CD2	Nef B	Pro76	CG	3.75	SH3B6 B	Trp114	CG	Nef B	Arg81	CZ	3.57
SH3B6 B	Tyr89	CD1	Nef B	Arg75	NH1	3.46	SH3B6 B	Trp114	CG	Nef B	Arg81	NH1	3.41
SH3B6 B	Tyr89	CE1	Nef B	Arg75	NH1	3.65	SH3B6 B	Trp114	CD1	Nef B	Arg81	CD	3.66
SH3B6 B	Tyr89	OH	Nef B	Thr121	O	3.28	SH3B6 B	Trp114	CD1	Nef B	Arg81	NE	3.54
SH3B6 B	Tyr89	OH	Nef B	Gln122	NE2	3.48	SH3B6 B	Trp114	CD1	Nef B	Arg81	CZ	3.61
SH3B6 B	Tyr90	O	Nef B	Arg75	NH1	3.29	SH3B6 B	Trp114	CD1	Nef B	Arg81	NH1	3.74
SH3B6 B	Tyr90	CE2	Nef A	Leu168	CB	3.79	SH3B6 B	Trp114	NE1	Nef B	Arg81	NE	3.41
SH3B6 B	Tyr90	CD2	Nef A	Leu168	CD1	3.66	SH3B6 B	Trp114	NE1	Nef B	Arg81	CZ	3.62
SH3B6 B	Tyr90	OH	Nef A	Leu169	CD1	3.14	SH3B6 B	Trp114	CE2	Nef B	Arg81	NE	3.78
SH3B6 B	Pro92	O	Nef B	Phe94	CE1	3.32	SH3B6 B	Trp114	CE2	Nef B	Arg81	CZ	3.56
SH3B6 B	Pro92	CB	Nef A	Leu168	O	3.73	SH3B6 B	Trp114	CE2	Nef B	Arg81	NH2	3.41
SH3B6 B	Pro92	CG	Nef A	Leu168	O	3.42	SH3B6 B	Trp114	CD2	Nef B	Arg81	CZ	3.55
SH3B6 B	Phe93	CD1	Nef B	Phe94	CG	3.76	SH3B6 B	Trp114	CD2	Nef B	Arg81	NH1	3.72
SH3B6 B	Phe93	CD1	Nef B	Phe94	CD1	3.63	SH3B6 B	Trp114	CD2	Nef B	Arg81	NH2	3.48
SH3B6 B	Phe93	CE1	Nef B	Phe94	CG	3.78	SH3B6 B	Trp114	CE3	Nef B	Arg81	NH2	3.74
SH3B6 B	Phe93	CE1	Nef B	Phe94	CD2	3.66	SH3B6 B	Trp114	CZ2	Nef B	Arg81	NH2	3.64
SH3B6 B	Phe93	CE1	Nef B	Trp117	CH2	3.69	SH3B6 B	Trp114	CH2	Nef B	Thr121	O	3.67
SH3B6 B	Phe93	CZ	Nef B	Trp117	CH2	3.4	SH3B6 B	Trp114	NE1	Nef B	Gln122	O	3.75
SH3B6 B	Phe93	CE2	Nef B	Thr121	OG1	3.72	SH3B6 B	Trp114	CE2	Nef B	Gln122	O	3.63
SH3B6 B	Phe93	CE2	Nef B	Gln122	CG	3.45	SH3B6 B	Trp114	CZ2	Nef B	Gln122	C	3.65
SH3B6 B	Phe93	CE2	Nef B	Gln122	CD	3.65	SH3B6 B	Trp114	CZ2	Nef B	Gln122	O	3.28
SH3B6 B	Phe93	CD2	Nef B	Gln122	CD	3.57	SH3B6 B	Pro129	CB	Nef B	Pro79	CD	3.45
SH3B6 B	Phe93	CD2	Nef B	Gln122	NE2	3.55	SH3B6 B	Asn131	ND2	Nef B	Gln77	O	2.95
SH3B6 B	Trp95	CZ3	Nef B	Asp90	CB	3.66	SH3B6 B	Asn131	OD1	Nef B	Pro79	CG	3.54
SH3B6 B	Trp95	CH2	Nef B	Asp90	CB	3.66	SH3B6 B	Asn131	OD1	Nef B	Pro79	CD	3.38
SH3B6 B	Trp95	CH2	Nef B	Asp90	C	3.78	SH3B6 B	Tyr132	OH	Nef B	Arg75	CB	3.31
SH3B6 B	Trp95	CH2	Nef B	Asp90	O	3.63	SH3B6 B	Tyr132	OH	Nef B	Arg75	CG	3.33
SH3B6 B	Trp95	NE1	Nef B	Gln122	OE1	2.84	SH3B6 B	Tyr132	OH	Nef B	Arg75	CD	3.07
SH3B6 B	Trp95	CE2	Nef B	Gln122	OE1	3.74	SH3B6 B	Tyr132	OH	Nef B	Arg75	NE	3.22
SH3B6 B	Asp96	CG	Nef B	Gln122	NE2	3.61	SH3B6 B	Tyr132	CE1	Nef B	Pro76	O	3.27
SH3B6 B	Asp96	OD2	Nef B	Gln122	NE2	2.68	SH3B6 B	Tyr132	CZ	Nef B	Pro76	O	3.3
SH3B6 B	Glu113	CB	Nef B	Pro79	CB	3.65	SH3B6 B	Tyr132	OH	Nef B	Pro76	N	3.72
SH3B6 B	Glu113	O	Nef B	Pro79	CG	3.78	SH3B6 B	Tyr132	OH	Nef B	Pro76	C	3.63
SH3B6 B	Trp114	CZ2	Nef B	Val78	CB	3.54	SH3B6 B	Tyr132	OH	Nef B	Pro76	O	2.54
SH3B6 B	Trp114	CZ2	Nef B	Val78	CG1	3.53	SH3B6 B	Tyr132	OH	Nef B	Pro76	O	2.54
SH3B6 B	Trp114	NE1	Nef B	Pro79	CB	3.72	SH3B6 B	Tyr132	CE1	Nef B	Val78	CG2	3.75
SH3B6 B	Trp114	NE1	Nef B	Pro79	CD	3.73							

Tabelle 12: Protein/Protein-Kontakte innerhalb von 3,8 Å in der asymmetrischen Einheit des SIV B/SH3_E-Kristalls.

Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)	Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)
Nef A	Arg103	CA	SH3E A	Tyr87	CD1	3.73	Nef A	Arg109	CD	SH3E A	Trp113	CZ2	3.7
Nef A	Arg103	CD	SH3E A	Asp88	O	3.63	Nef A	Arg109	NE	SH3E A	Trp113	CE2	3.62
Nef A	Arg103	CZ	SH3E A	Asp88	O	3.47	Nef A	Arg109	NE	SH3E A	Trp113	CZ2	3.21
Nef A	Arg103	NH1	SH3E A	Asp88	N	3.48	Nef A	Arg109	NE	SH3E A	Trp113	CH2	3.52
Nef A	Arg103	NH1	SH3E A	Asp88	CA	3.71	Nef A	Arg109	CZ	SH3E A	Trp113	CZ2	3.45
Nef A	Arg103	NH1	SH3E A	Asp88	C	3.4	Nef A	Arg109	CZ	SH3E A	Trp113	CZ3	3.65
Nef A	Arg103	NH1	SH3E A	Asp88	O	2.52	Nef A	Arg109	CZ	SH3E A	Trp113	CH2	3.22
Nef A	Arg103	NH1	SH3E A	Asp88	CB	3.66	Nef A	Arg109	NH1	SH3E A	Trp113	CZ3	3.53
Nef A	Arg103	CG	SH3E A	Tyr131	CE2	3.33	Nef A	Arg109	NH1	SH3E A	Trp113	CH2	3.63
Nef A	Arg103	CG	SH3E A	Tyr131	CZ	3.35	Nef A	Arg109	NH2	SH3E A	Trp113	CZ2	3.77
Nef A	Arg103	CG	SH3E A	Tyr131	OH	2.86	Nef A	Arg109	NH2	SH3E A	Trp113	CH2	3.28
Nef A	Arg103	CD	SH3E A	Tyr131	CE2	3.74	Nef A	Thr110	CB	SH3E B	Tyr126	OH	3.78
Nef A	Arg103	CD	SH3E A	Tyr131	OH	3.14	Nef A	Thr110	CG2	SH3E B	Tyr126	CE1	3.71
Nef A	Pro104	CG	SH3E A	Tyr87	CE2	3.55	Nef A	Thr110	CG2	SH3E B	Tyr126	CZ	3.5
Nef A	Pro104	CG	SH3E A	Tyr87	CZ	3.44	Nef A	Thr110	CG2	SH3E B	Tyr126	OH	3.15
Nef A	Pro104	CG	SH3E A	Tyr87	OH	3.6	Nef A	Tyr113	OH	Nef B	Lys169	O	3.31
Nef A	Pro104	CD	SH3E A	Tyr87	CG	3.72	Nef A	Tyr113	OH	Nef B	Thr170	CA	3.57
Nef A	Pro104	CD	SH3E A	Tyr87	CD1	3.69	Nef A	Tyr113	CZ	Nef B	Phe171	N	3.66
Nef A	Pro104	CD	SH3E A	Tyr87	CD2	3.63	Nef A	Tyr113	OH	Nef B	Phe171	N	3.19
Nef A	Pro104	CD	SH3E A	Tyr87	CE1	3.59	Nef A	Tyr113	CE1	Nef B	Tyr223	OH	3.48
Nef A	Pro104	CD	SH3E A	Tyr87	CE2	3.53	Nef A	Tyr113	CZ	Nef B	Tyr223	OH	3.49
Nef A	Pro104	CD	SH3E A	Tyr87	CZ	3.51	Nef A	Tyr113	OH	Nef B	Tyr223	CZ	3.78
Nef A	Pro104	O	SH3E A	Tyr131	CE1	3.23	Nef A	Tyr113	OH	Nef B	Tyr223	OH	2.8
Nef A	Pro104	O	SH3E A	Tyr131	CZ	3.2	Nef A	Lys114	CA	SH3E A	Trp93	CE3	3.6
Nef A	Pro104	O	SH3E A	Tyr131	OH	2.49	Nef A	Lys114	CA	SH3E A	Trp93	CZ3	3.65
Nef A	Pro104	C	SH3E A	Tyr131	OH	3.7	Nef A	Lys114	O	SH3E A	Trp93	CE3	3.41
Nef A	Lys105	O	SH3E A	Asn130	CG	3.72	Nef A	Lys114	O	SH3E A	Trp93	CZ3	3.8
Nef A	Lys105	O	SH3E A	Asn130	ND2	2.57	Nef A	Lys114	CB	SH3E A	Trp93	O	3.49
Nef A	Lys105	C	SH3E A	Asn130	ND2	3.76	Nef A	Lys114	CB	SH3E A	Trp93	CD2	3.65
Nef A	Val106	CG1	SH3E A	Tyr89	CE1	3.61	Nef A	Lys114	CB	SH3E A	Trp93	CE3	3.57
Nef A	Val106	CB	SH3E A	Trp113	CZ2	3.65	Nef A	Lys114	CD	SH3E A	Trp93	CD2	3.8
Nef A	Val106	CG2	SH3E A	Trp113	CZ2	3.8	Nef A	Lys114	CD	SH3E A	Trp93	CE2	3.34
Nef A	Val106	CG1	SH3E A	Tyr131	CE1	3.74	Nef A	Lys114	CD	SH3E A	Trp93	NE1	3.43
Nef A	Val106	CG1	SH3E A	Tyr131	OH	3.7	Nef A	Lys114	CD	SH3E A	Trp93	CZ2	3.6
Nef A	Pro107	CB	SH3E A	Glu112	CB	3.48	Nef A	Leu115	CD2	SH3E A	Trp92	CB	3.46
Nef A	Pro107	CB	SH3E A	Glu112	OE1	3.18	Nef A	Leu115	CD2	SH3E A	Trp92	CG	3.74
Nef A	Pro107	CG	SH3E A	Glu112	O	3.56	Nef A	Asp118	CG	SH3E A	Trp92	CE3	3.72
Nef A	Pro107	C	SH3E A	Trp113	NE1	3.31	Nef A	Asp118	OD2	SH3E A	Trp92	CA	3.52
Nef A	Pro107	O	SH3E A	Trp113	CD1	3.72	Nef A	Asp118	OD2	SH3E A	Trp92	C	3.66
Nef A	Pro107	O	SH3E A	Trp113	CE2	3.27	Nef A	Asp118	OD2	SH3E A	Trp92	CE3	3.72
Nef A	Pro107	O	SH3E A	Trp113	NE1	2.57	Nef A	Asp118	OD2	SH3E A	Trp93	N	3.11
Nef A	Pro107	O	SH3E A	Trp113	CZ2	3.4	Nef A	Asp118	OD2	SH3E A	Trp93	CB	3.58
Nef A	Pro107	CB	SH3E A	Trp113	CD1	3.77	Nef A	Met119	CG	SH3E A	Trp92	CD2	3.78
Nef A	Pro107	CB	SH3E A	Trp113	NE1	3.54	Nef A	Met119	CG	SH3E A	Trp92	CE3	3.76
Nef A	Pro107	CD	SH3E A	Pro128	CB	3.28	Nef A	Met119	CE	SH3E A	Trp92	CD1	3.43
Nef A	Pro107	CG	SH3E A	Asn130	OD1	3.4	Nef A	Met119	CE	SH3E A	Trp92	CE2	3.5
Nef A	Pro107	CD	SH3E A	Asn130	OD1	3.1	Nef A	Met119	CE	SH3E A	Trp92	NE1	3.22
Nef A	Leu108	O	SH3E B	Ser110	OG	3.38	Nef A	Phe122	CB	SH3E A	Trp92	CZ3	3.54
Nef A	Leu108	C	SH3E A	Trp113	NE1	3.66	Nef A	Phe122	CB	SH3E A	Trp92	CH2	3.76
Nef A	Leu108	O	SH3E A	Trp113	CD1	3.41	Nef A	Phe122	CG	SH3E A	Trp92	CZ3	3.76
Nef A	Leu108	O	SH3E A	Trp113	NE1	3.36	Nef A	Phe122	CG	SH3E A	Trp92	CH2	3.51
Nef A	Arg109	NH2	SH3E A	Tyr89	OH	3.2	Nef A	Phe122	CD2	SH3E A	Trp92	CH2	3.68
Nef A	Arg109	CZ	SH3E A	Asp95	OD1	3.78	Nef A	Glu150	CD	SH3E A	Trp92	CE2	3.73
Nef A	Arg109	CZ	SH3E A	Asp95	OD2	3.61	Nef A	Glu150	CD	SH3E A	Trp92	NE1	3.23
Nef A	Arg109	NH1	SH3E A	Asp95	CG	3.4	Nef A	Glu150	CD	SH3E A	Trp92	CZ2	3.58
Nef A	Arg109	NH1	SH3E A	Asp95	OD1	2.77	Nef A	Glu150	OE1	SH3E A	Trp92	CD1	3.79
Nef A	Arg109	NH1	SH3E A	Asp95	OD2	3.33	Nef A	Glu150	OE1	SH3E A	Trp92	CE2	3.61
Nef A	Arg109	NH2	SH3E A	Asp95	OD2	3.01	Nef A	Glu150	OE1	SH3E A	Trp92	NE1	2.73
Nef A	Arg109	CB	SH3E A	Trp113	CD1	3.76	Nef A	Glu150	OE2	SH3E A	Trp92	CE2	3.76
Nef A	Arg109	CB	SH3E A	Trp113	NE1	3.59	Nef A	Glu150	OE2	SH3E A	Trp92	NE1	3.68
Nef A	Arg109	CG	SH3E A	Trp113	NE1	3.64	Nef A	Glu150	OE2	SH3E A	Trp92	CZ2	3.16
Nef A	Arg109	CD	SH3E A	Trp113	CE2	3.54	Nef A	Asp155	OD2	SH3E B	Lys115	CD	3.37
Nef A	Arg109	CD	SH3E A	Trp113	NE1	3.73	Nef A	Asp155	OD2	SH3E B	Lys115	CE	3.13

Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)	Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)
Nef A	Asp155	OD2	SH3E B	Lys115	NZ	3.13	Nef B	Pro107	CD	SH3E B	Pro128	CB	3.59
Nef A	Asp155	CG	SH3E B	Tyr126	OH	3.32	Nef B	Pro107	CG	SH3E B	Asn130	OD1	3.74
Nef A	Asp155	OD1	SH3E B	Tyr126	OH	3.58	Nef B	Pro107	CD	SH3E B	Asn130	OD1	3.39
Nef A	Asp155	OD2	SH3E B	Tyr126	CE2	3.74	Nef B	Leu108	O	SH3E B	Trp113	CD1	3.75
Nef A	Asp155	OD2	SH3E B	Tyr126	CZ	3.32	Nef B	Leu108	O	SH3E B	Trp113	NE1	3.66
Nef A	Asp155	OD2	SH3E B	Tyr126	OH	2.38	Nef B	Leu108	CD1	SH3E A	Glu108	CD	3.68
Nef A	Lys169	O	Nef B	Tyr113	OH	3.38	Nef B	Leu108	CD1	SH3E A	Glu108	OE2	3.28
Nef A	Thr170	CA	Nef B	Tyr113	OH	3.59	Nef B	Leu108	O	SH3E A	Ser110	OG	3.14
Nef A	Phe171	N	Nef B	Tyr113	CZ	3.7	Nef B	Arg109	NH2	SH3E B	Tyr89	OH	3.24
Nef A	Phe171	N	Nef B	Tyr113	OH	3.19	Nef B	Arg109	NH1	SH3E B	Asp95	CG	3.62
Nef A	Phe171	CG	Nef B	Phe171	CD2	3.8	Nef B	Arg109	NH1	SH3E B	Asp95	OD1	2.97
Nef A	Phe171	CG	Nef B	Phe171	CE2	3.43	Nef B	Arg109	NH1	SH3E B	Asp95	OD2	3.56
Nef A	Phe171	CD2	Nef B	Phe171	CG	3.78	Nef B	Arg109	NH2	SH3E B	Asp95	OD2	3.2
Nef A	Phe171	CD2	Nef B	Phe171	CD2	3.19	Nef B	Arg109	CB	SH3E B	Trp113	NE1	3.69
Nef A	Phe171	CD2	Nef B	Phe171	CE2	3.36	Nef B	Arg109	CG	SH3E B	Trp113	NE1	3.66
Nef A	Phe171	CE2	Nef B	Phe171	CG	3.44	Nef B	Arg109	CD	SH3E B	Trp113	CE2	3.51
Nef A	Phe171	CE2	Nef B	Phe171	CD2	3.39	Nef B	Arg109	CD	SH3E B	Trp113	NE1	3.6
Nef A	Phe171	CZ	Nef B	Tyr223	CD1	3.74	Nef B	Arg109	CD	SH3E B	Trp113	CZ2	3.68
Nef A	Ala220	O	Nef B	Tyr223	CB	3.61	Nef B	Arg109	NE	SH3E B	Trp113	CE2	3.52
Nef A	Ala220	O	Nef B	Tyr223	CD1	3.41	Nef B	Arg109	NE	SH3E B	Trp113	CZ2	3.13
Nef A	Ala220	O	Nef B	Tyr226	CD2	3.63	Nef B	Arg109	NE	SH3E B	Trp113	CH2	3.55
Nef A	Tyr221	O	Nef B	Tyr221	O	3.61	Nef B	Arg109	CZ	SH3E B	Trp113	CZ2	3.27
Nef A	Tyr221	O	Nef B	Thr222	CA	3.29	Nef B	Arg109	CZ	SH3E B	Trp113	CZ3	3.65
Nef A	Tyr221	O	Nef B	Thr222	C	3.53	Nef B	Arg109	CZ	SH3E B	Trp113	CH2	3.14
Nef A	Tyr221	O	Nef B	Thr222	CG2	3.72	Nef B	Arg109	NH1	SH3E B	Trp113	CZ3	3.51
Nef A	Tyr221	O	Nef B	Tyr223	N	2.78	Nef B	Arg109	NH1	SH3E B	Trp113	CH2	3.53
Nef A	Tyr221	O	Nef B	Tyr223	CA	3.77	Nef B	Arg109	NH2	SH3E B	Trp113	CZ2	3.56
Nef A	Tyr221	O	Nef B	Tyr223	CB	3.66	Nef B	Arg109	NH2	SH3E B	Trp113	CH2	3.14
Nef A	Tyr221	CD1	Nef B	Tyr226	CD2	3.74	Nef B	Thr110	CB	SH3E A	Tyr126	OH	3.34
Nef A	Tyr221	CE1	Nef B	Tyr226	CD2	3.4	Nef B	Thr110	CG2	SH3E A	Tyr126	CE1	3.58
Nef A	Tyr221	CE1	Nef B	Tyr226	CE2	3.74	Nef B	Thr110	CG2	SH3E A	Tyr126	CE2	3.61
Nef A	Thr222	CA	Nef B	Tyr221	O	3.34	Nef B	Thr110	CG2	SH3E A	Tyr126	CZ	3.01
Nef A	Thr222	C	Nef B	Tyr221	O	3.57	Nef B	Thr110	CG2	SH3E A	Tyr126	OH	2.56
Nef A	Thr222	CG2	Nef B	Tyr221	O	3.8	Nef B	Tyr113	OH	Nef A	Lys169	O	3.38
Nef A	Tyr223	CZ	Nef B	Tyr113	OH	3.78	Nef B	Tyr113	OH	Nef A	Thr170	CA	3.59
Nef A	Tyr223	OH	Nef B	Tyr113	CE1	3.56	Nef B	Tyr113	CZ	Nef A	Phe171	N	3.7
Nef A	Tyr223	OH	Nef B	Tyr113	CZ	3.54	Nef B	Tyr113	OH	Nef A	Phe171	N	3.19
Nef A	Tyr223	OH	Nef B	Tyr113	OH	2.83	Nef B	Tyr113	CE1	Nef A	Tyr223	OH	3.56
Nef A	Tyr223	CD1	Nef B	Phe171	CZ	3.73	Nef B	Tyr113	CZ	Nef A	Tyr223	OH	3.54
Nef A	Tyr223	CB	Nef B	Ala220	O	3.7	Nef B	Tyr113	OH	Nef A	Tyr223	CZ	3.78
Nef A	Tyr223	CD1	Nef B	Ala220	O	3.45	Nef B	Tyr113	OH	Nef A	Tyr223	OH	2.83
Nef A	Tyr223	N	Nef B	Tyr221	O	2.8	Nef B	Lys114	CA	SH3E B	Trp93	CE3	3.71
Nef A	Tyr223	CA	Nef B	Tyr221	O	3.78	Nef B	Lys114	O	SH3E B	Trp93	CE3	3.52
Nef A	Tyr223	CB	Nef B	Tyr221	O	3.64	Nef B	Lys114	CB	SH3E B	Trp93	O	3.49
Nef A	Tyr226	CD2	Nef B	Ala220	O	3.61	Nef B	Lys114	CB	SH3E B	Trp93	CD2	3.78
Nef A	Tyr226	CD2	Nef B	Tyr221	CD1	3.73	Nef B	Lys114	CB	SH3E B	Trp93	CE3	3.7
Nef A	Tyr226	CD2	Nef B	Tyr221	CE1	3.41	Nef B	Lys114	CD	SH3E B	Trp93	CE2	3.61
Nef A	Tyr226	CE2	Nef B	Tyr221	CE1	3.72	Nef B	Lys114	CD	SH3E B	Trp93	NE1	3.72
Nef B	Arg103	CA	SH3E B	Tyr87	CD1	3.79	Nef B	Leu115	CD2	SH3E B	Trp92	CB	3.55
Nef B	Pro104	CG	SH3E B	Tyr87	CZ	3.8	Nef B	Leu115	CD2	SH3E B	Trp92	CG	3.8
Nef B	Pro104	CG	SH3E B	Tyr87	OH	3.79	Nef B	Asp118	CB	SH3E B	Trp92	CE3	3.78
Nef B	Pro104	CD	SH3E B	Tyr87	CE2	3.72	Nef B	Asp118	CG	SH3E B	Trp92	CE3	3.68
Nef B	Pro104	CD	SH3E B	Tyr87	CZ	3.65	Nef B	Asp118	OD2	SH3E B	Trp92	CA	3.34
Nef B	Pro104	O	SH3E B	Tyr131	CE1	3.44	Nef B	Asp118	OD2	SH3E B	Trp92	C	3.44
Nef B	Pro104	O	SH3E B	Tyr131	CZ	3.53	Nef B	Asp118	OD2	SH3E B	Trp92	CE3	3.77
Nef B	Pro104	O	SH3E B	Tyr131	OH	2.85	Nef B	Asp118	OD2	SH3E B	Trp93	N	2.94
Nef B	Lys105	O	SH3E B	Asn130	ND2	2.81	Nef B	Asp118	OD2	SH3E B	Trp93	CA	3.78
Nef B	Val106	CG1	SH3E B	Tyr131	CE1	3.8	Nef B	Asp118	OD2	SH3E B	Trp93	CB	3.52
Nef B	Val106	CG1	SH3E B	Tyr131	OH	3.79	Nef B	Met119	CA	SH3E B	Trp92	CZ3	3.71
Nef B	Pro107	CB	SH3E B	Glu112	CB	3.54	Nef B	Met119	CG	SH3E B	Trp92	CD2	3.68
Nef B	Pro107	CB	SH3E B	Glu112	OE1	3.05	Nef B	Met119	CG	SH3E B	Trp92	CE2	3.75
Nef B	Pro107	CG	SH3E B	Glu112	O	3.79	Nef B	Met119	CG	SH3E B	Trp92	CE3	3.7
Nef B	Pro107	CG	SH3E B	Glu112	CB	3.79	Nef B	Met119	CG	SH3E B	Trp92	CZ3	3.78
Nef B	Pro107	CG	SH3E B	Glu112	OE1	3.61	Nef B	Met119	CE	SH3E B	Trp92	CD1	3.46
Nef B	Pro107	C	SH3E B	Trp113	NE1	3.57	Nef B	Met119	CE	SH3E B	Trp92	CE2	3.52
Nef B	Pro107	O	SH3E B	Trp113	CE2	3.57	Nef B	Met119	CE	SH3E B	Trp92	NE1	3.21
Nef B	Pro107	O	SH3E B	Trp113	NE1	2.81	Nef B	Phe122	CB	SH3E B	Trp92	CZ3	3.35
Nef B	Pro107	O	SH3E B	Trp113	CZ2	3.72	Nef B	Phe122	CB	SH3E B	Trp92	CH2	3.59
Nef B	Pro107	CB	SH3E B	Trp113	NE1	3.68	Nef B	Phe122	CG	SH3E B	Trp92	CZ3	3.63

Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)	Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)
Nef B	Phe122	CG	SH3E B	Trp92	CH2	3.38	SH3E A	Tyr87	CZ	Nef A	Pro104	CD	3.44
Nef B	Phe122	CD2	SH3E B	Trp92	CH2	3.59	SH3E A	Tyr87	CZ	Nef A	Pro104	CG	3.51
Nef B	Glu147	OE2	SH3E A	Glu108	OE1	3.63	SH3E A	Tyr87	OH	Nef A	Pro104	NH1	3.6
Nef B	Glu150	CD	SH3E B	Trp92	CE2	3.76	SH3E A	Asp88	N	Nef A	Arg103	NH1	3.48
Nef B	Glu150	CD	SH3E B	Trp92	NE1	3.25	SH3E A	Asp88	CA	Nef A	Arg103	NH1	3.71
Nef B	Glu150	CD	SH3E B	Trp92	CZ2	3.63	SH3E A	Asp88	C	Nef A	Arg103	CD	3.4
Nef B	Glu150	OE1	SH3E B	Trp92	CE2	3.7	SH3E A	Asp88	O	Nef A	Arg103	CZ	3.63
Nef B	Glu150	OE1	SH3E B	Trp92	NE1	2.81	SH3E A	Asp88	O	Nef A	Arg103	NH1	3.47
Nef B	Glu150	OE2	SH3E B	Trp92	CE2	3.7	SH3E A	Asp88	O	Nef A	Arg103	NH1	2.52
Nef B	Glu150	OE2	SH3E B	Trp92	NE1	3.61	SH3E A	Asp88	CB	Nef A	Arg103	CG1	3.66
Nef B	Glu150	OE2	SH3E B	Trp92	CZ2	3.12	SH3E A	Tyr89	CE1	Nef A	Val106	NH2	3.61
Nef B	Asp155	CB	SH3E A	Lys115	CE	3.73	SH3E A	Tyr89	OH	Nef A	Arg109	CD2	3.2
Nef B	Asp155	CG	SH3E A	Lys115	CE	3.71	SH3E A	Trp92	CB	Nef A	Leu115	CD2	3.46
Nef B	Asp155	CG	SH3E A	Lys115	NZ	3.62	SH3E A	Trp92	CG	Nef A	Leu115	OD2	3.74
Nef B	Asp155	OD2	SH3E A	Lys115	CD	3.18	SH3E A	Trp92	CA	Nef A	Asp118	OD2	3.52
Nef B	Asp155	OD2	SH3E A	Lys115	CE	2.85	SH3E A	Trp92	C	Nef A	Asp118	CG	3.66
Nef B	Asp155	OD2	SH3E A	Lys115	NZ	2.81	SH3E A	Trp92	CE3	Nef A	Asp118	OD2	3.72
Nef B	Asp155	CG	SH3E A	Tyr126	OH	3.79	SH3E A	Trp92	CE3	Nef A	Asp118	CE	3.72
Nef B	Asp155	OD2	SH3E A	Tyr126	CZ	3.59	SH3E A	Trp92	CD1	Nef A	Met119	CG	3.43
Nef B	Asp155	OD2	SH3E A	Tyr126	OH	2.94	SH3E A	Trp92	CD2	Nef A	Met119	CE	3.78
Nef B	Lys169	O	Nef A	Tyr113	OH	3.31	SH3E A	Trp92	CE2	Nef A	Met119	CG	3.5
Nef B	Thr170	CA	Nef A	Tyr113	OH	3.57	SH3E A	Trp92	CE3	Nef A	Met119	CE	3.76
Nef B	Phe171	N	Nef A	Tyr113	CZ	3.66	SH3E A	Trp92	NE1	Nef A	Met119	CB	3.22
Nef B	Phe171	N	Nef A	Tyr113	OH	3.19	SH3E A	Trp92	CZ3	Nef A	Phe122	CG	3.54
Nef B	Phe171	CG	Nef A	Phe171	CD2	3.78	SH3E A	Trp92	CZ3	Nef A	Phe122	CB	3.76
Nef B	Phe171	CG	Nef A	Phe171	CE2	3.44	SH3E A	Trp92	CH2	Nef A	Phe122	CG	3.76
Nef B	Phe171	CD2	Nef A	Phe171	CG	3.8	SH3E A	Trp92	CH2	Nef A	Phe122	CD2	3.51
Nef B	Phe171	CD2	Nef A	Phe171	CD2	3.19	SH3E A	Trp92	CH2	Nef A	Phe122	OE1	3.68
Nef B	Phe171	CD2	Nef A	Phe171	CE2	3.39	SH3E A	Trp92	CD1	Nef A	Glu150	CD	3.79
Nef B	Phe171	CE2	Nef A	Phe171	CG	3.43	SH3E A	Trp92	CE2	Nef A	Glu150	OE1	3.73
Nef B	Phe171	CE2	Nef A	Phe171	CD2	3.36	SH3E A	Trp92	CE2	Nef A	Glu150	OE2	3.61
Nef B	Phe171	CZ	Nef A	Tyr223	CD1	3.73	SH3E A	Trp92	CE2	Nef A	Glu150	CD	3.76
Nef B	Ala220	O	Nef A	Tyr223	CB	3.7	SH3E A	Trp92	NE1	Nef A	Glu150	OE1	3.23
Nef B	Ala220	O	Nef A	Tyr223	CD1	3.45	SH3E A	Trp92	NE1	Nef A	Glu150	OE2	2.73
Nef B	Ala220	O	Nef A	Tyr226	CD2	3.61	SH3E A	Trp92	NE1	Nef A	Glu150	CD	3.68
Nef B	Tyr221	O	Nef A	Tyr221	O	3.61	SH3E A	Trp92	CZ2	Nef A	Glu150	OE2	3.58
Nef B	Tyr221	O	Nef A	Thr222	CA	3.34	SH3E A	Trp92	CZ2	Nef A	Glu150	CB	3.16
Nef B	Tyr221	O	Nef A	Thr222	C	3.57	SH3E A	Trp92	O	Nef A	Lys114	CB	3.49
Nef B	Tyr221	O	Nef A	Thr222	CG2	3.8	SH3E A	Trp93	CD2	Nef A	Lys114	CD	3.65
Nef B	Tyr221	O	Nef A	Tyr223	N	2.8	SH3E A	Trp93	CD2	Nef A	Lys114	CD	3.8
Nef B	Tyr221	O	Nef A	Tyr223	CA	3.78	SH3E A	Trp93	CE2	Nef A	Lys114	CA	3.34
Nef B	Tyr221	O	Nef A	Tyr223	CB	3.64	SH3E A	Trp93	CE3	Nef A	Lys114	O	3.6
Nef B	Tyr221	CD1	Nef A	Tyr226	CD2	3.73	SH3E A	Trp93	CE3	Nef A	Lys114	CB	3.41
Nef B	Tyr221	CE1	Nef A	Tyr226	CD2	3.41	SH3E A	Trp93	CE3	Nef A	Lys114	CD	3.57
Nef B	Tyr221	CE1	Nef A	Tyr226	CE2	3.72	SH3E A	Trp93	NE1	Nef A	Lys114	CD	3.43
Nef B	Thr222	CA	Nef A	Tyr221	O	3.29	SH3E A	Trp93	CZ2	Nef A	Lys114	CA	3.6
Nef B	Thr222	C	Nef A	Tyr221	O	3.53	SH3E A	Trp93	CZ3	Nef A	Lys114	O	3.65
Nef B	Thr222	CG2	Nef A	Tyr221	O	3.72	SH3E A	Trp93	CZ3	Nef A	Lys114	OD2	3.8
Nef B	Tyr223	CZ	Nef A	Tyr113	OH	3.78	SH3E A	Trp93	N	Nef A	Asp118	OD2	3.11
Nef B	Tyr223	OH	Nef A	Tyr113	CE1	3.48	SH3E A	Trp93	CB	Nef A	Asp118	NH1	3.58
Nef B	Tyr223	OH	Nef A	Tyr113	CZ	3.49	SH3E A	Asp95	CG	Nef A	Arg109	CZ	3.4
Nef B	Tyr223	OH	Nef A	Tyr113	OH	2.8	SH3E A	Asp95	OD1	Nef A	Arg109	NH1	3.78
Nef B	Tyr223	CD1	Nef A	Phe171	CZ	3.74	SH3E A	Asp95	OD1	Nef A	Arg109	CZ	2.77
Nef B	Tyr223	CB	Nef A	Ala220	O	3.61	SH3E A	Asp95	OD2	Nef A	Arg109	NH1	3.61
Nef B	Tyr223	CD1	Nef A	Ala220	O	3.41	SH3E A	Asp95	OD2	Nef A	Arg109	NH2	3.33
Nef B	Tyr223	N	Nef A	Tyr221	O	2.78	SH3E A	Asp95	OD2	Nef A	Arg109	CD1	3.01
Nef B	Tyr223	CA	Nef A	Tyr221	O	3.77	SH3E A	Glu108	CD	Nef B	Leu108	CD1	3.68
Nef B	Tyr223	CB	Nef A	Tyr221	O	3.66	SH3E A	Glu108	OE2	Nef B	Leu108	OE2	3.28
Nef B	Tyr226	CD2	Nef A	Ala220	O	3.63	SH3E A	Glu108	OE1	Nef B	Glu147	O	3.63
Nef B	Tyr226	CD2	Nef A	Tyr221	CD1	3.74	SH3E A	Ser110	OG	Nef B	Leu108	OE1	3.14
Nef B	Tyr226	CD2	Nef A	Tyr221	CE1	3.4	SH3E A	Ser110	OG	SH3E B	Glu112	CA	3.63
Nef B	Tyr226	CE2	Nef A	Tyr221	CE1	3.74	SH3E A	Gly111	CA	SH3E B	Gly111	N	3.57
SH3E A	Tyr87	CD1	Nef A	Arg103	CD	3.73	SH3E A	Gly111	CA	SH3E B	Glu112	CG	3.58
SH3E A	Tyr87	CG	Nef A	Pro104	CD	3.72	SH3E A	Glu112	O	Nef A	Pro107	CB	3.56
SH3E A	Tyr87	CD1	Nef A	Pro104	CD	3.69	SH3E A	Glu112	CB	Nef A	Pro107	CB	3.48
SH3E A	Tyr87	CD2	Nef A	Pro104	CD	3.63	SH3E A	Glu112	OE1	Nef A	Pro107	OG	3.18
SH3E A	Tyr87	CE1	Nef A	Pro104	CG	3.59	SH3E A	Glu112	OE1	SH3E B	Ser110	CA	3.75
SH3E A	Tyr87	CE2	Nef A	Pro104	CD	3.55	SH3E A	Glu112	N	SH3E B	Gly111	CB	3.63
SH3E A	Tyr87	CE2	Nef A	Pro104	CG	3.53	SH3E A	Trp113	CZ2	Nef A	Val106	CG2	3.65

Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)	Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)
SH3E A	Trp113	CZ2	Nef A	Val106	O	3.8	SH3E B	Trp92	CE3	Nef B	Asp118	OD2	3.68
SH3E A	Trp113	CD1	Nef A	Pro107	CB	3.72	SH3E B	Trp92	CE3	Nef B	Asp118	CE	3.77
SH3E A	Trp113	CD1	Nef A	Pro107	O	3.77	SH3E B	Trp92	CD1	Nef B	Met119	CG	3.46
SH3E A	Trp113	CE2	Nef A	Pro107	C	3.27	SH3E B	Trp92	CD2	Nef B	Met119	CG	3.68
SH3E A	Trp113	NE1	Nef A	Pro107	O	3.31	SH3E B	Trp92	CE2	Nef B	Met119	CE	3.75
SH3E A	Trp113	NE1	Nef A	Pro107	CB	2.57	SH3E B	Trp92	CE2	Nef B	Met119	CG	3.52
SH3E A	Trp113	NE1	Nef A	Pro107	O	3.54	SH3E B	Trp92	CE3	Nef B	Met119	CE	3.7
SH3E A	Trp113	CZ2	Nef A	Pro107	O	3.4	SH3E B	Trp92	NE1	Nef B	Met119	CA	3.21
SH3E A	Trp113	CD1	Nef A	Leu108	C	3.41	SH3E B	Trp92	CZ3	Nef B	Met119	CG	3.71
SH3E A	Trp113	NE1	Nef A	Leu108	O	3.66	SH3E B	Trp92	CZ3	Nef B	Met119	CB	3.78
SH3E A	Trp113	NE1	Nef A	Leu108	CB	3.36	SH3E B	Trp92	CZ3	Nef B	Phe122	CG	3.35
SH3E A	Trp113	CD1	Nef A	Arg109	CD	3.76	SH3E B	Trp92	CZ3	Nef B	Phe122	CB	3.63
SH3E A	Trp113	CE2	Nef A	Arg109	NE	3.54	SH3E B	Trp92	CH2	Nef B	Phe122	CG	3.59
SH3E A	Trp113	CE2	Nef A	Arg109	CB	3.62	SH3E B	Trp92	CH2	Nef B	Phe122	CD2	3.38
SH3E A	Trp113	NE1	Nef A	Arg109	CG	3.59	SH3E B	Trp92	CH2	Nef B	Phe122	CD	3.59
SH3E A	Trp113	NE1	Nef A	Arg109	CD	3.64	SH3E B	Trp92	CE2	Nef B	Glu150	OE1	3.76
SH3E A	Trp113	NE1	Nef A	Arg109	CD	3.73	SH3E B	Trp92	CE2	Nef B	Glu150	OE2	3.7
SH3E A	Trp113	CZ2	Nef A	Arg109	NE	3.7	SH3E B	Trp92	CE2	Nef B	Glu150	CD	3.7
SH3E A	Trp113	CZ2	Nef A	Arg109	CZ	3.21	SH3E B	Trp92	NE1	Nef B	Glu150	OE1	3.25
SH3E A	Trp113	CZ2	Nef A	Arg109	NH2	3.45	SH3E B	Trp92	NE1	Nef B	Glu150	OE2	2.81
SH3E A	Trp113	CZ2	Nef A	Arg109	CZ	3.77	SH3E B	Trp92	NE1	Nef B	Glu150	CD	3.61
SH3E A	Trp113	CZ3	Nef A	Arg109	NH1	3.65	SH3E B	Trp92	CZ2	Nef B	Glu150	OE2	3.63
SH3E A	Trp113	CZ3	Nef A	Arg109	NE	3.53	SH3E B	Trp92	CZ2	Nef B	Glu150	CB	3.12
SH3E A	Trp113	CH2	Nef A	Arg109	CZ	3.52	SH3E B	Trp93	O	Nef B	Lys114	CB	3.49
SH3E A	Trp113	CH2	Nef A	Arg109	NH1	3.22	SH3E B	Trp93	CD2	Nef B	Lys114	CD	3.78
SH3E A	Trp113	CH2	Nef A	Arg109	NH2	3.63	SH3E B	Trp93	CE2	Nef B	Lys114	CA	3.61
SH3E A	Trp113	CH2	Nef A	Arg109	OD2	3.28	SH3E B	Trp93	CE3	Nef B	Lys114	O	3.71
SH3E A	Lys115	CD	Nef B	Asp155	CB	3.18	SH3E B	Trp93	CE3	Nef B	Lys114	CB	3.52
SH3E A	Lys115	CE	Nef B	Asp155	CG	3.73	SH3E B	Trp93	CE3	Nef B	Lys114	CD	3.7
SH3E A	Lys115	CE	Nef B	Asp155	OD2	3.71	SH3E B	Trp93	NE1	Nef B	Lys114	OD2	3.72
SH3E A	Lys115	CE	Nef B	Asp155	CG	2.85	SH3E B	Trp93	N	Nef B	Asp118	OD2	2.94
SH3E A	Lys115	NZ	Nef B	Asp155	OD2	3.62	SH3E B	Trp93	CA	Nef B	Asp118	OD2	3.78
SH3E A	Lys115	NZ	Nef B	Asp155	CG2	2.81	SH3E B	Trp93	CB	Nef B	Asp118	NH1	3.52
SH3E A	Tyr126	CE1	Nef B	Thr110	CG2	3.58	SH3E B	Asp95	CG	Nef B	Arg109	NH1	3.62
SH3E A	Tyr126	CE2	Nef B	Thr110	CG2	3.61	SH3E B	Asp95	OD1	Nef B	Arg109	NH1	2.97
SH3E A	Tyr126	CZ	Nef B	Thr110	CB	3.01	SH3E B	Asp95	OD2	Nef B	Arg109	NH2	3.56
SH3E A	Tyr126	OH	Nef B	Thr110	CG2	3.34	SH3E B	Asp95	OD2	Nef B	Arg109	O	3.2
SH3E A	Tyr126	OH	Nef B	Thr110	OD2	2.56	SH3E B	Ser110	OG	Nef A	Leu108	OE1	3.38
SH3E A	Tyr126	CZ	Nef B	Asp155	CG	3.59	SH3E B	Ser110	OG	SH3E A	Glu112	CA	3.75
SH3E A	Tyr126	OH	Nef B	Asp155	OD2	3.79	SH3E B	Gly111	CA	SH3E A	Gly111	N	3.57
SH3E A	Tyr126	OH	Nef B	Asp155	CD	2.94	SH3E B	Gly111	CA	SH3E A	Glu112	CG	3.63
SH3E A	Pro128	CB	Nef A	Pro107	O	3.28	SH3E B	Glu112	O	Nef B	Pro107	CB	3.79
SH3E A	Asn130	CG	Nef A	Lys105	O	3.72	SH3E B	Glu112	CB	Nef B	Pro107	CG	3.54
SH3E A	Asn130	ND2	Nef A	Lys105	C	2.57	SH3E B	Glu112	CB	Nef B	Pro107	CB	3.79
SH3E A	Asn130	ND2	Nef A	Lys105	CG	3.76	SH3E B	Glu112	OE1	Nef B	Pro107	CG	3.05
SH3E A	Asn130	OD1	Nef A	Pro107	CD	3.4	SH3E B	Glu112	OE1	Nef B	Pro107	OG	3.61
SH3E A	Asn130	OD1	Nef A	Pro107	CG	3.1	SH3E B	Glu112	OE1	SH3E A	Ser110	CA	3.63
SH3E A	Tyr131	CE2	Nef A	Arg103	CD	3.33	SH3E B	Glu112	N	SH3E A	Gly111	O	3.58
SH3E A	Tyr131	CE2	Nef A	Arg103	CG	3.74	SH3E B	Trp113	CE2	Nef B	Pro107	C	3.57
SH3E A	Tyr131	CZ	Nef A	Arg103	CG	3.35	SH3E B	Trp113	NE1	Nef B	Pro107	O	3.57
SH3E A	Tyr131	OH	Nef A	Arg103	CD	2.86	SH3E B	Trp113	NE1	Nef B	Pro107	CB	2.81
SH3E A	Tyr131	OH	Nef A	Arg103	O	3.14	SH3E B	Trp113	NE1	Nef B	Pro107	O	3.68
SH3E A	Tyr131	CE1	Nef A	Pro104	O	3.23	SH3E B	Trp113	CZ2	Nef B	Pro107	O	3.72
SH3E A	Tyr131	CZ	Nef A	Pro104	O	3.2	SH3E B	Trp113	CD1	Nef B	Leu108	O	3.75
SH3E A	Tyr131	OH	Nef A	Pro104	C	2.49	SH3E B	Trp113	NE1	Nef B	Leu108	CD	3.66
SH3E A	Tyr131	OH	Nef A	Pro104	CG1	3.7	SH3E B	Trp113	CE2	Nef B	Arg109	NE	3.51
SH3E A	Tyr131	CE1	Nef A	Val106	CG1	3.74	SH3E B	Trp113	CE2	Nef B	Arg109	CB	3.52
SH3E A	Tyr131	OH	Nef A	Val106	CA	3.7	SH3E B	Trp113	NE1	Nef B	Arg109	CG	3.69
SH3E B	Tyr87	CD1	Nef B	Arg103	CD	3.79	SH3E B	Trp113	NE1	Nef B	Arg109	CD	3.66
SH3E B	Tyr87	CE2	Nef B	Pro104	CG	3.72	SH3E B	Trp113	NE1	Nef B	Arg109	CD	3.6
SH3E B	Tyr87	CZ	Nef B	Pro104	CD	3.8	SH3E B	Trp113	CZ2	Nef B	Arg109	NE	3.68
SH3E B	Tyr87	CZ	Nef B	Pro104	CG	3.65	SH3E B	Trp113	CZ2	Nef B	Arg109	CZ	3.13
SH3E B	Tyr87	OH	Nef B	Pro104	NH2	3.79	SH3E B	Trp113	CZ2	Nef B	Arg109	NH2	3.27
SH3E B	Tyr89	OH	Nef B	Arg109	CD2	3.24	SH3E B	Trp113	CZ2	Nef B	Arg109	CZ	3.56
SH3E B	Trp92	CB	Nef B	Leu115	CD2	3.55	SH3E B	Trp113	CZ3	Nef B	Arg109	NH1	3.65
SH3E B	Trp92	CG	Nef B	Leu115	OD2	3.8	SH3E B	Trp113	CZ3	Nef B	Arg109	NE	3.51
SH3E B	Trp92	CA	Nef B	Asp118	OD2	3.34	SH3E B	Trp113	CH2	Nef B	Arg109	CZ	3.55
SH3E B	Trp92	C	Nef B	Asp118	CB	3.44	SH3E B	Trp113	CH2	Nef B	Arg109	NH1	3.14
SH3E B	Trp92	CE3	Nef B	Asp118	CG	3.78	SH3E B	Trp113	CH2	Nef B	Arg109	NH2	3.53

Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)
SH3E B	Trp113	CH2	Nef B	Arg109	OD2	3.14
SH3E B	Lys115	CD	Nef A	Asp155	OD2	3.37
SH3E B	Lys115	CE	Nef A	Asp155	OD2	3.13
SH3E B	Lys115	NZ	Nef A	Asp155	CG2	3.13
SH3E B	Tyr126	CE1	Nef A	Thr110	CG2	3.71
SH3E B	Tyr126	CZ	Nef A	Thr110	CB	3.5
SH3E B	Tyr126	OH	Nef A	Thr110	CG2	3.78
SH3E B	Tyr126	OH	Nef A	Thr110	OD2	3.15
SH3E B	Tyr126	CE2	Nef A	Asp155	OD2	3.74
SH3E B	Tyr126	CZ	Nef A	Asp155	CG	3.32
SH3E B	Tyr126	OH	Nef A	Asp155	OD1	3.32

Protein 1	Amino säure	Atom	Protein 2	Amino säure	Atom	Abst. (Å)
SH3E B	Tyr126	OH	Nef A	Asp155	OD2	3.58
SH3E B	Tyr126	OH	Nef A	Asp155	CD	2.38
SH3E B	Pro128	CB	Nef B	Pro107	O	3.59
SH3E B	Asn130	ND2	Nef B	Lys105	CG	2.81
SH3E B	Asn130	OD1	Nef B	Pro107	CD	3.74
SH3E B	Asn130	OD1	Nef B	Pro107	O	3.39
SH3E B	Tyr131	CE1	Nef B	Pro104	O	3.44
SH3E B	Tyr131	CZ	Nef B	Pro104	O	3.53
SH3E B	Tyr131	OH	Nef B	Pro104	CG1	2.85
SH3E B	Tyr131	CE1	Nef B	Val106	CG1	3.8
SH3E B	Tyr131	OH	Nef B	Val106	CG1	3.79

9 Literaturverzeichnis

- Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W. & Adams, P.D. 2005. contribution 8. *CCP4 Newsl.* **42**.
- Anderson, S., Shugars, D.C., Swanstrom, R., and Garcia, J.V. 1993. Nef from primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 suppresses surface CD4 expression in human and mouse T cells. *J Virol* **67**: 4923-4931.
- Arendt, C.W., and Littman, D.R. 2001. HIV: master of the host cell. *Genome Biol* **2**: REVIEWS1030.
- Arien, K.K., and Verhasselt, B. 2008. HIV Nef: role in pathogenesis and viral fitness. *Curr HIV Res* **6**: 200-208.
- 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.
- 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.
- Arold, S., O'Brien, R., Franken, P., Strub, M.P., Hoh, F., Dumas, C., and Ladbury, J.E. 1998. RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef. *Biochemistry* **37**: 14683-14691.
- Atkins, K.M., Thomas, L., Youker, R.T., Harriff, M.J., Pissani, F., You, H., and Thomas, G. 2008. HIV-1 Nef binds PACS-2 to assemble a multikinase cascade that triggers major histocompatibility complex class I (MHC-I) down-regulation: analysis using short interfering RNA and knock-out mice. *J Biol Chem* **283**: 11772-11784.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., and McCammon, J.A. 2001. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 10037-10041.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871.
- Baur, A.S., Sass, G., Laffert, B., Willbold, D., Cheng-Mayer, C., and Peterlin, B.M. 1997. The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. *Immunity* **6**: 283-291.
- 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.

- Benichou, S., Liu, L.X., Erdtmann, L., Selig, L., and Benarous, R. 1997. Use of the two-hybrid system to identify cellular partners of the HIV1 Nef protein. *Res Virol* **148**: 71-73.
- 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.
- 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.
- Bonifacino, J.S., and Traub, L.M. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**: 395-447.
- Brenner, M., Munch, J., Schindler, M., Wildum, S., Stolte, N., Stahl-Hennig, C., Fuchs, D., Matz-Rensing, K., Franz, M., Heeney, J., et al. 2006. Importance of the N-distal AP-2 binding element in Nef for simian immunodeficiency virus replication and pathogenicity in rhesus macaques. *J Virol* **80**: 4469-4481.
- 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.
- Breuer, S. 2006. Entwicklung eines gegen HIV-1 NefSF2 gerichteten Inhibitors. Fakultät für Chemie, Universität Dortmund, Germany.
- 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.
- Chaudhry, A., Das, S.R., Hussain, A., Mayor, S., George, A., Bal, V., Jameel, S., and Rath, S. 2005. The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J Immunol* **175**: 4566-4574.
- Chaudhry, A., Das, S.R., Jameel, S., George, A., Bal, V., Mayor, S., and Rath, S. 2007. A two-pronged mechanism for HIV-1 Nef-mediated endocytosis of immune costimulatory molecules CD80 and CD86. *Cell Host Microbe* **1**: 37-49.
- Chaudhuri, R., Lindwasser, O.W., Smith, W.J., Hurley, J.H., and Bonifacino, J.S. 2007. Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J Virol* **81**: 3877-3890.
- Chaudhuri, R., Mattera, R., Lindwasser, O.W., Robinson, M.S., and Bonifacino, J.S. 2009. A basic patch on {alpha}-adaptin required for binding of HIV-1 Nef and cooperative assembly of a CD4-Nef-AP-2 complex. *J Virol*.
- Chen, N., McCarthy, C., Drakesmith, H., Li, D., Cerundolo, V., McMichael, A.J., Screaton, G.R., and Xu, X.N. 2006. HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef. *Eur J Immunol* **36**: 278-286.
- 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.

- Choi, H.J., and Smithgall, T.E. 2004. Conserved residues in the HIV-1 Nef hydrophobic pocket are essential for recruitment and activation of the Hck tyrosine kinase. *J Mol Biol* **343**: 1255-1268.
- Cicchetti, P., Mayer, B.J., Thiel, G., and Baltimore, D. 1992. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* **257**: 803-806.
- Coleman, S.H., Madrid, R., Van Damme, N., Mitchell, R.S., Bouchet, J., Servant, C., Pillai, S., Benichou, S., and Guatelli, J.C. 2006. Modulation of cellular protein trafficking by human immunodeficiency virus type 1 Nef: role of the acidic residue in the ExxxLL motif. *J Virol* **80**: 1837-1849.
- Coleman, S.H., Van Damme, N., Day, J.R., Noviello, C.M., Hitchin, D., Madrid, R., Benichou, S., and Guatelli, J.C. 2005. Leucine-specific, functional interactions between human immunodeficiency virus type 1 Nef and adaptor protein complexes. *J Virol* **79**: 2066-2078.
- Collette, Y., Dutartre, H., Benziane, A., Ramos, M., Benarous, R., Harris, M., and Olive, D. 1996. Physical and functional interaction of Nef with Lck. HIV-1 Nef-induced T-cell signaling defects. *J Biol Chem* **271**: 6333-6341.
- Collins, B.M., McCoy, A.J., Kent, H.M., Evans, P.R., and Owen, D.J. 2002. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* **109**: 523-535.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. 2002. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **156**: 921-929.
- Conner, S.D., Schroter, T., and Schmid, S.L. 2003. AAK1-mediated micro2 phosphorylation is stimulated by assembled clathrin. *Traffic* **4**: 885-890.
- Craig, H.M., Pandori, M.W., and Guatelli, J.C. 1998. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11229-11234.
- Craig, H.M., Reddy, T.R., Riggs, N.L., Dao, P.P., and Guatelli, J.C. 2000. Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. *Virology* **271**: 9-17.
- Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D.J., McPhee, D.A., Greenway, A.L., Ellett, A., Chatfield, C., et al. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**: 988-991.
- 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.
- Doms, R.W., and Trono, D. 2000. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev* **14**: 2677-2688.
- Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G., and Kornfeld, S. 2007. The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Mol Biol Cell* **18**: 1887-1896.

- Duchardt, E., Sigalov, A.B., Aivazian, D., Stern, L.J., and Schwalbe, H. 2007. Structure induction of the T-cell receptor zeta-chain upon lipid binding investigated by NMR spectroscopy. *Chembiochem* **8**: 820-827.
- Edeling, M.A., Smith, C., and Owen, D. 2006. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 32-44.
- Emsley, P., and Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2126-2132.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 486-501.
- 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.
- Fenard, D., Yonemoto, W., de Noronha, C., Cavrois, M., Williams, S.A., and Greene, W.C. 2005. Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement. *J Immunol* **175**: 6050-6057.
- Fortin, J.F., Barat, C., Beausejour, Y., Barbeau, B., and Tremblay, M.J. 2004. Hyper-responsiveness 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.
- Franke, D., and Svergun, D.I. 2009. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* **42**: 342-346.
- Frankel, A.D., and Young, J.A. 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**: 1-25.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**: 500-503.
- Gerlach, H., Laumann, V., Martens, S., Becker, C.F., Goody, R.S., and Geyer, M. 2010. HIV-1 Nef membrane association depends on charge, curvature, composition and sequence. *Nat Chem Biol* **6**: 46-53.
- Geyer, M., Fackler, O.T., and Peterlin, B.M. 2001. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep* **2**: 580-585.
- 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.
- 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.
- Geyer, M., Yu, H., Mandic, R., Linnemann, T., Zheng, Y.H., Fackler, O.T., and Peterlin, B.M. 2002. Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery. *J Biol Chem* **277**: 28521-28529.

- Ghosh, P., and Kornfeld, S. 2003. AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation. *J Cell Biol* **160**: 699-708.
- Giese, S.I., Woerz, I., Homann, S., Tibroni, N., Geyer, M., and Fackler, O.T. 2006. Specific and distinct determinants mediate membrane binding and lipid raft incorporation of HIV-1(SF2) Nef. *Virology* **355**: 175-191.
- Gorry, P.R., Churchill, M., Learmont, J., Cherry, C., Dyer, W.B., Wesselingh, S.L., and Sullivan, J.S. 2007a. Replication-dependent pathogenicity of attenuated nef-deleted HIV-1 in vivo. *J Acquir Immune Defic Syndr* **46**: 390-394.
- Gorry, P.R., McPhee, D.A., Verity, E., Dyer, W.B., Wesselingh, S.L., Learmont, J., Sullivan, J.S., Roche, M., Zaunders, J.J., Gabuzda, D., et al. 2007b. Pathogenicity and immunogenicity of attenuated, nef-deleted HIV-1 strains in vivo. *Retrovirology* **4**: 66.
- Grant, B.D. 2005. Intracellular trafficking. In *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community.
- Greenberg, M., DeTulleo, L., Rapoport, I., Skowronski, J., and Kirchhausen, T. 1998a. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr Biol* **8**: 1239-1242.
- Greenberg, M.E., Bronson, S., Lock, M., Neumann, M., Pavlakis, G.N., and Skowronski, J. 1997. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J* **16**: 6964-6976.
- Greenberg, M.E., Iafrate, A.J., and Skowronski, J. 1998b. The SH3 domain-binding surface and an acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. *EMBO J* **17**: 2777-2789.
- 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.
- 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.
- Guy, B., Kieny, M.P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L., and Lecocq, J.P. 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**: 266-269.
- Harris, M. 1995. The role of myristoylation in the interactions between human immunodeficiency virus type I Nef and cellular proteins. *Biochem Soc Trans* **23**: 557-561.
- Heldwein, E.E., Macia, E., Wang, J., Yin, H.L., Kirchhausen, T., and Harrison, S.C. 2004. Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14108-14113.
- Helms, J.B., Palmer, D.J., and Rothman, J.E. 1993. Two distinct populations of ARF bound to Golgi membranes. *J Cell Biol* **121**: 751-760.

- Hiipakka, M., Poikonen, K., and Saksela, K. 1999. SH3 domains with high affinity and engineered ligand specificities targeted to HIV-1 Nef. *J Mol Biol* **293**: 1097-1106.
- Hiipakka, M., and Saksela, K. 2002. Capacity of simian immunodeficiency virus strain mac Nef for high-affinity Src homology 3 (SH3) binding revealed by ligand-tailored SH3 domains. *J Gen Virol* **83**: 3147-3152.
- Hoffmann, S., Jonas, E., Konig, 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.
- Hofmann, M.W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von Figura, K., and Bakke, O. 1999. The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem* **274**: 36153-36158.
- Honing, S., Ricotta, D., Krauss, M., Spate, K., Spolaore, B., Motley, A., Robinson, M., Robinson, C., Haucke, V., and Owen, D.J. 2005. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell* **18**: 519-531.
- IUPAC-IUB. 1984. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur J Biochem* **138**: 9-37.
- IUPAC-IUB. 1993. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Corrections to recommendations 1983. *Eur J Biochem* **213**: 2.
- Janardhan, A., Swigut, T., Hill, B., Myers, M.P., and Skowronski, J. 2004. HIV-1 Nef binds the DOCK2-ELMO1 complex to activate rac and inhibit lymphocyte chemotaxis. *PLoS Biol* **2**: E6.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport M., Shlomchik M. 2001. *Immunobiology*, 5 ed. Garland Science, New York and London.
- Janvier, K., Kato, Y., Boehm, M., Rose, J.R., Martina, J.A., Kim, B.Y., Venkatesan, S., and Bonifacino, J.S. 2003. Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J Cell Biol* **163**: 1281-1290.
- Jin, Y.J., Cai, C.Y., Zhang, X., Zhang, H.T., Hirst, J.A., and Burakoff, S.J. 2005. HIV Nef-mediated CD4 down-regulation is adaptor protein complex 2 dependent. *J Immunol* **175**: 3157-3164.
- Kabsch, W. 2010. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 125-132.
- Kelly, B.T., McCoy, A.J., Spate, K., Miller, S.E., Evans, P.R., Honing, S., and Owen, D.J. 2008. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* **456**: 976-979.
- Keppler, O.T., Tibroni, N., Venzke, S., Rauch, S., and Fackler, O.T. 2006. Modulation of specific surface receptors and activation sensitization in primary resting CD4+ T lymphocytes by the Nef protein of HIV-1. *J Leukoc Biol* **79**: 616-627.
- Kienzle, N., Freund, J., Kalbitzer, H.R., and Mueller-Lantzsch, N. 1993. Oligomerization of the Nef protein from human immunodeficiency virus (HIV) type 1. *Eur J Biochem* **214**: 451-457.

- Kim, W.M., Sigalov, A.B., and Stern, L.J. 2010. Pseudo-merohedral twinning and noncrystallographic symmetry in orthorhombic crystals of SIVmac239 Nef core domain bound to different-length TCRzeta fragments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 163-175.
- Kirchhoff, F. 2009. Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution? *Nat Rev Microbiol* **7**: 467-476.
- 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.
- Kirchhoff, F., Schindler, M., Specht, A., Arhel, N., and Munch, J. 2008. Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cell Mol Life Sci* **65**: 2621-2636.
- Koch, M.H., Vachette, P., and Svergun, D.I. 2003. Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys* **36**: 147-227.
- Korolchuk, V.I., and Banting, G. 2002. CK2 and GAK/auxilin2 are major protein kinases in clathrin-coated vesicles. *Traffic* **3**: 428-439.
- Krissinel, E., and Henrick, K. 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**: 774-797.
- Lee, C.H., Leung, B., Lemmon, M.A., Zheng, J., Cowburn, D., Kuriyan, J., and Saksela, K. 1995. A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J* **14**: 5006-5015.
- 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.
- Levy, J.A., and Shimabukuro, J. 1985. Recovery of AIDS-associated retroviruses from patients with AIDS or AIDS-related conditions and from clinically healthy individuals. *J Infect Dis* **152**: 734-738.
- Lim, W.A. 1996. Reading between the lines: SH3 recognition of an intact protein. *Structure* **4**: 657-659.
- Lindwasser, O.W., Chaudhuri, R., and Bonifacino, J.S. 2007. Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses. *Curr Mol Med* **7**: 171-184.
- Lindwasser, O.W., Smith, W.J., Chaudhuri, R., Yang, P., Hurley, J.H., and Bonifacino, J.S. 2008. A diacidic motif in human immunodeficiency virus type 1 Nef is a novel determinant of binding to AP-2. *J Virol* **82**: 1166-1174.
- Liu, L.X., Heveker, N., Fackler, O.T., Arold, S., Le Gall, S., Janvier, K., Peterlin, B.M., Dumas, C., Schwartz, O., Benichou, S., 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.
- Liu, Y., Kahn, R.A., and Prestegard, J.H. 2009. Structure and membrane interaction of myristoylated ARF1. *Structure* **17**: 79-87.
- 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.
- Lubben, N.B., Sahlender, D.A., Motley, A.M., Lehner, P.J., Benaroch, P., and Robinson, M.S. 2007. HIV-1 Nef-induced down-regulation of MHC class I requires AP-1 and clathrin but not PACS-1 and is impeded by AP-2. *Mol Biol Cell* **18**: 3351-3365.
- Manninen, A., Hiipakka, M., Vihinen, M., Lu, W., Mayer, B.J., and Saksela, K. 1998. SH3-Domain binding function of HIV-1 Nef is required for association with a PAK-related kinase. *Virology* **250**: 273-282.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**: 658-674.
- Michel, N., Allespach, I., Venzke, S., Fackler, O.T., and Keppler, O.T. 2005. The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr Biol* **15**: 714-723.
- Miller, M.D., Feinberg, M.B., and Greene, W.C. 1994a. The HIV-1 nef gene acts as a positive viral infectivity factor. *Trends Microbiol* **2**: 294-298.
- Miller, M.D., Warmerdam, M.T., Gaston, I., Greene, W.C., and Feinberg, M.B. 1994b. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med* **179**: 101-113.
- Mousavi, S.A., Malerod, L., Berg, T., and Kjekken, R. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* **377**: 1-16.
- Munch, J., Janardhan, A., Stolte, N., Stahl-Hennig, C., Ten Haaft, P., Heeney, J.L., Swigut, T., Kirchhoff, F., and Skowronski, J. 2002. T-cell receptor:CD3 down-regulation is a selected in vivo function of simian immunodeficiency virus Nef but is not sufficient for effective viral replication in rhesus macaques. *J Virol* **76**: 12360-12364.
- Munch, J., Rajan, D., Schindler, M., Specht, A., Rucker, E., Novembre, F.J., Nerrienet, E., Muller-Trutwin, M.C., Peeters, M., Hahn, B.H., et al. 2007. Nef-mediated enhancement of virion infectivity and stimulation of viral replication are fundamental properties of primate lentiviruses. *J Virol* **81**: 13852-13864.
- Musacchio, A., Noble, M., Pauptit, R., Wierenga, R., and Saraste, M. 1992. Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature* **359**: 851-855.
- Noble, M.E., Musacchio, A., Saraste, M., Courtneidge, S.A., and Wierenga, R.K. 1993. Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin. *EMBO J* **12**: 2617-2624.
- Nunn, M.F., and Marsh, J.W. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a member of the p21-activated kinase family. *J Virol* **70**: 6157-6161.
- Olusanya, O., Andrews, P.D., Swedlow, J.R., and Smythe, E. 2001. Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo. *Curr Biol* **11**: 896-900.

- Owen, D.J., Collins, B.M., and Evans, P.R. 2004. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 153-191.
- Owen, D.J., and Evans, P.R. 1998. A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science* **282**: 1327-1332.
- Paillart, J.C., and Gottlinger, H.G. 1999. Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of gag membrane targeting. *J Virol* **73**: 2604-2612.
- Pandrea, I., Sodora, D.L., Silvestri, G., and Apetrei, C. 2008. Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts. *Trends Immunol* **29**: 419-428.
- Pauloin, A., and Thuriereau, C. 1993. The 50 kDa protein subunit of assembly polypeptide (AP) AP-2 adaptor from clathrin-coated vesicles is phosphorylated on threonine-156 by AP-1 and a soluble AP50 kinase which co-purifies with the assembly polypeptides. *Biochem J* **296 (Pt 2)**: 409-415.
- Piguet, V., Schwartz, O., Le Gall, S., and Trono, D. 1999. The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol Rev* **168**: 51-63.
- Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., Damond, F., Robertson, D.L., and Simon, F. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**: 871-872.
- Poe, J.A., and Smithgall, T.E. 2009. HIV-1 Nef dimerization is required for Nef-mediated receptor downregulation and viral replication. *J Mol Biol* **394**: 329-342.
- Pomerantz, R.J., and Horn, D.L. 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med* **9**: 867-873.
- Pugliese, A., Cantamessa, C., Saini, A., Piragino, A., Gennero, L., Martini, C., and Torre, D. 1999. Effects of the exogenous Nef protein on HIV-1 target cells. *Cell Biochem Funct* **17**: 183-192.
- Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L., and Tainer, J.A. 2007. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys* **40**: 191-285.
- Rapoport, I., Chen, Y.C., Cupers, P., Shoelson, S.E., and Kirchhausen, T. 1998. Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J* **17**: 2148-2155.
- Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**: 1157-1161.
- Robinson, M.S. 2004. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* **14**: 167-174.
- Rodionov, D.G., and Bakke, O. 1998. Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J Biol Chem* **273**: 6005-6008.
- Rodionov, D.G., Honing, S., Silye, A., Kongsvik, T.L., von Figura, K., and Bakke, O. 2002. Structural requirements for interactions between leucine-sorting signals

- and clathrin-associated adaptor protein complex AP3. *J Biol Chem* **277**: 47436-47443.
- 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.
- Roeth, J.F., Williams, M., Kasper, M.R., Filzen, T.M., and Collins, K.L. 2004. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **167**: 903-913.
- Rohde, G., Wenzel, D., and Haucke, V. 2002. A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **158**: 209-214.
- Saksela, K., Cheng, G., and Baltimore, D. 1995. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J* **14**: 484-491.
- Schaefer, T.M., Bell, I., Fallert, B.A., and Reinhart, T.A. 2000. The T-cell receptor zeta chain contains two homologous domains with which simian immunodeficiency virus Nef interacts and mediates down-modulation. *J Virol* **74**: 3273-3283.
- Schaefer, T.M., Bell, I., Pfeifer, M.E., Ghosh, M., Tribble, R.P., Fuller, C.L., Ashman, C., and Reinhart, T.A. 2002. The conserved process of TCR/CD3 complex down-modulation by SIV Nef is mediated by the central core, not endocytic motifs. *Virology* **302**: 106-122.
- Schindler, M., Munch, J., Kutsch, O., Li, H., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Muller-Trutwin, M.C., Novembre, F.J., Peeters, M., Courgnaud, V., 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.
- Schindler, M., Schmokel, J., Specht, A., Li, H., Munch, J., Khalid, M., Sodora, D.L., Hahn, B.H., Silvestri, G., and Kirchhoff, F. 2008. Inefficient Nef-mediated downmodulation of CD3 and MHC-I correlates with loss of CD4+T cells in natural SIV infection. *PLoS Pathog* **4**: e1000107.
- Schindler, M., Wurfl, S., Benaroch, P., Greenough, T.C., Daniels, R., Easterbrook, P., Brenner, M., Munch, J., and Kirchhoff, F. 2003. Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J Virol* **77**: 10548-10556.
- Schmidt, U., Briese, S., Leicht, K., Schurmann, A., Joost, H.G., and Al-Hasani, H. 2006. Endocytosis of the glucose transporter GLUT8 is mediated by interaction of a dileucine motif with the beta2-adaptin subunit of the AP-2 adaptor complex. *J Cell Sci* **119**: 2321-2331.
- Schrager, J.A., and Marsh, J.W. 1999. HIV-1 Nef increases T cell activation in a stimulus-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8167-8172.
- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., 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.

- Sharp, P.M., Bailes, E., Chaudhuri, R.R., Rodenburg, C.M., Santiago, M.O., and Hahn, B.H. 2001. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**: 867-876.
- Sharp, P.M., Bailes, E., Gao, F., Beer, B.E., Hirsch, V.M., and Hahn, B.H. 2000. Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale. *Biochem Soc Trans* **28**: 275-282.
- Silvestri, G., Paiardini, M., Pandrea, I., Lederman, M.M., and Sodora, D.L. 2007. Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. *J Clin Invest* **117**: 3148-3154.
- Sloan, R.D., Donahue, D.A., Kuhl, B.D., Bar-Magen, T., and Wainberg, M.A. Expression of Nef from unintegrated HIV-1 DNA downregulates cell surface CXCR4 and CCR5 on T-lymphocytes. *Retrovirology* **7**: 44.
- Stevenson, M. 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* **9**: 853-860.
- Stove, V., Van de Walle, I., Naessens, E., Coene, E., Stove, C., Plum, J., and Verhasselt, B. 2005. Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alphabeta. *J Virol* **79**: 11422-11433.
- Stumptner-Cuvelette, P., Morchoisne, S., Dugast, M., Le Gall, S., Raposo, G., Schwartz, O., and Benaroch, P. 2001. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12144-12149.
- Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M.H.J. 1995. CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography* **28**: 768-773.
- Swigut, T., Greenberg, M., and Skowronski, J. 2003. Cooperative interactions of simian immunodeficiency virus Nef, AP-2, and CD3-zeta mediate the selective induction of T-cell receptor-CD3 endocytosis. *J Virol* **77**: 8116-8126.
- Swigut, T., Shohdy, N., and Skowronski, J. 2001. Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J* **20**: 1593-1604.
- Swingler, S., Brichacek, B., Jacque, J.M., Ulich, C., Zhou, J., and Stevenson, M. 2003. HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature* **424**: 213-219.
- 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.
- Theos, A.C., Tenza, D., Martina, J.A., Hurbain, I., Peden, A.A., Sviderskaya, E.V., Stewart, A., Robinson, M.S., Bennett, D.C., Cutler, D.F., et al. 2005. Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol Biol Cell* **16**: 5356-5372.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 2**: Unit 2 3.
- Torres, B.A., and Johnson, H.M. 1994. Identification of an HIV-1 Nef peptide that binds to HLA class II antigens. *Biochem Biophys Res Commun* **200**: 1059-1065.
- Trono, D., and Wang, J.K. 1997. Nef and PAK: virulence factor and cellular accomplice. *Chem Biol* **4**: 13-15.

- Turner, B.G., and Summers, M.F. 1999. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**: 1-32.
- Umeda, A., Meyerholz, A., and Ungewickell, E. 2000. Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur J Cell Biol* **79**: 336-342.
- UNAIDS. 2009. AIDS epidemic update : November 2009. *UNAIDS*.
- Venzke, S., Michel, N., Allespach, I., Fackler, O.T., and Keppler, O.T. 2006. Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection. *J Virol* **80**: 11141-11152.
- Viguera, A.R., Arrondo, J.L., Musacchio, A., Saraste, M., and Serrano, L. 1994. Characterization of the interaction of natural proline-rich peptides with five different SH3 domains. *Biochemistry* **33**: 10925-10933.
- 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.
- Wang, Y.J., Wang, J., Sun, H.Q., Martinez, M., Sun, Y.X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J.P., Roth, M.G., and Yin, H.L. 2003. Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**: 299-310.
- Witte, V., Laffert, B., Rosorius, O., Lischka, P., Blume, K., Galler, G., Stilper, A., Willbold, D., D'Aloja, P., Sixt, M., et al. 2004. HIV-1 Nef mimics an integrin receptor signal that recruits the polycomb group protein Eed to the plasma membrane. *Mol Cell* **13**: 179-190.
- Wonderlich, E.R., Williams, M., and Collins, K.L. 2008. The tyrosine binding pocket in the adaptor protein 1 (AP-1) mu1 subunit is necessary for Nef to recruit AP-1 to the major histocompatibility complex class I cytoplasmic tail. *J Biol Chem* **283**: 3011-3022.
- Xu, C., Gagnon, E., Call, M.E., Schnell, J.R., Schwieters, C.D., Carman, C.V., Chou, J.J., and Wucherpennig, K.W. 2008. Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell* **135**: 702-713.
- Xu, X.N., Laffert, B., Screaton, G.R., Kraft, M., Wolf, D., Kolanus, W., Mongkolsapay, J., McMichael, A.J., and Baur, A.S. 1999. Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J Exp Med* **189**: 1489-1496.
- Ye, H., Choi, H.J., Poe, J., and Smithgall, T.E. 2004. Oligomerization is required for HIV-1 Nef-induced activation of the Src family protein-tyrosine kinase, Hck. *Biochemistry* **43**: 15775-15784.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Nachname:	Horenkamp
Vorname:	Florian Alexander
Nationalität:	Deutsch
Geburtstagdatum/-ort	13. August 1980, Lübeck
Geschlecht:	Männlich
Familienstand:	Ledig

Promotion

Seit Nov. 2006	Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Abteilung für Physikalische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. R. Goody). Thema: Biochemische und strukturelle Untersuchungen der HIV/SIV Nef-vermittelten Rezeptorinternalisierung.
----------------	--

Schule, Studium und Beruf

Sep. 1987 – Jun. 1991	Grundschule Steenkamp in Lübeck
Sep. 1991 – Jun. 2000	Gymnasium Ernestinenschule zu Lübeck. Abschluss: Abitur
Aug. 2000 – Jun. 2001	Zivildienst
Okt. 2001 – Sep. 2004	Bachelorstudium „Molekulare Biotechnologie“ an der Universität zu Lübeck. Abschluss: Bachelor of Science (B. Sc.)
Okt. 2004- Nov. 2006	Masterstudium „ <i>Molecular Life Science</i> “ an der Universität zu Lübeck. Abschluss: Master of Science (M. Sc.)

11 Eidesstattliche Erklärung

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

Dortmund, den 30. Juni 2010

Florian Alexander Horenkamp