

**Strukturelle Untersuchungen der Lck-Domänen unique  
und SH3 und ihre Wechselwirkungen mit zellulären und  
viralen Proteinen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Diplom-Biologe

**Lars Briese**

aus Flensburg

Jena 2002

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der  
Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat.-

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1997 bis Januar 2002 am Lehrstuhl für Struktur  
und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth und in der Abteilung Strukturelle und  
Evolutive Biochemie am Institut für Molekulare Biotechnologie e.V., Jena, unter der Leitung  
von Prof. Dr. Dieter Willbold angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 18.02.2002

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 17.05.2002

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dieter Willbold

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Krauss

*Für Petra*



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	DIE ZELLULÄRE IMMUNANTWORT – T-ZELL VERMITTELTE IMMUNITÄT	1
1.2	DER T-ZELL REZEPTOR KOMPLEX	1
1.3	DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS (HIV)	4
1.4	WECHSELWIRKUNGEN DER HIV-1 PROTEINE GP120, VPU UND NEF MIT CD4	5
1.5	DAS AKZESSORISCHE HIV-1 PROTEIN NEF	7
1.6	DIE LYMPHOCYTEN SPEZIFISCHE KINASE (LCK)	8
1.7	ZIELE DER ARBEIT	9
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
2.1	BAKTERIENSTÄMME	11
2.2	PLASMIDE	11
2.3	SYNTHETISCHE PEPTIDE	12
2.4	ENZYME UND CHEMIKALIEN	12
2.5	LÖSUNGEN UND PUFFER	13
2.6	SONSTIGE MATERIALIEN	14
2.7	ELEKTROPHORESEN	14
2.7.1	SDS-GELELEKTROPHORESE NACH LAEMMLI	14
2.7.2	SDS-GELE NACH SCHÄGGER UND VON JAGOW	15
2.8	ELEKTROTRANSFER VON PROTEINEN AUF BLOTTING-MEMBRANEN	15
2.9	ANZUCHT VON BAKTERIEN	15
2.9.1	NÄHRMEDIEN	15
2.9.2	ZELLANZUCHT	16
2.10	PROTEINREINIGUNGEN	17
2.10.1	ZELLAUFSCHLUSS	17
2.10.2	AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN GLUTATHION-SEPHAROSE	17
2.10.3	METALLIONENAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN TALON-SUPERFLOW	17
2.10.4	HYDROPHOBE INTERAKTIONSCHROMATOGRAPHIE	18
2.10.5	SPALTUNG MIT PRESCISSION PROTEASE	18
2.10.6	SPALTUNG MIT THROMBIN	18
2.10.7	TRENNUNG DER SPALTPRODUKTE MITTELS GELFILTRATION	19
2.11	UV/VIS SPEKTROSKOPIE	19
2.11.1	ABSORPTIONSMESSUNGEN	19
2.11.2	MESSUNG DER BAKTERIENDICHTE	19
2.11.3	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN	20
2.12	FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHE MESSUNGEN	20
2.12.1	BESTIMMUNG VON DISSOZIATIONSKONSTANTEN ( $K_D$ ) MIT FLUORESZENZMESSUNGEN	20

2.13	NMR-SPEKTROSKOPIE UND SPEKTRENAUSWERTUNG	21
2.13.1	PROBENVORBEREITUNG	21
2.13.2	ALLGEMEINE MESSBEDINGUNGEN	21
2.13.3	NMR EXPERIMENTE	22
2.13.3.1	BESTIMMUNG SKALARER KOPPLUNGSKONSTANTEN	23
2.13.3.2	BESTIMMUNG DES HETERONUKLEAREN $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -NOE	23
2.14	ZUORDNUNG VON NOES UND STRUKTURRECHNUNGEN	24
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE</b>	<b>26</b>
3.1	EXPRESSION UND REINIGUNG VON LCKU3	26
3.2	NMR-SPEKTROSKOPIE AN LCKU3	28
3.2.1	1D-NMR SPEKTROSKOPIE AN LCKU3	28
3.2.2	HETERONUKLEARE 2D-NMR SPEKTROSKOPIE AN LCKU3	29
3.2.3	SEQUENZIELLE ZUORDNUNG DER RÜCKGRATAMIDPROTONEN	31
3.2.4	EXPERIMENTE ZUR ZUORDNUNG DER SEITENKETTEN-RESONANZEN	34
3.2.5	3D-NOE SPEKTROSKOPIE ZUR GEWINNUNG STRUKTURGEBENDER PARAMETER	34
3.2.6	3D-HNHA-EXPERIMENT ZUR BESTIMMUNG DER $^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\text{N}}$ KOPPLUNGSKONSTANTEN	37
3.2.7	DER HETERONUKLEARE $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -NOE	38
3.3	DIE DREIDIMENSIONALE STRUKTUR VON LCKU3	40
3.3.1	ANALYSE DER TORSIONSWINKEL	44
3.4	NMR-TITRATIONSEXPERIMENTE MIT LCKU3	45
3.4.1	LIGANDEN, DIE AN DIE SH3-DOMÄNE BINDEN	45
3.4.1.1	BINDUNG EINES MITTELS PHAGENDISPLAY SELEKTIERTE PEPTIDS	46
3.4.1.2	BINDUNG VON HIV-1 NEF	49
3.4.2	LIGANDEN, DIE AN DIE UNIQUE-DOMÄNE BINDEN	51
3.4.2.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR ZINK-BINDUNG AN LCKU3	52
3.4.2.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR BINDUNG VON CD4 <sub>(394-433)</sub> AN DIE UNIQUE DOMÄNE	55
3.5	FLUORESZENTITRATIONSEXPERIMENTE MIT CD4	55
3.5.1	BESTIMMUNG DES $K_D$ DER BINDUNG VON ZINK AN CD4 <sub>(394-433)</sub> MITTELS FLUORESZENTITRATIONSMESSUNGEN	56
3.5.2	BESTIMMUNG DES $K_D$ DER BINDUNG VON LCKU3 AN CD4 <sub>(394-433)</sub>	57
3.6	EXPRESSION UND REINIGUNG VON HIV-1 NEF	58
3.6.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR EIGNUNG VON HIV-1 NEF FÜR NMR-TITRATIONSEXPERIMENTE	60
3.7	EXPRESSION UND REINIGUNG VON CD4 <sub>(394-433)</sub>	60
3.8	FLUORESZENZUNTERSUCHUNGEN ZUR BINDUNG VON HIV-1 NEF AN VERSCHIEDENE CD4- VARIANTEN	62
3.9	NMR-TITRATIONEN VON HIV-1 NEF MIT CD4 <sub>(403-433)</sub>	65
3.10	ERWEITERTE UNTERSUCHUNGEN ZUM LCK-CD4 KOMPLEX	67
3.10.1	ERSTE NMR-UNTERSUCHUNGEN AM LCK-CD4 KOMPLEX	67

3.10.2	BESTIMMUNG DES $K_D$ DER BINDUNG VON HIV-1 NEF AN EINEN KOMPLEX AUS LCKU3 UND CD4 <sub>(394-433)</sub>	68
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>70</b>
4.1	DIE PRÄPARATION VON LCKU3, LCK UNIQUE, HIV-1 NEF UND CD4 <sub>(394-433)</sub>	70
4.2	DIE STRUKTURBESTIMMUNG VON LCKU3 IN LÖSUNG	70
4.2.1	DIE UNIQUE-DOMÄNE BILDET IN LÖSUNG KEINE DEFINIERTE STRUKTUR AUS	71
4.2.2	DIE SH3-DOMÄNE ENTHÄLT FÜNF ANTIPARALLELE $\beta$ -FALTBLATTSTRÄNGE	72
4.3	EINE FLEXIBLE UNIQUE-DOMÄNE ERHÖHT DEN AKTIONSRADIUS DER LCK	74
4.4	DIE UNIQUE-DOMÄNE NIMMT AUF DIE BINDUNG VON POLY-PROLIN MOTIVEN AN DIE SH3-DOMÄNE KEINEN EINFLUSS	76
4.5	DIE ZINK-AFFINITÄTEN FÜR LCK UND CD4 ERLAUBEN EINE OPTIMALE REGULATION DER ASSOZIATION	77
4.6	DIE BINDUNG VON CD4 UND HIV-1 NEF AN DIE LCK IST NICHT KOMPETITIV	78
4.7	DIE N-TERMINALE REGION IN HIV-1 NEF ERHÖHT DIE AFFINITÄT FÜR CD4 UM EIN VIELFACHES	80
4.8	AUSBLICK	83
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>98</b>
9.1	PLASMIDE	98
9.1.1	LCKU3	98
9.1.2	CD4 <sub>(394-433)</sub>	99
9.1.3	HIV-1 NEF (STAMM SF2)	99
9.2	DISTANZBESCHRÄNKUNGEN FÜR DIE STRUKTURECHNUNGEN FÜR LCKU3	101
9.3	DIHEDRALE WINKELBESCHRÄNKUNGEN FÜR DIE STRUKTURECHNUNGEN VON LCKU3	110
9.4	CNS-PROTOKOLL FÜR EINE STRUKTURECHNUNG AN LCKU3	111





---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die zelluläre Immunantwort – T-Zell vermittelte Immunität

Die adaptive (erworbene) Immunität, also die Fähigkeit des Immunsystems, auf schon bekannte Antigene verstärkt zu reagieren, setzt sich aus zwei Hauptbestandteilen zusammen: die durch Antikörper vermittelte humorale Immunität, und die zelluläre Immunität, die in das Aufgabengebiet der T-Zellen fällt.

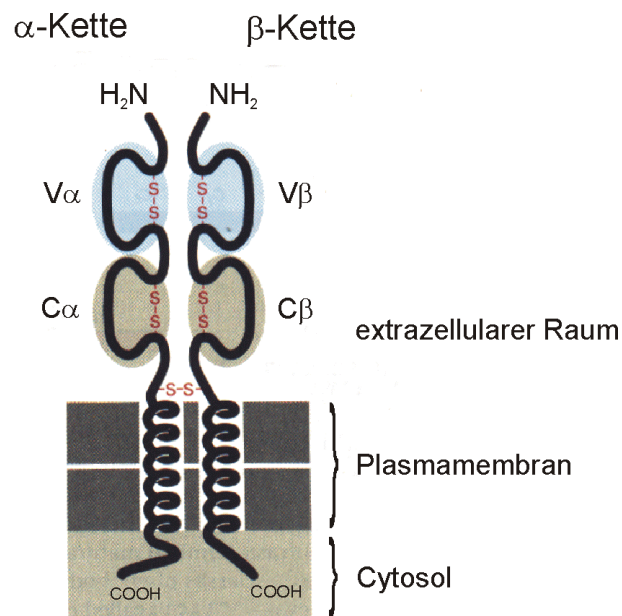
T-Zellen reifen in einem kompliziertem Prozess im Thymus aus T-Lymphocyten (Thymocyten) heran. Dabei unterliegen sie einem Prozess positiver und negativer Selektion, der darauf ausgerichtet ist, nur diejenigen Zellen reifen zu lassen, die ein Fremd-Antigen erkennen und gleichzeitig nicht autoreaktiv sind.

Die Wirkungsweise von T-Zellen beruht auf ihrer Fähigkeit, solche Zellen zu erkennen, die Pathogene beherbergen oder sie aufgenommen haben. Sie bewerkstelligen dies, indem sie von den Pathogenen stammende Peptidfragmente erkennen, die von MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*), die sich an der Oberfläche dieser Zellen befinden, präsentiert werden. Cytotoxische T-Zellen, für die das Oberflächenprotein CD8 charakteristisch ist, eliminieren diejenigen Zellen, die Pathogene im Cytosol beherbergen. Diese präsentieren den T-Zellen die Peptidfragmente mit Hilfe von MHC-Klasse I Molekülen. Solche Zellen, die Pathogene in Endosomen enthalten, z.B. phagozytierende Zellen, präsentieren Peptidfragmente mit Hilfe von MHC-Klasse II Molekülen, die nur von CD4-T-Zellen erkannt werden. Dies sind inflammatorische T-Zellen und T-Helferzellen. Erstere regen Makrophagen dazu an, die Pathogene zu eliminieren, die die Zelle beherbergt. Die T-Helferzellen hingegen aktivieren B-Zellen, Antikörper zu produzieren (Janeway & Travers, 1995).

## 1.2 Der T-Zell Rezeptor Komplex

Über den T-Zell-Rezeptor (TCR) einer T-Zelle wird die Erkennung eines Antigens realisiert. Das Antigen ist dabei an ein MHC-Molekül gekoppelt und wird so der T-Zelle präsentiert. Der Rezeptor besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette, welche durch eine Disulfidbrücke miteinander kovalent verbunden sind (Abb. 1.1). Diese übergeordnete Struktur ist in hohem Maße dem Fab-Fragment eines Immunglobulins homolog und gehört mit z.B. CD4, CD8, dem CD3-Komplex, den MHC-Proteinen und dem

Immunglobulin sowie weiteren Vertretern zur Superfamilie der Immunglobuline (Allison & Lanier, 1987). Jede Polypeptidkette besitzt nach außen zeigend eine variable Region und an der Membran gelegen einen konstanten Teil sowie eine helikale Transmembranregion. Die variable Region ist der Teil des Rezeptors, der sowohl mit dem Antigen als auch mit dem MHC-Komplex, der es der T-Zelle präsentiert, interagiert.

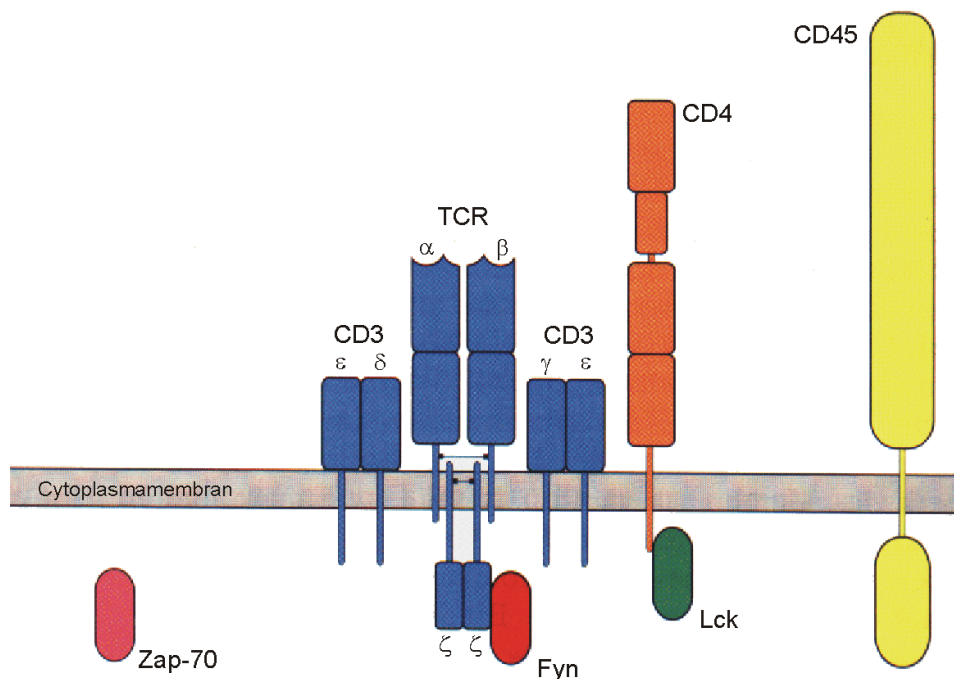


**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung eines T-Zell-Rezeptors (verändert nach Alberts et al. (1994))

In blau dargestellt sind die variablen Regionen des Rezeptors ( $V\alpha$  und  $V\beta$ ) und in grau die konstanten Regionen ( $C\alpha$  und  $C\beta$ ).

Keine der Ketten des T-Zell-Rezeptorheterodimers besitzt eine große cytoplasmatische Domäne, die dazu dienen könnte, der Zelle zu signalisieren, dass der T-Zell-Rezeptor ein Antigen gebunden hat. Diese Aufgabe wird von einem Komplex von Proteinen übernommen, der fest mit dem T-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche assoziiert ist. Dieser als CD3 bezeichnete Komplex besteht aus zwei Heterodimeren ( $\epsilon\delta$  und  $\gamma\epsilon$ ) und einem Homodimer ( $\zeta\zeta$ ) (Abb. 1.2). Der CD3-Komplex besitzt insgesamt zehn sogenannte ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), die sich durch die Sequenz  $\mathbf{YxxLx_{8-11}YxxL}$  auszeichnen und potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen darstellen, über die eine Signalweiterleitung erfolgen kann (Reth, 1989; Malissen & Schmitt-Verhulst, 1993). Die Bindung des TCR an ein Antigen allein aber reicht zur T-Zell Aktivierung nicht

aus. Hierzu ist ein Korezeptor notwendig, der die Empfindlichkeit der T-Zelle soweit steigert, dass die zur Aktivierung notwendige Menge an Antigen auf etwa ein Hundertstel verringert wird. Als Korezeptor des TCR-Komplexes fungieren entweder CD4 oder CD8. CD4 ist ein Protein von 433 Aminosäuren Länge und besitzt vier immunglobulinartige Domänen und eine kurze cytoplasmatische Domäne. Diese ist fest mit der src-Typ Tyrosin-Kinase Lck (*Lymphocyten spezifische Kinase*) assoziiert (Abb. 1.2) (Veillette et al., 1988). Auf diese beiden Komponenten wird später noch genauer eingegangen. Das CD8-Korezeptormolekül ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.



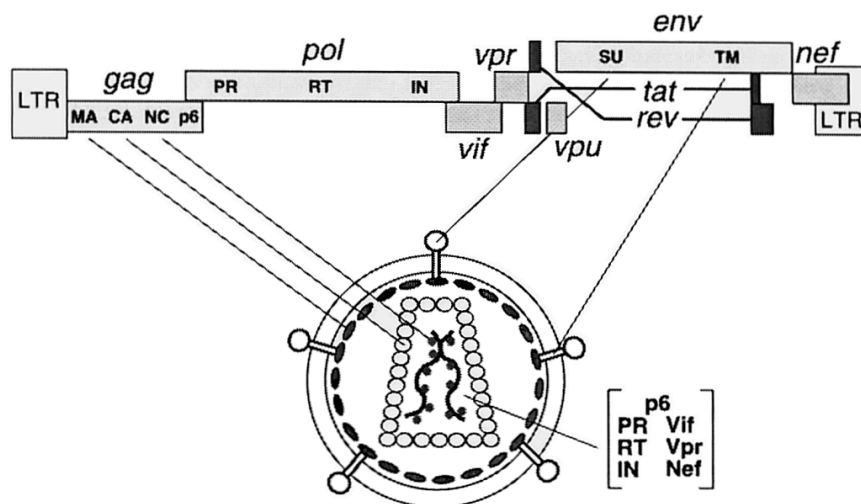
**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes einer CD4-T-Zelle (verändert nach Janeway & Travers (1995))

Ein weiteres Molekül, das für die Aktivierung der T-Zelle erforderlich ist, ist CD45. Es besitzt eine cytoplasmatische Domäne mit tyrosinspezifischer Phosphatase-Aktivität. Die T-Zell-Aktivierung nach Bindung eines Antigens an den TCR und Interaktion des Korezeptors mit dem MHC-Molekül hat zur Folge, dass die Tyrosinkinase Lck und Fyn durch die CD45-Phosphatase aktiviert werden. Diese phosphorylieren die ITAMs von CD3 und ermöglichen somit die über eine SH2-Domäne vermittelte Bindung der Tyr-Kinase ZAP-70 ( $\zeta$ -associated protein 70) an deren  $\zeta$ -Ketten, wodurch diese ebenfalls phosphoryliert und damit aktiviert

wird. Die Folge ist der Ablauf einer ganzen Kaskade von Ereignissen, an deren Ende die Stimulierung des Interleukin-2 (IL-2) Gens steht. Die IL-2 Sezernierung stimuliert B-Zellen, leitet aber auch autokrin die Proliferation der T-Zelle selbst ein. Einen guten Überblick über die Ereignisse bei der T-Zell Aktivierung geben einschlägige Lehrbücher zur Immunologie, z.B. Janeway & Travers (1995) und Zellbiologie, z.B. Alberts et al. (1994); Kleinig et al. (1999).

### 1.3 Das humane Immundefizienzvirus (HIV)

Zu Beginn der 80er Jahre wurde das humane Immundefizienzvirus HIV-1 als Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) identifiziert (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984). Zur Familie der Retroviren gehörend besitzt es die *gag*, *pol* und *env* Gene, die für Polyproteine kodieren und als Vorläuferproteine später proteolytisch gespalten werden. Darüber hinaus zeichnet es sich durch einige zusätzliche Gene aus, die für regulatorische Proteine (Tat und Rev) und für die sogenannten akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpx (nur bei HIV-2), Vpu (nur bei HIV-1) und Nef kodieren (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Aufbau des HIV-Genoms mit Darstellung eines Virions (aus: Frankel & Young (1998))**

Aus dem *gag*-Genprodukt entstehen die Strukturproteine Matrix (MA), Capsid (CA), Nucleocapsid (NC) und p6. Das Pol-Protein wird gespalten in die Enzyme Protease (PR),

Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Die beiden Env-Proteine gp120 (SU, *surface*) und gp41 (TM, *transmembrane*) bilden die äußere Virushülle.

Ausführliche Darstellungen zur Biologie von HIV-1, auch unter Einbeziehung struktureller Aspekte, geben Frankel & Young (1998) und Turner & Summers (1999).

#### 1.4 Wechselwirkungen der HIV-1 Proteine gp120, Vpu und Nef mit CD4

Bald nach Entdeckung des Virus fand man heraus, dass das CD4-Molekül als Hauptrezeptor für HIV-1 dient (Dalgeish et al., 1984). Der Kontakt zwischen dem reifen Virus und CD4 wird dabei über das virale Hüllprotein gp120 erreicht, welches CD4 mit hoher Affinität ( $K_D \sim 4$  nM) an seiner N-terminalen Ig-Domäne bindet. Für eine erfolgreiche Infektion der Zelle ist neben der CD4-Bindung zusätzlich die Interaktion mit einem Chemokinrezeptor (z.B. CXCR4 oder CCR5) notwendig (Clapham & Weiss, 1997). Durch die Lösung der Kristallstruktur der gp120 Core-Domäne im Komplex mit den ersten beiden Ig-Domänen von CD4 und einem Fab17b Antikörper, der ein Inhibitor für die Bindung an Chemokinrezeptoren ist, konnten Hinweise für den Mechanismus der Interaktion gefunden werden (Kwong et al., 1998). Man geht davon aus, dass die CD4 Bindung eine konformationelle Änderung von gp120 zur Folge hat und dadurch die Chemokinrezeptor-Bindestelle in gp120 offenlegt. Durch die nun mögliche Bindung des Chemokinrezeptors werden vermutlich weitere konformationelle Änderungen hervorgerufen, die wiederum Umlagerungen im gp41-Protein zur Folge haben. Dies ermöglicht die Membranfusion des Viruspartikels mit der zu infizierenden Zelle.

Nach der Fusion wird der Inhalt des Virions (siehe Abb. 1.3) in die Zelle entlassen, die virale RNA in doppelsträngige cDNA transkribiert und diese in das Wirtsgenom integriert. Damit ist die T-Zelle latent infiziert. Erst bei der Aktivierung einer solchen latent infizierten T-Zelle wird die Produktion von viralen Proteinen in Gang gesetzt.

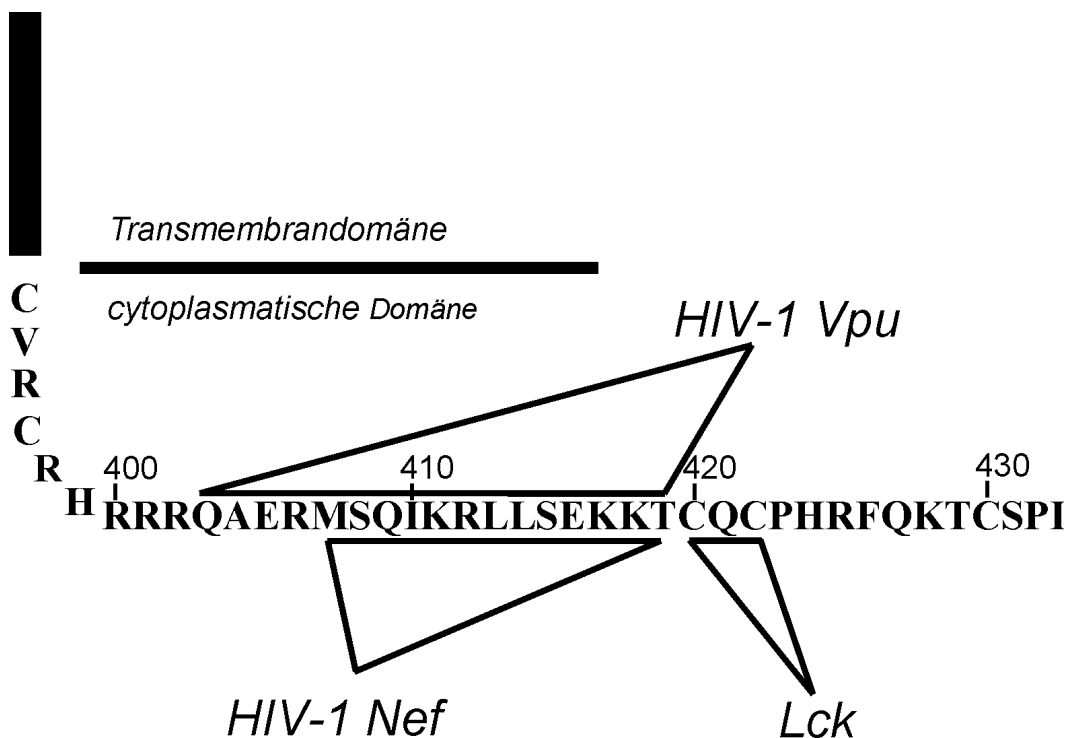
Das Env-Protein (gp160, wird später gespalten in gp41 und gp120) wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) produziert. Dies ist auch der Entstehungsort von CD4-Molekülen. Die Bildung eines Komplexes von neusynthetisiertem CD4 und Env kann die Translokation von Env zur Zellmembran, wo es für die Formierung neuer Virionen benötigt wird, stören (Hoxie et al., 1986). Um solche ungünstigen Interaktionen zu verhindern, hat das HI-Virus zwei Strategien entwickelt, in die akzessorische Proteine involviert sind:

- Das Vpu-Protein sorgt dafür, dass neusynthetisierte CD4-Moleküle aus dem ER und dem Golgi-Apparat entfernt und abgebaut werden (Willey et al., 1992).

- Das Nef-Protein induziert den Abbau solcher CD4-Moleküle, die sich bereits an der Zelloberfläche befinden (Garcia & Miller, 1991).

Als Binderegion für sowohl Vpu als auch Nef konnte die cytoplasmatische Domäne von CD4 bestimmt werden. Dabei wurde gefunden, dass der Sequenzabschnitt 414-LSEKKT-419 das minimal notwendige bzw. der Abschnitt von Arg402 bis Cys420 das ausreichende Element für den Vpu-vermittelten CD4-Abbau ist (Vincent et al., 1993).

Das Di-Leucin-Motiv (Leu<sub>413</sub>Leu<sub>414</sub>) in der cytoplasmatischen Domäne von CD4 hingegen ist unerlässlich für einen Nef-vermittelten Abbau des Rezeptors von der Zelloberfläche (Aiken et al., 1994). Abbildung 1.4 zeigt den entsprechenden Sequenzabschnitt von CD4 mit den Sequenzmotiven, die für eine Interaktion mit Nef, Vpu und der Tyrosinkinase Lck nötig sind. Auffallend dabei ist eine außerordentliche Clusterung der Bindestellen.



**Abb. 1.4: Primärsequenz der cytoplasmatischen Domäne von CD4**

Die für eine Interaktion mit den HIV-1 Proteinen Vpu und Nef und der Tyrosinkinase Lck wichtigen Reste sind markiert. Die Transmembrandomäne von CD4 ist als schwarzes Rechteck dargestellt.

## 1.5 Das akzessorische HIV-1 Protein Nef

HIV-1 Nef ist ein N-terminal myristyliertes und damit membranassoziiertes Protein von etwa 27 kDa. Es ist schon in einigen Kopien im Virion vorhanden und wird unmittelbar nach der Infektion in hohem Maße exprimiert (Goldsmith et al., 1995). Nef sorgt für eine erhöhte Infektiösität der Viren und ist vermutlich in besonderem Maße für ein Fortschreiten der Infektion bis hin zum Auftreten typischer AIDS-Symptome verantwortlich. Rhesus-Affen, die mit einer SIV-Variante (SIV=*simian immunodeficiency virus*), die Deletionen in *nef* enthielt, infiziert wurden, entwickelten keine AIDS-typischen Symptome, und waren darüber hinaus sogar immun gegen pathogene SIV-Stämme (Daniel et al., 1992; Kestler et al., 1991). Wie oben schon erwähnt, sorgt Nef gleich nach der erfolgreichen Infektion der Zelle für den Abbau der verbliebenen CD4-Rezeptoren. Auf diesem Wege wird auch eine Superinfektion der Zelle verhindert, die vermutlich ihren Tod nach sich ziehen würde. Des Weiteren bindet Nef über eine Poly-Prolin Helix vom Typ II spezifisch an die SH3-Domänen von src-Typ Tyrosin-Kinasen (Saksela et al., 1995). Auf diesem Wege wird es dem Virus möglich, ganz entscheidend in Signaltransduktionswege einzuschreiten. Zudem konnte die Erhöhung der Infektiösität durch Nef auf diese Eigenschaft zurückgeführt werden (Goldsmith et al., 1995). Nef ist bisher sowohl mit NMR-Methoden als auch röntgen-kristallografisch strukturell charakterisiert worden (Grzesiek et al., 1996a; Lee et al., 1996; Arold et al., 1997). Allerdings wurden alle Untersuchungen an Proteinen durchgeführt, bei denen ein bis zu 70 Aminosäuren langer unstrukturierter N-Terminus deletiert worden war.

Grzesiek et al. (1996b) konnten die Bindung von CD4 an Nef NMR-spektroskopisch nachweisen und die Bindungsregion bestimmen. CD4 bindet demnach mit relativ geringer Affinität an Nef ( $K_D=1$  mM).

Über die Interaktion der Poly-Prolin Helix vom Typ II mit SH3-Domänen von src-Typ Tyrosin-Kinasen liegen ebenfalls strukturelle Daten vor. Komplexe von Nef mit der SH3-Domäne von Fyn sind sowohl von Lee et al. (1996) und Arold et al. (1996) röntgen-kristallografisch untersucht worden. Weiterhin untersuchten Arold et al. (1998) die Affinität verschiedener SH3-Domänen von src-Typ Tyrosin-Kinasen zu Nef. Demnach zeigt Nef eine hohe Affinität (etwa nM) zu Hck und Lyn und eine geringere (etwa  $\mu$ M) zu Lck, Fyn und Src. Darüber hinaus sind eine Vielzahl weiterer Funktionen von Nef beschrieben worden, insgesamt wurden Interaktionen mit über 20 verschiedenen Proteinen beobachtet.

## 1.6 Die Lymphocyten spezifische Kinase (Lck)

Die Lck gehört zur Familie der src-Typ Tyrosin-Kinasen, die neun Mitglieder umfasst: Src, Fyn, Yes, Yrk, Lck, Lyn, Fgr, Hck und Blk. Sie wird exklusiv in lymphatischen Zellen exprimiert, insbesondere in T-Lymphocyten.

Protein Tyrosin-Kinasen sind involviert in Signalwege, die Zell-Wachstum, Differenzierung, Aktivierung und Transformation steuern. Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen, zu denen auch die src-Familie gehört, spielen dabei eine Schlüsselrolle.

Src-Typ Tyrosin-Kinasen bestehen aus mehreren unabhängigen strukturellen Domänen (Abb. 1.5):

- einer myristylierten N-terminalen unique-Domäne von etwa 60 Aminosäuren Länge, durch die das Molekül mit der Cytoplasmamembran assoziiert wird
- einer regulatorischen SH3-Domäne, die spezifisch mit Poly-Prolin Motiven interagiert
- einer regulatorischen SH2-Domäne, die phosphorylierte Tyrosinpeptide binden kann
- der katalytisch aktiven Kinase-Domäne
- und einer kurzen C-terminalen Region, die einen regulatorischen Tyrosin-Rest enthält (Tyr505 bei der Lck), der in phosphoryliertem Zustand an die SH2-Domäne bindet und damit die Kinase-Aktivität negativ reguliert.



**Abb. 1.5: Überblick über die Domänenorganisation der Lck**

Wie schon in Kap. 1.2 kurz erwähnt wurde, spielt die Lck eine Schlüsselrolle bei der T-Zell Aktivierung und Reifung. Da sie über die unique-Domäne fest mit den Korezeptoren CD4 oder CD8 $\alpha$  assoziiert ist, steht sie ganz am Anfang einer Kaskade von Signal-Ereignissen. Sie ist neben Fyn eine der Kinasen, die mit dem CD3-Komplex interagieren und dessen ITAMs phosphorylieren.

Sind die regulatorischen SH2- und SH3-Domänen sowie die Kinase-Domäne recht gut untersucht, so ist über die unique-Domänen und ihre Funktionen in den verschiedenen src-Typ Tyrosin-Kinasen verhältnismäßig wenig bekannt. Sie sind innerhalb der Familie sehr



---

unterschiedlich (daher der Name) und spielen möglicherweise eine Rolle bei der Spezifität und Substraterkennung der Kinase (Carrera et al., 1995).

Bei der Lck findet die Assoziation mit CD4 bzw. CD8 $\alpha$  über zwei Cysteine in der unique-Domäne statt (Turner et al., 1990). Die Verknüpfung ist Zink-abhängig (Lin et al., 1998) und absolut essentiell für eine normale T-Zell Funktion (Glaichenhaus et al., 1991). Mit Hilfe von Mutationsstudien ließ sich die Bindungsregion sowohl in CD4 als auch in der unique-Domäne lokalisieren (Huse et al., 1998). Demnach sind Cys420 und Cys422 in CD4 und Cys20 und Cys23 in der unique-Domäne der Lck essentiell für die Interaktion. Es wurde ein Modell der Bindung vorgeschlagen, wonach jeweils die beiden Thiolgruppen der Cysteine eines Bindungspartners ein Zink-Atom koordinieren.

Bisher sind keine strukturellen Eigenschaften von src-Typ Tyrosin-Kinase-unique-Domänen in der Literatur beschrieben worden. Auch die Zink-vermittelte Assoziation der Lck mit den cytoplasmatischen Domänen von CD4 bzw. CD8 $\alpha$  ist bisher nicht strukturell untersucht worden.

## **1.7 Ziele der Arbeit**

Die Lymphocyten spezifische Kinase spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von T-Zellen und steht am Anfang einer ganzen Reihe von Signal-Prozessen. Es überrascht daher nicht, dass z.B. Viren effektive Wege gefunden haben, an dieser Stelle einzugreifen, um ihre eigene Replikation und Persistenz zu sichern.

Untersuchungen zu Wechselwirkungen der Lck mit zellulären und viralen Proteinen können unser Verständnis zum Mechanismus der Regulation des T-Zell Wachstums verbessern. Darüber hinaus ist hier ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Medikamente und Therapien im Kampf gegen virale Infektionen zu sehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die dreidimensionale Struktur der ersten beiden Lck-Domänen mittels NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Obwohl die Struktur der Lck SH3-Domäne bereits gelöst wurde (Eck et al., 1994), sollte sie in die Untersuchungen mit einbezogen werden, da insbesondere z.B. HIV-1 Nef mit diesem Teil des Moleküls interagiert.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen strukturellen Daten sollten Untersuchungen zur Bindung von Zink, CD4 und Nef an Lck einen Aufschluss darüber geben, mit welcher

Affinität die verschiedenen Moleküle miteinander wechselwirken. Ebenso sollten mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Methoden diese Wechselwirkungen auf atomarer Ebene verfolgt werden.

Um das Eingreifen des HI-Virus in Signaltransduktionswege besser zu verstehen, standen desweiteren Untersuchungen über die Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit CD4 im Vordergrund. Darüber hinaus war es von besonderem Interesse, die potentielle Entstehung eines ternären Komplexes aus Lck, CD4 und Nef zu untersuchen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

**Tab. 2.1:** Name, Genotyp und Referenz aller in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda^-$ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	(Jessee, 1986)
<i>E. coli</i> BL21	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> , ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i>	(Grodberg & Dunn, 1988)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> , ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , $\lambda$ (DE3)	(Grodberg & Dunn, 1988)
<i>E. coli</i> BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> , ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , <i>rne131</i> , $\lambda$ (DE3)	Invitrogen, Niederlande

### 2.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

**Tab. 2.2:** Name, Resistenz, Eigenschaft und Referenz der verwendeten und konstruierten Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Eigenschaft	Referenz/Quelle
pUBS520	Kan	enthält tRNA <i>argU</i> zur Verbesserung der Expression von ORF's mit seltenen Codons für Arg in <i>E. coli</i>	Ralf Mattes, Stuttgart
pET15b	Amp	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pGEX6P-2	Amp	Expressionsvektor	Amersham

pLckU3	Amp	pGEX6P-2 mit integriertem <i>lck</i> <sub>1-120</sub> -Gen	Biosciences, Freiburg Silke Hoffmann, LS Biopolymere
pLckUNI	Amp	pGEX6P-2 mit integriertem <i>lck</i> <sub>1-62</sub> -Gen	Silke Hoffmann, LS Biopolymere
pNefR_fulllength	Amp	pET15b mit integriertem <i>nef</i> -Gen aus HIV-1, Stamm SF2	diese Arbeit
pET15bCD4(wt)_1	Amp	pET15b mit integriertem <i>cd4</i> <sub>394-433</sub> -Gen	Gesa Jonas, IMB Jena

### 2.3 Synthetische Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetisch hergestellten Peptide wurden von der Firma Interactiva (Ulm) in einem Reinheitsgrad >95 % bezogen. Die Sequenzen sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

**Tab. 2.3:** Name und Sequenz der verwendeten synthetisch hergestellten Peptide.

Name	Aminosäuresequenz	Länge
PxxP <sub>(SH3)</sub>	HVTFPQHPPRTV	12mer
CD4 <sub>(394-433)</sub>	<b>FITC</b> -CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTCQCPHRFQKTCSPI	40mer
CD4 <sub>(403-433)</sub>	<b>FITC</b> -QAERMSQIKRLLSEKKTCQCPHRFQKTCSPI	31mer
CD4 <sub>(403-419)</sub>	<b>FITC</b> -QAERMSQIKRLLSEKKT	17mer
CD4 <sub>(407-419)</sub>	<b>FITC</b> -MSQIKRLLSEKKT	13mer
CD4 <sub>(LL-AA)</sub>	<b>FITC</b> -QAERMSQIKRAASEKKT	17mer

### 2.4 Enzyme und Chemikalien

Alle kommerziell erhältlichen Enzyme stammten von den Firmen Boehringer (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein), Fluka (Neu-Ulm), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), New England Biolabs (Frankfurt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

Alle Chemikalien wurden in den Reinheitsgraden *pro analysi* (p.a.) oder *reinst* erworben und stammten von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe). Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranosid (IPTG) wurde

von Gerbu (Gaiberg),  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid und  $^{13}\text{C}$ -Glukose sowie  $\text{D}_2\text{O}$  wurden von Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA) bezogen.

## 2.5 Lösungen und Puffer

Ampicillin-	200 mg/ml Ampicillin in $\text{H}_2\text{O}$ bidest., sterilfiltriert
Stammlösung:	
Anodenpuffer:	0,2 M Tris/HCl, pH 8,9
APS:	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in $\text{H}_2\text{O}$ bidest.
Aufschlusspuffer:	PBS mit 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Triton X-100, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lysozym, DNase I, Complete Proteinaseinhibitoren (Boehringer, Mannheim), pH 7,2
IPTG:	1 M IPTG in $\text{H}_2\text{O}$ bidest., sterilfiltriert
Kanamycin-	100 mg/ml Kanamycin in $\text{H}_2\text{O}$ bidest., sterilfiltriert
Stammlösung:	
Kathodenpuffer:	0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin, pH 8,25, 0,1 % (w/v) SDS
Laemmlli-Probenpuffer:	40 % (w/v) Saccharose, 3 % (w/v) SDS, 4 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,075 % (w/v) Bromphenolblau
LckU3 NMR-Puffer:	20 mM Na-Acetat, 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,5, entgast, sterilfiltriert
PBS:	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,3
Protein-Entfärbelösung:	5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure
Protein-Färbelösung:	0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 % (v/v) Methanol, 9,2 % Essigsäure
Spaltpuffer:	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,0
Transferpuffer:	12 mM Tris, 96 mM Glycin, pH 8,3, 20 % (v/v) Methanol
Tris-Glycin-Puffer:	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8.3

## 2.6 Sonstige Materialien

Slide-A-Lyzer Dialyse Kassetten mit einer Molekulargewicht-Ausschlussgrenze von 3500 Da stammten von Pierce (Rockford, USA), Minisart Sterilfilter (0,20 µm) wurden von Sartorius (Göttingen) und Sterilfiltrationseinheiten für größere Volumina wurden von Nunc (Wiesbaden) bezogen.

## 2.7 Elektrophoresen

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zur analytischen Trennung von Proteingemischen verwendet. Sie wurde als vertikale Plattenelektrophorese (Mighty Small 260 SE, Hoefer/Amersham Biosciences, Freiburg) im diskontinuierlichen System durchgeführt. Die Gele hatte jeweils eine Größe von 10 cm x 10,5 cm und eine Dicke von 0,75 mm. Für Proteine wurden 12 %ige und 15 %ige SDS-Gele nach Laemmli (1970) und für kleine Proteine und Peptide 16,5 %ige SDS-Gele in einem Tricin-Puffer System nach Schägger und von Jagow (1987) verwendet.

### 2.7.1 SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli

Das Trenngel bestand aus 17,5 % bzw. 20 % (w/v) Acrylamid, 2,7 % (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 375 mM Tris/HCl, pH 8,8, das Sammelgel aus 8 % (w/v) Acrylamid, 0,21 % (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % SDS und 125 mM Tris/HCl, pH 6,8. Die Polymerisation wurde durch 8 µl TEMED und 40 µl einer 10 % (w/v) APS-Lösung pro 20 ml Gel gestartet.

Jeweils 10 µl der zu trennenden Proteinprobe (bis max. 20 µg Protein) wurden mit 10 µl Probenpuffer versetzt. Sollte die Proteinzusammensetzung von Bakterienzellen untersucht werden, bestand die Probe aus dem Zellpellet von 1 OD<sub>600</sub> einer Bakteriensuspension, versetzt mit 50 µl Probenpuffer. Die Proben wurden vor dem Auftrag für mindestens 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem Laufpuffer mit 50 mM Tris, pH 8,3, 385 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS bei konstant 20 mA für etwa 1 h.

## 2.7.2 SDS-Gele nach Schägger und von Jagow

Das Trenngel enthielt 16,5 %T und 6 % C in 1 M Tris/HCl, pH 8,45, 0,1 % (w/v) SDS. Das Sammelgel bestand aus 4 % T und 6 % C in 0,775 M Tris/HCl, pH 8,45, 0,1 % (w/v) SDS. Die Polymerisation wurde mit 8 µl TEMED und 40 µl einer 10 %igen APS-Lösung gestartet. In die obere Pufferkammer wurde der Kathodenpuffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8,25, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS), in die untere der Anodenpuffer (0,2 M Tris/HCl, pH 8,9) gefüllt. Jeweils 10 µl der Proteinprobe wurde mit 10 µl Probenpuffer vermischt und für mind. 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 30 mA für ca. 3.5 h.

## 2.8 Elektrotransfer von Proteinen auf Blotting-Membranen

Zur N-terminalen Ansequenzierung von Proteinen wurden diese in einer SDS-PAGE (Kap. 2.7) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Elektroblothing vom Gel auf eine PVDF-Membran (Biorad, München) übertragen. Der Transfer erfolgte in einer horizontalen, semi-trockenen Transferkammer (SemiPhor, Hoefer, San Francisco, USA) mit ca. 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche für 75 min. Dazu wurde die Membran kurz in Methanol und anschließend für 5 min in Transferpuffer (10 mM CAPS, 10 % (v/v) Methanol, pH 11,0) äquilibriert. Sechs Lagen Chromatographie-Papier (3MM CHR, Whatman, Maidstone, England) und die Membran wurden auf die exakt gleiche Größe wie das Gel zugeschnitten, ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert und nach folgendem Schema luftblasenfrei auf die anodische Graphitplatte gelegt: drei Lagen Chromatographie-Papier, die Membran, das Gel und weitere drei Lagen Chromatographie-Papier. Auf dieses Sandwich wurde dann die kathodische Graphitplatte gelegt und der Elektrotransfer begonnen.

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurde die Membran mit Coomassie angefärbt und anschließend an der Luft getrocknet. Die zu untersuchende Bande wurde ausgeschnitten und ansequenziert (Applied Biosystems, Procise Protein Sequencing System Mod. 494).

## 2.9 Anzucht von Bakterien

### 2.9.1 Nährmedien

Alle verwendeten Nährmedien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert (20 min, 1,2 bar, 121 °C; Autoklav Typ Matachana HST 250, Zirbus, Osterode). Glukose, Mineralsalze und

Antibiotika wurden als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben. Zur Produktion von nicht-isotopenmarkierten Proteinen wurden die Bakterien in LB- oder TB-Medium kultiviert, Minimalmedium mit  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid und  $^{13}\text{C}$ -Glukose als alleinige Stickstoff- bzw. Energiequelle diente zur Gewinnung von isotopen-angereicherten Proteinen.

LB-Medium: 10 g Pepton (tryptisch verdaut), 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

Minimalmedium: Als Grundlage für das verwendete Minimalmedium diente das Minimalmedium M9 nach Sambrook et al. (1989), welches mit einer Spurenelementlösung TS2 (Meyer & Schlegel, 1983) sowie 2,0 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$ , 1,0 ml 10 mM Fe(III)-citrat, 0,1 ml 1 M  $\text{CaCl}_2$  und 4 g/l Glukose versetzt wurde. Sollte  $^{13}\text{C}$ -isotopenangereichertes Protein gewonnen werden, wurde die  $^{13}\text{C}$ -Glukose Konzentration auf 2 g/l eingestellt.

M9: 9,14 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 3,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g NaCl, 1,0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ad 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

Spurenelementlösung TS2: 100 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 30 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 300 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 200 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 10 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 900 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 20 mg  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , ad 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

## 2.9.2 Zellanzucht

Die Zellanzucht erfolgte in mit Schikanen versehenen Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 200 rpm (Schüttler Infors HT, Infors AG, Bottmingen, CH). In einem 1000 ml Kolben wurden 500 ml Kulturmedium, versehen mit dem entsprechendem Antibiotikum, mit einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Bakterienstammes auf eine optische Dichte bei 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) von ca. 0,1 angeimpft und unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 bis 0,8 wurde die Bakterienkultur mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Überexpression des gewünschten Proteins wurde durch Probennahme vor und nach Induktion mittels SDS-PAGE überprüft. Nach ca. 2 bis 4 h wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4 °C mit 5000 rpm für 20 min geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.



---

## **2.10 Proteinreinigungen**

### **2.10.1 Zellaufschluss**

Für die Präparation von GST-Lck-Proteinen und HIV-1 Nef-Protein konnte ein nativer Zellaufschluss durchgeführt werden, für die Gewinnung von CD4-Protein wurde unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet, der Aufschlusspuffer enthielt hier zusätzlich 6 M Harnstoff.

Zellpellets wurden in 4 ml Aufschlusspuffer pro g Nasszellgewicht aufgenommen und durch 3-malige Passage durch eine 20 ml French-Press Zelle (American Instruments, Silver Springs, Maryland, USA) bei einem Druck von 1000 bar aufgeschlossen. Anschließend wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zellwandbestandteile durch Zentrifugation (4 °C, 13000 rpm, Sorvall RC-50, Hereus, Hanau) entfernt. Der erhaltene zellfreie Rohextrakt wurde für die weitere Reinigung verwendet.

### **2.10.2 Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose**

Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen (Lck-unique und LckU3) wurde ein „batch“-Verfahren an selbstgepackten Säulen mit Glutathion-Sepharose 4B (GSH-Sepharose) (Amersham Biosciences, Freiburg) als Chromatographiematerial durchgeführt. Hierzu wurde der lösliche Überstand des Zellaufschlusses mit 1,5 ml in PBS äquilibrierter Glutathion-Sepharose pro g Zellnassgewicht versetzt und eine Stunde bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde mit dem 10-fachen Säulenvolumen mit Spaltpuffer gewaschen. Das Chromatographie-Material war damit vorbereitet für die Abspaltung des GST-Affinitätstags vom GST-Fusionsprotein.

### **2.10.3 Metallionenaffinitätschromatographie an TALON-Superflow**

Für die Reinigung von HIV Nef-Protein wurde der lösliche Überstand des Zellaufschlusses an TALON-Superflow (Clontech, Heidelberg) chromatographiert. Das Säulenmaterial wurde zuvor mit 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 7 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,5 bei einem Fluss von 1 ml/min äquilibriert. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit dem 10-fachen Volumen gewaschen und das Ziel-Protein anschließend mit 150 mM Imidazol in dem

gleichen Puffer fraktioniert eluiert. Nef-Protein enthaltende Fraktionen wurden in PBS umgepuffert und mit 8,4 % (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  versetzt.

Da die Reinigung von CD4-Protein unter denaturierenden Bedingungen erfolgte, wurde hier dem obigen Puffer zusätzlich 3 M Harnstoff zugesetzt. Außerdem wurde ein Waschschrift mit 50 mM Imidazol in zwei Säulenvolumina durchgeführt.

#### **2.10.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie**

HIV-Nef-Protein wurde zusätzlich einer Chromatographie an Butyl-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Freiburg) unterzogen. Die Bindung des Proteins erfolgte bei einem Fluss von 1 ml/min in entgastem PBS-Puffer mit 8,4 % (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und 14 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 8,4 % bis 0 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Die Chromatographie wurde über ein ÄKTA-*purifier* System (Amersham Biosciences, Freiburg) gesteuert und dokumentiert. Fraktionen, die Nef-Protein enthielten, wurden vereinigt, umgepuffert in PBS und konzentriert (Macrosep-Konzentratoren, Molekulargewicht-Ausschlussgrenze 10 kDa, Pall-Filtron).

#### **2.10.5 Spaltung mit PreScission Protease**

Die GST-Lck Fusionsproteine besaßen eine Erkennungssequenz für die PreScission Protease (Amersham Biosciences, Freiburg). Damit war nach der Reinigung an GSH-Sepharose eine Abspaltung des N-terminalen Glutathion-S-Transferase Affinitätstags möglich. Die Spaltung wurde durchgeführt, während das Protein noch an die Säulenmatrix gebunden vorlag. Dadurch war eine Abspaltung und gleichzeitige Trennung des GST-Affinitätstags gegeben. Die Spaltreaktion wurde durch die Zugabe von 20 U PreScission Protease pro ml GSH-Sepharose gestartet und erfolgte bei 4 °C für 12 h. Stündlich wurden 20  $\mu$ l Spaltansatz entnommen und in einer SDS-PAGE die Vollständigkeit der Spaltung überprüft.

#### **2.10.6 Spaltung mit Thrombin**

Das HIV-1 Nef Fusions-Protein besaß eine Erkennungssequenz für Thrombin. Somit war nach der Reinigung des Proteins eine Abspaltung des N-terminalen Hexahistidin-Anhangs möglich. Die Spaltung wurde durch Zugabe von 0,3 U biotinyliertem Thrombin (Amersham Biosciences, Freiburg) pro mg Protein gestartet und erfolgte bei Raumtemperatur für 3 bis 4 h.

---

Das Thrombin konnte durch Zugabe von 15  $\mu$ l Streptavidin-Agarose (Novagen, Madison, USA) pro Unit und anschließende Zentrifugation aus dem Spaltansatz entfernt werden.

### **2.10.7 Trennung der Spaltprodukte mittels Gelfiltration**

Die Trennung von Spaltprodukten erfolgte mittels Gelfiltration an Superdex 75. Je nach Menge des zu chromatographierenden Proteins kamen entweder eine HiLoad 26/60- oder eine HR10/30-Säule zum Einsatz. HIV-1 Nef-Protein wurde in PBS mit 14 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und Lck-Proteine in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,5 chromatographiert. Die Steuerung und Dokumentation erfolgte über ein ÄKTA-*purifier* System (Amersham Biosciences, Freiburg). Lck-Proteine wurden nach Vereinigung der Fraktionen lyophilisiert, Nef-Protein wurde auf eine Endkonzentration von ca. 200  $\mu$ M konzentriert (Macrosep-Konzentratoren, Molekulargewicht-Ausschlussgrenze 10 kDa, Pall-Filtron)

## **2.11 UV/VIS Spektroskopie**

### **2.11.1 Absorptionsmessungen**

Absorptionsmessungen im UV/VIS-Bereich wurden mit einem Spektralphotometer Typ UV-Mini 1240 (Shimadzu, Duisburg) durchgeführt. Für Messungen im sichtbaren Bereich wurden Polystyrol Küvetten (Roth, Karlsruhe) verwendet, für Messungen im UV-Bereich kamen Quarzglas Küvetten (Hellma, Müllheim) zum Einsatz. Die Schichtdicke der Küvetten betrug jeweils 1 cm.

### **2.11.2 Messung der Bakteriendichte**

Die Bestimmung der Bakteriendichte erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm. Ab einer  $\text{OD}_{600} > 0,3$  wurden die zu messenden Bakteriensuspensionen mit Referenzmedium auf eine  $\text{OD}_{600} \approx 0,3$  verdünnt.

### 2.11.3 Proteinkonzentrationsbestimmungen

Die Konzentration von Proteinen bzw. Peptiden wurde mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Demnach gilt folgender Zusammenhang zwischen der Extinktion  $E$  und der Konzentration  $c$ :

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gleichung 2-1})$$

$\varepsilon$  steht für den molaren Extinktionskoeffizienten und  $d$  für die Schichtdicke der Küvette. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine bzw. Peptide wurden anhand der aromatischen Aminosäuren ermittelt (Gill & von Hippel, 1989).

## 2.12 Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren erfolgte an einem LS50B (Perkin-Elmer) Spektropolarimeter in Standard-Fluoreszenzküvetten aus SUPRASIL Quarzglas ( $d=1$  cm, Hellma, Müllheim) in einem Volumen von 2 ml. Die Messung FITC-markierter Peptide erfolgte unter Rühren in PBS-Puffer bei einer Excitationswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Für einen Messpunkt wurden 589 Datenpunkte in einer Minute aufgenommen und gemittelt. Für jeden Messpunkt wurde eine Nullpunktkorrektur durchgeführt.

### 2.12.1 Bestimmung von Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) mit Fluoreszenzmessungen

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) aus Fluoreszenzdaten wurde durch nichtlineares Fitten der Kurven mit dem Programm SigmaPlot (Vers. 6.0) nach Gleichung 2-2 durchgeführt (Müller et al., 1991).

$$F = F_{\min} + \frac{\left(1 + \frac{c_{ges} + E_{ges}}{K_D} - \sqrt{\left(1 + \frac{c_{ges} + E_{ges}}{K_D}\right)^2 - 4 \frac{c_{ges} \cdot E_{ges}}{K_D^2}}\right) K_D (F_{\max} - F_{\min})}{2 \cdot E_{ges}}$$

(Gleichung 2-2)

Variablen:

$E_{\text{ges}}$ =Konzentration des vorgelegten Fluorophors

$c_{\text{ges}}$ =Konzentration der titrierten Komponente

Initiale Parameter:

$F_{\text{min}}$ =minimale beobachtete Fluoreszenz

$F_{\text{max}}$ =maximale beobachtete Fluoreszenz

$K_{\text{D}}$ =abgeschätzte Dissoziationskonstante

## 2.13 NMR-Spektroskopie und Spektrenauswertung

### 2.13.1 Probenvorbereitung

Lyophilisierte Proteine wurden in den entsprechenden NMR-Puffern aufgenommen und für 6 h gegen diesen Puffer dialysiert (PIERCE Mikrodialysesystem). Den Proben wurde 0,02 % (w/v) Na-Azid, 0,1 mM PMSF und 10 % (v/v) D<sub>2</sub>O zugesetzt.

5 mm Probenröhrchen (535-PP, Wilmad) wurden mit 20 ml Ethanol und anschließend mit mindestens 300 ml H<sub>2</sub>O gespült und anschließend im Vakuum getrocknet. Für Probenvolumina kleiner als 600 µl wurden Suszeptibilitätseinsätze (Doty Scientific) für die NMR-Röhrchen verwendet und ober- und unterhalb der Probe positioniert.

### 2.13.2 Allgemeine Messbedingungen

NMR-Experimente wurden an Varian Unity *INOVA* Spektrometern mit Protonenfrequenzen von 600 MHz bzw. 750 MHz durchgeführt. Es wurden Varian 5 mm Z-PFG-<sup>1</sup>H{<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N}-, XYZ-PFG-<sup>1</sup>H{<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N}- und XYZ-PFG-<sup>1</sup>H{<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>31</sup>P}-Probenköpfe verwendet. Alle Experimente wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Prozessierung der NMR-Spektren erfolgte mit den Programmen VNMR (Vers. 5.3b, Varian) und PROSA (Vers. 2.9), (Güntert, 1992). Die Visualisierung und Auswertung der Experimente wurde mit dem Programm XEASY (Vers. 1.3.13) (Bartels et al., 1995) realisiert.

### 2.13.3 NMR Experimente

Die Akquisitions- und Prozessierungsparameter aller Spektren sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

**Tab. 2.4:** Akquisitions- und Prozessierungsparameter für NMR Experimente an LckU3

Experiment	sw <sub>1</sub> [ppm]	t <sub>1</sub> [Pkt]	sw <sub>2</sub> [ppm]	t <sub>2</sub> [Pkt]	sw <sub>3</sub> [ppm]	t <sub>3</sub> [Pkt]	nt	mix [ms]	<sup>15</sup> N* [ppm]	<sup>13</sup> C* [ppm]	ω <sub>1</sub> [Pkt]	ω <sub>2</sub> [Pkt]	ω <sub>3</sub> [Pkt]
2D ( <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N)-HSQC	32,9	96-128	16,6	512	-	-	4-32	-	120	-	1024	2048	-
2D (ct)-( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C)-HSQC	65,6	300	16	640	-	-	8	-	-	35	1024	2048	-
2D ( <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N)-NOE	25,1	96	13,3	5,2	-	-	64	3000	120	-	1024	2048	-
3D HNCACB	54,1	105	25,6	47	13,3	512	16	-	120	46	512	128	512
3D CBCA(CO)NH	54,1	60	25,6	47	13,3	416	16	-	120	46	256	128	512
3D HNCO	10,4	44	26,8	44	16	512	8	-	120	174	512	128	512
3D HNHA	11,5	100	24,3	64	16	1024	8	-	118	-	512	128	512
3D (H)C(CO)NH	56,1	120	25	53	13,4	416	4	9,7	120	46	512	128	512
3D H(CCO)NH	10,6	110	25	53	13,3	544	4	9,7	120	46	512	128	512
3D HCCH-COSY	11,2	128	31,7	75	13,3	544	8	-	-	43	512	128	1024
3D ( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N)-NOESY-HSQC	11,2	196	25,6	44	11,6	449	8	100	120	-	512	128	512
3D ( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C)-NOESY-HSQC	11,2	140	33,3	73	13,3	512	8	80	118	43	512	128	1024

**sw:** Spektrale Weite der jeweiligen Dimension; **t:** Anzahl der komplexen Punkte in der jeweiligen Dimension; **nt:** Anzahl der scans pro Experiment; **mix:** NOESY- oder TOCSY-Mischzeit; **\***: <sup>15</sup>N- oder <sup>13</sup>C-Trägerfrequenz; **ω:** Anzahl der realen Punkte nach Fourier-Transformation und Reduzierung der spektralen Weite

Die Quadraturdetektion in den indirekten Dimensionen wurde durch die Hyperkomplex-Methode (States et al., 1982) erreicht. Für die Breitband- <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-Entkopplung während der direkten Detektionsperiode wurden in der Regel GARP-Sequenzen (Shaka & Keeler, 1987) benutzt. Als Mischsequenz während TOCSY-Spinlockperioden wurde das DIPSI-3 Schema (Shaka et al., 1988) verwendet. <sup>1</sup>H-Breitbandentkopplung wurde durch die WALTZ-16 Sequenz (Shaka et al., 1983) erreicht. <sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen wurden auf externes DSS (δ<sub>DSS</sub>=0 ppm) geeicht. <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-chemische Verschiebungen wurden indirekt auf die <sup>1</sup>H-Methylfrequenz von DSS geeicht (Wishart et al., 1995); das v(<sup>1</sup>H)/v(<sup>13</sup>C)- bzw. v(<sup>1</sup>H)/v(<sup>15</sup>N)-Frequenzverhältnis zur Bestimmung der 0 ppm-Frequenz ist für <sup>13</sup>C 0,251449530 und für <sup>15</sup>N 0,101329118 (Wishart et al., 1995).

### 2.13.3.1 Bestimmung skalarer Kopplungskonstanten

Die Bestimmung der homonuklearen Dreibindungskopplung zwischen dem H $\alpha$ - und H<sup>N</sup>-Proton ( ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ ) erfolgte durch ein HNHA-Experiment (Vuister & Bax, 1993). Die Kopplungskonstante wird durch Intensitätsvergleich der Signale des H $\alpha$ - und des H<sup>N</sup>-Protons wie folgt berechnet:

$${}^3J \approx \frac{\arctan \sqrt{\frac{I_{\text{Kreuz}}}{I_{\text{Diagonal}}}}}{\pi(\delta + \delta')} \quad (\text{Gleichung 2-3})$$

$I_{\text{Kreuz}}$ : Intensität des Kreuz-Signals

$I_{\text{Diagonal}}$ : Intensität des Diagonal-Signals

$\delta + \delta' = 25,0754$  ms; (feste Zeitwerte aus der Pulssequenz)

Die Umrechnung in dihedrale Winkel nach der Karplus-Beziehung erfolgte nach Pardi et al., (1984):

$$J = A \cos^2(\phi - 60) - B \cos(\phi - 60) + C \quad (\text{Gleichung 2-4})$$

mit  $A=6,4$ ;  $B=1,4$ ;  $C=1,9$

Wurde eine Kopplungskonstante  $< 6,0$  Hz bestimmt, so wurde der dazugehörige  $\phi$ -Winkel auf Werte zwischen  $-80^\circ$  und  $-40^\circ$  beschränkt. War die gemessene Kopplungskonstante  $> 8,0$  Hz, wurde der  $\phi$ -Winkel auf Werte zwischen  $-160^\circ$  und  $-80^\circ$  festgelegt.

### 2.13.3.2 Bestimmung des heteronuklearen ${}^1\text{H}$ , ${}^{15}\text{N}$ -NOE

Die Auswertung von ( ${}^1\text{H}$ ,  ${}^{15}\text{N}$ )-NOE Spektren erfolgte mit dem Programm NMRView (Johnson & Blevins, 1994) nach Prozessierung der Daten mit dem Programm NMRPipe (Delaglio et al., 1995). Der Hetero-NOE wurde bestimmt durch das Verhältnis der Intensitäten der Signale mit und ohne vorherige 3 s dauernde Protonensaturierung. (Gleichung 2-5):

$$NOE = \frac{I_{sat}}{I_{unsat}} \quad (\text{Gleichung 2-5})$$

NOE: „steady-state“-Heteronuklearer Nuklear Overhauser Effekt

$I_{sat}$ : Intensität des Signals mit Protonensaturierung

$I_{unsat}$ : Intensität des Signals ohne Protonensaturierung

Die Standard-Abweichung des NOE,  $\sigma_{NOE}$ , wurde nach folgender Gleichung auf Basis des gemessenen Hintergrundrauschens bestimmt (Gleichung 2-6):

$$\frac{\sigma_{NOE}}{NOE} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{I_{sat}}}{I_{sat}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{I_{unsat}}}{I_{unsat}}\right)^2} \quad (\text{Gleichung 2-6})$$

NOE: „steady-state“-Heteronuklearer Nuklear Overhauser Effekt

$\sigma_{NOE}$ : Standardabweichung des NOE

$I_{sat}$ : Intensität des Signals mit Protonensaturierung

$I_{unsat}$ : Intensität des Signals ohne Protonensaturierung

$\sigma_{I_{sat}}$ : Standardabweichung von  $I_{sat}$ , abgeschätzt durch Hintergrundrauschen

$\sigma_{I_{unsat}}$ : Standardabweichung von  $I_{unsat}$ , abgeschätzt durch Hintergrundrauschen

## 2.14 Zuordnung von NOEs und Strukturrechnungen

Die Zuordnung von NOEs erfolgte, soweit Eindeutigkeit gegeben war, zunächst manuell. Anschließend wurden nicht eindeutige NOEs in einem iterativen Prozess mit dem Programm ARIA (**a**mbiguous **r**estraints for **i**terative **a**ssignment) (Linge et al., 2001) zugeordnet. ARIA berechnet pro Iteration einen Satz von 40 Strukturen. Unter Verwendung der zehn energieärmsten Strukturen werden die NOEs aufgrund der chemischen Verschiebung und der strukturellen Konsistenz neu zugeordnet. Für die Zuordnung aufgrund der chemischen Verschiebung arbeitete das Programm mit einer Toleranz von 0,02 ppm für Protonen und von 0,2 ppm für Heterokerne. Die Toleranz für strukturelle Verletzungen wurde dabei von 1000 Å in der ersten Iteration schrittweise bis auf 0,1 Å in der achten und letzten Iteration gesenkt.

Das Refinement erfolgte mit dem Programm CNS (Vers. 1.0) (Brunger et al., 1998). Dazu mussten die ARIA-restraint Listen dem CNS-Format manuell angepasst werden, um



Inkompatibilitäten zu umgehen. Weiterhin war es notwendig, einige Parameter aus den Topologie-Dateien zu entfernen, aus denen zu Beginn der Strukturrechnungen die Startstruktur in einer gestreckten Konformation berechnet wird, da sich diese Dateien bei ARIA und CNS in wenigen Details unterscheiden. Während der Refinement-Phase der Strukturrechnungen wurden mit CNS je 50 Strukturen berechnet und auf konsistent verletzte NOEs untersucht.

Die Berechnung von Strukturen erfolgte auf einem DS20 Server (Compaq, Houston, USA) und auf einer SGI Origin 3200 (SGI, Mountainview, USA). Das Refinement wurde mit dem Standard CNS-*ab initio* simulated annealing Protokoll *anneal.inp*, welches sich auch im Anhang befindet, durchgeführt. Nach der Randomisierung aller  $\Phi$ - und  $\Psi$ -Winkel wurde in einer Hochtemperatur-Phase das Absuchen des Konformationsraumes für 15 ps bei 50000 K mit einem Zeitschritt von 15 fs simuliert. Anschließend folgte mit einer Torsionsdynamik eine Phase langsamen Abkühlens in 200 Schritten auf 0 K in 15 ps mit Verdopplung der Wichtung der Dihedralwinkel Daten, ebenfalls mit einem Zeitschritt von 15 fs. Daran schloss sich eine langsame Abkühlphase mit kartesischer Dynamik an, die von 2000 K in 80 Schritten auf 0 K mit einem Zeitschritt von 5 fs erfolgte. Am Ende der Simulation wurde eine Energieminimierung in 80 Schritten durchgeführt, wobei die Skalierung für den Dihedralwinkel-Energie Term verdoppelt, und für den NOE-Energie Term halbiert wurde.

Die erhaltenen Strukturen wurden mit den Programmen MOLMOL (Koradi et al., 1996) und SYBYL (Tripos) visualisiert und mit Hilfe des Programms PROCHECK-NMR (Laskowski et al., 1996) bewertet.

### 3 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

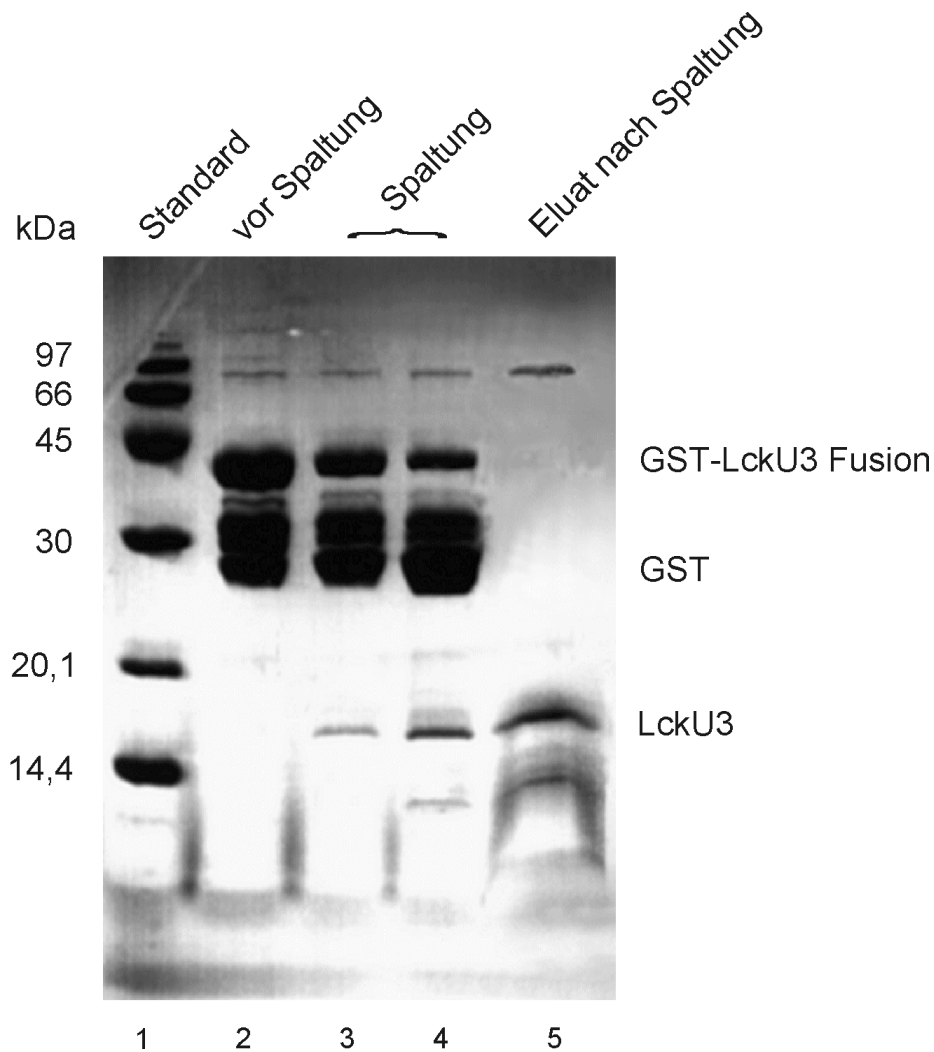
Das Ziel der im Folgenden beschriebenen Arbeiten war zunächst die Etablierung eines Reinigungsprotokolls zur Gewinnung von isotoopenmarkiertem Lck-unique-SH3 Protein (LckU3), für das bereits ein Expressionsvektor zur Verfügung stand. Von dem gereinigten Protein sollte dann mit Hilfe heteronuklearer NMR-Experimente eine Strukturbestimmung in Lösung durchgeführt werden. Gleichzeitig würde durch die Identifizierung der Rückgrat-Amidprotonen die Grundvoraussetzung für die Auswertung von  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Titrationsen mit verschiedenen Liganden geschaffen werden. Diese Liganden sollten entweder synthetisch oder ebenfalls durch bakterielle Überexpression hergestellt werden.

#### 3.1 Expression und Reinigung von LckU3

Zur Gewinnung von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  markiertem LckU3 Protein im Milligramm-Maßstab wurden 2 l M9 Medium wie in Kap. 2.9.2 beschrieben mit *E. coli* BL21/pLckU3 beimpft, diese bei Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von ca. 0,6 mit IPTG induziert und ca. 3 h nach der Induktion geerntet. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass das gesamte gebildete Fusionsprotein in löslicher Form in den Zellen vorlag, so dass eine native Präparation des Proteins erfolgen konnte. Da die Aminosäuresequenz insbesondere in der unique-Domäne mehrere Cysteine aufweist, wurde in sämtlichen Reinigungsschritten besonderer Wert auf möglichst anoxische und reduzierende Bedingungen gelegt, um eine Oxidation der Sulfhydryl-Gruppen zu vermeiden. Dies war insbesondere deshalb von Wichtigkeit, weil die zu untersuchende Bindung der Lck unique-Domäne an den cytoplasmatischen Teil des humanen CD4-Rezeptors über ein durch Sulfhydryl-Gruppen komplexiertes Zink-Atom erfolgt.

Pro Liter Medium konnten ca. 1,5 g Zellen (Nassgewicht) gewonnen werden. Die Zellen wurden wie in Kap. 2.10.1 beschrieben aufgeschlossen und mit dem Überstand nach Zentrifugation eine Chromatographie an Glutathion Sepharose 4B im „batch“-Verfahren durchgeführt (Kap. 2.10.2). Das „batch“-Verfahren hat gegenüber einer normalen Chromatographie zwei Vorteile: zum einen kann die Spaltung des Fusionsproteins durchgeführt werden, ohne dass dieses erst in einem weiteren Chromatographieschritt umgepuffert werden muss. Zum zweiten kann das Zielprotein nach der Abspaltung vom Fusionspartner direkt eluiert werden. Die Trennung vom Fusionspartner erfolgt somit im

gleichen Arbeitsschritt wie die Spaltung. In Abb. 3.1 ist beispielhaft eine Reinigung von LckU3 an GSH-Sepharose im „batch“-Verfahren gezeigt.

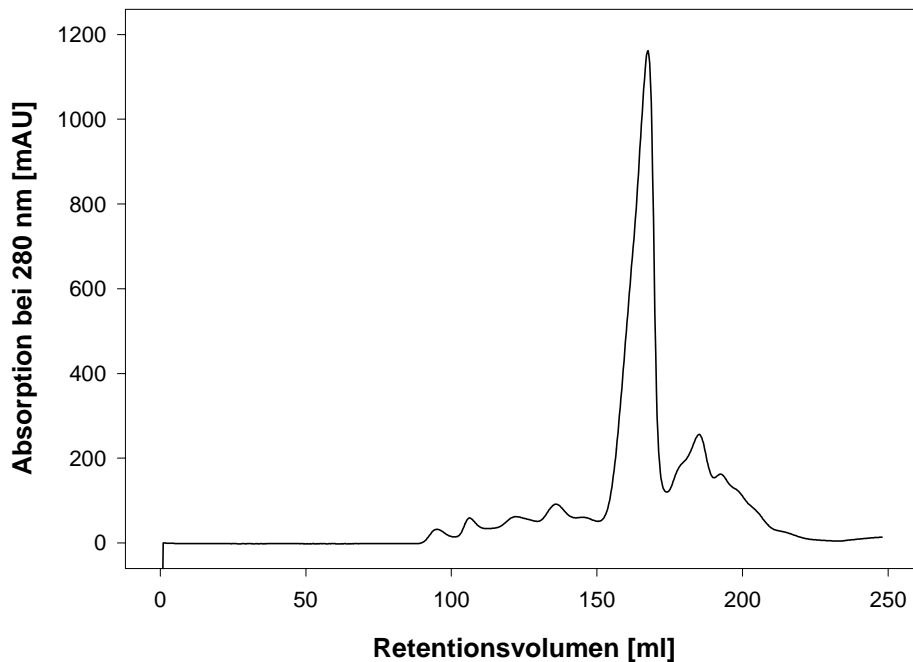


**Abb. 3.1: Überprüfung der Reinigung von LckU3 an Glutathion-Sepharose 4B mittels SDS-Gelelektrophorese**

12 % SDS-Gel einer Reinigung von LckU3 Fusionsprotein. Bahn 1: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2-4: Säulenmaterial nach 0 h, 3 h und 7 h Spaltung mit PreScission Protease; Bahn 5: Eluat nach Spaltung

Deutlich ist zu erkennen, dass bei der Reinigung verkürzte Nebenprodukte mit angereichert werden. Hierbei handelt es sich um nicht vollständig synthetisierte Fusionsproteine. Da der GST-Affinitätsanhang N-terminal vom Zielprotein liegt, werden auch solche verkürzten und damit unerwünschten Nebenprodukte bis nach der Spaltung mit angereichert. Somit war zur Gewinnung von reinem LckU3 Protein ein weiterer Reinigungsschritt notwendig. Das Eluat der Chromatographie an GSH-Sepharose wurde einer Größenausschlusschromatographie an

Superdex 75 unterzogen (Kap. 2.10.7). Damit war eine Trennung von unerwünschten Nebenprodukten und eine gleichzeitige Umpufferung in einem Schritt möglich. Ein typisches Elutionsprofil einer solchen Chromatographie ist in Abb. 3.2 gezeigt. Nach diesem letzten Reinigungsschritt konnte LckU3 in ausreichender Reinheit und in für Triple-Resonanzexperimente ausreichenden Mengen gewonnen werden.



**Abb. 3.2:** Reinigung von LckU3 mittels Gelfiltration an Superdex 75 prep grade

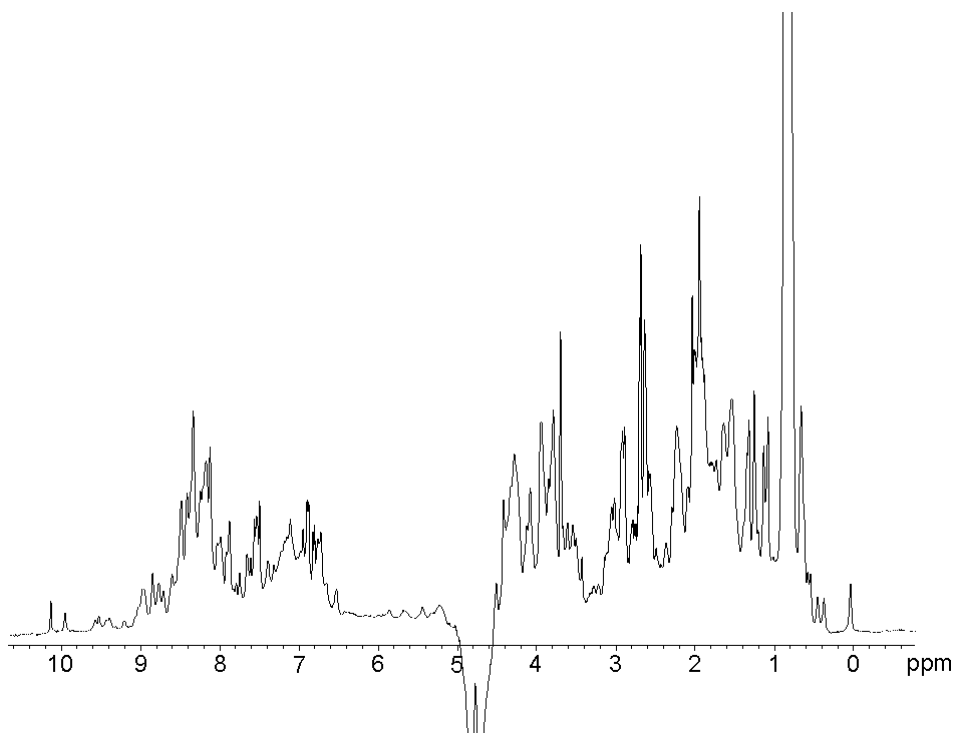
Gezeigt ist der typische Verlauf einer Gelfiltration von LckU3 an Superdex 75 prep grade. Das LckU3-Protein eluiert bei einem Retentionsvolumen von ca. 150 bis 170 ml. Deutlich sieht man die Trennung von später eluierenden kürzeren Spaltfragmenten.

## 3.2 NMR-Spektroskopie an LckU3

### 3.2.1 1D-NMR Spektroskopie an LckU3

Zur Optimierung der Messbedingungen wurden eindimensionale Spektren aufgenommen. Die Spektren mit der besten Dispersion und einer einheitlichen Linienbreite wurden bei 298 K in 20 mM Na-Acetat, 150 mM NaCl, pH 6,5 erhalten. Das in Abb. 3.3 dargestellte 1D-Spektrum zeigte eine akzeptable Dispersion der Amidprotonen von ca. 3 ppm mit einzelnen Resonanzlinien bei für Indolring-NH-Protonen von Tryptophanen typischen Frequenzen von

ca. 10 ppm. Einzelne hochfeldverschobene Protonen im Aliphatenbereich (bis 0,03 ppm) ließen darauf schließen, dass reguläre Sekundärstrukturelemente vorhanden waren. Unter den so optimierten Bedingungen sollten erste zweidimensionale Experimente aufgenommen werden.



**Abb. 3.3:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von LckU3

Die Konzentration betrug ca. 1,6 mM LckU3 Protein in 10 % D<sub>2</sub>O, 20 mM Na-Acetat, 150 mM NaCl, pH 6,5. Das Spektrum wurde bei 298 K aufgenommen, die Protonenfrequenz des Spektrometers betrug 750 MHz.

### 3.2.2 Heteronukleare 2D-NMR Spektroskopie an LckU3

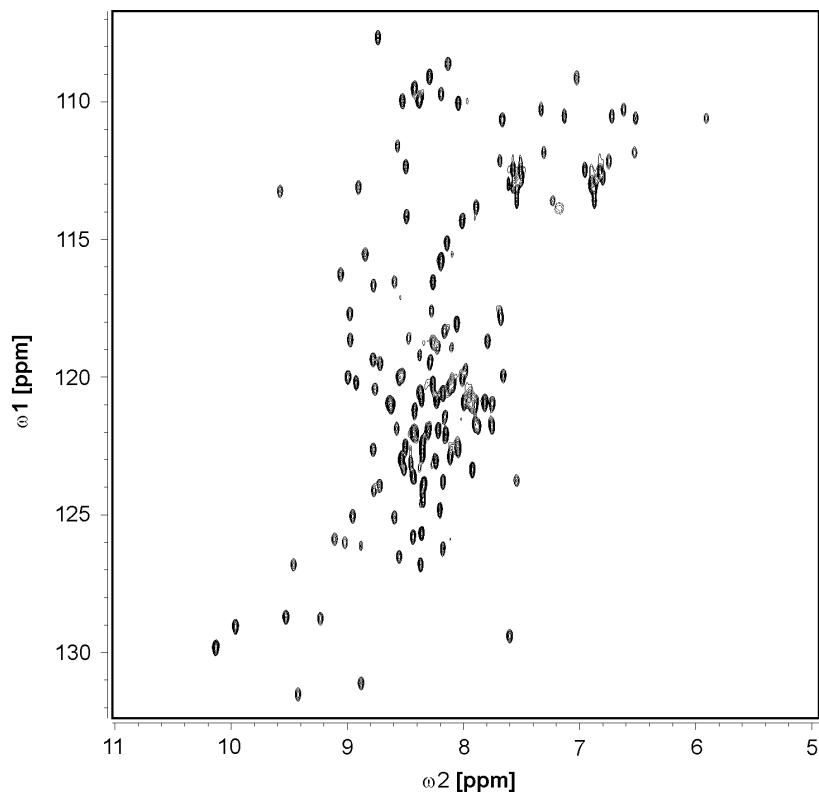
Als Grundlage für die Tripleresonanzspektren dienen die <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N- und <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-Einbindungskorrelationsspektren (HSQC-Spektren). Ein <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum enthält alle Signale von Protonen, die an einen <sup>15</sup>N-Kern gebunden sind. Dies sind alle Rückgrat-Amidprotonen (NH), δNH von Argininen, εNH von Lysin, γNH<sub>2</sub> von Asparaginen und δNH<sub>2</sub> von Glutaminen. Das <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-Spektrum enthält hingegen alle die Signale von Protonen, die an einen <sup>13</sup>C-Kern gebunden sind.

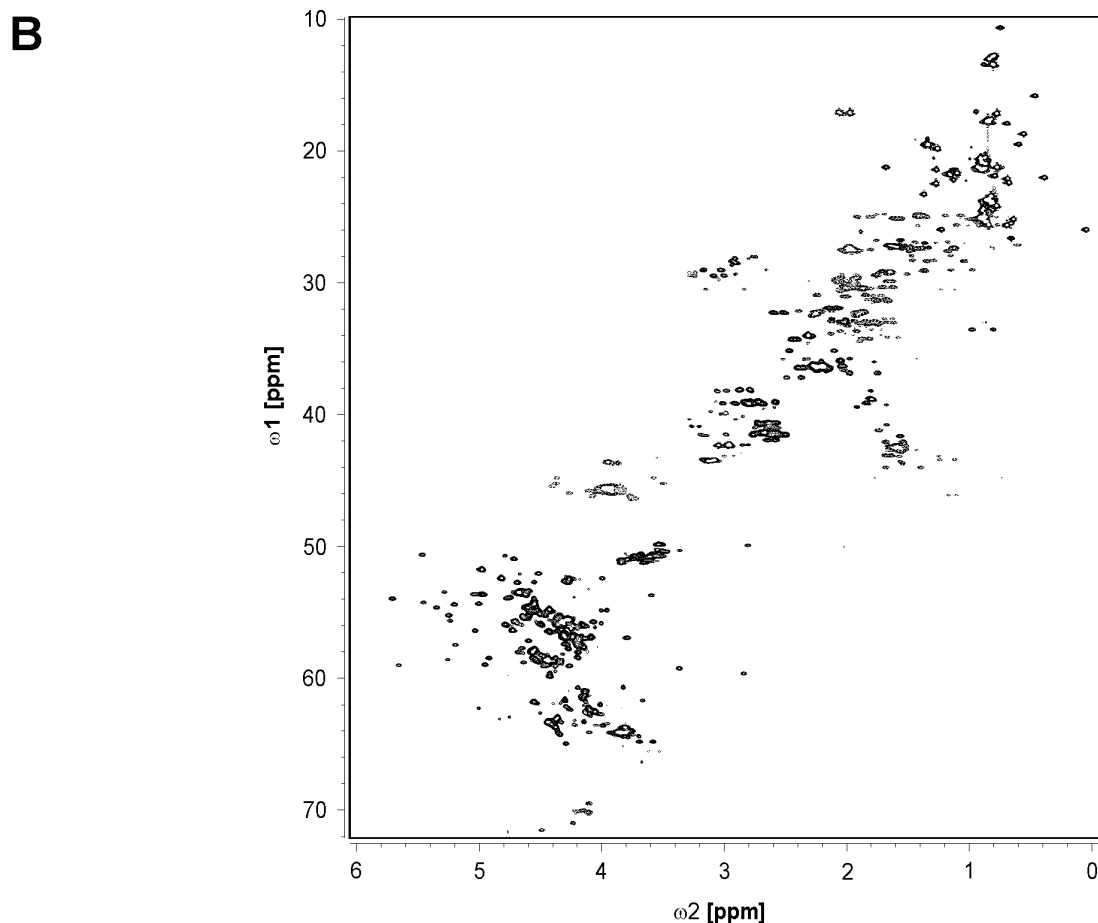
In Abb. 3.4, sind das <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N- und das <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-Spektrum von LckU3 dargestellt. Im <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC (A) zeigt ein Großteil der Signale eine gute Dispersion in beiden Dimensionen. Etwa 30 Signale von Rückgratamidprotonen haben leichte Überlagerungen mit anderen

Signalen, ebenso ca. 6 Signale von Seitenkettenprotonen. Es konnten etwa 130 Resonanzen mit einheitlichen Signalhalbwertsbreiten beobachtet werden. Dies entsprach, abgeleitet von der Aminosäuresequenz, den Erwartungen.

In Abb. 3.4, **B**, ist das  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC der aliphatischen Region gezeigt. Im Bereich der  $\text{H}^\alpha$ -Protonen (zwischen 4 und 6 ppm), der  $\delta$ -Protonen von Prolinen (bei ca. 3,8 ppm), aber auch im Bereich der Methyl-Protonen (zwischen 0 und 1 ppm) sind starke Überlagerungen von Signalen zu erkennen. Dies deutete darauf hin, dass ein Teil des Proteins möglicherweise keine regulären Sekundärstrukturelemente aufweist.

Aufgrund der Qualität des  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums konnte aber zum einen davon ausgegangen werden, dass die Durchführung von 3D-NMR-Experimenten erfolgreich sein würde. Zum anderen konnte die Dispersion als ausreichend betrachtet werden, um im weiteren Verlauf der Arbeit erfolgreich HSQC-Titrationsexperimente durchführen zu können. Somit war die Zuordnung möglichst aller Resonanzen von LckU3 das primäre Ziel, um dann mit Hilfe von 3D-NOESY Experimenten Daten über Abstandseinschränkungen für die Strukturbestimmung zu gewinnen.

**A**

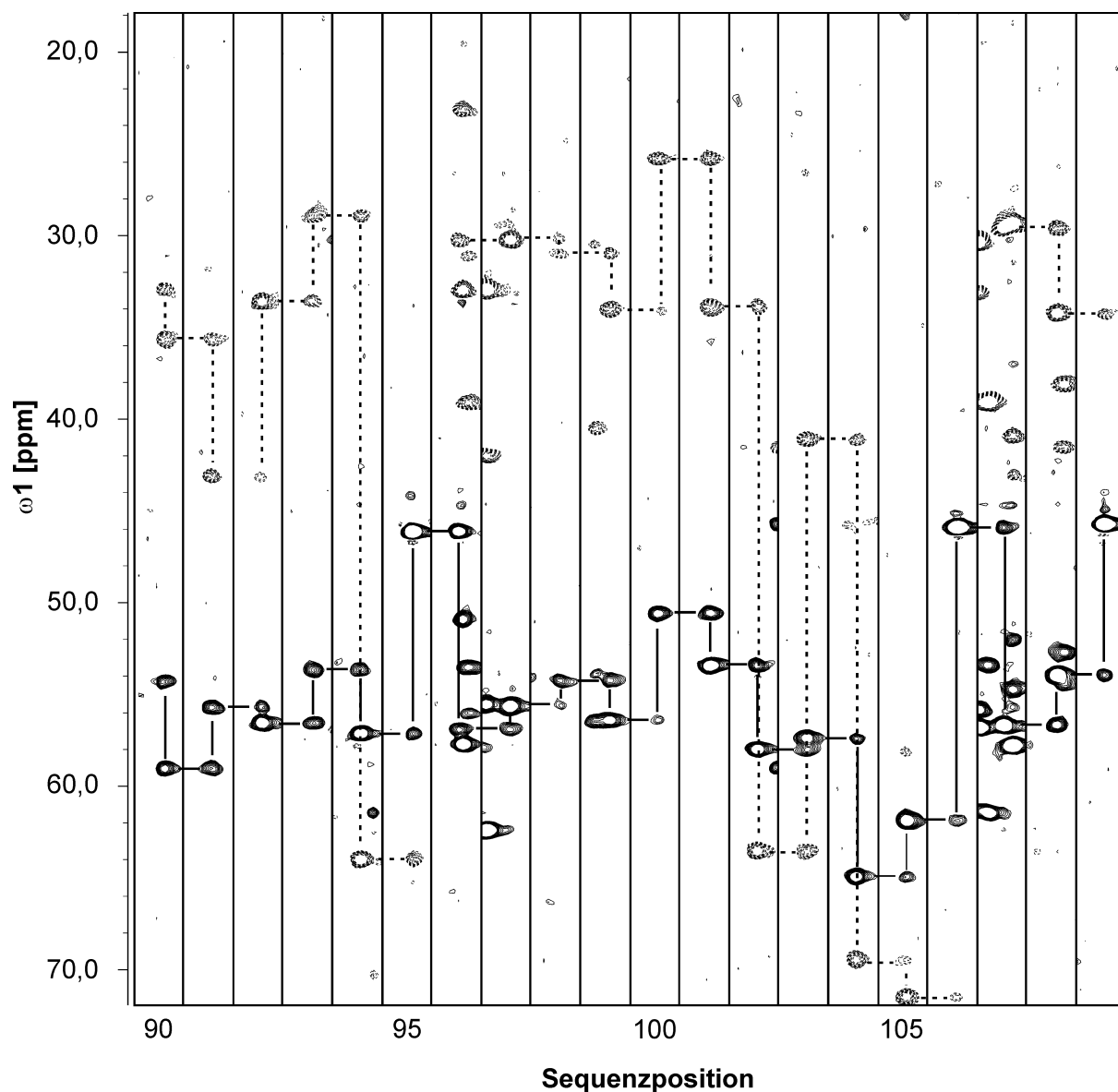


**Abb. 3.4:**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC- und  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -(ct)-HSQC-Spektrum von LckU3

Dargestellt sind die  $^{15}\text{N}$ - (A) und  $^{13}\text{C}$ - (B)-Einbindungskorrelationsspektren. Der Bereich der Aromaten-Protonen im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum (zwischen etwa 6 und 8 ppm) ist in einem gesonderten Spektrum aufgenommen worden. Die Konzentration betrug ca. 1,6 mM LckU3 Protein in 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 20 mM Na-Acetat, 150 mM NaCl, pH 6,5. Die Spektren wurden bei 298 K aufgenommen, die Protonenfrequenz des Spektrometers betrug 750 MHz.

### 3.2.3 Sequenzielle Zuordnung der Rückgratamidprotonen

Die Zuordnung der Rückgratamidprotonen wurde mit Hilfe eines HNCACB- und eines CBCA(CO)NH-Spektrums erreicht. Das HNCACB enthält die Korrelationen  $\text{H}^{\text{N}}_i/\text{N}^{\text{H}}_i \leftrightarrow \text{C}^{\alpha}_i/\text{C}^{\beta}_i$  und gleichzeitig  $\text{H}^{\text{N}}_i/\text{N}^{\text{H}}_i \leftrightarrow \text{C}^{\alpha}_{i-1}/\text{C}^{\beta}_{i-1}$ . Letztere Korrelation führt zu schwächeren Signalintensitäten und lässt sich daher zumeist so identifizieren. Für die Eindeutigkeit kann hier das CBCA(CO)NH-Spektrum sorgen, das nur die Korrelation  $\text{H}^{\text{N}}_i/\text{N}^{\text{H}}_i \leftrightarrow \text{C}^{\alpha}_{i-1}/\text{C}^{\beta}_{i-1}$  enthält und folglich mit dem HNCACB zusammen eine eindeutige Zuordnung zulässt.  $^{13}\text{C}$ (F1)- $^1\text{H}$ (F3)-Streifen aus dem HNCACB-Spektrum sind exemplarisch in Abb. 3.5 dargestellt.  $\text{C}^{\alpha}$ - und  $\text{C}^{\beta}$ -Resonanzen sind unterscheidbar durch unterschiedliche Vorzeichen, die negativen  $\text{C}^{\beta}$ -Resonanzen sind durch gestrichelte Konturlinien dargestellt.

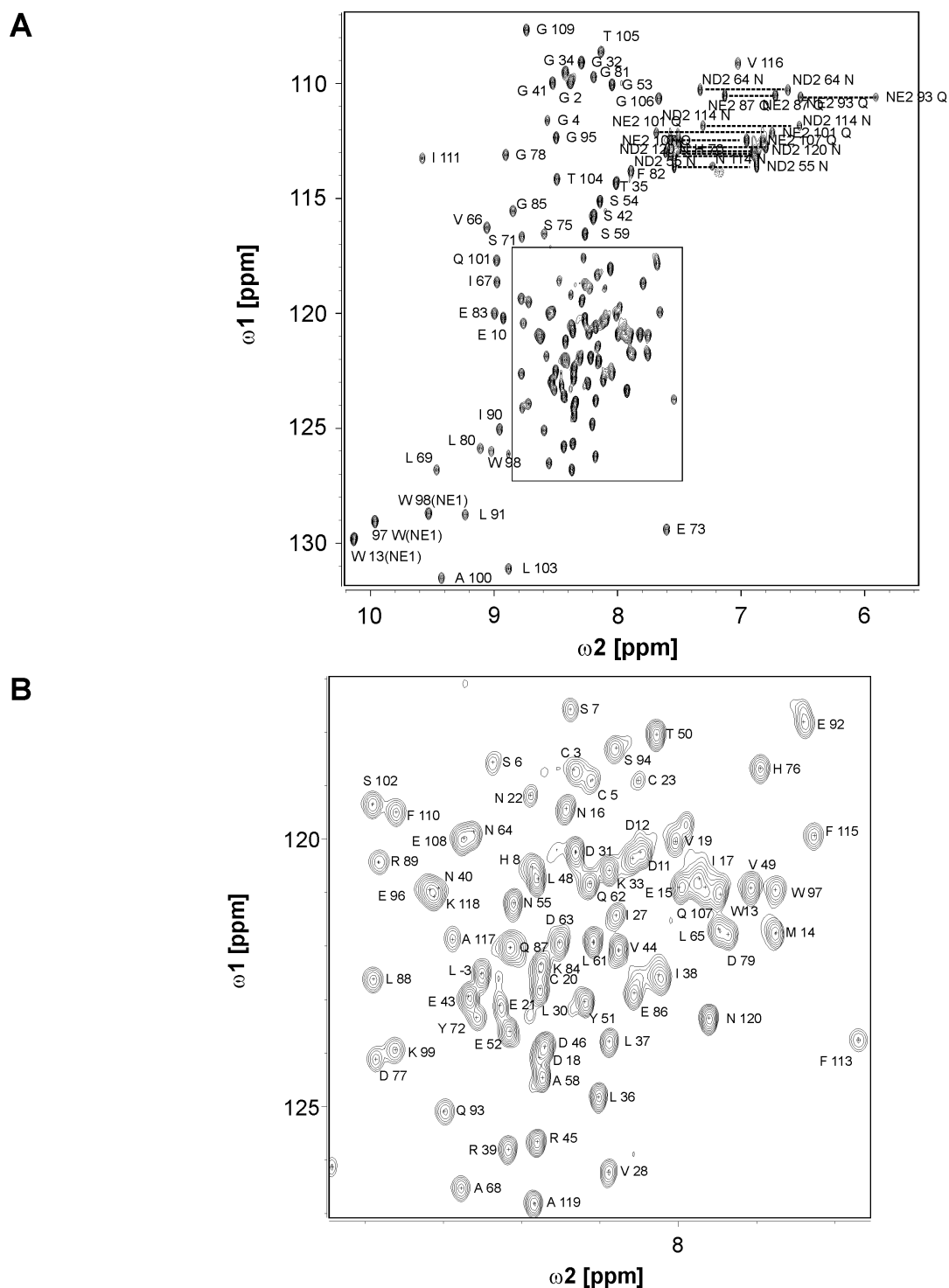


**Abb. 3.5: Sequenzielle Resonanzzuordnung mit einem HNCACB-Spektrum**

Gezeigt ist die sequenzspezifische Resonanzzuordnung des Proteinrückgrats für das Segment Ile 90 bis Gly 109 von LckU3 in einem 3D HNCACB-Spektrum.  $^{13}\text{C}(\text{F1})\text{-}^1\text{H}(\text{F3})$ -Streifen sind bei entsprechenden  $\text{N}^{\text{H}}$ - und  $\text{H}^{\text{N}}$ -chemischen Verschiebungen in den Dimensionen F2 und F3 entnommen und sequenziell angeordnet. Konnektivitäten anhand der  $\text{C}^\alpha$ - und  $\text{C}^\beta$ -chemischen Verschiebungen sind mit durchgezogenen bzw. gepunkteten Linien eingezeichnet. Die Konzentration betrug ca. 1,6 mM LckU3 Protein in 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 20 mM Na-Acetat, 150 mM NaCl, pH 6,5. Das Spektrum wurde bei 298 K aufgenommen, die Protonenfrequenz des Spektrometers betrug 750 MHz.

Für LckU3 konnten auf diesem Wege 109 von 112 möglichen (LckU3 enthält 9 Proline) Rückgratamidprotonen-Resonanzen zugeordnet werden (97,3 %). Nicht zugeordnet werden konnten die Amidresonanzen von His24, Tyr25 und Ser121, für die im  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC kein Signal gefunden werden konnte.





**Abb. 3.6:**  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von LckU3 mit zugeordneten Amidresonanzen

**A** zeigt das  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von LckU3 mit zugeordneten Amidresonanzen, **B** einen vergrößerten Ausschnitt aus **A**. Zusammengehörige Resonanzsignalepaare der Asparaginylnyl- („ND2“) und Glutaminyl-Seitenkettenamidgruppen („NE2“) sind durch gestrichelte Linien miteinander verbunden. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode gekennzeichnet **C**: Aminosäuresequenz von LckU3.

Durch die Zuordnung wurde deutlich, dass die sich überlagernden Resonanzen zum N-terminalen Teil von LckU3 gehören, der unique-Domäne (aa 1-61). Die Resonanzen der SH3-Domäne zeigten hingegen eine sehr gute Dispersion, sowohl in der  $^1\text{H}$ - als auch in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension (Abb.3.6).

### 3.2.4 Experimente zur Zuordnung der Seitenketten-Resonanzen

Die sequenzspezifische Zuordnung der  $\text{C}^\alpha$ - und  $\text{C}^\beta$ -Resonanzen konnte bereits, wie in Kap. 3.2.3 (Abb. 3.5) beschrieben, durch ein 3D-HNCACB-Spektrum erreicht werden. Die Zuordnung der aliphatischen CH-Seitenkettenpositionen erfolgte durch ein 3D H(CCO)NH-Spektrum (oder HCCH-TOCSY-NNH) (Grzesiek et al., 1993) für die Seitenketten-Protonen und ein 3D (H)C(CO)NH-Spektrum für die Seitenketten-Kohlenstoffe. Für die Eindeutigkeit der Zuordnung diente einerseits das HCCH-COSY Experiment sowie andererseits der Vergleich der erhaltenen CH-Koordinaten mit dem Vorhandensein von Signalen im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC Spektrum. Zusätzlich wurde auch ein HNHA-Experiment aufgenommen, mit dem gleichzeitig auch die  $^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ -Kopplungskonstanten bestimmt wurden. Eine Auflistung der chemischen Verschiebungen ist in der BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) hinterlegt und unter der Zugriffsnummer 4860 abrufbar (Briese et al., 2001).

Im Lauf der Zuordnung ließ sich erkennen, dass sich die unique-Domäne und die SH3-Domäne der Lck in ihren strukturellen Eigenschaften unterscheiden würden. Nahezu alle sich in den HSQC-Spektren überlagernden Signale stammten von Resten der unique-Domäne, die Resonanzen der Protonen gleicher Spinsysteme wurden im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC bei gleichen Frequenzen beobachtet. Dies ließ vermuten, dass der Anteil regulärer Sekundärstrukturelemente in der unique-Domäne nicht sehr hoch sein würde. Die Gewinnung strukturgebender Parameter durch 3D-NOESY Spektren würde darüber Aufschluss geben können.

### 3.2.5 3D-NOE Spektroskopie zur Gewinnung strukturgebender Parameter

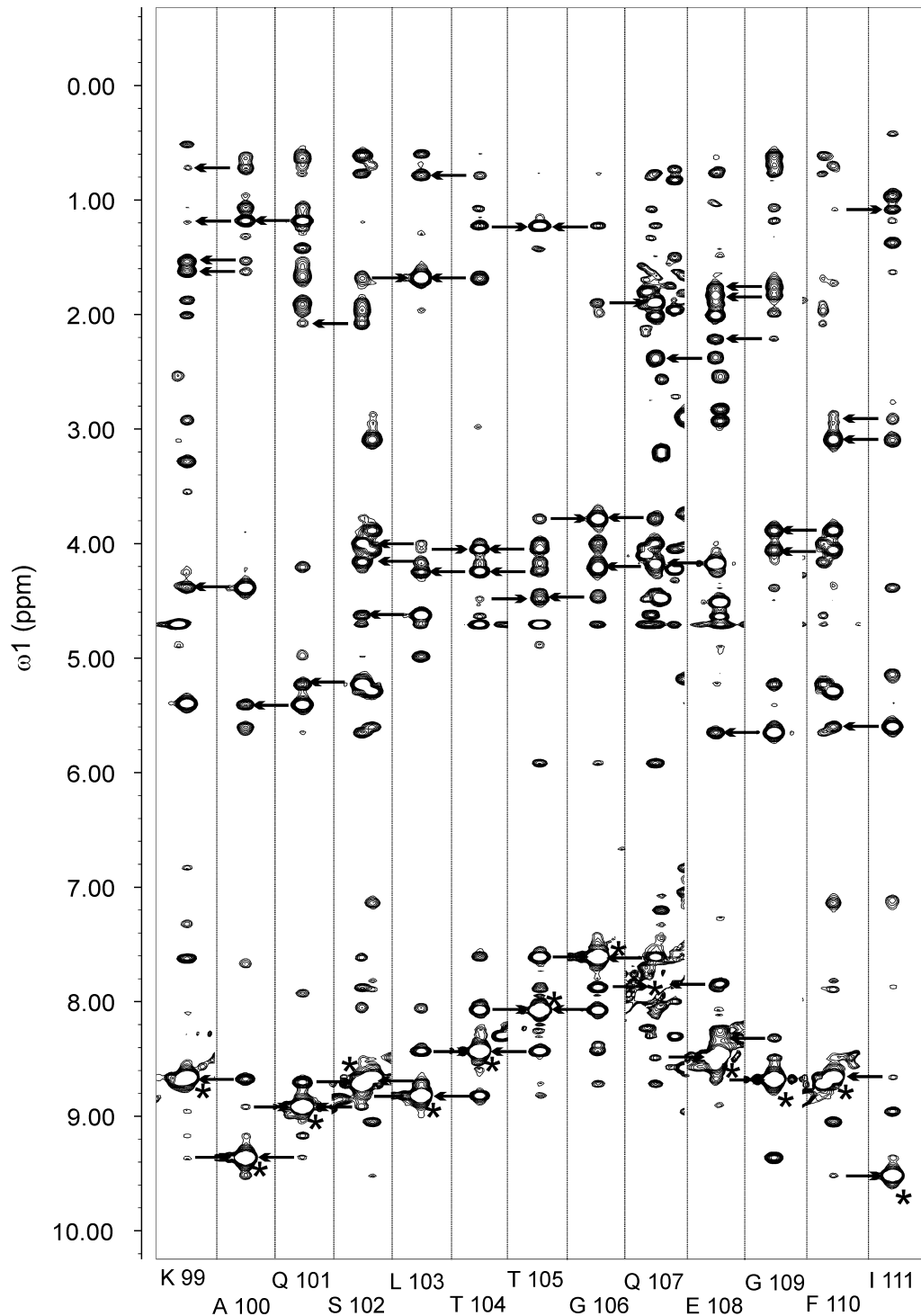
Um Informationen über inter-Proton Abstände zu gewinnen, wurden  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -editierte NOE-Spektren aufgenommen. Eine NOE-Korrelation ist dann zwischen zwei Protonen zu erwarten, wenn sie nicht mehr als etwa 5 Å voneinander entfernt sind. Die Stärke der Korrelation ist in etwa proportional zu  $r^{-6}$ , wobei  $r$  der Abstand der beteiligten Protonen ist.

Aus einem  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC mit 100 ms Mischzeit konnten nach automatischer Erfassung und anschließender manueller Durchsicht und Korrektur 1184 NOE-Kreuzsignale in eine Liste aufgenommen und soweit Eindeutigkeit gegeben war, zugeordnet werden. Noch nicht eindeutig zuzuordnende Resonanzen wurden später durch den iterativen Strukturbestimmungsprozess zugeordnet.

Abb. 3.7 zeigt eine Anordnung von  $^1\text{H}(\text{F1}),^1\text{H}(\text{F3})$ -Streifen bei den jeweiligen Amidverschiebungen von Lys99 bis Ile111. Neben den durch Pfeile gekennzeichneten sequenziellen NOEs sind noch eine nicht unerhebliche weitere Anzahl Signale zu erkennen. Dies sind NOEs zu Protonen, die bis zu fünf Reste („medium range“) oder noch weiter („long range“) entfernt liegen.

Im Bereich der unique-Domäne waren ausschließlich sequenzielle *interresiduale* oder *intraresiduale* NOEs zu erkennen (ohne Abbildung). Des Weiteren war für fast jedes Amidproton in der unique-Domäne ein sehr starker NOE bei  $\text{F1}=4,76$  ppm zu detektieren, was auf einen schnellen Austausch dieses Amidprotons mit dem Lösungsmittel hindeutete. Ein solcher Austausch war in der SH3-Domäne nur für die sich in flexiblen Loop-Regionen befindlichen Amidprotonen von Ser75 bis Gly78 und Thr104 und Thr105 erkennbar.

Die Auswertung des  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC Spektrums mit 80 ms Mischzeit zeigte schon bei der Erfassung der NOEs ein ähnliches Bild. Aufgrund der Überlagerung sehr vieler Resonanzen im  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC musste diese vollständig von Hand erfolgen. Sehr viele Signale, die zu Protonen der unique-Domäne gehörten, konnten nicht erfasst werden, da eine eindeutige Zuordnung in der F2- und/oder F3-Dimension nur selten gegeben war. Ein anderes Bild zeigte sich bei der SH3-Domäne. Die gute Dispersion der Resonanzen im  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC Spektrum vereinfachte die Erfassung der Signale im NOESY-Spektrum, eine eindeutige Zuordnung in der  $^{13}\text{C}(\text{F2}),^1\text{H}(\text{F3})$ -Dimension war bei allen Seitenketten-Protonen gegeben. Aus dem  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC wurden vorerst 2339 NOE-Kreuzsignale erfasst und soweit schon möglich, manuell zugeordnet.



**Abb. 3.7: NOE-Kreuzresonanzen in einem  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC Spektrum**

Sequenzielle Anordnung von  $^1\text{H}(\text{F}1)$ - $^1\text{H}(\text{F}3)$  Streifen eines  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC Spektrums. Diagonal Peaks sind durch (\*) gekennzeichnet, Pfeile zeigen von intraresidualen zu interresidualen NOE Kreuzresonanzen und markieren damit sequenzielle NOEs. Die Protonenfrequenz des Spektrometers betrug 750 MHz, die Temperatur 298 K, die Konzentration von LckU3 war 1,6 mM, die NOE-Mischzeit betrug 100 ms.

Bei der Auswertung der NOESY-Spektren stellte sich bald heraus, dass die unique-Domäne im Gegensatz zur SH3-Domäne vermutlich ohne Sekundärstruktur ist. Zugleich schienen sich

die beiden Domänen stark in ihren dynamischen Eigenschaften zu unterscheiden. Aus diesem Grunde sollten zum einen die  $^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ -Kopplungskonstanten bestimmt werden, um einen Hinweis darauf zu geben, ob die unique-Domäne Sekundärstruktur aufweist. Zum anderen sollten die dynamischen Eigenschaften des Proteins durch Relaxationsmessungen näher untersucht werden.

### 3.2.6 3D-HNHA-Experiment zur Bestimmung der $^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ Kopplungskonstanten

Die Größe der  $^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$  Kopplung wurde durch Intensitätsvergleich der HN- und H $\alpha$ -Kreuzresonanzen im HNHA-Spektrum erhalten (Vuister & Bax, 1993).

In Tab. 3.1. sind die Kopplungskonstanten für die Aminosäuren zusammengefasst, die eindeutig bestimmt werden konnten. Nicht aufgelistet sind Glycine (12) und Proline (9) sowie diejenigen Reste, deren H $\alpha$ - oder H<sup>N</sup>-Resonanzen mit anderen Resonanzen im Spektrum überlappten.

**Tab. 3.1:**  $^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ -Kopplungskonstanten für LckU3

Rest	$^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$	Rest	$^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$	Rest	$^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$	Rest	$^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$	Rest	$^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$	Rest	$^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$
3	6,43	27	7,65	50	7,94	68	4,20	89	8,46	103	6,29
6	6,65	28	8,12	51	7,20	69	6,58	90	7,34	104	8,19
7	6,86	31	6,84	52	6,62	71	6,22	91	9,03	105	8,29
10	6,17	35	7,29	53	7,69	73	8,23	93	8,54	108	8,21
13	5,89	37	7,29	54	7,23	75	9,11	94	7,94	111	8,84
14	6,74	38	6,77	55	7,03	76	8,33	97	7,82	114	5,46
15	6,47	42	6,99	59	6,87	77	2,30	98	8,72	115	7,54
16	7,32	43	6,50	61	6,60	80	7,89	99	7,80	116	9,17
19	7,18	44	7,69	63	6,30	83	7,24	100	9,27	117	8,00
22	6,98	45	7,16	64	7,89	86	4,79	101	9,04	119	6,38
23	6,69	49	7,57	66	9,38	88	9,04	102	5,93	120	8,01

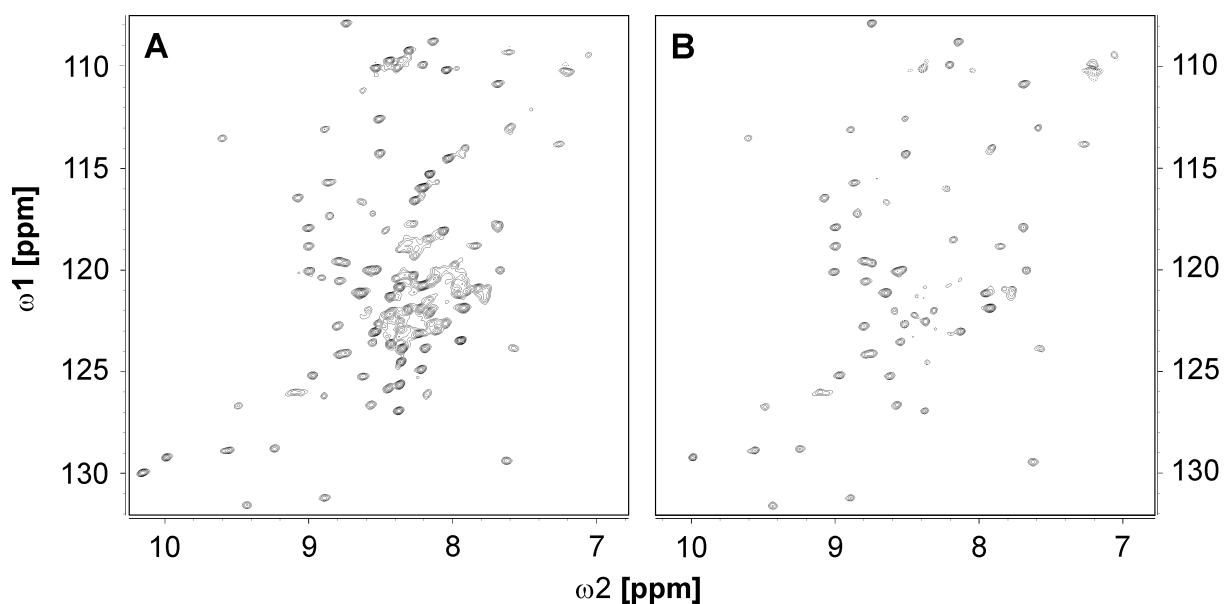
Die Kopplungskonstanten wurden aus dem HNHA-Spektrum durch Intensitätsvergleich der Resonanzen für das H<sup>N</sup>- und das H $\alpha$ -Proton erhalten (siehe Kap. 2.13.3.1). **Rest:** Aminosäureposition;  $^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ : bestimmte Kopplungskonstante in Hz.

Die Umrechnung in dihedrale Winkelbeschränkungen für Strukturrechnungen wurde wie in Kap. 2.13.3.1 beschrieben, durchgeführt. Eine Zusammenfassung dieser insgesamt 23 Winkelbeschränkungen findet sich im Anhang.

Für die unique-Domäne konnten auf diesem Wege keine strukturbestimmenden Parameter ermittelt werden.

### 3.2.7 Der heteronukleare $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -NOE

Um die flexiblen Bereiche von LckU3 zu bestimmen, wurde der heteronukleare  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -NOE gemessen (Kap. 2.13.3.2). Abb. 3.8 zeigt die  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -NOE-Spektren ohne (A) und mit (B) vorangehender 3 s dauernder Sättigung der Amidprotonen. Deutlich ist zu erkennen, dass viele Signale in B nicht mehr sichtbar oder sogar negativ sind. Amidprotonen mit solchen Eigenschaften deuten auf eine hohe interne Dynamik der entsprechenden Aminosäure hin.

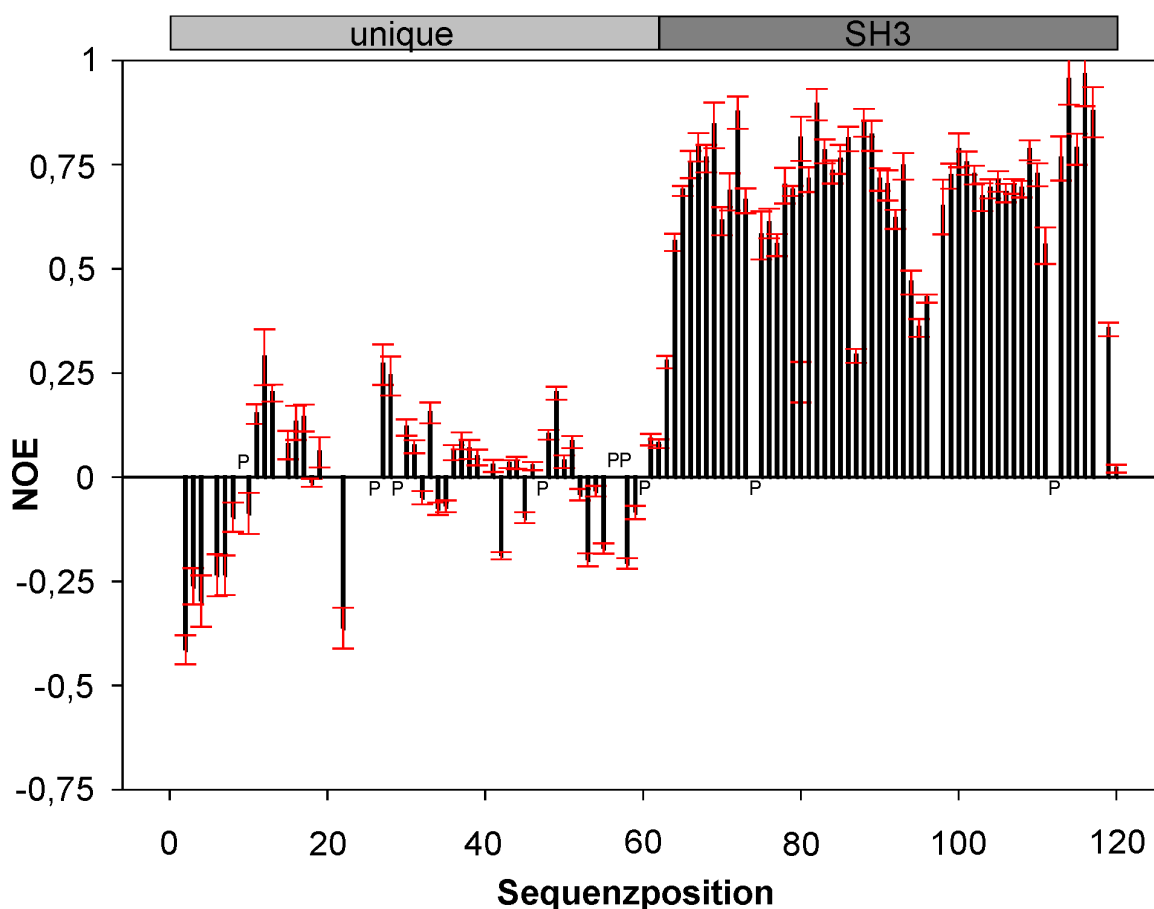


**Abb. 3.8:**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  NOE-Spektren von LckU3

Dargestellt sind die  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  NOE-Spektren von LckU3 ohne (A) und mit (B) vorheriger 3 s dauernder Sättigung der Amidprotonen. Fehlende oder negative (gestrichelt dargestellte) Resonanzen der Amidprotonen deuten auf einen hohen Grad interner Dynamik dieser Aminosäuren hin.

Der  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -NOE berechnet sich aus dem Verhältnis der Kreuzresonanzen der  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  NOE-Spektren mit und ohne vorherige Sättigung der Amidprotonen und ist in Abb. 3.9 als Funktion der Sequenz dargestellt. Aufgrund von Überlagerungen in den  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -NOE Spektren war der Hetero-NOE für die Reste Met14, Asn40, Trp97 und Lys 118 nicht eindeutig bestimmbar.

Im Bereich der unique-Domäne ist der heteronukleare NOE stetig  $<0,3$ . Im Bereich der SH3-Domäne hingegen bleibt ab Leu65 der NOE konstant  $>0,6$ . Lediglich bei Ser75, Asp77, Leu80, Gln87 und Ser94-Glu96 wird dieser etwas schwächer, bleibt aber durchgehend positiv. Dieses dynamische Verhalten der unique-Domäne bestätigt das Fehlen stabilisierender Sekundärstruktur. In der SH3-Domäne ließen sich auf diesem Wege einige Bereiche mit erhöhter interner Dynamik feststellen, die nach der Strukturbestimmung (Kap. 3.3) etwas labileren Loop-Regionen zuzuordnen waren.



**Abb. 3.9:** Der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -Hetero-NOE von LckU3 als Funktion der Sequenz

Der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -Hetero-NOE wurde bestimmt durch das Verhältnis der Intensitäten der Kreuzresonanzen mit und ohne 3 s dauernde Sättigung der Amidprotonen in den  $^1\text{H},^{15}\text{N}$  NOE-Spektren. Die Positionen von Prolinen in der Primärsequenz sind durch ein **P** gekennzeichnet, die Lage der unique- und SH3-Domäne sind durch einen Balken angedeutet.

### 3.3 Die dreidimensionale Struktur von LckU3

Wie in den vorangehenden Kapiteln gezeigt wurde, konnten keine Anzeichen gefunden werden, dass die unique-Domäne der Lck Sekundärstruktur enthält. Sowohl fehlende Abstandseinschränkungen aus den NOESY-Spektren, fehlende Beschränkungen dihedraler Winkel als auch die erhöhte Dynamik, die aus dem Hetero-NOE Experiment und Relaxationsmessungen (Daten nicht gezeigt) abzuleiten war, ließen erkennen, dass nur die SH3-Domäne eine definierte Struktur ausbildet. Die Strukturbestimmung wurde daher in der späteren Refinement-Phase nur mit den die SH3-Domäne betreffenden Daten durchgeführt.

Zu Beginn des Strukturbestimmungsprozesses wurde das Programmpaket ARIA (**ambig**ious **re**straints for **i**terative **a**ssignment) genutzt (Linge et al., 2001) (Kap. 2.14).

Daher wurden aus den NOESY-Spektren auch Abstandsbeschränkungen aus *intramolekularen* NOEs hinzugezogen, da diese von Nutzen sind bei der Kalibrierung der NOEs. Aus dem  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC wurden 2145 und aus dem  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC 840 NOEs als Ausgangsdatensatz in die Strukturrechnung eingesetzt. In diesem Datensatz waren bereits 1957 bzw. 807 NOEs manuell zugeordnet worden. Da die Programmroutinen von ARIA selbsttätig Diagonalpeaks und aus mehreren Spektrensätzen doppelt vorkommende Beschränkungen herausfiltern, war eine vorherige Filterung der NOE-Listen nicht notwendig. Zusätzlich zu den NOE-Daten wurden 23 Beschränkungen dihedraler Winkel aus der Bestimmung der  $^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\text{N}}$  Kopplungskonstanten in die Strukturrechnung eingebracht. Das Refinement am Ende des Strukturbestimmungsprozesses wurde mit dem Programmpaket CNS durchgeführt (Kap. 2.14). Ohne die die unique-Domäne betreffenden Daten blieben 1817 struktureinschränkende Parameter aufgrund von NOE-Daten (Tab 3.2). Die vollständigen Datensätze finden sich im Anhang.

**Tab. 3.2:** Experimentelle Parameter für die Strukturrechnung von LckU3

<b>Herkunft der Daten</b>	<b>Anzahl</b>
<b>NOEs: gesamt</b>	1817
intraresidual	635
sequenziell	357
medium range ( $i-j \leq 5$ )	215
long range ( $i-j > 5$ )	610
<b>Dihedrale Winkel (<math>\Phi</math>)</b>	23



Es wurden 150 Strukturen gerechnet und die 25 energieärmsten für die weitere Analyse verwendet. Diese 25 Strukturen, deren NOE-Verletzungen alle kleiner als 0,2 Å waren, wurden in der Protein Data Bank (PDB)(<http://www.rcsb.pdb.edu>) unter 1KIK hinterlegt.

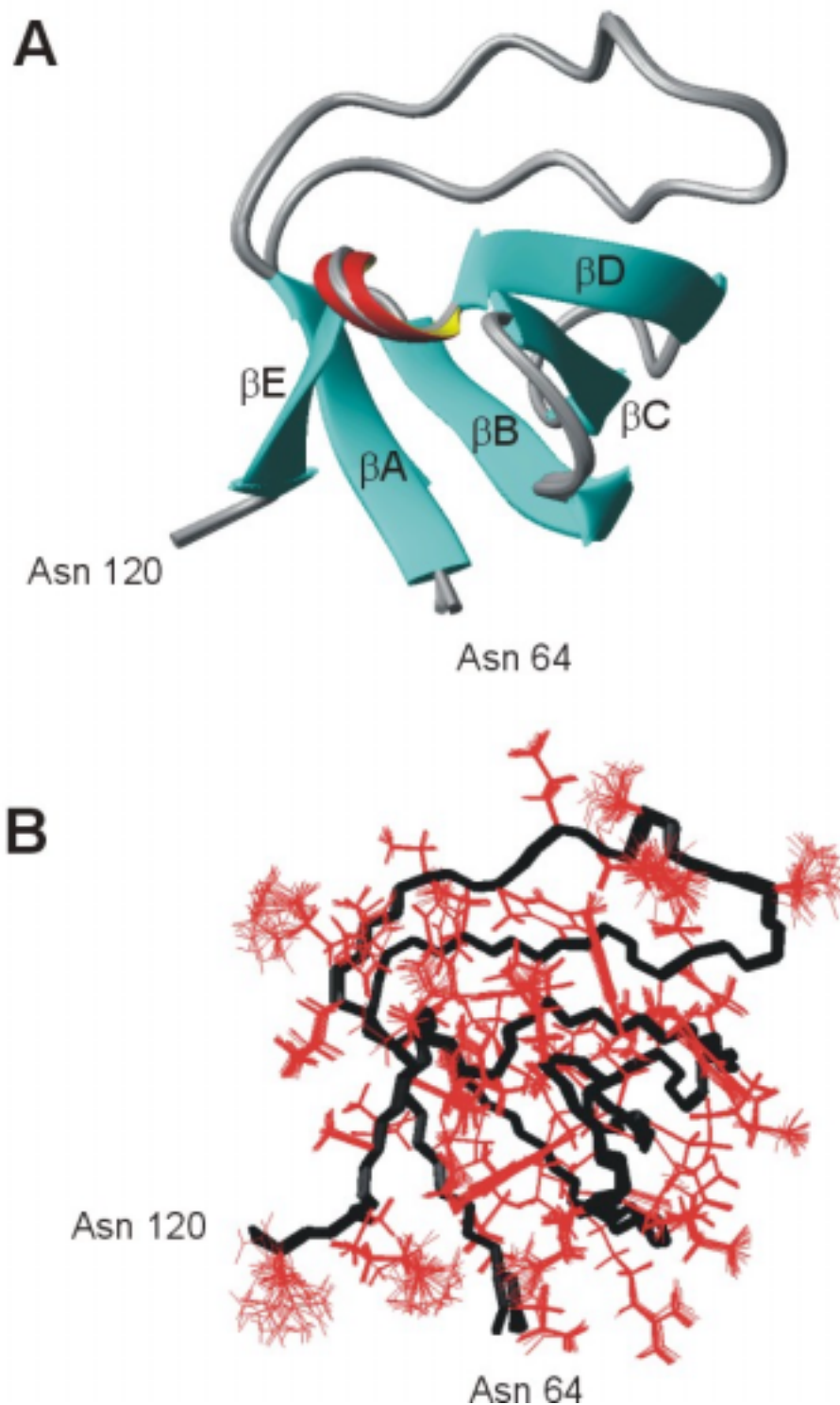
Eine Zusammenfassung wichtiger Parameter aus den Strukturrechnungen finden sich in Tab. 3.3.

**Tab. 3.3:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Strukturrechnungen von LckU3

<b>Durchschnittliche Energien</b>	<b>Energie [kcal/mol]</b>
$E_{\text{tot}}$	234,7 ( $\pm$ 1,13)
$E_{\text{Bindung}}$	17,34 ( $\pm$ 0,27)
$E_{\text{Winkel}}$	88,15 ( $\pm$ 0,79)
$E_{\text{improper}}$	10,91 ( $\pm$ 0,53)
$E_{\text{repel}}$	56,01 ( $\pm$ 0,92)
$E_{\text{NOE}}$	62,26 ( $\pm$ 0,88)
<b>Standardabweichungen von idealen Abständen</b>	<b>RMSD [Å]</b>
NOE	0,0212
Bindungslängen	0,0031
<b>Standardabweichungen von idealen Winkeln</b>	<b>RMSD [Grad]</b>
Bindungswinkel	0,4183
Improper Winkel	0,2721
<b>RMSD-Werte der 25 Strukturen untereinander</b>	<b>RMSD [Å]</b>
Proteinrückgrat (Asn64-Asn120)	0,16 $\pm$ 0,04
alle schweren Atome (Asn64-Asn120)	0,67 $\pm$ 0,09

Alle Werte sind Mittelwerte über die 25 energieärmsten Strukturen. Die Standardabweichungen von diesen Mittelwerten sind in Klammern angegeben.

Um einen Eindruck von der Güte der berechneten Strukturen zu erhalten, ist in Abb. 3.10 eine Überlagerung der 25 energieärmsten Strukturen dargestellt. Da die unique-Domäne unstrukturiert ist, ist sie aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

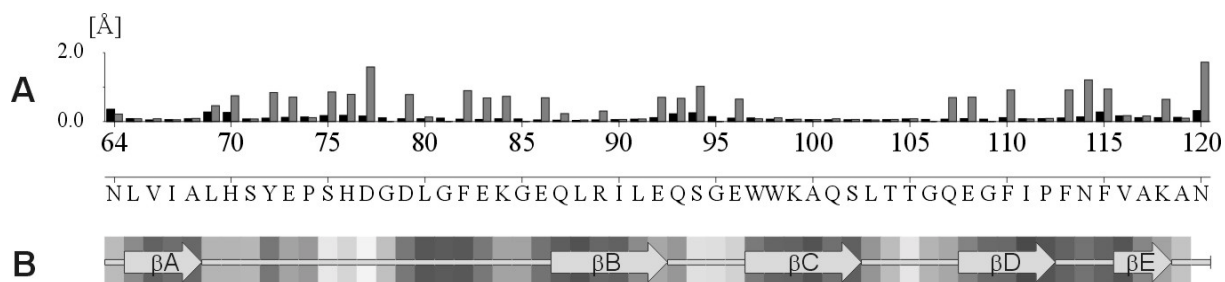


### Abb. 3.10: Die Struktur der Lck SH3-Domäne in Lösung

Gezeigt ist die Überlagerung der 25 energieärmsten Strukturen. In **A** ist eine sog. „ribbon“-Darstellung gewählt.  $\beta$ -Faltblätter sind in cyan dargestellt,  $3_{10}$ -helikale Bereiche in rot. In **B** sind das Proteinrückgrat in schwarz und die Seitenketten in rot dargestellt. Die endständigen Aminosäuren und die Faltblätter sind bezeichnet.

Deutlich ist zu erkennen, dass die Strukturen sehr gut definiert sind. Nur nach außen zeigende Seitenketten zeigen eine leichte Varianz (Abb. 3.10, **B**). Durch den niedrigen Rückgrat-rmsd Wert von  $0,16 \text{ \AA}$  erscheint das Proteinrückgrat in der Überlagerung als eine einzige Struktur (siehe auch Abb. 3.11, **A**).

Die Analyse der Struktur offenbart das Vorhandensein von fünf Strängen antiparalleler  $\beta$ -Faltblätter (Leu65 bis Ala68,  $\beta$ A; Gln87 bis Glu92,  $\beta$ B; Trp92 bis Ser102,  $\beta$ C; Glu108 bis Pro112,  $\beta$ D und Val116 bis Lys118,  $\beta$ E; Abb. 3.11, **B**). Bei zwei der 25 Strukturen ergab sich zusätzlich eine Windung einer  $3_{10}$ -Helix von Phe113 bis Phe115. Die Faltblattstränge  $\beta$ A und  $\beta$ B sind durch den RT-Loop (Leu69 bis Gly85) miteinander verbunden. Dieser lange Loop-Bereich zeichnet sich durch das Fehlen regulärer Sekundärstruktur aus und ist damit denen in anderen SH3-Domänen beobachteten sehr ähnlich (Larson & Davidson, 2000). Die Loop-Bereiche, die zwischen den Faltblattsträngen  $\beta$ B und  $\beta$ C bzw.  $\beta$ C und  $\beta$ D liegen, werden als n-src und distaler Loop bezeichnet. Wie die Bestimmung des heteronuklearen  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -NOE gezeigt hat (Kap. 3.2.7), ist insbesondere der n-src Loop durch erhöhte Dynamik gekennzeichnet.



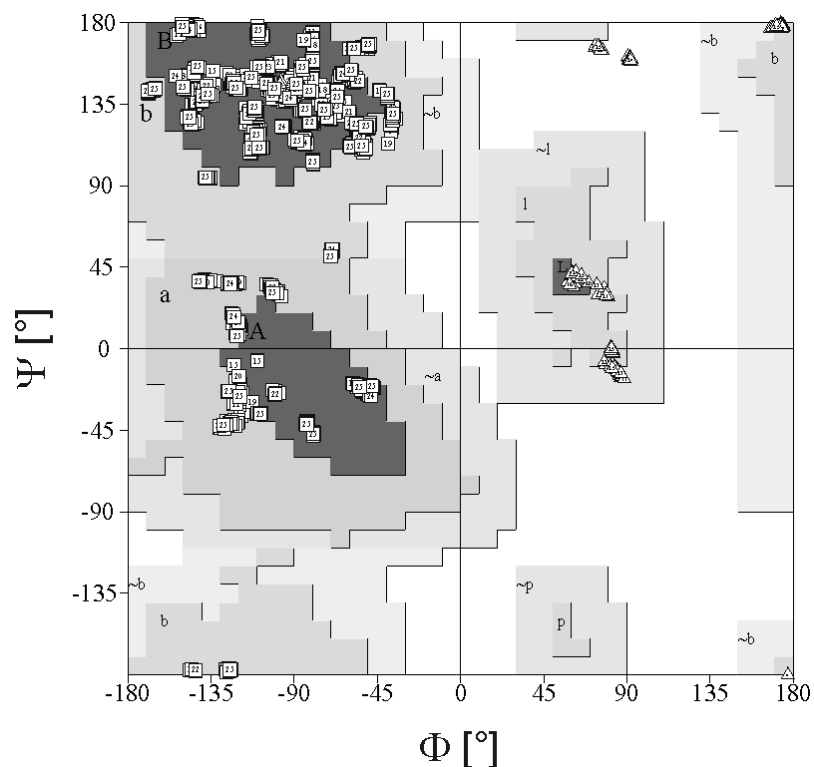
**Abb. 3.11: Abweichung von mittleren Koordinaten, Sekundärstrukturelemente und Lösungsmittel-Zugänglichkeit**

In **A** ist die mittlere Abweichung von den mittleren Koordinaten der 25 energieärmsten Strukturen pro Rest dargestellt. Schwarze Balken kennzeichnen das Proteinrückgrat, graue Balken die Seitenketten. In **B** kennzeichnen Pfeile  $\beta$ -Faltblattbereiche. Graue Balken zeigen die Lösungsmittelzugänglichkeit pro Rest an. Je heller der Balken, desto zugänglicher ist der Rest.

Insgesamt betrachtet ist die Lösungsstruktur des SH3-Teils der Lck kaum unterschiedlich zur Kristallstruktur des SH3-Teils des SH3-SH2-Domänenpaares der Lck (Eck et al., 1994). Dies wird auch deutlich durch einen rmsd-Wert von  $1,05 \text{ \AA}$  zwischen den Rückgrat-Atomen, wie er für die Reste 64 bis 120 zwischen der mittleren LckU3 Struktur und der Kristallstruktur berechnet wurde ( $0,72 \text{ \AA}$  für die Reste 64-118).

### 3.3.1 Analyse der Torsionswinkel

Zur Analyse der Torsionswinkel wurde das Programm PROCHECK-NMR (Laskowski et al., 1996) verwendet. Die resultierenden  $\Phi/\Psi$ -Winkelpaare sind in Abb. 3.12 als Ramachandran-Plot dargestellt. Demnach nehmen 70,9 % der Aminosäuren eine Position in den bevorzugten Bereichen des Ramachandran-Plots ein, und 29,1 % liegen in den erlaubten Bereichen. Keine Aminosäure kommt in den zusätzlich oder großzügig erlaubten Bereichen zu liegen. Eine genauere Analyse zeigt, dass hauptsächlich Reste in Loop-Regionen (z.B. Pro74, Ser75 oder Gln93) und Aminosäuren im C-terminalen Teil (Lys118, Ala119) nicht in den bevorzugten Regionen liegen.



**Abb. 3.12: Ramachandran-Plot für die Aminosäuren Asn64 bis Asn120 der 25 energieärmsten Strukturen der Lck SH3-Domäne**

Die dunkelgrauen Flächen geben die Core-Region der erlaubten Bereiche an (A, B, L), die grauen stellen die zusätzlich erlaubten (a, b, l, p), die hellgrauen die großzügig erlaubten ( $\sim$ a,  $\sim$ b,  $\sim$ l,  $\sim$ p) und die weißen die nicht erlaubten Bereiche dar. Für alle Strukturen sind die  $\Phi/\Psi$ -Winkelpaare der einzelnen Aminosäuren als nummerierte Kästchen eingezeichnet (Gly als Dreieck), wobei die Zahl in den Kästchen die jeweilige Struktur kennzeichnet.

### 3.4 NMR-Titrationsexperimente mit LckU3

Während der Arbeiten zur Lösung der dreidimensionalen Struktur von LckU3 war auch die Zuordnung der Amidresonanzen im  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC erfolgt. Somit konnten nun Titrationsexperimente mit potentiellen Bindungspartnern an LckU3 bei gleichzeitiger Erkennung der Bindungsregion durchgeführt werden. Zunächst sollten Liganden, die an die SH3-Domäne binden, näher betrachtet werden. Da es nicht genau bekannt ist, welche Rolle der unique-Domäne im Prozess der Signalerkennung und Signalweiterleitung durch die Lck zuteil wird, sollte ein besonderes Augenmerk darauf gelenkt werden, ob auch Reste der unique-Domäne bei der Bindung eines Liganden an die SH3-Domäne beteiligt sind bzw. beeinflusst werden.

#### 3.4.1 Liganden, die an die SH3-Domäne binden

SH3-Domänen binden spezifisch Prolin-reiche Sequenzen von ca. 10 Aminosäuren Länge. Das Konsensus-Bindungsmotiv ist hierbei X-P-p-X-P, wobei die Prolin Reste P invariant, p oft ein Prolin und X häufig ein aliphatischer Rest sind (Krauss, 1997). Der Pro-reiche Abschnitt des bindenden Liganden an die SH3-Domäne liegt dabei in Form einer linksgängigen Poly-Prolin-Helix vom Typ II vor. Die dreidimensionalen Strukturen der SH3-Domäne der Lck (Eck et al., 1994; Hiroaki et al., 1996), diese Arbeit) und anderer Src-Typ Tyrosin-Kinasen (Sicheri & Kuriyan, 1997) sind gelöst und sich untereinander sehr ähnlich. Beispielhaft ist in Abb. 3.13 noch einmal die Anordnung der Sekundärstrukturelemente der SH3-Domäne von Lck dargestellt.



**Abb. 3.13: Sekundärstrukturelemente der Lck-SH3 Domäne**

Zuordnung von Sekundärstrukturelementen der SH3-Domäne von Lck.  $\beta$ -Faltblätter sind als Pfeil dargestellt.

Bei der Auswahl eines geeigneten Modellpeptides für die Bindung an die SH3-Domäne der Lck wurde auf das Phagendisplay zurückgegriffen. Diese Methode ist in der Arbeitsgruppe

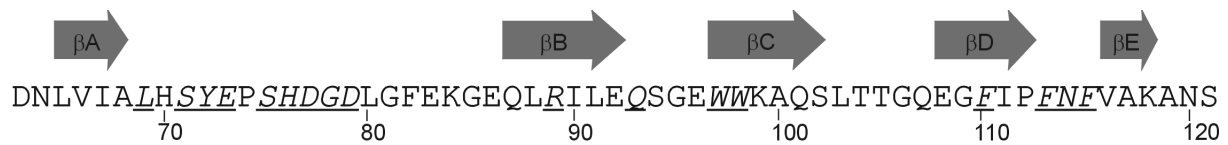
etabliert, und auf diesem Wege ist es möglich, die Sequenz eines Peptides zu erhalten, welches in idealem Maße an LckSH3 binden sollte.

### 3.4.1.1 Bindung eines mittels Phagendisplay selektierten Peptids

Mit Hilfe der Phagendisplay-Technologie ist es möglich, Peptide zu selektieren, welche z.B. spezifisch mit einem Protein, DNA oder einem Antikörper interagieren. Bestimmte Bakteriophagen exprimieren an ihrer Oberfläche Proteine, die gewisse Veränderungen, z.B. zusätzliche Segmente in bestimmten Sequenzbereichen, tolerieren. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden gelingt es, diese Bereiche gezielt zu manipulieren. Es ist nun möglich, auf diesem Wege randomisierte Peptidbibliotheken zu exprimieren, die z.B. zur Auffindung von Bindungsmotiven dienen können. Phagen, die ein Peptid auf ihrer Oberfläche präsentieren, welches z.B. an ein Protein bindet, können selektiert und anschließend gezielt vermehrt werden. Somit ist mit diesem System nicht nur die gezielte Selektion einer Eigenschaft möglich, sondern gleichzeitig auch ihre Anreicherung. Nach drei bis vier Selektionsrunden wird die Phagen-DNA analysiert, und man erhält die Sequenzen von Peptiden, welche an das Molekül, gegen das selektiert wurde, binden.

In der Arbeitsgruppe wurde eine Selektion von Phagen gegen die SH3-Domäne der Lck durchgeführt. Nach vier Selektionsrunden und Analyse der erhaltenen Sequenzen wurde ein Peptid mit der Aminosäuresequenz HVTFPQHPPRTV ausgewählt.

Die Titration wurde an einer  $97 \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -LckU3 Probe mit einer  $2,84 \text{ mM}$  Lösung des synthetisierten Peptides durchgeführt, dabei wurden vier Titrationsschritte aufgezeichnet. Die  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren vor Beginn und am Ende der Titration sind in Abb. 3.15 gezeigt. Die Amidresonanzen der Reste, die durch die Bindung des Peptides an LckU3 beeinflusst wurden, sind in der Abb. 3.14 zusammengefasst. Gleichzeitig sind diese Reste in einer Darstellung des Protein-Rückgrats in Abb. 3.15 rot eingefärbt.



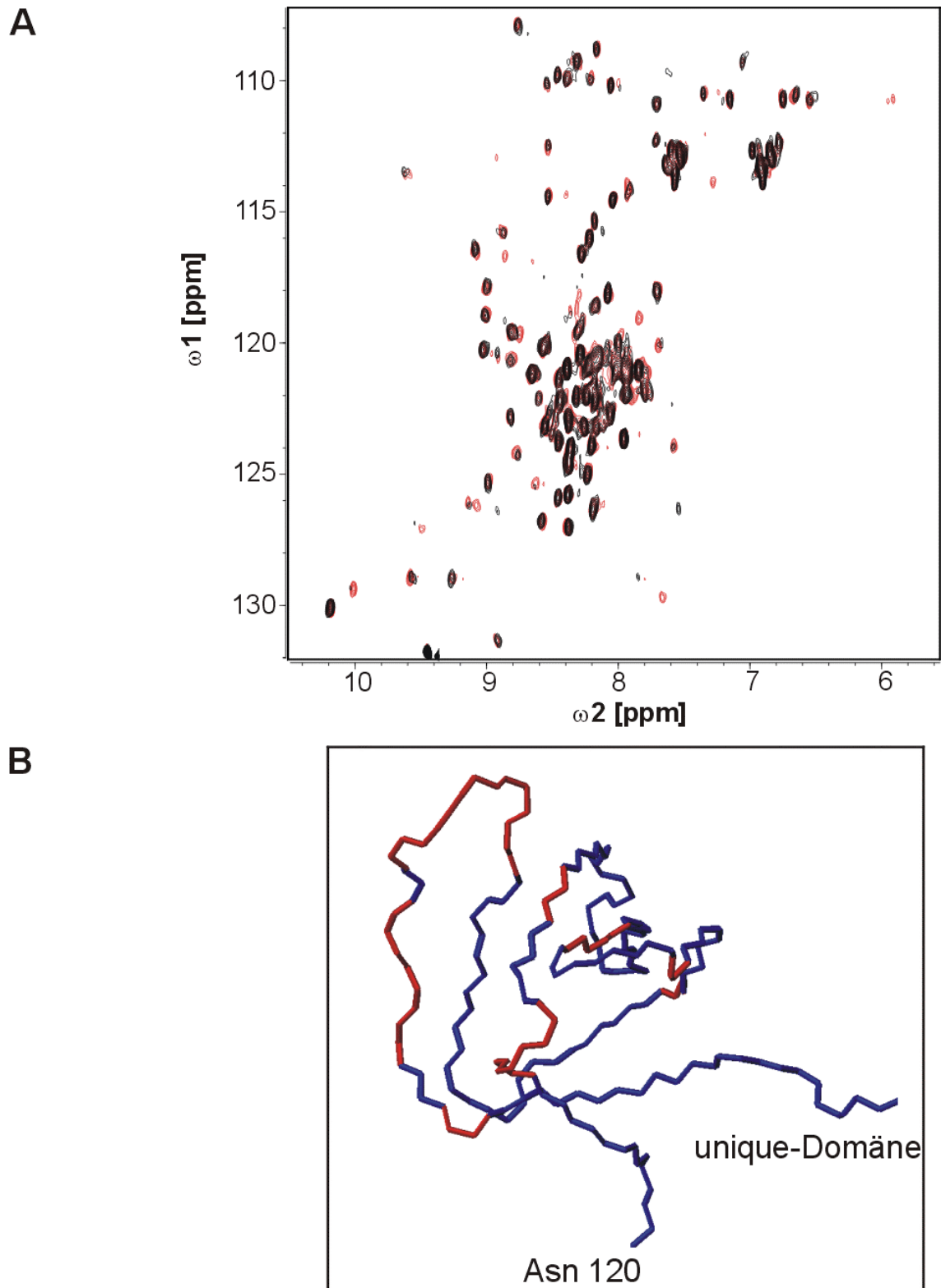
**Abb. 3.14:** Durch die Bindung des PxxP<sub>(SH3)</sub>-Peptides beeinflusste Reste in LckU3

Unterstrichen und kursiv dargestellt sind diejenigen Reste von LckSH3, deren Amidresonanzen im <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum durch die Titration mit dem PxxP<sub>(SH3)</sub>-Peptid Veränderungen unterworfen waren.  $\beta$ -Faltblätter sind als Pfeil dargestellt.

Die Auswertung der Spektren ließ erkennen, dass die Resonanzen der unique-Domäne durch die Bindung des Peptides nicht beeinflusst wurden. Beteiligt sind im Besonderen der sehr flexible RT-Loop der SH3-Domäne (Leu69 bis Gly85), drei kurze Abschnitte der Faltblattstränge  $\beta$ B,  $\beta$ C und  $\beta$ D und der kurze Abschnitt der <sub>10</sub>3-Helix (Phe113 bis Phe115). Damit verteilen sich die Bindungsstellen über die gesamte SH3-Domäne hinweg, nur kurze Abschnitte an den Termini sind an der eigentlichen Bindung nicht beteiligt.

Die Bindung des selektierten Peptids ist damit sehr ähnlich zum Mechanismus, den man aus Bindungsstudien von Poly-Prolin-Peptiden an SH3-Domänen anderer Src-Typ Tyrosin-Kinasen kennt (Larson & Davidson, 2000).

Mit diesen Ergebnissen konnte zum ersten Mal direkt mit NMR-spektroskopischen Methoden die Bindung eines mittels Phagendisplay selektierten Peptids an die SH3-Domäne der Lck nachgewiesen werden.



**Abb. 3.15: Titration von  $^{15}\text{N}$ -LckU3 mit selektiertem PxxP<sub>(SH3)</sub>-Peptid**

In **A** dargestellt sind die  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren am Anfang (rote Konturlinien) und Ende (schwarze Konturlinien) einer Titrationsreihe von  $^{15}\text{N}$ -LckU3 mit dem gegen die SH3-Domäne selektierten Peptid (Molares Verhältnis LckU3:Peptid=1:2). In **B** sind die Bindungen zwischen den Rückgratatomern der Reste von LckSH3 (Eck et al., 1994), die durch die Bindung des Peptides beeinflusst werden, rot eingefärbt. Die Protonenfrequenz des Spektrometers betrug 600 MHz, die Temperatur 298 K, die Startkonzentration von LckU3 war 97  $\mu\text{M}$ .



### 3.4.1.2 Bindung von HIV-1 Nef

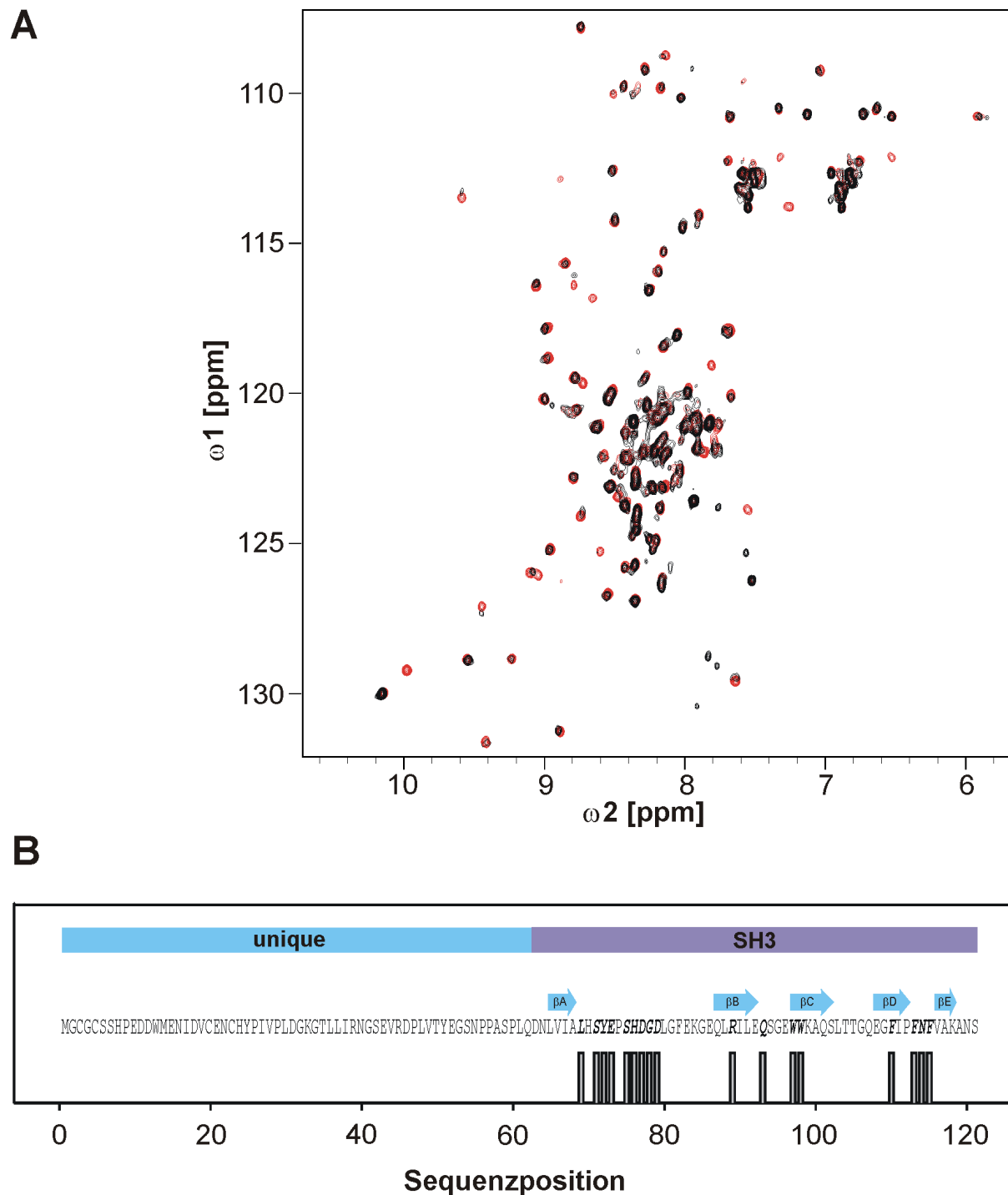
Dem Nef-Protein des Humanen Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) werden mindesten zwei distinkte Funktionen zugeschrieben. Es bewirkt zum einen eine Steigerung der viralen Replikationsrate und sorgt zweitens als schon im Virus vorhandene Komponente gleich nach der Infektion der Zelle für einen Abbau des Primärrezeptors CD4 von der Zelloberfläche (Goldsmith et al., 1995). Für Nef sind vielfältige Interaktionen mit zellulären Proteinen beschrieben. Neben der Interaktion mit CD4 soll es unter anderem verschiedenste Effekte auf zelluläre Signaltransduktionswege haben. Dabei kann Nef sowohl als ein Kinase-Substrat dienen als auch ein Modulator für Kinase-Aktivität sein (Baur et al., 1997; Greenway et al., 1996). Nef kann auch mit SH3-Domänen interagieren. Dafür besitzt es N-terminal eine Poly-Prolin-Helix vom Typ II. Dieses PxxP-Motiv ist essentiell für die Steigerung der viralen Infektiosität durch Nef (Saksela et al., 1995). Eine Bindung an die SH3-Domäne der Lck ist ebenfalls beschrieben (Arold et al., 1998), und es liegt nahe zu vermuten, dass unter anderem genau diese Interaktion einen nicht unerheblichen Anteil daran hat, dass Nef entscheidend in Signaltransduktionswege der Zelle eingreifen kann.

Wie in der Einleitung bereits gezeigt wurde, interagieren Teile der unique-Domäne der Lck mit dem cytoplasmatischen Teil des CD4-Rezeptors. Genauere Untersuchungen hierzu werden später noch in dieser Arbeit beschrieben. HIV-1 Nef bindet ebenfalls an CD4 und bewirkt dadurch mit anderen Komponenten den Abbau dieses Rezeptors von der Oberfläche. Nef kann nun aber ebenso mit der SH3-Domäne der Lck interagieren. Es wäre nicht verwunderlich, wenn Nef gleichzeitig mit LckSH3 und CD4 interagiert, während die Lck über die unique-Domäne mit CD4 verknüpft ist. Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Reste von LckU3 an einer Bindung von HIV-1 Nef beteiligt sind. Wenn die unique-Domäne von Lck keinen Anteil an der Interaktion nimmt, könnte sie weiterhin für eine Bindung an CD4 zur Verfügung stehen, was eine Voraussetzung für die Existenz eines ternären Komplexes von Lck, CD4 und Nef wäre. Hierüber bestehen in der Literatur unterschiedliche Auffassungen (Salghetti et al., 1995; Gratton et al., 1996).

Zur Bestimmung der Reste von LckU3, die mit HIV-1 Nef wechselwirken, wurden wiederum NMR-Titrationsexperimente durchgeführt. Die Expression und Reinigung des vollständigen HIV-1 Nef-Proteins wird später in dieser Arbeit beschrieben (Kap. 3.6).

Die Titration wurde an einer  $192 \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -LckU3 Probe mit einer  $370 \mu\text{M}$  Nef-Lösung durchgeführt. Dabei wurden sechs Titrationschritte aufgezeichnet. Die  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren vor Beginn und am Ende der Titration sind in Abb. 3.16, A gezeigt. Die Amid-

resonanzen der Reste, die durch die Bindung des Peptides an LckU3 beeinflusst werden, sind in der Abb. 3.16, **B** dargestellt.



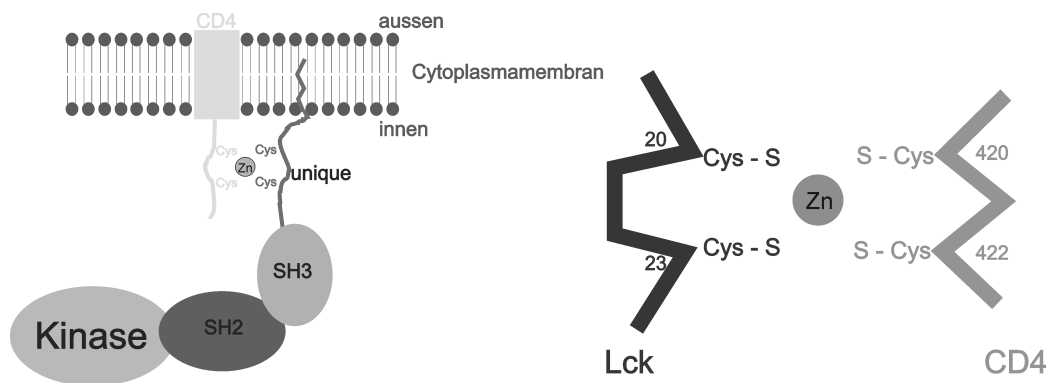
**Abb. 3.16: Titration von  $^{15}\text{N}$ -LckU3 mit HIV-1 Nef**

Dargestellt sind in **A** die  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren am Anfang (rote Konturlinien) und Ende (schwarze Konturlinien) einer Titrationsreihe von  $^{15}\text{N}$ -LckU3 mit HIV-1 Nef. (Molares Verhältnis LckU3:Nef=1:1,5). In **B** sind die Sequenzpositionen von LckU3 markiert, die durch die Bindung von HIV-1 Nef beeinflusst werden. Die Lage der unique- und SH3-Domäne sind durch einen Balken angedeutet. Die Protonenfrequenz des Spektrometers betrug 600 MHz, die Temperatur 298 K, die Startkonzentration von LckU3 war 192  $\mu\text{M}$ .

Es ist deutlich zu erkennen, dass nur Reste der SH3-Domäne von LckU3 an der Bindung zu HIV-1 Nef beteiligt sind. Des Weiteren sind es genau die gleichen Reste, die bei der Bindung des gegen die SH3-Domäne selektierten Peptides beeinflusst wurden (Kap. 3.4.1.1). Es ist davon auszugehen, dass nur die Poly-Prolin-Helix vom Typ II von HIV-1 Nef mit LckU3 interagiert und keine weiteren Reste von Nef oder LckU3 an einer Bindung beteiligt sind. Damit wäre eine gleichzeitige Bindung von CD4 an die unique-Domäne und Nef im Prinzip möglich. Untersuchungen zur Bindung von CD4 an die unique-Domäne von Lck sollten klären können, ob sich ein ternärer Komplex prinzipiell ausbilden könnte.

### **3.4.2 Liganden, die an die unique-Domäne binden**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die Funktion der unique-Domäne von src-Typ Tyrosin-Kinasen weitestgehend unbekannt, für die Lck allerdings sind einige Funktionen beschrieben. Die unique-Domäne verankert zum einen über Myristyl- und Palmityl-Reste die Lck in der Cytoplasmamembran (Shenoy-Scaria et al., 1993; Weil & Veillette, 1996), zum anderen vermittelt sie die Assoziation mit den T-Zell Oberflächen-Korezeptoren CD4 und CD8 $\alpha$ , welche essentiell ist für eine normale T-Zell Funktion (Glaichenhaus et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass diese Interaktionen Zink-abhängig sind (Lin et al., 1998), und mit Hilfe von Mutationsstudien ließ sich die Bindungsregion sowohl in CD4 als auch in der unique-Domäne lokalisieren (Huse et al., 1998). Demnach sind Cys420 und Cys422 in CD4 und Cys20 und Cys23 in der unique-Domäne essentiell für die Interaktion, wodurch ein Modell der Bindung vorgeschlagen werden konnte (Abb. 3.17). Hiernach koordinieren jeweils die beiden Thiolgruppen der Cysteine eines Bindungspartners ein Zink-Atom.



**Abb. 3.17: Modell der Zink-vermittelten Bindung von Lck und CD4**

Je zwei Cysteine von CD4 und der unique-Domäne der Lck koordinieren ein Zink-Atom (verändert nach Huse et al., (1998).

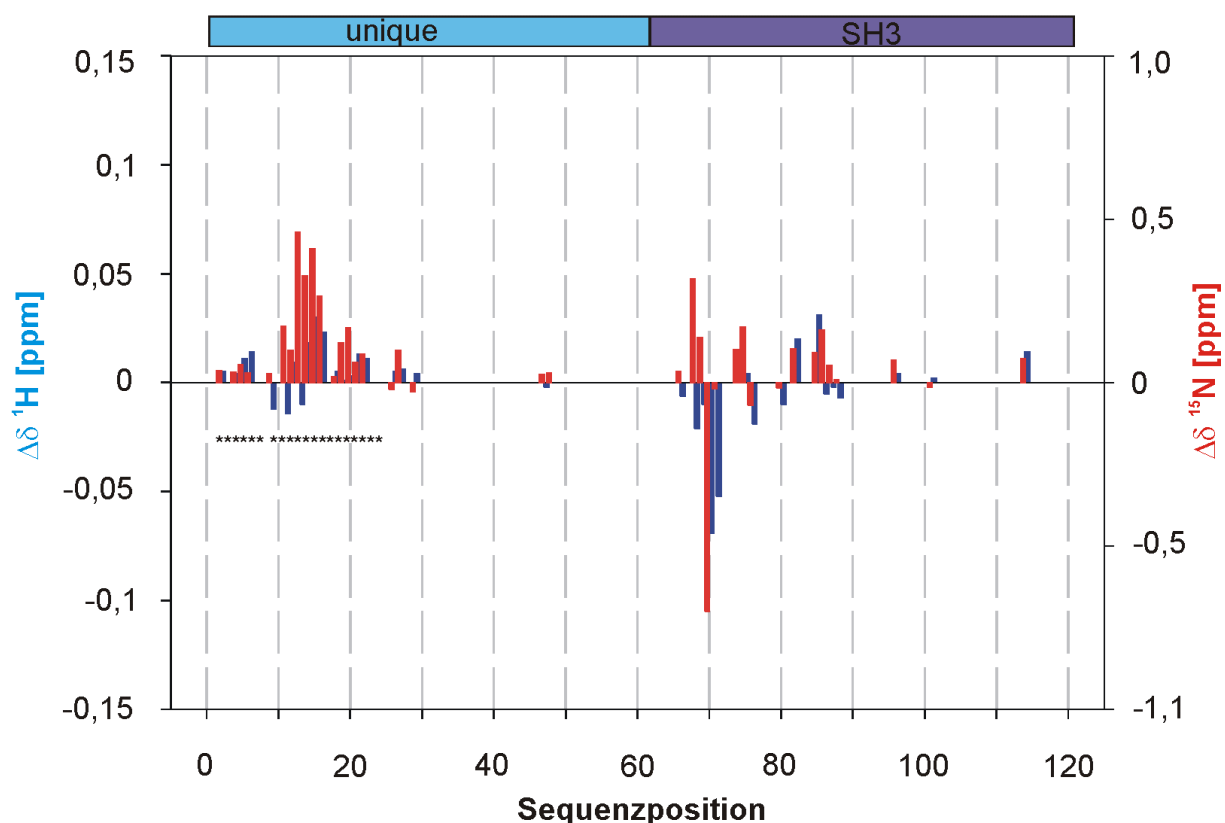
Im Folgenden soll die Interaktion der cytoplasmatischen Domäne von CD4 an die Lck näher untersucht werden. Insbesondere die Zink-Anhängigkeit der Bindung muss zunächst näher betrachtet werden.

### 3.4.2.1 Untersuchungen zur Zink-Bindung an LckU3

Um sicherzustellen, dass die Thiolgruppen von Cysteinen in reduzierter Form vorliegen, was laut Modell eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Bindung von Zink an die unique-Domäne ist, wurden alle Bindungsuntersuchungen in einem Puffersystem mit reduzierenden und möglichst Sauerstoff-ausschließenden Bedingungen durchgeführt. Neben der Entgasung aller Puffer gehörte hierzu das Spülen von NMR-Probengefäßen mit Argon und das Zusetzen von Reduktionsmittel ( $\beta$ -Mercaptoethanol).

Die Untersuchung der Zink-Bindung an die unique-Domäne gelang schließlich in einem Puffersystem aus 20 mM Na-Acetat, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,5 mit  $\text{ZnSO}_4$  als Zinkdonor.

Wiederum mit Hilfe von  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrationsexperimenten konnten diejenigen Reste in LckU3 identifiziert werden, die an einer Zn-Bindung beteiligt bzw. durch die Zn-Bindung beeinflusst werden. Die Titration wurde in sechs Schritten mit einer  $530 \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -markierten LckU3 Lösung und einer 10 mM  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung bis zu einem molaren Verhältnis von LckU3:Zn = 1:2 durchgeführt. In Abb. 3.18 sind die Resonanzfrequenzänderungen aller Reste bei der Zugabe von Zink zu LckU3 dargestellt.



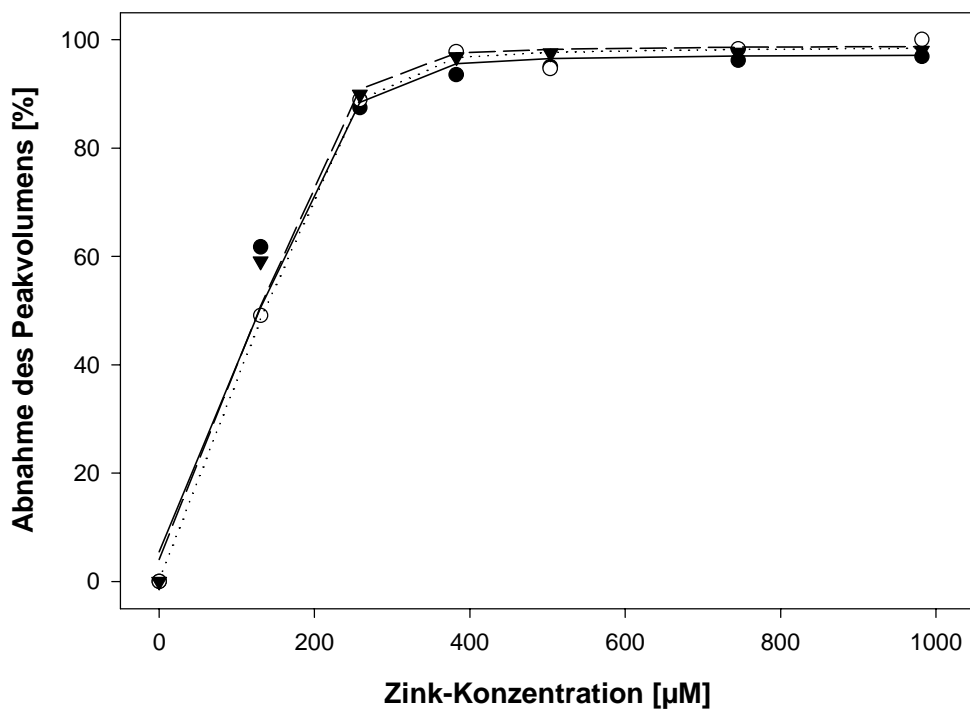
**Abb. 3.18: Resonanzfrequenzänderungen der Amidprotonen von LckU3 bei Zinkzugabe als Funktion der Sequenz**

In rot dargestellt sind die absoluten Änderungen der Resonanzfrequenzen des Amidstickstoffs, in blau die Änderungen der Resonanzfrequenzen des Amidprotons des jeweiligen Restes. Bei allen mit \* markierten Resten sind die Änderungen nach dem 3. Titrationschritt gezeigt, diese Peaks waren danach nicht mehr detektierbar.

Deutlich sind zwei Hauptbereiche im Protein zu erkennen, welche durch Zinkzugabe Veränderungen unterworfen sind. Dies ist zum einen der Bereich von Asp12 bis Cys23 und zum anderen der Bereich um His70. Die Signale der Amidresonanzen, die in Abb. 3.18 mit einem Sternchen gekennzeichnet wurden, sind nach dem dritten Titrationschritt (bei einem Verhältnis LckU3:Zn = 1:0,75) nicht mehr detektierbar. Das Verschwinden der Signale deutet auf einen intermediären Austausch hin, d.h., der Austausch von Zn-gebundener und ungebundener Form ist ähnlich auf der NMR-Zeitskala. Diese Beobachtungen stützen erheblich die These, dass Zink mit Cys20 und Cys23 interagiert. Die Shifts, welche für His70 und benachbarte Reste beobachtet werden, lassen vermuten, dass das Zink ebenfalls mit diesem Histidin wechselwirkt.

Aus den NMR-Daten war es direkt möglich, eine Dissoziationskonstante für die Bindung von Zink an LckU3 zu bestimmen. Hierzu wurde die Änderung des Peakvolumens der

Kreuzsignale von Val19, Asn22 und Cys23 während der Titration mit Zink herangezogen (Abb. 3.19). Wie aus Abb. 3.18 zu erkennen, gehören diese Aminosäuren zu den Resten, die einen intermediären Austausch zeigen. Um die Datenpunkte fitten zu können, wurde in der Rechnung die eingesetzte LckU3-Konzentration halbiert, da bei der Bindung des Zink vermutlich zwei Lck-Moleküle miteinander komplexiert werden.



**Abb. 3.19: Änderung des Peakvolumens von Val19, Asn22 und Cys23 während der Zinktitration**

Dargestellt ist die prozentuale Abnahme der Peakvolumina von Val19 (●), Asn22 (▼) und Cys23 (○) während der Titration von LckU3 mit  $\text{ZnSO}_4$ . Die Peakvolumina am Anfang der Titration wurden gleich 100% gesetzt, Peakvolumina wurden durch Integration bestimmt. Die durchgezogene Linie (für Val19) zeigt den Fit der Datenpunkte mit einem  $K_D=27,7 \mu\text{M}$ , die gestrichelte (für Asn22) mit einem  $K_D=20,8 \mu\text{M}$  und die gepunktete (für Cys23) mit einem  $K_D=28,7 \mu\text{M}$ .

Das Fitten der Datenpunkte ergab im Mittel eine Dissoziationskonstante von  $25,7 \pm 3,5 \mu\text{M}$ . Dieser Wert entspricht etwa der physiologischen Konzentration von Zink im Körper (Lippard & Berg, 1995). Mit diesen Ergebnissen konnte die Bindung von Zink an die unique-Domäne nachgewiesen werden.

Da das Zink den Kontakt zwischen der unique-Domäne und CD4 vermittelt, war es naheliegend, auch diese Bindung eingehender zu untersuchen. Im Folgenden soll daher näher

darauf eingegangen werden, wie der Oberflächenkorezeptor CD4 mit der unique-Domäne der Lck, aber auch mit HIV-1 Nef interagiert.

### 3.4.2.2 Untersuchungen zur Bindung von CD4<sub>(394-433)</sub> an die unique Domäne

Wie schon in den vorangehenden Kapiteln gezeigt werden konnte, sind  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrationsexperimente sehr geeignet, um Bindungsregionen in isotopenmarkierten Molekülen zu bestimmen. Schwierigkeiten in der Auswertung solcher Experimente sind allerdings dann zu erwarten, wenn bei Bindung eines Liganden die Amidresonanzen so starke Veränderungen zeigen, dass eine eindeutige Zuordnung am Ende einer Titration nicht mehr möglich ist. Wenn zum Beispiel ein schneller Austausch zwischen Ligand-gebundener und ungebundener Form vorliegt, so beobachtet man lediglich die Verschiebung von Resonanzen bei Erhöhung der Liganden-Konzentration. Ist aber ein Austausch langsamer auf der NMR-Zeitskala, so können Resonanzen verschwinden und an anderer Stelle im Spektrum wieder erscheinen, womit dann die Identität dieser Resonanzen verloren gehen kann. In einem solchen Falle ist folglich die komplette Neuordnung des Komplexes an einer hochkonzentrierten doppelt-isotopenmarkierten Proteinprobe notwendig.

Auch die Bestimmung der Bindungsregion in der Lck-unique-Domäne bei CD4-Bindung nach bereits erfolgter Zinkzugabe sollte durch  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrationsexperimente bestimmt werden. Eine eindeutige Resonanzzuordnung im Komplex war aber nach den schon beträchtlichen Änderungen bei Zinkaddition nicht mehr möglich. Da jedoch auf diesem Wege die Existenz eines zink-vermittelten Komplexes zwischen der unique-Domäne der Lck (Amidresonanzen in der SH3-Domäne zeigten keine Änderungen bei CD4-Zugabe) und der cytoplasmatischen Domäne von CD4 nachgewiesen werden konnte (ohne Abbildung), sollten zunächst Fluoreszenz-Bindungsstudien Informationen über Affinitäten in den Komplexen geben.

## 3.5 Fluoreszenztitrationsexperimente mit CD4

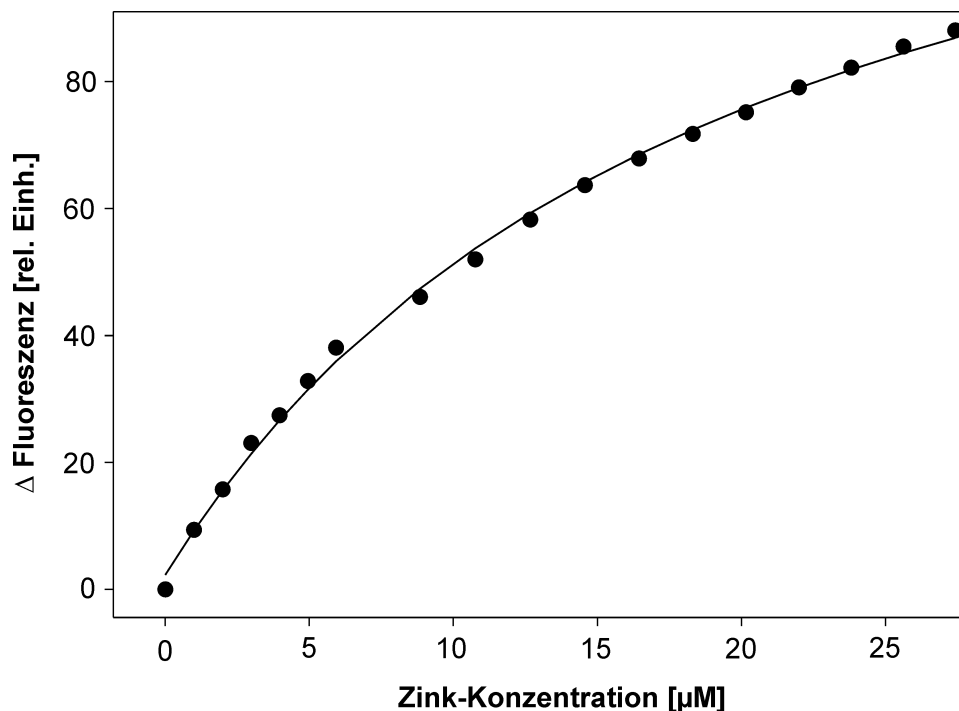
Peptide, die mit einem Fluorophor gekoppelt sind, können für fluoreszenzspektroskopische Bindungs-Untersuchungen eingesetzt werden. Das Fluorophor kann bei Bindung eines Liganden in eine andere chemische Umgebung kommen und dadurch eine Änderung des Fluoreszenzsignals bewirken. An ihrem N-Terminus fluoresceinylierte CD4-Peptide wurden für solche Bindungsstudien eingesetzt. Dabei wird das Peptid in der gewählten Konzentration

vorgelegt und anschließend mit dem Liganden titriert. Tritt eine konzentrationsabhängige Änderung der Fluoreszenz ein, so muss von einer Interaktion des Peptids und des Liganden ausgegangen werden.

### 3.5.1 Bestimmung des $K_D$ der Bindung von Zink an $CD4_{(394-433)}$ mittels Fluoreszenztitrationmessungen

Wie bereits in Kap. 3.4.2.1 gezeigt wurde, konnte die Bindung von Zink an die unique-Domäne der Lck mittels NMR-Untersuchungen nachgewiesen werden. Dabei wurde der  $K_D$  anhand der NMR-Spektren mit ca. 25  $\mu\text{M}$  bestimmt.

Zur Bestimmung des  $K_D$  für die Interaktion zwischen  $CD4_{(394-433)}$  und Zink wurden Fluoreszenz-Titrationsexperimente durchgeführt. Abb. 3.20 zeigt die Änderung des Fluoreszenzsignals bei Zinkzugabe als Funktion der Zinkkonzentration. Das Fitten der Datenpunkte ergab einen  $K_D$ -Wert von 18,5  $\mu\text{M}$ . Damit ist die Zink-Affinität für  $CD4_{(394-433)}$  und LckU3 in etwa vergleichbar.



**Abb. 3.20:** Fluoreszenztitration von  $CD4_{(394-433)}$  mit Zink

Die Startkonzentration von  $CD4$  betrug 1  $\mu\text{M}$  in einem Messvolumen von 2 ml. Titriert wurde mit einer 500  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ -Lösung in TBS mit 14 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und dem Puffer ohne Zink. Dargestellt ist die Differenz der Werte dieser beiden Titrationen. Die Excitationswellenlänge war 495 nm, die Emissionswellenlänge 520 nm.

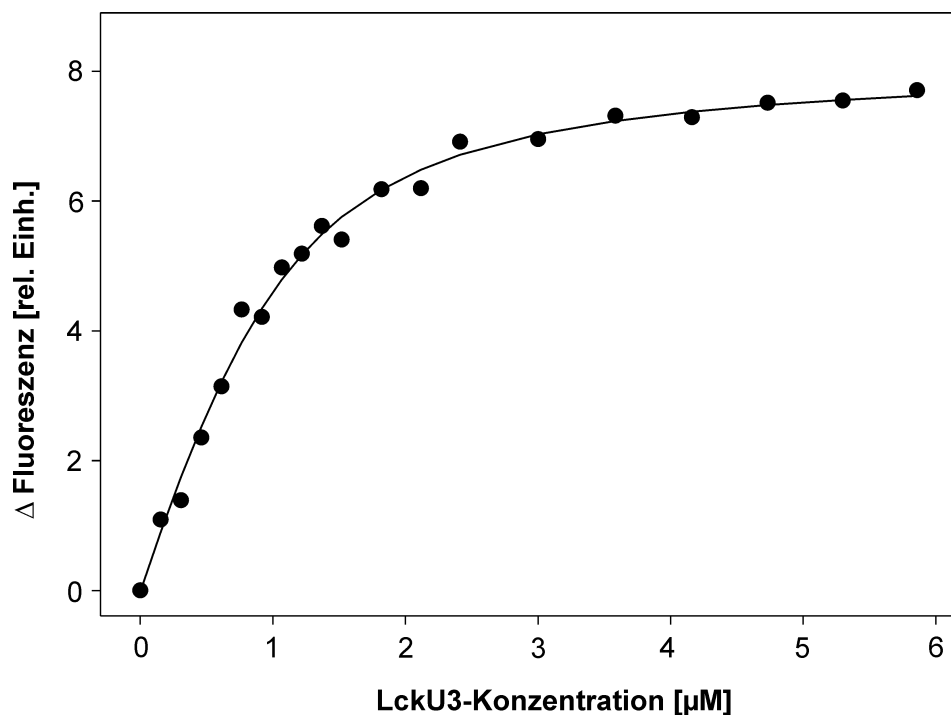


Der Fit der Datenpunkte (durchgezogene Linie) bei Annahme einer einfachen bimolekularen Reaktion zwischen CD4 und Zink ergab einen  $K_D$ -Wert von 18,5  $\mu\text{M}$ .

Somit konnte die Affinität von LckU3 und CD4<sub>(394-433)</sub> für Zink mit zwei unterschiedlichen Methoden gezeigt werden. Titrationsuntersuchungen von CD4 und LckU3 in Anwesenheit von Zink sollten im Folgenden ergeben, wie hoch die Affinität dieser beiden Komponenten zueinander ist. Somit sollten sich auch Aussagen treffen lassen, ob ein Komplex für eine eingehende Charakterisierung mittels NMR geeignet ist.

### 3.5.2 Bestimmung des $K_D$ der Bindung von LckU3 an CD4<sub>(394-433)</sub>

Die Bestimmung des  $K_D$  der Bindung von LckU3 an CD4<sub>(394-433)</sub> erfolgte wiederum mit Hilfe von Fluoreszenztitrationsmessungen, wie in Kap. 2.12 beschrieben. Vorgelegt wurden 0,98  $\mu\text{M}$  CD4 und 5  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub>, titriert wurde mit einer 123  $\mu\text{M}$  LckU3-Lösung. Abb. 3.21 zeigt die Ergebnisse dieser Titration. Das Fitten der Datenpunkte ergab einen  $K_D$ -Wert von 0,35  $\mu\text{M}$ .



**Abb. 3.21:** Fluoreszenztitration von CD4<sub>(394-433)</sub> und Zink mit LckU3

Die Startkonzentration von CD4 betrug 0,98  $\mu\text{M}$  in TBS mit 14 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 5  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub>. Das Messvolumen betrug 2 ml. Titriert wurde mit einer 123  $\mu\text{M}$  LckU3-Lösung in TBS mit 14 mM  $\beta$ -

Mercaptoethanol und dem Puffer ohne LckU3. Dargestellt ist die Differenz der Werte dieser beiden Titrations. Die Excitationswellenlänge war 495 nm, die Emissionswellenlänge 520 nm. Der Fit der Datenpunkte (durchgezogene Linie) bei Annahme einer einfachen bimolekularen Reaktion zwischen CD4 und LckU3 ergab einen  $K_D$ -Wert von 0,35  $\mu$ M.

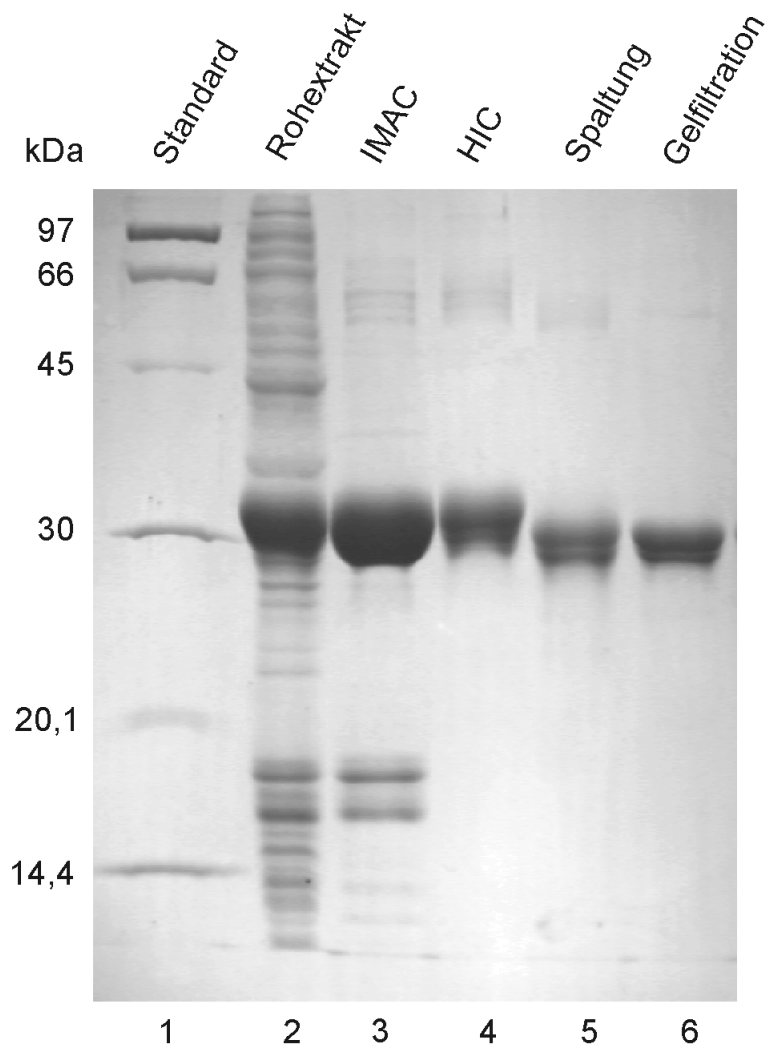
Mit Hilfe von Fluoreszenztitrations sollte es offensichtlich auch möglich sein, die Affinitäten zwischen CD4 und Nef zu bestimmen, bzw. den Einfluss von Nef auf den Komplex von LckU3 und CD4 zu untersuchen.

Im Hinblick auf die Durchführbarkeit von Experimenten an Komplexen zwischen sowohl HIV-1 Nef und CD4, als auch LckU3 und CD4 war es nötig, HIV-1 Nef rekombinant in größeren Mengen zu gewinnen. Auch die cytoplasmatische Domäne von CD4 musste für kommende Experimente in größerem Maßstab und isotopenmarkiert zur Verfügung stehen. Daher soll in den folgenden Kapiteln die Reinigung und Expression dieser beiden Proteine beschrieben werden.

### **3.6 Expression und Reinigung von HIV-1 Nef**

Die Expression von HIV-1 Nef gelang als Fusion mit einem Hexa-Histidinanhang in *E. coli* BL21 (DE3). Zusätzlich zum Expressionsvektor pET15b, der das Nef-Gen des HIV-1 Isolates SF2 enthielt (vollständige Aminosäuresequenz im Anhang), wurde in diesen Stamm auch das Plasmid pUBS520 transformiert. Dieses enthält die tRNA *argU* zur Verbesserung der Expression von ORF's mit seltenen Codons für Arginin in *E. coli*.

Die Bakterien wurden aerob bei 37° C entweder in LB- oder in isotopenmarkiertem M9-Medium angezogen. Nach dem Aufschluss der Zellen (Kap. 2.10.1) wurde eine Chromatographie des Zellrohextraktes an TALON-Superflow durchgeführt (Kap. 2.10.3). Dieses Chromatographiematerial widersteht  $\beta$ -Mercaptoethanolkonzentrationen bis 10 mM und eignet sich daher in besonderer Weise für das Arbeiten unter reduzierenden Bedingungen. Es folgte eine Hydrophobe Interaktionschromatographie an Butyl-Sepharose 4 Fast Flow (Kap. 2.10.4). Die Abspaltung des Hexa-Histidinanhangs wurde mit Thrombin erreicht (Kap. 2.10.6), die anschließende Trennung der Spaltprodukte mit einer Gelfiltration (Kap. 2.10.7). Abbildung 3.22 dokumentiert die einzelnen Reinigungsschritte anhand einer SDS-PAGE.



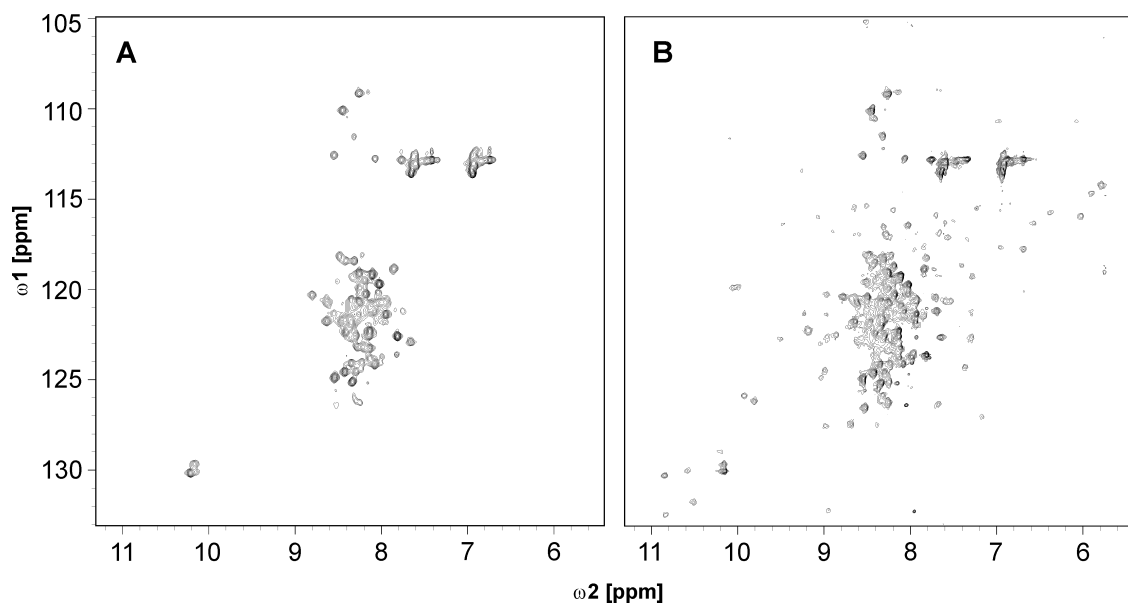
**Abb. 3.22: SDS-PAGE der Reinigung von HIV-1 Nef**

12 % SDS-Gel einer Reinigung von HIV-1 Nef. Bahn 1: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2: Rohextrakt; Bahn 3: vereinigte Fraktionen nach IMAC an TALON-Superflow; Bahn 4: vereinigte Fraktionen nach HIC; Bahn 5: vereinigte Fraktionen nach Thrombinspaltung; Bahn 6: vereinigte Fraktionen nach Gelfiltration

Die Identität des Endproduktes wurde mittels N-terminaler Sequenzierung und MALDI-TOF-Analyse bestätigt. Das vollständige HIV-1 Nef-Protein konnte auf diesem Wege erstmals in löslicher Form mit einer Ausbeute von bis zu 60 mg Protein pro Liter Vollmedium gereinigt werden und stand somit für NMR- und fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen zur Verfügung.

### 3.6.1 Untersuchungen zur Eignung von HIV-1 Nef für NMR-Titrationsexperimente

Um die Eignung des gereinigten HIV-1 Nef-Proteins für NMR-Titrationsexperimente zu testen, wurde eine  $^{15}\text{N}$ -markierte Proteinprobe hergestellt und auf eine Konzentration von etwa 1 mM konzentriert. Ein  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC dieser Probe zeigte nur wenige, sehr breite Resonanzlinien (Abb. 3.23, **A**). Dies deutete daraufhin, dass das Protein in einem oligomeren Zustand vorlag, wie es auch schon von Grzesiek et al. (1996a) beschrieben wurde, die das Lösungsverhalten nur durch die schon erwähnten Deletionen im N-Terminus verbessern konnten. Beim Verdünnen der hochkonzentrierten Probe waren nach und nach immer mehr Resonanzlinien zu erkennen (Abb. 3.23, **B**). Die höchstmögliche Konzentration für einen überwiegend monomeren Zustand ließ sich auf diesem Wege auf etwa 180  $\mu\text{M}$  Nef festlegen.



**Abb. 3.23:**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von HIV-1 Nef bei verschiedenen Konzentrationen

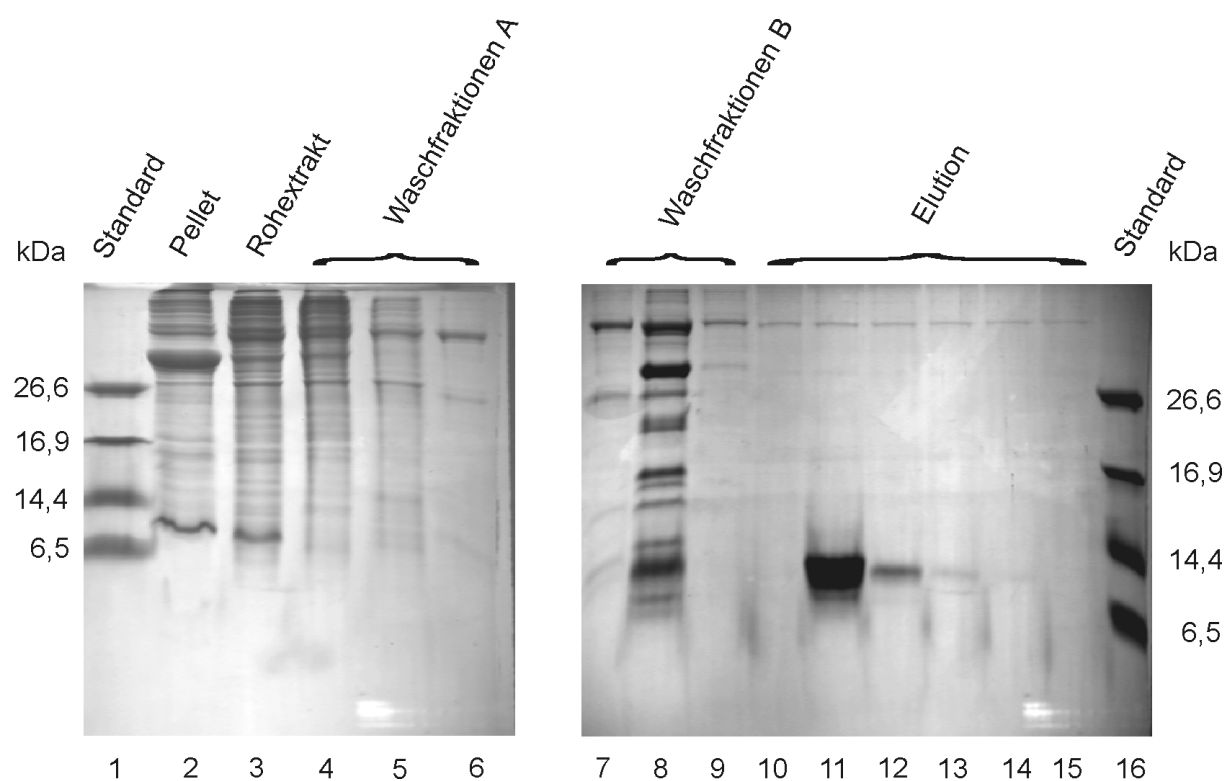
**A** zeigt ein Spektrum von HIV-1 Nef in PBS-Puffer bei einer Proteinkonzentration von 1 mM, **B** bei einer Konzentration von 180  $\mu\text{M}$ . Die Protonenfrequenz des Spektrometers betrug 750 MHz, die Temperatur 298 K.

### 3.7 Expression und Reinigung von CD4<sub>(394-433)</sub>

Wie in Kap. 3.4.2.2 und 3.5 gezeigt werden konnte, bindet CD4<sub>(394-433)</sub> mit hoher Affinität an die unique-Domäne der Lck. Um eine eingehende Charakterisierung dieses Komplexes mit

NMR-spektroskopischen Methoden ermöglichen zu können, ist die heterologe Expression von CD4<sub>(394-433)</sub> notwendig, damit möglichst kostengünstig auch isotonenmarkierte Präparate in ausreichender Menge hergestellt werden können. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) gewählt. Er stellte sich als der einzige *E. coli* Stamm heraus, der dieses kurze Peptid stabil exprimieren konnte.

Die Reinigung erfolgte wie in Kap. 2.10.3 beschrieben mittels Metallionenaffinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen an TALON-Superflow, die Rückfaltung erfolgte anschließend durch Dialyse. Die durchschnittliche Ausbeute betrug etwa 15 mg Protein pro Liter Vollmedium, die Identität des Endproduktes wurde durch N-terminale Sequenzierung bestätigt. Abbildung 3.24 dokumentiert die Reinigung von CD4<sub>(394-433)</sub> anhand einer SDS-PAGE.



**Abb. 3.24:** SDS-PAGE der Reinigung von CD4<sub>(394-433)</sub>

16,5 % Tricin-SDS-Gel einer Reinigung von CD4<sub>(394-433)</sub>. Bahn 1: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2: Pellet; Bahn 3: auf TALON-Säule aufgetragener Rohextrakt; Bahn 4-6: Waschen mit Aufschlusspuffer (Waschfraktion A); Bahn 7-9: Waschen mit 50 mM Imidazol (Waschfraktion B); Bahn 10-15: Eluieren mit 150 mM Imidazol; Bahn 16: Molekulargewichtsstandard

### 3.8 Fluoreszenzuntersuchungen zur Bindung von HIV-1 Nef an verschiedene CD4-Varianten

Mit der Verfügbarkeit des rekombinant hergestellten HIV-1 Nef-Proteins war es möglich, die Interaktion von HIV-1 Nef mit der cytoplasmatischen Domäne von CD4 eingehender zu untersuchen. Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten sollte hierbei wiederum durch Fluoreszenztitrations erreicht werden.

Die Bindung von CD4<sub>(407-419)</sub> an HIV-1 Nef ist bereits NMR-spektroskopisch charakterisiert worden (Grzesiek et al., 1996b). Die Dissoziationskonstante wurde dabei aus den NMR-Spektren auf 1 mM bestimmt. Diese Bindungsstudien wurden allerdings mit Nef-Varianten durchgeführt, die größere Deletionen am N-Terminus oder noch zusätzlich in einer Loop-Region besaßen (Nef<sup>Δ2-39</sup> und Nef<sup>Δ2-39,Δ159-173</sup>). Experimente zur Affinität der cytoplasmatischen Domäne von CD4 an das vollständige HIV-1 Nef-Protein sollten nun zeigen können, welchen Beitrag die N-terminalen Aminosäuren von HIV-1 Nef zur Bindung leisten. In Abbildung 3.25 ist in einer Übersicht dargestellt, welche N-terminal fluoreszenzmarkierten CD4-Peptide für Bindungsuntersuchungen eingesetzt wurden.

	403	407	419	433
CD4(403-433)	Q	A	E	R
CD4(403-419)	Q	A	E	R
CD4(407-419)		M	S	Q
CD4(LL-AA)	Q	A	E	R

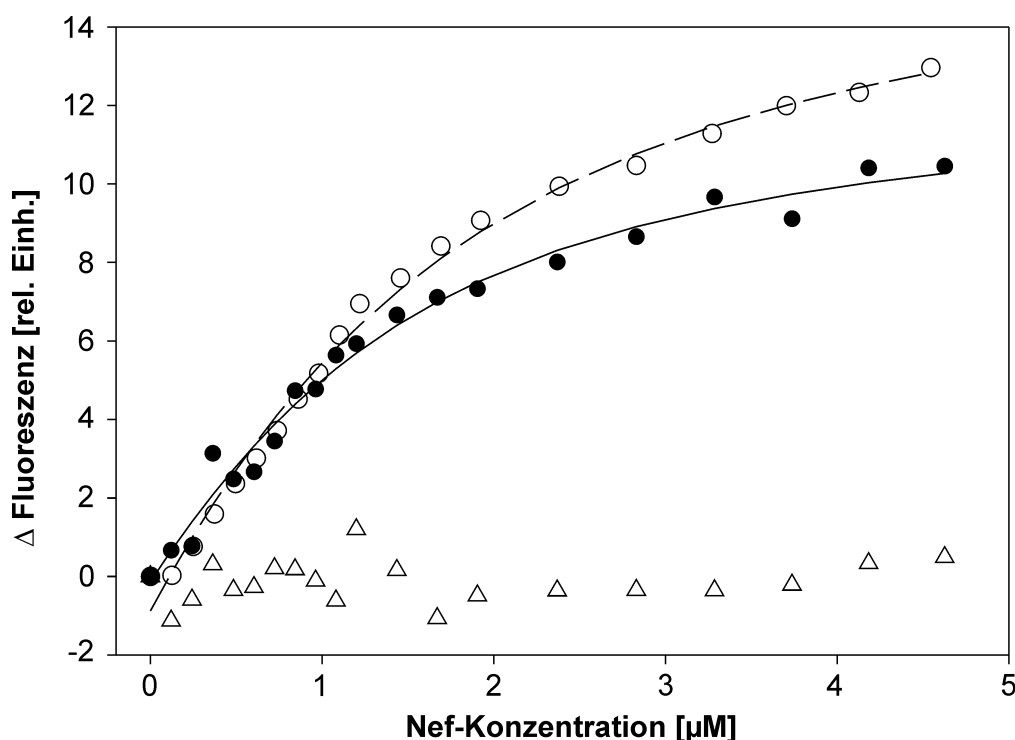
**Abb. 3.25: Darstellung der verschiedenen CD4-Varianten**

Übersicht über N-terminal fluoresceinylierte CD4-Peptide, die für Nef-Bindungsstudien benutzt wurden. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode dargestellt, die obere Reihe zeigt die korrespondierende Sequenzposition in CD4.

Bereits in Vorversuchen zur  $K_D$ -Bestimmung hatte sich herausgestellt, dass die Affinität von CD4<sub>(403-433)</sub> an das vollständige HIV-1 Nef-Protein deutlich höher ist als 1 mM. Für die Fluoreszenzuntersuchungen wurde daher das CD4-Peptid mit ca. 1  $\mu$ M vorgelegt, die Titration wurde mit einer 100  $\mu$ M HIV-1 Nef Lösung durchgeführt. Der  $K_D$ -Wert dieser Titration konnte auf 0,87  $\mu$ M bestimmt werden (Abb. 3.26, (●), durchgezogene Linie).

Dieser  $K_D$ -Wert ist etwa 1000-fach kleiner als der für die Bindung von  $CD4_{(407-419)}$  an die Nef-Mutanten  $Nef^{\Delta 2-39}$  und  $Nef^{\Delta 2-39, \Delta 159-173}$  bestimmte (Grzesiek et al., 1996b). Die Unterschiede dieser beiden Untersuchungen liegen nur in der Länge der verwendeten CD4-Peptide und in der Vollständigkeit des Nef-Proteins. Eine Titration mit einem verkürzten CD4-Peptid sollte zeigen können, welchen Anteil die 38 N-terminalen Aminosäuren von HIV-1 Nef an der CD4-Bindung haben.

Die Bestimmung des  $K_D$ -Wertes für die Bindung von  $CD4_{(403-419)}$  an HIV-1 Nef durch die Fluoreszenztitration ergab einen Wert von  $1,4 \mu\text{M}$  (Abb. 3.26, (○), gestrichelte Linie).



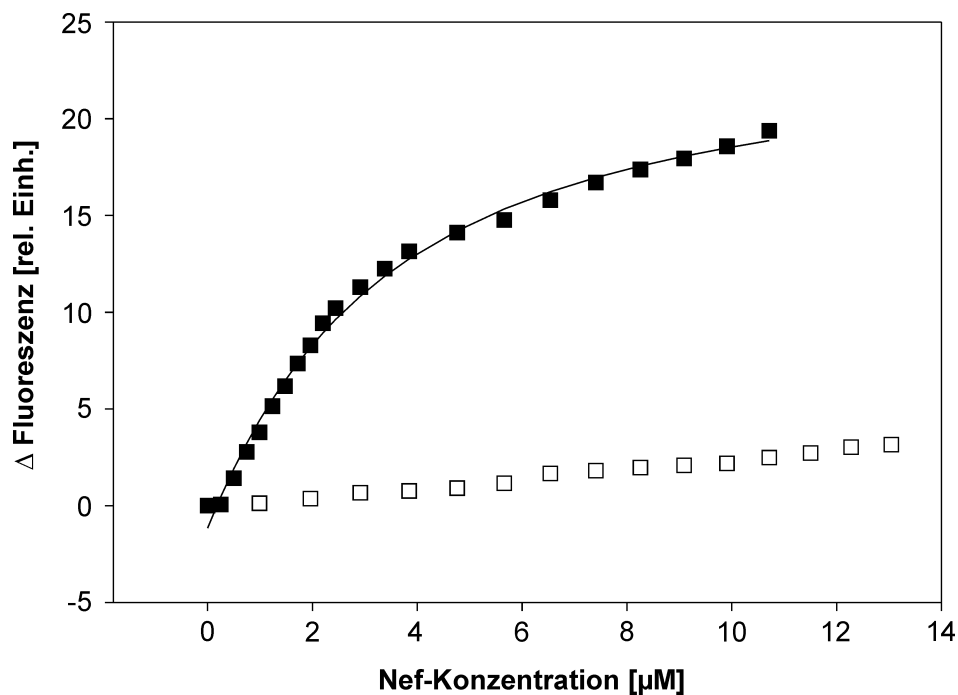
**Abb. 3.26:** Fluoreszenztitration von  $CD4_{(403-419)}$ ,  $CD4_{(403-433)}$  und FITC mit HIV-1 Nef

Die Startkonzentration von CD4 betrug jeweils  $1,1 \mu\text{M}$  für  $CD4_{(403-433)}$  und FITC und  $1 \mu\text{M}$  für  $CD4_{(403-419)}$  in einem Messvolumen von 2 ml. Titriert wurde mit einer  $100 \mu\text{M}$  HIV-1 Nef-Lösung in PBS und dem Puffer ohne HIV-1 Nef. Dargestellt ist jeweils die Differenz der Werte dieser beiden Titrations. Die Excitationswellenlänge war 495 nm, die Emissionswellenlänge 520 nm. Der Fit der Datenpunkte bei Annahme einer einfachen bimolekularen Reaktion zwischen CD4 und HIV-1 Nef ergab  $K_D$ -Werte von  $0,87 \mu\text{M}$  (durchgezogene Linie) für  $CD4_{(403-433)}$  (●) bzw.  $1,4 \mu\text{M}$  (gestrichelte Linie) für  $CD4_{(403-419)}$  (○). Die Werte der Titration von FITC mit HIV-1 Nef sind durch  $\Delta$  gekennzeichnet.

Die Reste 420-433 von CD4 haben damit offensichtlich nur einen geringen Anteil an der Nef-Bindung. Im Gegensatz dazu sind die 38 N-terminalen Aminosäuren von HIV-1 Nef ganz erheblich an der Interaktion zu CD4 beteiligt. Eine Titration von Fluoresceinisothiocyanat

(FITC) mit HIV-1 Nef diente als Kontrolle, es konnte keine Bindung an HIV-1 Nef festgestellt werden (Abb. 3.26, ( $\Delta$ )).

Die Anwesenheit eines Glutamins an Position 403 der verwendeten CD4-Peptide bildet den N-terminalen Cap einer  $\alpha$ -Helix (Willbold & Rösch, 1996). Diese Helix konnte sich nicht bei dem von Grzesiek et al. verwendeten CD4-Peptid bilden, welches erst bei Position 407 mit einem Methionin beginnt. Um zu ermitteln, wie hoch der Anteil dieser vier Aminosäuren an der Nef-Bindung ist, wurde eine Titration mit  $CD4_{(407-419)}$  durchgeführt. Der  $K_D$ -Wert für dieses Peptid wurde auf  $3,3 \mu\text{M}$  bestimmt (Abb. 3.27, ( $\blacksquare$ ), durchgezogene Linie). Die Anwesenheit der Aminosäuren 403-406, welche den Helix-Cap bilden, erhöhen damit die Affinität zu HIV-1 Nef um etwa den Faktor 2. Als eine weitere Kontrolle wurde eine Titration mit einem CD4-Peptid durchgeführt, bei dem die Positionen Leucin 413 und Leucin 414 durch je ein Alanin ersetzt wurden ( $CD4_{(LL-AA)}$ ). Die Mutation dieses Di-Leucin-Motives verhindert die Nef-induzierte negative Regulierung des CD4-Rezeptors (Aiken et al., 1994). Wie in Abb. 3.27 zu erkennen ist, konnte im gemessenen Bereich von 0 bis  $13 \mu\text{M}$  Nef keine Dissoziationskonstante für die Bindung von  $CD4_{(LL-AA)}$  an HIV-1 Nef ermittelt werden ( $\square$ ). Eine Mutation der Leucine zu Alaninen verringert erheblich die Affinität von CD4 zu HIV-1 Nef.



**Abb. 3.27:** Fluoreszenztitration von  $CD4_{(407-419)}$  und  $CD4_{(LL-AA)}$  mit HIV-1 Nef

Die Startkonzentration von CD4 betrug jeweils  $1 \mu\text{M}$  in einem Messvolumen von 2 ml. Titriert wurde mit einer  $100 \mu\text{M}$  HIV-1 Nef-Lösung in PBS und dem Puffer ohne HIV-1 Nef. Dargestellt ist jeweils die Differenz der



Werte dieser beiden Titrations. Die Excitationswellenlänge war 495 nm, die Emissionswellenlänge 520 nm. Der Fit der Datenpunkte bei Annahme einer einfachen bimolekularen Reaktion zwischen CD4 und HIV-1 Nef ergab einen  $K_D$ -Wert von 3,3  $\mu\text{M}$  (durchgezogene Line) für CD4<sub>(407-419)</sub> (■). Die Werte der Titration von CD4<sub>(LL-AA)</sub> mit HIV-1 Nef sind durch □ gekennzeichnet.

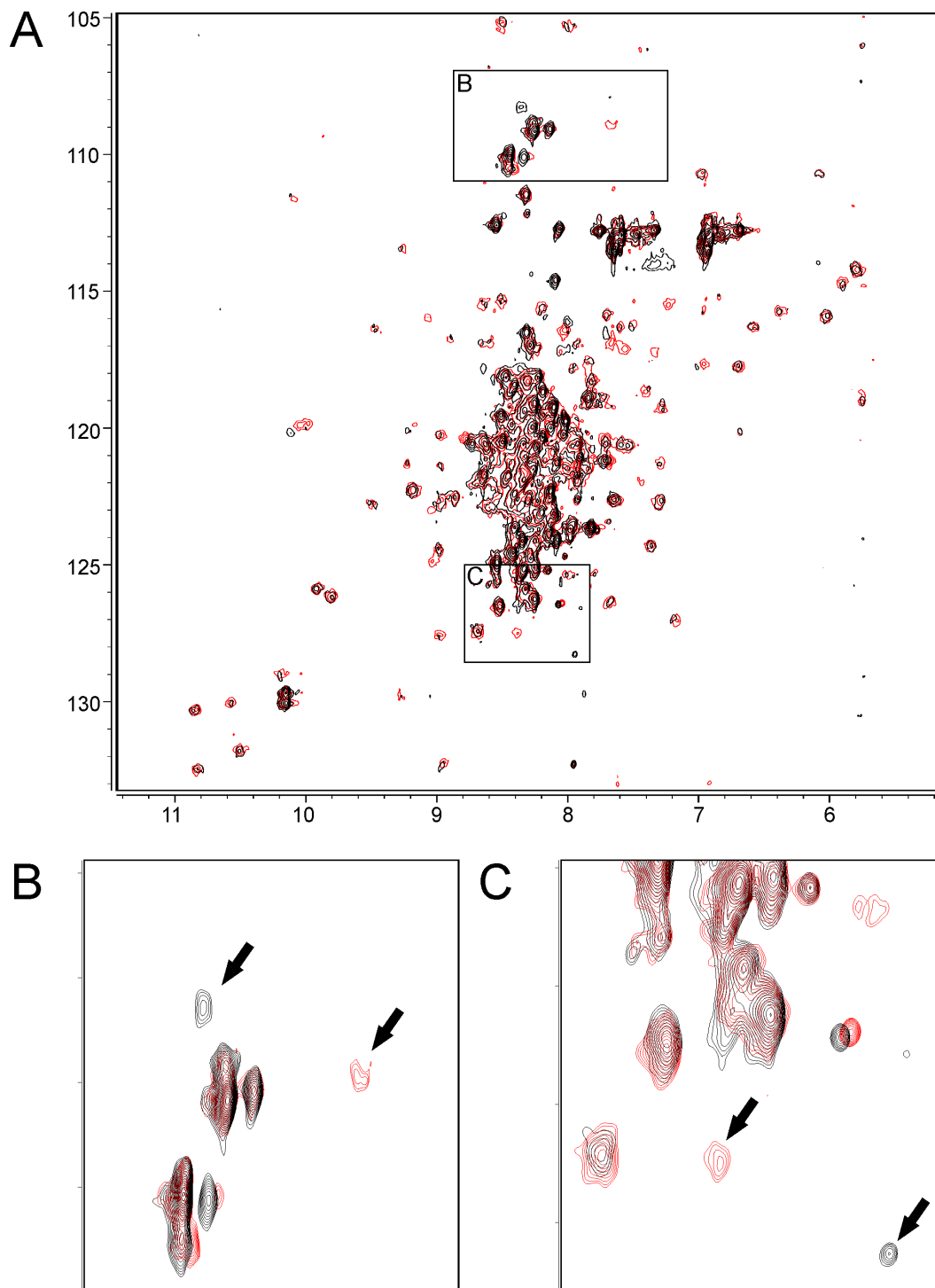
### 3.9 NMR-Titrations von HIV-1 Nef mit CD4<sub>(403-433)</sub>

Wie schon in Kap. 3.4 gezeigt werden konnte, sind NMR-Titrationsexperimente hervorragend dazu geeignet, Bindungen nachzuweisen und Bindungsregionen zu ermitteln. Daher sollte versucht werden, die CD4-Bindung an das vollständige HIV-1 Nef-Protein auch NMR-spektroskopisch zu untersuchen. Um  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Titrationsexperimente aufnehmen zu können, wurde eine  $^{15}\text{N}$ -markierte Proteinprobe hergestellt und auf eine Konzentration von etwa 180  $\mu\text{M}$  konzentriert (siehe auch Kap. 3.6.1).

Um eine weitere Verdünnung möglichst zu vermeiden, wurde die zu titrierende Peptid-Lösung auf 5 mM konzentriert.

Wie in Kap. 3.5 angegeben, wurde durch Fluoreszenztitration ein  $K_D$ -Wert von etwa 1  $\mu\text{M}$  für die Bindung von HIV-1 Nef an das CD4<sub>(403-433)</sub>-Peptid bestimmt. Bei diesem  $K_D$ -Wert sollten Dissoziationsraten von etwa 100 Hz erwartet werden können. Der Austausch zwischen Nef-gebundenem und ungebundenem CD4-Peptid sollte damit langsam sein auf einer NMR-Zeitskala. In Abbildung 3.28, **A** ist das gesamte  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von HIV-1 Nef vor der Titration (rote Konturlinien) und bei einer äquimolaren Konzentration von CD4<sub>(403-433)</sub> (schwarze Konturlinien) zu sehen. Nur an wenigen Stellen sind Unterschiede zwischen den beiden Spektren auszumachen. Dies deutet darauf hin, dass der größte Teil der Core-Struktur von HIV-1 Nef nur wenig beeinflusst wird durch die CD4-Bindung. In Abb. 3.28, **B** und **C** sind beispielhaft zwei  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Resonanzen markiert, die bei Zugabe des Peptids verschwanden und in einer Protonenverschiebung von 510 bzw. 330 Hz wieder auftauchten und damit als langsam austauschend gelten. Damit ist der Austausch von Nef-gebundenem und ungebundenem CD4-Peptid deutlich langsamer als 330 Hz und bestätigt somit einen  $K_D$ -Wert von etwa 1  $\mu\text{M}$ .

Da es noch keine sequenzspezifische Zuordnung des Nef HSQC-Spektrums gibt, können noch keine Aussagen darüber getroffen werden, in welchen Regionen des Moleküls das CD4-Peptid bindet. Mit Standard-Methoden ist es nicht gelungen, eine sequenzspezifische Zuordnung zu erreichen. Selbst mit Hilfe von tiefgekühlten Probenköpfen konnten für viele beobachtbare  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Kreuzresonanzen keine  $\text{C}\alpha$ - oder  $\text{C}\beta$ -chemischen Verschiebungen ermittelt werden.



**Abb. 3.28:** NMR-Titration von HIV-1 Nef mit CD4<sub>(403-433)</sub>

Überblick (A) und zwei Ausschnittsvergrößerungen (B und C) von übereinandergelegten  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von HIV-1 Nef in Abwesenheit (rote Konturlinien) und Anwesenheit (schwarze Konturlinien) einer äquimolaren Konzentration von CD4<sub>(403-433)</sub> Peptid. Pfeile markieren Amidresonanzen, deren Intensität während der Titration abnahm (rote Konturlinien) und an anderer Stelle wieder erschienen (schwarze Konturlinien). Die Protonenfrequenz des Spektrometers betrug 750 MHz, die Temperatur 298 K, die Startkonzentration von HIV-1 Nef war 180  $\mu\text{M}$ .

### 3.10 Erweiterte Untersuchungen zum Lck-CD4 Komplex

In den vorangehenden Kapiteln wurden Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen untersucht, die eine Schlüsselrolle bei der T-Zell Signalisierung und Aktivierung spielen. Neben der Identifizierung von Resten, die eine zentrale Rolle bei der Bindung einnehmen, konnten darüber hinaus auch Dissoziationskonstanten für verschiedene Komplexe experimentell bestimmt werden. Für ein noch besseres Verständnis der stattfindenden Wechselwirkungen ist es wünschenswert, auch strukturelle Daten der resultierenden Komplexe zu erhalten und letztendlich die dreidimensionale Struktur eines Komplexes zu lösen.

#### 3.10.1 Erste NMR-Untersuchungen am Lck-CD4 Komplex

Die sich aus dieser Arbeit ergebenden neuen Fragestellungen fordern nähere strukturelle Untersuchungen zum zinkvermittelten Komplex zwischen der Lck und CD4 und, besonders herausfordernd, zwischen Lck bzw. CD4 und dem vollständigen Nef-Protein. Es wurden daher erste Versuche unternommen, den zinkvermittelten Lck-CD4 Komplex weiterführend NMR-spektroskopisch zu untersuchen.

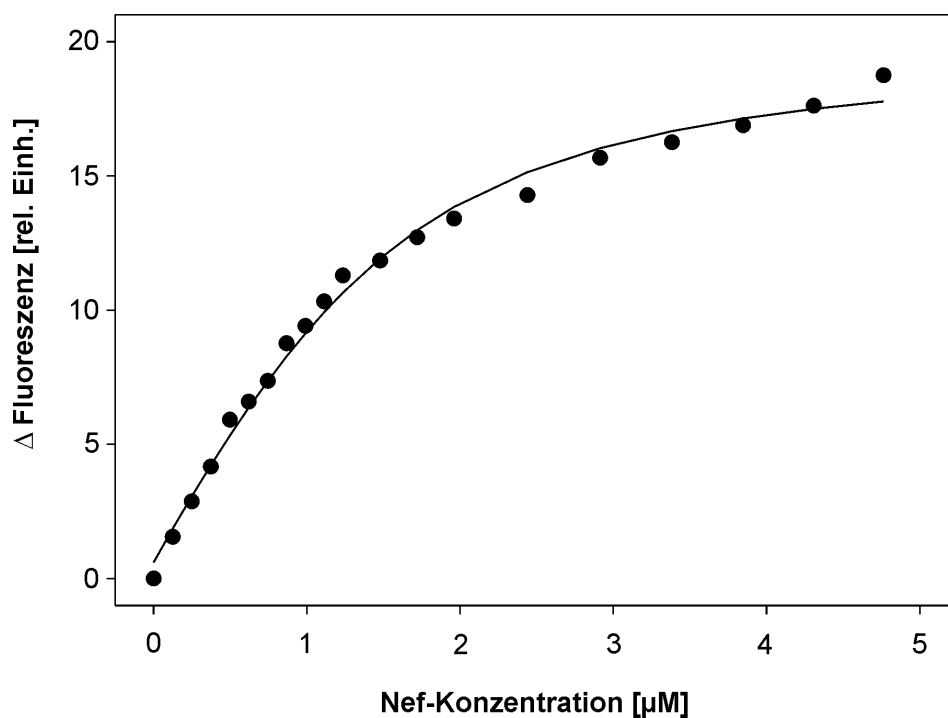
Da sich die Interaktion zwischen der Lck und dem cytoplasmatischen Teil von CD4 auf die unique-Domäne beschränkt (Kap. 3.4.2.2), wurden die folgenden Untersuchungen nur mit der unique-Domäne durchgeführt. Diese konnte, wie in Kap. 2.10 beschrieben, heterolog exprimiert und gereinigt werden.

Es wurde daher nach Bedingungen gesucht, unter denen der Komplex in für NMR-Untersuchungen notwendigen Konzentrationen löslich ist. Es gelang schließlich, eine etwa 1 mM Lösung von  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -isotopenmarkierter Lck-unique in Anwesenheit von etwa 1 mM CD4<sub>(394-433)</sub> und 5 mM ZnSO<sub>4</sub> in einem Puffersystem von 20 mM Na-Acetat, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 5,0 herzustellen und ein HNCACB-Spektrum zur Neuordnung der Amidprotonen im Komplex aufzunehmen. Bei der Auswertung musste festgestellt werden, dass für die Region von Glu15 bis Ile27 ein Signalsatz von der CD4-ungebundenen und der CD4-gebundenen Form vorlag. Aus einem Vergleich mit vorher aufgenommenen Kontroll-HSQC-Experimenten war zu schließen, dass die Menge an zugegebenem CD4-Peptid zu gering war. Es konnte aber gezeigt werden, dass der Lck-unique-CD4 Komplex für NMR-spektroskopische Untersuchungen prinzipiell zugänglich ist. Des weiteren konnte noch einmal bestätigt werden, dass die Bindungsregion sich etwa auf die

Aminosäuren Glu15 bis Ile27 beschränkt. Es konnten somit die Voraussetzungen für ein zügiges Fortschreiten zu Komplex-Untersuchungen geschaffen werden.

### 3.10.2 Bestimmung des $K_D$ der Bindung von HIV-1 Nef an einen Komplex aus LckU3 und CD4<sub>(394-433)</sub>

Da HIV-1 Nef sowohl mit LckU3 als auch mit CD4 wechselwirken kann, ist es von großem Interesse zu untersuchen, ob sich die einzelnen Komponenten gegenseitig in ihren Bindungseigenschaften beeinflussen. Darüber hinaus könnten weitere Hinweise gefunden werden, ob sich ein ternärer Komplex ausbilden kann. Mit Hilfe eines Fluoreszenztitrations-experimentes wurde daher die Bindung von HIV-1 Nef an einen schon bestehenden Komplex aus LckU3 und fluoreszenzmarkiertem CD4<sub>(394-433)</sub> untersucht (Abb. 3.29), es wurde ein  $K_D$ -Wert von 0,47  $\mu\text{M}$  ermittelt.



**Abb. 3.29:** Fluoreszenztitration von einem CD4<sub>(394-433)</sub>-LckU3 Komplex mit HIV-1 Nef

Vorgelegt wurden 1,44  $\mu\text{M}$  CD4, 5  $\mu\text{M}$  LckU3 und 5  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub> in einem Messvolumen von 2 ml. Titriert wurde mit einer 100  $\mu\text{M}$  HIV-1 Nef-Lösung in PBS und dem Puffer ohne HIV-1 Nef. Dargestellt ist die Differenz der Werte dieser beiden Titrations. Die Excitationswellenlänge war 495 nm, die Emissionswellenlänge 520 nm. Der Fit der Datenpunkte bei Annahme einer einfachen bimolekularen Reaktion zwischen CD4-LckU3 und HIV-1 Nef ergab einen  $K_D$ -Wert von 0,47  $\mu\text{M}$  (durchgezogene Line).

Unter der Annahme, dass die Fluoreszenzänderung die Wechselwirkung von Nef mit CD4 widerspiegelt, würde dies eine Erhöhung der Affinität von Nef zu CD4 um etwa das Doppelte bedeuten. Es ist allerdings zu beachten, dass mehrere Möglichkeiten einer Komplexbildung bestehen. So würde eine Freisetzung von CD4 bei Bindung von Nef an die Lck-SH3-Domäne ebenfalls eine Fluoreszenzänderung nach sich ziehen.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Die Präparation von LckU3, Lck unique, HIV-1 Nef und CD4<sub>(394-433)</sub>

Die Untersuchung von Peptiden, Proteinen oder auch Nukleinsäuren mit Hilfe NMR-spektroskopischer Methoden hat zur Voraussetzung, dass die jeweiligen Komponenten in ausreichender Menge, Konzentration und isotonenmarkiert beschafft werden können. Die bakterielle Überexpression und besonders Reinigung mit möglichst geringem Arbeitsaufwand und maximalen Ausbeuten ist daher von großer Bedeutung, nicht zuletzt auch, um wirtschaftlich arbeiten zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit ist die bakterielle Expression und anschließende Reinigung für vier Proteine gelungen: LckU3 (Kap. 3.1), Lck unique (Kap. 3.10.1), HIV-1 Nef (Kap. 3.6) und CD4<sub>(394-433)</sub> (Kap. 3.7). Lck-Proteine wurden dabei als Fusion mit Glutathion-S-Transferase exprimiert, CD4 und HIV-1 Nef mit einem N-terminalen Poly-Histidin Anhang.

Durch die Anwendung eines „batch“-Verfahrens für die Reinigung der Lck-Proteine ist es einerseits gelungen, die Ausbeute auf diesem Wege zu maximieren. Zum anderen konnte auf diese Weise eine erhebliche Zeitersparnis erreicht werden, da das Umpuffern in den für die Spaltung benötigten Puffer und die Spaltung selbst in einem Arbeitsschritt erfolgten.

Die Etablierung eines Reinigungsprotokolls für das vollständige HIV-1 Nef-Protein unter nativen Bedingungen wurde möglich durch den strikten Ausschluss von Sauerstoff während der gesamten Anreicherung des Proteins. Erst der Einsatz von Chromatographie-Materialien, die einen dauerhaften Einsatz unter reduzierenden Bedingungen erlauben, ermöglichte dieses Vorgehen.

Mit der Expression von CD4<sub>(394-433)</sub> ist die Anreicherung eines sehr kurzen Proteinfragmentes gelungen. Dies wurde erst durch die Nutzung des Expressionsstammes *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) möglich, der sich durch eine Mutation im *rne*-Gen auszeichnet, wodurch eine erhöhte Stabilität der mRNA erreicht wird.

### 4.2 Die Strukturbestimmung von LckU3 in Lösung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, mit Hilfe mehrdimensionaler heteronuklearer NMR-Spektroskopie die Struktur der ersten beiden Domänen des humanen Lck-Proteins zu bestimmen. Obwohl schon eine Kristallstruktur der SH3-Domäne bekannt war, wurden beide

Domänen in die Untersuchungen miteinbezogen, um bei folgenden Experimenten zur Bindung von Liganden den Einfluss der Domänen untereinander zu untersuchen. Konnten für die unique-Domäne keine Anhaltspunkte für das Vorkommen regulärer Sekundärstrukturelemente gefunden werden, so wurde für den Bereich der SH3-Domäne eine Strukturschar mit sehr hoher Präzision bestimmt (mittlere Abweichung der Koordinaten der Rückgratome  $0,16 \text{ \AA}$ ) (Kap. 3.3).

#### 4.2.1 Die unique-Domäne bildet in Lösung keine definierte Struktur aus

In jeder Phase der NMR-Auswertungen wurde deutlich, dass sich die unique- und die SH3-Domäne in ihren strukturellen Eigenschaften sehr unterscheiden.

Aus dem  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum (Kap. 3.2.2) war zu erkennen, dass sich alle Resonanzen, die zu Spinsystemen der unique-Domäne gehörten, in der Mitte des Spektrums konzentrierten. Wenn mehrere Signale Überlagerungen zeigten, waren Resonanzen der unique-Domäne daran beteiligt (Abb. 3.6, **B**). Dies wurde auch durch die Zuordnung der Seitenketten-Amidprotonen bestätigt. Alle Resonanzen von Glutamin- und Asparagin-Seitenkettenamidgruppen der unique-Domäne lagen übereinander, diejenigen Resonanzen, die der SH3-Domäne zugeordnet werden konnten, zeigten hingegen eine gute Dispersion (Abb. 3.6, **A**). Besondere Schwierigkeiten bereitete die Zuordnung der unique-Resonanzen im  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum (Abb. 3.4, **B**), da Signale gleicher Spinsystemtypen bei sehr ähnlichen Frequenzen, sowohl in der Protonen- als auch der Kohlenstoff-Dimension, zu beobachten waren. Als Beispiel seien hier die Kreuzresonanzen der  $\text{H}\delta$ -Protonen von Prolinen angeführt, die alle bei Frequenzen von etwa  $3,5 \text{ ppm}$  in der  $^1\text{H}$ -Dimension und  $50 \text{ ppm}$  in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension beobachtet wurden. Solche Überlagerungen haben zur Folge, dass Kreuzresonanzen im  $^{13}\text{C}$ -editierten NOE-Spektrum nicht mehr eindeutig zugeordnet werden können, da hier, insbesondere in der Kohlenstoffdimension, die Anzahl aufgenommener Punkte und damit die Auflösung der Spektren deutlich geringer ist. Somit war es in vielen Fällen nicht mehr möglich, beobachtete NOEs eindeutig einem Protonenpaar zuzuordnen.

NOEs, die im Bereich der unique-Domäne beobachtet werden konnten, waren ausschließlich intra- oder interresidual (Kap. 3.2.5). NOEs, die z.B. für helikale Bereiche typisch sind ( $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$  und  $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ ) (Wüthrich, 1986)), wurden in der unique-Domäne nicht gefunden. Ebenso konnten keine NOEs zu Resten identifiziert werden, die in der Sequenz weiter als zwei Positionen entfernt lagen. Aufgrund der starken Frequenzdegeneration ist es zwar nicht

völlig auszuschließen, dass auch Kreuzsignale zwischen weiter entfernt liegenden Protonen existieren, da nicht alle NOEs eindeutig zugeordnet werden konnten. Die Auswertung der Hetero-NOE Daten (Kap. 3.2.7) zeigte jedoch, dass stabile Tertiärstruktur im unique-Teil praktisch ausgeschlossen werden kann. Ein negativer  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Hetero-NOE ist ein eindeutiges Indiz für einen sehr beweglichen, unstrukturierten Bereich, stabilisierende Sekundärstrukturanteile machen sich in Hetero-NOE Werte  $>0,6$  bemerkbar (Kay et al., 1989). Für die Aminosäuren, die in der SH3-Domäne an der Ausbildung von  $\beta$ -Faltblättern beteiligt sind, wurden solche hohen Hetero-NOE Werte beobachtet. In der unique-Domäne konnten hingegen keine Werte größer 0,3 gemessen werden (Abb. 3.9).

Die Bestimmung der  $^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\text{N}}$  Kopplungskonstanten (Kap. 3.2.6) bestätigte, dass die unique-Domäne sehr flexibel ist. Im Bereich der unique-Domäne konnten keine Kopplungskonstanten ermittelt werden, die auf das Vorhandensein von regulären Sekundärstrukturelementen wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblättern hinwiesen.

#### **4.2.2 Die SH3-Domäne enthält fünf antiparallele $\beta$ -Faltblattstränge**

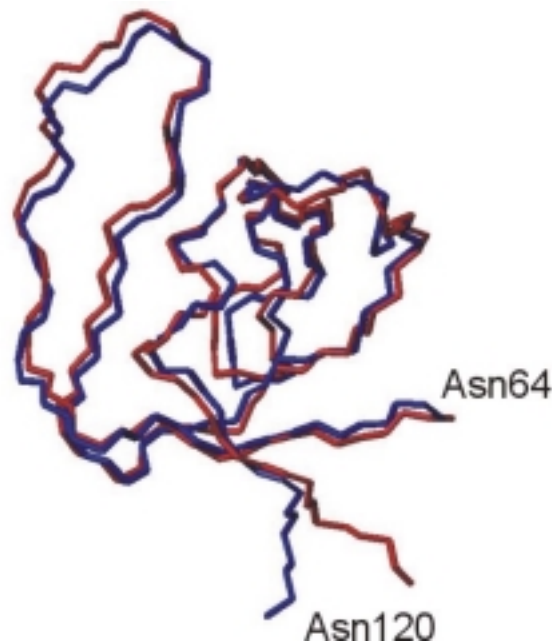
Im Gegensatz zur unique-Domäne ist die Struktur der SH3-Domäne der Lck sehr gut definiert. Nur in sehr kurzen Sequenzabschnitten fallen die Werte für den Hetero-NOE unter 0,6. Dies sind im RT-Loop die Bereiche Ser75 bis Asp77, am Anfang des  $\beta$ -Faltblattstranges  $\beta\text{B}$  Gln87, welches Bestandteil eines  $\beta$ -Turns ist, im n-src Loop Ser94 bis Glu96 und im C-terminalen Bereich die Aminosäuren Lys118 bis Asn120 (Kap. 3.2.7).

Die Strukturberechnungen ergaben eine typische SH3-Faltung, bestehend aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Strängen (Kap. 3.3). Diese sind zu zwei nahezu rechtwinklig gelegenen  $\beta$ -Faltblättern angeordnet. Dabei wird das erste Faltblatt durch die Stränge  $\beta\text{A}$  und  $\beta\text{E}$  sowie einer Hälfte des Stranges  $\beta\text{B}$  gebildet. Das andere Faltblatt besteht aus der zweiten Hälfte von  $\beta\text{B}$  und den Strängen  $\beta\text{C}$  und  $\beta\text{D}$  (Abb. 3.10, **A**).

Der RT-Loop, der die Stränge  $\beta\text{A}$  und  $\beta\text{B}$  miteinander verbindet, und der n-src-Loop, welcher die Stränge  $\beta\text{C}$  und  $\beta\text{D}$  verknüpft, zeichnen sich durch erhöhte Flexibilität aus. Dies zeigt sich nicht nur in den erniedrigten Hetero-NOE Werten, sondern wird auch deutlich durch erhöhte Abweichungen der mittleren Koordinaten des Proteinerückgrates (Abb. 3.11, **A**).

Der Vergleich mit dem SH3-Teil des SH3-SH2-Domänenpaares der von Eck et al. (1994) gelösten Kristallstruktur zeigt nur sehr wenige Unterschiede (Abb. 4.1).





#### Abb. 4.1: Vergleich der NMR- und der Kristallstruktur der Lck-SH3-Domäne

In blau ist die NMR-Struktur (die energieärmste Struktur aus einer Schar von 25) und in rot die Kristallstruktur der Lck-SH3 Domäne dargestellt.

Auffällig ist hier lediglich der Bereich von Phe113 bis Phe115, der in der Kristallstruktur eine Windung einer  $3_{10}$ -Helix ausbildet. Diese war bei der in dieser Arbeit berechneten Schar nur in zwei Strukturen zu finden (Abb. 3.10, A). Zwar konnten typisch helikale NOEs ( $H_{\alpha}113 \leftrightarrow H_N 116$  und  $H_{\beta 2}112 \leftrightarrow H_N 115$ ) gefunden werden, diese reichen aber offensichtlich nicht aus, diese Reste in einer idealen  $3_{10}$ -Helix zu stabilisieren. Diese Helix wurde auch in einer anderen NMR-Untersuchung zur SH3-Domäne der Lck nicht gefunden (Hiroaki et al., 1996), was darauf hindeutet, dass die Kristallausbildung diesen Bereich zusätzlich in einer  $3_{10}$ -helikalen Konformation stabilisiert. In der Tat liegt das SH3-SH2-Domänenpaar im Kristall als Dimer vor, wobei jeweils Reste der SH3-Domäne eines Moleküls mit der SH2-Domäne eines anderen die Dimer-Kontaktfläche bilden. Dabei sind in der SH3-Domäne auch Reste dieser Helix-Windung involviert (Eck et al., 1994).

Weitere geringe Unterschiede finden sich in den flexiblen Bereichen des RT-Loops und des n-src-Loops. Werden diese Bereiche bei der Berechnung des rmsd-Wertes zwischen der Kristallstruktur und der mittleren Lösungsstruktur ausgeschlossen, so sinkt dieser von 1,05 Å auf 0,59 Å.

### 4.3 Eine flexible unique-Domäne erhöht den Aktionsradius der Lck

Die Mitglieder der src-Familie der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen haben eine gemeinsame Architektur (Abb. 1.5). Alle Proteine besitzen am N-Terminus eine kurze Region von etwa zehn Aminosäuren, die für die Membranverankerung vonnöten ist (Shenoy-Scaria et al., 1993; Silverman & Resh, 1992), gefolgt von der unique-Domäne, welche keine konservierten Bereiche zeigt.

Über biologische Funktionen der unique-Domäne gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse. Neben der Assoziation mit verschiedenen Effektormolekülen (CD4 oder CD8 für Lck) wurde gefunden, dass die unique-Domäne der Lck einen Einfluss hat bei der Selektion ihrer spezifischen Kinase-Substrate. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion der unique-Domäne die Fähigkeit der Lck geschwächt wird, den IL-2 Promotor zu induzieren (Carrera et al., 1995).

Aus den strukturellen Daten, die im Rahmen dieser Arbeit zur unique-Domäne gewonnen wurden, lässt sich eine weitere mögliche Funktion ableiten. Die Lck ist durch die Myristylierung fest mit der Membran und über die unique-Domäne mit CD4 oder CD8 assoziiert. Neben diesen Wechselwirkungen sind aber noch eine ganze Reihe weiterer Interaktionspartner gefunden worden. Einen Überblick gibt Tabelle 4.1 mit den jeweiligen Referenzen.

**Tab. 4.1:** Übersicht über Proteine, die mit Lck interagieren (nach Isakov & Biesinger, (2000).

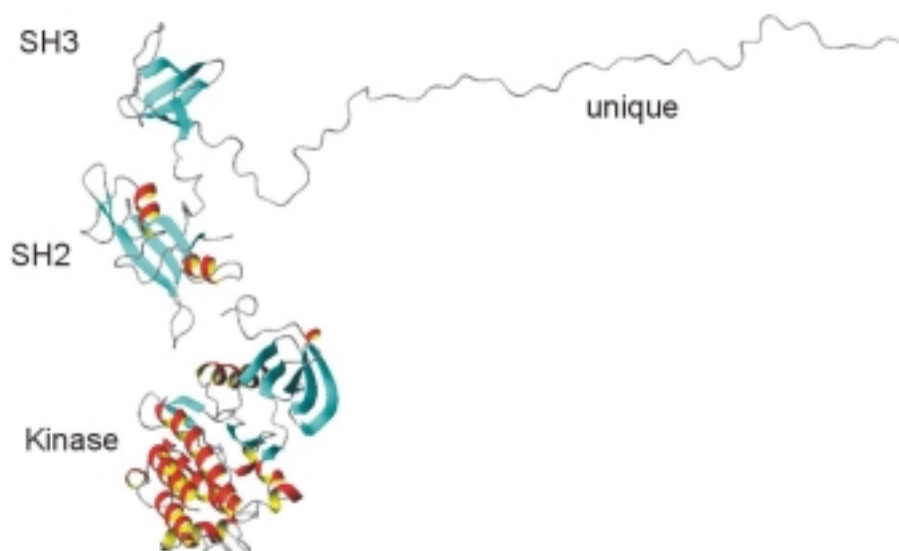
Interaktionspartner	Referenz
<b>Zelloberflächenrezeptor-Moleküle</b>	
CD2	(Bell et al., 1996)
CD4	(Veillette et al., 1988)
CD5	(Raab et al., 1994)
CD8	(Veillette et al., 1988)
CD44	(Ilangumaran et al., 1998)

Interaktionspartner	Referenz
<b>Effektor-Moleküle</b>	
PI-3 Kinase	(Prasad et al., 1993)
PI-4 Kinase	(Prasad et al., 1993)
Vav	(Gulbins et al., 1993)
ras GAP	(Amrein et al., 1992)
p120	(Reedquist et al., 1994)

CD45	(Bruyns et al., 1998)
IL-2 Rezeptor	(Minami et al., 1993)
IL-7 Rezeptor	(Page et al., 1995)

LckBP1	(Takemoto et al., 1995)
<b>andere Protein-Kinasen</b>	
Cdc2	(Pathan et al., 1996)
Raf-1	(Popik & Pitha, 1996)
ZAP-70	(Duplay et al., 1994)
Syk	(Ting et al., 1995)

Durch die Assoziation mit der Membran wäre die Lck eingeschränkt, manche der potentiellen Wechselwirkungspartner räumlich zu erreichen. Zwar ist eine laterale Diffusion in der Membran möglich, doch ist sie durch die Assoziation mit einem CD4 oder CD8 Molekül auch mit dem T-Zell Rezeptor verbunden. Durch einen langen flexiblen Bereich, wie er für die unique-Domäne gefunden wurde, wird es dem Molekül ermöglicht, in einem räumlich deutlich größeren Bereich mit anderen Proteinen Wechselwirkungen einzugehen. Beträgt der Durchmesser für die SH3-Domäne nur etwa 30 Å und für die SH2-Domäne 40 Å, so könnte die unique-Domäne in gestreckter Konformation eine Länge von etwa 160 Å erreichen.



**Abb. 4.2: Schematischer Größenvergleich der Lck-Domänen**

Die Darstellung der unique- und der SH3-Domäne entstammt dieser Arbeit. Es ist zu beachten, dass die Abbildung der unique-Domäne nur eine von nahezu unbegrenzt vielen möglichen Konformationen zeigt. Die SH2- und die Kinase-Domäne sind der Protein Data Bank entnommen. (Zugriffscodes: 1lck für das SH3-SH2-Domänenpaar (Eck et al., 1994) und 1qpc für die Kinase-Domäne (Zhu et al., 1999).

Insbesondere die Vielzahl der Zelloberflächenrezeptor-Moleküle, für die Wechselwirkungen mit der Lck gefunden wurden (siehe Tab. 4.1), legen diese Hypothese nahe, da diese selbst mit der Membran assoziiert und nicht wie cytosolische Proteine frei beweglich in allen drei Dimensionen sind. Darüber hinaus muss auch gewährleistet sein, dass die Kinase-Domäne alle Substrate erreichen kann, wie z.B. die ITAMs in den  $\zeta$ -Ketten des T-Zell Rezeptors.

Die Bemühungen, nach erfolgter Sequenzierung ganzer Genome die Daten auf Proteinebene zu entschlüsseln („Proteomics“) machen deutlich, dass offenbar ein großer Teil der Gensequenzen nicht für gefaltete, globuläre Proteine kodieren, sondern für lange Abschnitte an Aminosäuren, die vermutlich in Lösung eine unbekannte, nicht globuläre Konformation einnehmen (Wright & Dyson, 1999). Mit Verbesserung der spektroskopischen Methoden (NMR, CD-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie) ist es inzwischen möglich, auch solche ungefalteten Zustände zu untersuchen und zu charakterisieren, in der Literatur sind viele Beispiele zu diesem Thema erschienen.

Da viele Proteine einer induzierten Faltung bei Bindung eines Interaktionspartners unterliegen, ist ein solcher Mechanismus auch an dieser Stelle zu diskutieren. Demnach wäre vorstellbar, dass in der unique-Domäne bei Bindung an die cytoplasmatische CD4-Domäne reguläre Sekundärstruktur induziert wird. Die ersten strukturellen Untersuchungen zu diesem Komplex (Kap. 3.10.1) gaben allerdings bisher nur geringe Hinweise auf Bildung von Sekundärstruktur oder einer Änderung der globalen Konformation in der unique-Domäne. Es ist allerdings nicht zu vergessen, dass *in vivo* die unique-Domäne über einen Myristylrest mit der Membran assoziiert ist und diese Wechselwirkungen durchaus einen Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften der unique-Domäne haben können.

#### **4.4 Die unique-Domäne nimmt auf die Bindung von Poly-Prolin Motiven an die SH3-Domäne keinen Einfluss**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung eines mittels Phagendisplay selektierten Peptides an die SH3-Domäne der Lck untersucht (Kap. 3.4.1.1). Das für die Experimente ausgewählte Peptid kann mit der Sequenz HVTFPQHPPRTV als ein Klasse-II Ligand angesehen werden. Klasse-I und Klasse-II SH3-Liganden sind pseudosymmetrisch und binden in entgegengesetzte Richtungen (Feng et al., 1994) an eine SH3-Domäne. Die Konsensus-Motive für Klasse-I und Klasse-II Liganden sind  $+p\Psi Pp\Psi P$  und  $\Psi Pp\Psi Pp+$  (Sparks et al., 1996), ein  $\Psi$  repräsentiert aliphatische und ein  $+$  basische Reste.

Die Prolin-reiche Region von HIV-1 Nef bindet ebenfalls an SH3-Domänen in einer Klasse-II Orientierung (Lee et al., 1996; Arold et al., 1997). Die Ähnlichkeit der Wechselwirkungen von HIV-1 Nef mit der Lck SH3-Domäne und der Bindung des durch Phagendisplay selektierten Peptides konnte durch NMR-Titrationsexperimente und die Identifizierung der an der Bindung beteiligten Reste gezeigt werden (Kap. 3.4.1.1 und 3.4.1.2). Demnach interagieren nur Reste in der SH3-Domäne mit der Prolin-reichen Region. Wie durch die HSQC-Titrationen gezeigt werden konnte (Abb. 3.15 und 3.16), nimmt die unique-Domäne der Lck keinerlei Anteil an den Wechselwirkungen, da für Resonanzen der unique-Domäne keine Veränderungen bei Zugabe der Prolin-reichen Liganden beobachtet wurden.

Interessanterweise binden sowohl das kurze selektierte Peptid als auch das vollständige Nef-Protein in gleicher Weise an die Lck SH3-Domäne (Kap. 3.4.1.2). Wenn Nef in identischer Weise an LckSH3 wie an die SH3-Domäne von Fyn binden würde, hätte man Unterschiede in den beeinflussten Resten in der Lck erwarten können, da an der Nef-Fyn Interaktion auch Nef-Reste beteiligt sind, die zur Core-Region gehören, und nicht nur solche, die unmittelbar zur Poly-Prolin Helix gehören (Arold et al., 1997). Ein Vergleich der korrespondierenden, an der Nef-Bindung beteiligten Sequenzelemente von Lck und Fyn kann erklären, dass ein Teil dieser zusätzlichen Interaktionen der Nef Core-Domäne zwar in Fyn, aber nicht bei der Lck beobachtet werden können. In der Kristallstruktur des Nef-Fyn Komplexes (Arold et al., 1997) wurden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Arg96 in Fyn und den Nef-Resten Phe90, Trp113 und Ile114 beobachtet. Die in der Lck zu diesem Arg96 homologe Sequenzposition ist das Ser70, welches aufgrund seiner kurzen polaren Seitenkette diese Wechselwirkungen jedoch nicht zeigen kann.

#### **4.5 Die Zink-Affinitäten für Lck und CD4 erlauben eine optimale Regulation der Assoziation**

Mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden ist es gelungen, die Zink-Bindung an beide Komponenten des Lck-CD4 Komplexes (Kap. 3.4.2.1 und 3.5.1) nachzuweisen sowie die Zink-Abhängigkeit der Komplexbildung zu bestätigen. Darüber hinaus konnten die Dissoziationskonstanten sowohl für die Zink-Lck- als auch die Zink-CD4-Bindung auf etwa 20  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Zusätzlich war es möglich, eine Dissoziationskonstante für Lck und CD4 in Anwesenheit von Zink zu ermitteln. Ein  $K_D$ -Wert von 0,35  $\mu\text{M}$  offenbarte eine hohe Affinität dieser Komponenten füreinander (Kap. 3.5.2). Die Tatsache, dass die Affinitäten für

Zink für beide Komponenten des Komplexes etwa gleich groß ist und damit im Bereich der physiologischen Zellkonzentration liegt (Lippard & Berg, 1995), weist darauf hin, dass die Assoziation einer effektiven Kontrolle unterliegen könnte. So würden schon leichte Veränderungen der Zink-Konzentration in der Zelle das Verhältnis von gebundener und ungebundener Form verschieben. Ob dies von physiologischer Bedeutung ist, kann an dieser Stelle leider nicht geklärt werden.

Bei den NMR-Titrationsexperimenten von Lck und Zink wurde auch die Beeinflussung von Resten in der SH3-Domäne festgestellt (Abb. 3.18). Insbesondere in der Region um His70 wurden leichte Verschiebungen der Resonanzen bei steigender Zinkkonzentration bestimmt. Dies lässt vermuten, dass die Zinkzugabe auch diese Region strukturell beeinflusst. Ob die unique-Domäne bei Zink-Bindung eine Konformation einnimmt, die mit dem His70 interagiert oder ob das His70 selbst Zink binden kann, werden spätere Untersuchungen am zinkvermittelten Lck-CD4 Komplex zeigen können.

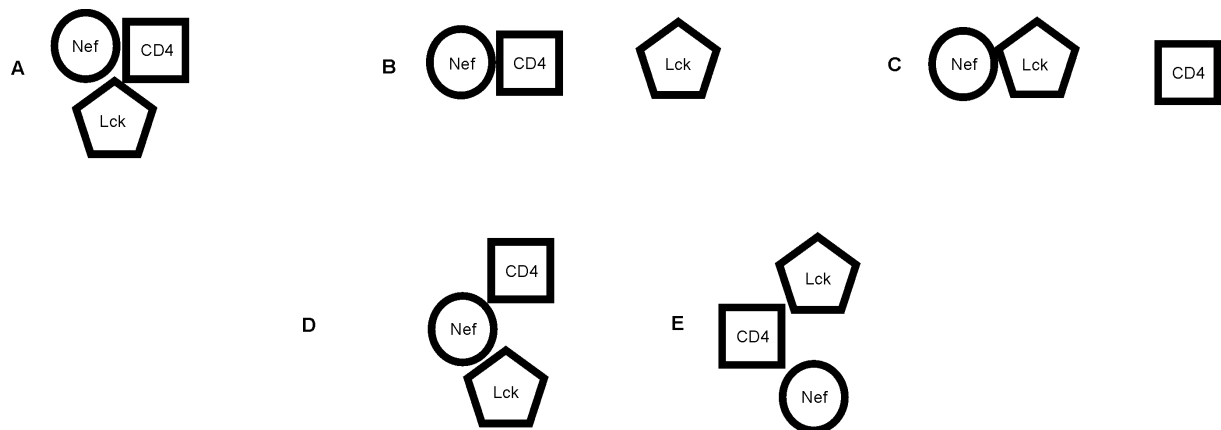
#### **4.6 Die Bindung von CD4 und HIV-1 Nef an die Lck ist nicht kompetitiv**

Eine der wichtigsten Funktionen von HIV-1 Nef ist der Abbau des HIV-Hauptrezeptors CD4 von der Oberfläche der Zelle unmittelbar nach erfolgter Infektion. Hierfür ist eine direkte Interaktion mit Resten der cytoplasmatischen Domäne von CD4 notwendig (Salghetti et al., 1995). Der Nef-induzierte Abbau von CD4 hat zur Folge, dass der Komplex von Lck und CD4 an der Innenseite der Membran dissoziiert, damit das CD4-Molekül dem lysosomalen Abbau zugeführt werden kann. Der genaue Mechanismus des Nef-induzierten CD4-Abbaus ist noch immer nicht bekannt. Salghetti et al. (1995) konnten mit Hilfe von Mutationsstudien die für den Abbau notwendigen Reste in der cytoplasmatischen Domäne von CD4 bestimmen. Dabei stellten sie fest, dass einige Reste nicht nur für eine Nef-CD4-Interaktion notwendig sind, sondern ebenfalls zur Bindung des CD4-Lck Komplexes benötigt werden.

Einige Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sich ein ternärer Komplex aus Nef, CD4 und Lck bilden kann. Mit Hilfe von HSQC-Titrationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Nef und die Lck nur über die bekannte Poly-Prolin-SH3 Wechselwirkung interagieren. Eine Beteiligung von Resten der unique-Domäne wurde nicht gefunden (Kap. 3.4.1.2). Die unique-Domäne steht demnach weiterhin für eine CD4-Bindung zur Verfügung. Zusätzlich wurde bei der CD4-Bindung an die Lck keine Beteiligung der SH3-Domäne festgestellt. Sie wäre also weiterhin für eine Nef-Interaktion zugänglich. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen wurde gezeigt, dass sich die Affinität von Nef zu einem schon

bestehenden Komplex aus CD4<sub>(394-433)</sub> und Lck etwa verdoppelt ( $K_D$ -Änderung von 0,87  $\mu\text{M}$  auf 0,47  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zur Affinität von Nef zu CD4<sub>(403-433)</sub> (Kap. 3.10.2). Es ist allerdings an dieser Stelle zu beachten, dass es prinzipiell mehrere Möglichkeiten gibt, wie eine Änderung des Fluoreszenzsignals bei der durchgeführten Titration entsteht, da alle Komponenten miteinander wechselwirken konnten:

- Es entsteht ein ternärer Komplex, in dem Nef sowohl mit CD4 als auch mit der Lck SH3-Domäne interagiert, gleichzeitig aber auch CD4 mit der Lck unique-Domäne (Abb. 4.3, **A**).
- Nef bindet an CD4 und verdrängt die Lck (Abb. 4.3, **B**).
- Nef bindet an die Lck SH3-Domäne und verdrängt CD4 (Abb. 4.3, **C**).
- Es bildet sich ein ternärer Komplex, bei dem ein Nef-Molekül sowohl ein CD4- als auch ein Lck-Molekül bindet (Abb. 4.3, **D**).
- Es bildet sich ein ternärer Komplex, bei dem ein CD4-Molekül sowohl ein Lck- als auch ein Nef-Molekül bindet (Abb. 4.3, **E**).



**Abb. 4.3:** Schema der sich ergebenden Möglichkeiten der Interaktionen von HIV-1 Nef, CD4 und Lck

Aus Abb. 3.29 ist zu erkennen, dass die letzten beiden Messpunkte möglicherweise einen erneuten Anstieg der Steigung der Titrationskurve einleiten. Im Experiment war die LckU3-Konzentration gegenüber der CD4-Konzentration etwa 3fach erhöht, um eine Absättigung der CD4-Moleküle im Komplex zu gewährleisten. Am Ende der Titration war das Verhältnis Nef:CD4 etwa 3:1, das Verhältnis Nef:Lck jedoch nur 1:1. Es wäre vorstellbar, dass die

letzten beiden Messpunkte den Beginn einer zweiten Titrationskurve einleiten, die die Bindung zwischen Nef und Lck widerspiegeln würde.

Grzesiek et al. konnten ebenfalls die Bindung von CD4 an Nef auch dann nachweisen, wenn Nef mit der SH3-Domäne von Hck komplexiert war und fanden ebenso eine Erhöhung der Affinität von Nef zu CD4 (Grzesiek et al., 1996b). Da allerdings eine Bindung der Hck an CD4 in der Literatur nicht beschrieben ist (dieses würde dem Schema in Abb. 4.3, **E** entsprechen), darf vermutet werden, dass die Interaktion zwischen Nef, CD4 und der Lck nach dem Schema, wie es in Abb. 4.3, **D** gezeigt ist, stattfindet. Die Tyrosin-Kinase Hck wird nur in Makrophagen exprimiert, nicht jedoch in T-Zellen. Es kann daher angenommen werden, dass in T-Zellen die Lck der bevorzugte Bindungspartner ist und die Interaktion von Nef-LckSH3 die Ursache dafür ist, dass Nef Signal-Transduktionswege beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Bindung von CD4 und Lck an Nef nicht nur miteinander kompatibel, sondern sogar kooperativ sind. Offensichtlich erhöht die Interaktion von Nef mit einer SH3-Domäne die Affinität zu CD4. Da sowohl Nef als auch die Lck einen langen flexiblen N-Terminus, der auch in der Länge ähnlich ist, besitzen, und beide durch Myristylierung mit der Membran assoziiert sind, könnte diese Region dazu beitragen, dass das Nef-Poly-Prolin Motiv und die Lck-SH3-Domäne ideal miteinander wechselwirken können (Arold & Baur, 2001).

Zukünftige Untersuchungen an einem ternären Komplex, für die im Rahmen dieser Arbeit alle notwendigen Vorarbeiten geleistet werden konnten, werden sicher zum Verständnis des Nef-induzierten CD4-Abbaus wertvolle Hinweise geben.

#### **4.7 Die N-terminale Region in HIV-1 Nef erhöht die Affinität für CD4 um ein Vielfaches**

Für die Bindung des vollständigen Nef-Proteins an CD4<sub>(403-433)</sub> wurde ein  $K_D$ -Wert bestimmt, der etwa 1000fach niedriger (0,87  $\mu$ M) war als der, der von Grzesiek et al. (1996b) für die Bindung der Nef-Mutanten Nef <sup>$\Delta$ 2-39</sup> und Nef <sup>$\Delta$ 2-39,159-173</sup> an CD4<sub>(407-419)</sub> gemessen wurde (Abb. 3.26), (Preusser et al., 2001). Unterschiede in diesen beiden Untersuchungen bestanden auf der einen Seite in der Länge des verwendeten CD4-Peptides und auf der anderen Seite in der Vollständigkeit des Nef-Proteins. Die Möglichkeit, dass der C-terminale Schwanz der cytoplasmatischen CD4-Domäne eine Rolle bei der Nef-Bindung spielt, kann durch viele Mutationsstudien ausgeschlossen werden (Aiken et al., 1994; Anderson et al., 1994; Garcia et



al., 1993; Rossi et al., 1996; Salghetti et al., 1995). Hiernach sind die Reste 407 bis 418 notwendig und ausreichend für einen Nef-induzierten CD4-Abbau. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann diese Aussage grundlegend bestätigt werden, allerdings liefern die Reste, die N- und C-terminal von dieser Region liegen, einen geringen Beitrag zur Bindung.

So zeigte die Bestimmung des  $K_D$ -Wertes von 1,4  $\mu\text{M}$  für die Bindung der C-terminal verkürzten Variante ( $\text{CD4}_{(403-419)}$ ), dass die Reste 420 bis 433 nur eine untergeordnete Rolle bei der Nef-Bindung spielen (Abb. 3.26). Ein  $K_D$ -Wert von 3,3  $\mu\text{M}$  für die Bindung von  $\text{CD4}_{(407-419)}$  an Nef ließ erkennen, dass das Fehlen der vier N-terminalen Reste noch einmal die Affinität um etwa einen Faktor zwei herabsetzt und damit die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix mit dem Gln403 als Helix-Cap (Willbold & Rösch, 1996) an dieser Stelle die Prädisposition für die Nef-Bindung erhöht, wie dies auch schon von Gratton et al. (1996) diskutiert wurde. Entscheidend an dieser Stelle aber ist der Anteil an der Bindung, der vom Nef N-Terminus ausgeht. Das Fehlen der ersten 40 Reste verringert die Affinität der beiden Komponenten zueinander um das 300fache, so dass diese Reste neben den von Grzesiek et al. (1996b) gefundenen einen erheblichen Beitrag für die Interaktion liefern. In Tabelle 4.2 sind die experimentell bestimmten Dissoziationskonstanten mit den CD4-Sequenzen zusammengefasst.

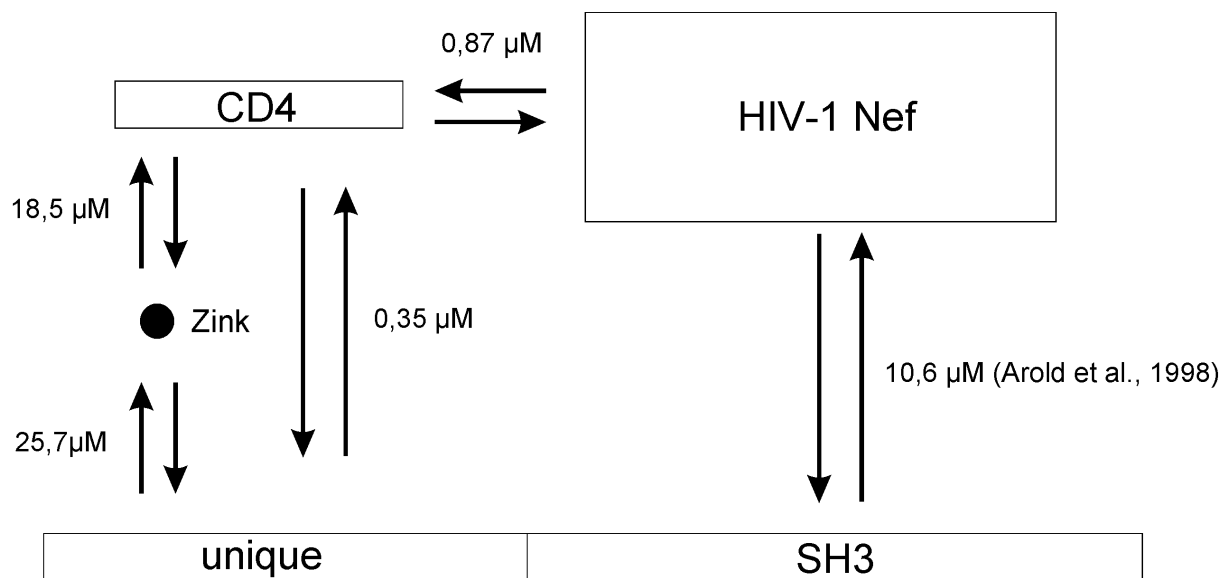
**Tab. 4.2:** Zusammenfassung der ermittelten Dissoziationskonstanten für die Nef-CD4 Interaktion

CD4-Variante	Sequenz	experimentell bestimmter $K_D$
$\text{CD4}_{(403-433)}$	QAERMSQIKRLLSEKKTCQCPHRFQKTCSPI	0,87 $\mu\text{M}$
$\text{CD4}_{(403-419)}$	QAERMSQIKRLLSEKKT	1,4 $\mu\text{M}$
$\text{CD4}_{(407-419)}$	MSQIKRLLSEKKT	3,3 $\mu\text{M}$
$\text{CD4}_{(\text{LLAA})}$	QAERMSQIKR <b>AA</b> SEKKT	-

Die gefundene hohe Affinität zwischen Nef und CD4 lässt allerdings vermuten, dass ihre Bindung einer strengen Kontrolle unterliegt, da Nef die CD4-Moleküle dem endocytotischen Abbau zuführt. Sofern ein Nef-Molekül mehrere CD4-Moleküle abbauen kann, müsste also auch wieder eine Dissoziation erfolgen.

In der Tat wird seit kurzem in der Literatur diskutiert, dass Nef in einer Art Zyklus verschiedene Konformationen annehmen könne. Je nach Konformation sei es dadurch, in Abhängigkeit von der zu erfüllenden Funktion, entweder an der Membran oder im Cytosol lokalisiert (Arold & Baur, 2001). So wird vermutet, dass eine 'geschlossene' Konformation, bei der der lange flexible N-Terminus und die Loop-Region sich um die Core-Domäne legen und dabei verschiedene Bindungsstellen verdecken, im Cytosol lokalisiert sei. Im Gegensatz dazu stehe die 'offene Form', bei der der Myristylrest mit der Membran assoziieren kann und damit die Interaktionsstellen für z.B. Signalmoleküle freigelegt würden.

In Abbildung 4.4 sind die in dieser Arbeit gefundenen Dissoziationskonstanten und Wechselwirkungen zwischen LckU3, HIV-1 Nef und der cytoplasmatischen Domäne von CD4 in einem Schema noch einmal zusammengefasst dargestellt. Für alle Lck-Interaktionen ist es zusätzlich gelungen, auch strukturelle Informationen zu gewinnen. Es sind damit alle binären Wechselwirkungen der an einem ternären Komplex beteiligten Moleküle untersucht worden.



**Abb. 4.4:** Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen der Lck, der cytoplasmatischen Domäne von CD4 und HIV-1 Nef

---

## 4.8 Ausblick

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sollte es bald möglich sein, die Struktur des Lck-unique-CD4 Komplexes aufzuklären. Lösungsbedingungen wurden bereits gefunden und Expressionssysteme und Reinigungsprotokolle für die zugehörigen Komponenten etabliert. Strukturelle Kenntnisse über diesen Komplex würden sicher auch das Verständnis zum Nef-induzierten CD4-Abbau verbessern können. Ein wichtiges Ziel wäre es, die Existenz eines ternären Komplexes von Lck, Nef und CD4 nachzuweisen und seine Eigenschaften eingehender zu untersuchen. Die Interaktion dieser Moleküle stellt ein Schlüsselereignis bei der HIV-Infektion dar, an dieser Stelle findet das Eingreifen in zelluläre Signaltransduktionswege statt. Auf der Basis neugewonnener struktureller Informationen sollte es möglich sein, die Entwicklung neuer Therapieansätze gegen das Fortschreiten einer HIV-Infektion und die Ausprägung AIDS-typischer Symptome voranzutreiben. In den letzten Jahren wurde zunehmend das therapeutische Potential erkannt, das von den akzessorischen HIV-Proteinen ausgeht, und insbesondere das Nef-Protein, das einen entscheidenden Anteil an der hohen Infektiosität des Virus hat, stellt einen aussichtsreichen Kandidaten dar. Der Nachweis der Nef-CD4 Bindung durch fluoreszenzspektroskopische Methoden, wie er in dieser Arbeit beschrieben wurde (Kap. 3.5), ist möglicherweise in dieser oder einer abgewandelten Form dazu geeignet, in Hochdurchsatzverfahren nach Substanzen zu suchen, die diese Interaktion beeinträchtigen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die beiden amino-terminalen Domänen der Lymphocyten Spezifischen Kinase (unique- und SH3-Domäne, LckU3) mittels NMR-Spektroskopie in Lösung strukturell zu charakterisieren. Auf Basis dieser NMR-Untersuchungen war es möglich, die Wechselwirkungen von LckU3 mit verschiedenen Bindungspartnern auf atomarer Ebene zu verfolgen. Darüber hinaus wurden neue Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen dem HIV-1 Protein Nef und dem HIV Hauptrezeptor CD4 gewonnen.

Die unique- und die SH3-Domäne der Lck wurden in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt. Die Untersuchung von LckU3 mittels NMR-Spektroskopie zeigte, dass die unique-Domäne in wässriger Lösung unstrukturiert vorliegt. Für die SH3-Domäne wurde die dreidimensionale Struktur in Lösung mit hoher Präzision bestimmt.

Mit Hilfe von  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrationsexperimenten konnten die Bindung eines durch Phagendisplay selektierten SH3-Liganden sowie die Interaktion von HIV-1 Nef mit der Lck SH3-Domäne nachgewiesen und diese charakterisiert werden. Ebenso wurde die zinkvermittelte Interaktion der Lck unique-Domäne mit der cytoplasmatischen CD4-Domäne gezeigt. Sowohl CD4 als auch die unique-Domäne binden spezifisch Zink mit einer Affinität, die eine optimale Regulation der Lck-CD4 Assoziation in der Zelle erlaubt. Mit Hilfe von Fluoreszenztitrationmessungen wurde der  $K_D$  der Lck-CD4 Interaktion auf  $0,35\ \mu\text{M}$  bestimmt. Darüber hinaus wurden experimentelle Bedingungen gefunden, die eine eingehende Charakterisierung des Lck-CD4 Komplexes ermöglichen werden.

Die Untersuchung der Bindung von HIV-1 Nef an CD4 sowohl mit NMR- als auch fluoreszenzspektroskopischen Methoden zeigte, dass bislang unbeachtete Reste im N-terminalen Bereich des Nef-Proteins einen erheblichen Anteil an der CD4-Interaktion haben und die Affinität von Nef zu CD4 um etwa das 300fache erhöhen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, alle binären Interaktionen zwischen der Lymphocyten Spezifischen Kinase, dem Oberflächenrezeptor CD4 und dem HIV-1 Protein

Nef eingehend zu untersuchen und zu charakterisieren. Da keine dieser Interaktionen kompetitiv sind, wurde die Existenz eines ternären Komplexes diskutiert.

## 6 SUMMARY

In the present work, the two N-terminal domains of the lymphocyte specific kinase (unique- and SH3-domains, LckU3) were characterized structurally by NMR spectroscopy. Thus, it was possible to examine the interactions of LckU3 with various ligands on an atomic level. Moreover, this work resulted in new insights into the interactions of the HIV-1 protein Nef and the HIV main receptor CD4.

Lck unique and SH3 domains were overexpressed in *E. coli* and subsequently purified. Using NMR spectroscopy, the unique domain was found to be unstructured in aqueous solution. A high resolution three-dimensional structure of the SH3-portion of the molecule could be determined.

Binding of a phage display selected SH3 ligand and the interaction of HIV-1 Nef to the Lck SH3 domain could be demonstrated and were characterized by the use of  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC titration experiments. Likewise, the zinc mediated interaction of the Lck unique domain and the cytoplasmic CD4 domain was shown. CD4 as well as the unique domain bind zinc with an affinity which would allow an optimal Lck-CD4 association in the cell. Using fluorescence titration experiments, a  $K_D$  value of 0,35  $\mu\text{M}$  was determined for the association of the Lck-CD4 complex. Furthermore, experimental conditions were found which will enable a full characterization of the complex in the future.

Applying nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopy, it could be demonstrated that additional, so far disregarded residues in the N-terminal portion of HIV-1 Nef are important for CD4 binding. These residues increased the binding affinity 300-fold.

In this work, all binary interactions of the lymphocyte specific kinase, the cell surface receptor CD4 and HIV-1 Nef were investigated and characterized. On the basis of these studies, the existence of a ternary complex has been discussed.

---

**7 LITERATURVERZEICHNIS**

- Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E. & Trono, D.** (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. **76**:853-864.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D.** (1994). Molecular Biology of the Cell. Garland publishing, Inc.
- Allison, J. P. & Lanier, L. L.** (1987). The structure, function and serology of the T cell antigen receptor complex. *Annu Rev Immunol*. **5**:503-540.
- Amrein, K. E., Flint, N., Panholzer, B. & Burn, P.** (1992). Ras GTPase-activating protein: a substrate and a potential binding protein of the protein-tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**:3343-3346.
- Anderson, S. J., Lenburg, M., Landau, N. R. & Garcia, J. V.** (1994). The cytoplasmic domain of CD4 is sufficient for its down-regulation from the cell surface by human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol*. **68**:3092-3101.
- Arold, S., Franken, P., Strub, M. P., Hoh, F., Benichou, S., Benarous, R. & 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., O'Brien, R., Franken, P., Strub, M. P., Hoh, F., Dumas, C. & Ladbury, J. E.** (1998). RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef. *Biochemistry*. **37**:14683-14691.
- Arold, S. T. & Baur, A. S.** (2001). Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends in Biochemical Sciences*. **26**:356-363.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, T., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezin-Brun, F., Rouzioux, C., Rosenbaum, W. & Montagnier, L.** (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. **220**:868.
- Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P. & Wüthrich, K.** (1995). The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J Biomol NMR*. **6**:1-10.

- Baur, A. S., Sass, G., Laffert, B., Willbold, D., Cheng Mayer, C. & 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.
- Bell, G. M., Fargnoli, J., Bolen, J. B., Kish, L. & Imboden, J. B.** (1996). The SH3 domain of p56lck binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2. *J Exp Med*. **183**:169-178.
- Briese, L., Hoffmann, S., Friedrich, U., Biesinger, B. & Willbold, D.** (2001). Sequence-specific  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  resonance assignments of lymphocyte specific kinase unique and SH3 domains. *J Biomol NMR*. **19**:193-194.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., J.-S., J., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L.** (1998). Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst*. **D54**:905-921.
- Bruyns, E., Kirchgessner, H., Meuer, S. & Schraven, B.** (1998). Biochemical analysis of the CD45-p56(lck) complex in Jurkat T cells lacking expression of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein. *Int Immunol*. **10**:185-194.
- Carrera, A. C., Paradis, H., Borlado, L. R., Roberts, T. M. & Martinez, C.** (1995). Lck unique domain influences Lck specificity and biological function. *J Biol Chem*. **270**:3385-3391.
- Clapham, P. R. & Weiss, R. A.** (1997). Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. *Nature*. **388**:230-231.
- Dalgeish, A. G., Beverly, P. C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. & Weiss, R. A.** (1984). The CD4(T4)Antigen is an Essential Component of the Receptor for the AIDS Retrovirus. *Nature*. **312**:763-767.
- Daniel, M. D., Kirchhoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K. & Desrosiers, R. C.** (1992). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science*. **258**:1938-1941.
- Delaglio, F., Gresziek, S., Vuister, G., Zhu, G., Pfeifer, J. & Bax, A.** (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing program based on UNIX pipes. *J Biol NMR*. **6**:277-293.
- Duplay, P., Thome, M., Herve, F. & Acuto, O.** (1994). p56lck interacts via its src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J Exp Med*. **179**:1163-1172.



- 
- Eck, M. J., Atwell, S. K., Shoelson, S. E. & Harrison, S. C.** (1994). Structure of the regulatory domains of the Src-family tyrosine kinase Lck. *Nature*. **368**:764-769.
- Feng, S., Chen, J. K., Yu, H., Simon, J. A. & Schreiber, S. L.** (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science*. **266**:1241-1247.
- Frankel, A. D. & 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., White, G., Foster, P. & Markham, P. D.** (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at a risk for AIDS. *Science*. **224**:500-503.
- Garcia, J. V., Alfano, J. & Miller, A. D.** (1993). The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 Nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4. *J Virol*. **67**:1511-1516.
- Garcia, J. V. & Miller, A. D.** (1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by Nef. *Nature*. **350**:508-511.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*. **182**:319-326.
- Glaichenhaus, N., Shastri, N., Littman, D. R. & Turner, J. M.** (1991). Requirement for association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell*. **64**:511-520.
- Goldsmith, M. A., Warmerdam, M. T., Atchison, R. E., Miller, M. D. & Greene, W. C.** (1995). Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol*. **69**:4112-4121.
- Gratton, S., Yao, X. J., Venkatesan, S., Cohen, E. A. & Sekaly, R. P.** (1996). Molecular analysis of the cytoplasmic domain of CD4: overlapping but noncompetitive requirement for lck association and down-regulation by Nef. *J Immunol*. **157**:3305-3311.
- Greenway, A., Azad, A., Mills, J. & McPhee, D.** (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds directly to Lck and mitogen-activated protein kinase, inhibiting kinase activity. *J Virol*. **70**:6701-6708.

- Grodberg, J. & Dunn, J. J.** (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol.* **170**:1245-1253.
- Grzesiek, S., Anglister, J. & Bax, A.** (1993). Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-Enriched Proteins by Isotropic Mixing of <sup>13</sup>C Magnetization. *J Mag Reson.* **101B**:114-119.
- Grzesiek, S., Bax, A., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Hu, J. S., Kaufman, J., Palmer, I., Stahl, S. J. & Wingfield, P. T.** (1996a). 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., Stahl, S. J., Wingfield, P. T. & Bax, A.** (1996b). The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry.* **35**:10256-10261.
- Gulbins, E., Coggeshall, K. M., Baier, G., Katzav, S., Burn, P. & Altman, A.** (1993). Tyrosine kinase-stimulated guanine nucleotide exchange activity of Vav in T cell activation. *Science.* **260**:822-825.
- Güntert, P., Dötsch, V., Wider, G. & Wüthrich K.** (1992). Processing of multi-dimensional NMR data with the new software PROSA. *J Biomol NMR.* **2**:619-629.
- Hiroaki, H., Klaus, W. & Senn, H.** (1996). Determination of the solution structure of the SH3 domain of human p56 Lck tyrosine kinase. *J Biomol NMR.* **8**:105-122.
- Hoxie, J. A., Alpers, J. D., Rackowski, J. L., Huebner, K., Haggarty, B. S., Cedarbaum, A. J. & Reed, J. C.** (1986). Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. *Science.* **234**:1123-1127.
- Huse, M., Eck, M. J. & Harrison, S. C.** (1998). A Zn<sup>2+</sup> ion links the cytoplasmic tail of CD4 and the N-terminal region of Lck. *J Biol Chem.* **273**:18729-18733.
- Ilangumaran, S., Briol, A. & Hoessli, D. C.** (1998). CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes. *Blood.* **91**:3901-3908.
- Isakov, N. & Biesinger, B.** (2000). Lck protein tyrosine kinase is a key regulator of T-cell activation and a target for signal intervention by Herpesvirus saimiri and other viral gene products. *Eur J Biochem.* **267**:3413-3421.
- Janeway, C. A. & Travers, P.** (1995). Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

- 
- Jessee, J.** (1986). New subcloning efficiency competent cells: $>10^6$  transformants/ $\mu\text{g}$ . *Focus*. **8/4**:9-10.
- Johnson, B. A. & Blevins, R. A.** (1994). NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J Biomol NMR*. **4**:603-614.
- Kay, L. E., Torchia, D. A. & Bax, A.** (1989). Backbone dynamics of proteins as studied by  $^{15}\text{N}$  inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*. **28**:8972-8979.
- Kestler, H. W. d., Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D. & Desrosiers, R. C.** (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*. **65**:651-662.
- Kleinig, H., Sitte, P. & Maier, U.** (1999). Zellbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- Koradi, R., Billeter, M. & Wuthrich, K.** (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph*. **14**:51-55, 29-32.
- Krauss, G.** (1997). Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. WILEY-VCH, Weinheim.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. & Hendrickson, W. A.** (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. **393**:648-659.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.
- Larson, S. M. & Davidson, A. R.** (2000). The identification of conserved interactions within SH3 domain by alignment of sequences and structures. *Protein Sci*. **9**:2170-2180.
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M.** (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*. **8**:477-486.
- Lee, C. H., Saksela, K., Mirza, U. A., Chait, B. T. & Kuriyan, J.** (1996). Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell*. **85**:931-942.
- Lin, R. S., Rodriguez, C., Veillette, A. & Lodish, H. F.** (1998). Zinc is essential for binding of p56(lck) to CD4 and CD8 $\alpha$ . *J Biol Chem*. **273**:32878-32882.
- Linge, J. P., O'Donoghue, S. I. & Nilges, M.** (2001). Assigning Ambiguous NOEs with ARIA. *Methods in Enzymology*. **339**:71-90.

- Lippard, S. & Berg, J.** (1995). Bioanorganische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Malissen, B. & Schmitt-Verhulst, A.-M.** (1993). Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex. *Curr Opin Immunol.* **44**:153-205.
- Meyer, O. & Schlegel, H. G.** (1983). Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **37**:277-310.
- Minami, Y., Kono, T., Yamada, K., Kobayashi, N., Kawahara, A., Perlmutter, R. M. & Taniguchi, T.** (1993). Association of p56lck with IL-2 receptor beta chain is critical for the IL-2-induced activation of p56lck. *EMBO J.* **12**:759-768.
- Müller, B., Restle, T., Reinstein, J. & Goody, R. S.** (1991). Interaction of fluorescently labeled dideoxynucleotides with HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry.* **30**:3709-37015.
- Page, T. H., Lali, F. V. & Foxwell, B. M.** (1995). Interleukin-7 activates p56lck and p59fyn, two tyrosine kinases associated with the p90 interleukin-7 receptor in primary human T cells. *Eur J Immunol.* **25**:2956-2960.
- Pardi, A., Billeter, M. & Wuthrich, K.** (1984). Calibration of the angular dependence of the amide proton-C alpha proton coupling constants, 3JHN alpha, in a globular protein. Use of 3JHN alpha for identification of helical secondary structure. *J Mol Biol.* **180**:741-751.
- Pathan, N. I., Geahlen, R. L. & Harrison, M. L.** (1996). The protein-tyrosine kinase Lck associates with and is phosphorylated by Cdc2. *J Biol Chem.* **271**:27517-27523.
- Popik, W. & Pitha, P. M.** (1996). Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 induces association of Lck and Raf-1 and activates Raf-1 by a Ras-independent pathway. *Mol Cell Biol.* **16**:6532-6541.
- Prasad, K. V., Kapeller, R., Janssen, O., Repke, H., Duke-Cohan, J. S., Cantley, L. C. & Rudd, C. E.** (1993). Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and PI 4-kinase binding to the CD4-p56lck complex: the p56lck SH3 domain binds to PI 3-kinase but not PI 4-kinase. *Mol Cell Biol.* **13**:7708-7717.
- Preusser, A., Briese, L., Baur, A. S. & Willbold, D.** (2001). Direct in vitro binding of full-length human immunodeficiency virus type 1 Nef protein to CD4 cytoplasmic domain. *J Virol.* **75**:3960-3964.
- Raab, M., Yamamoto, M. & Rudd, C. E.** (1994). The T-cell antigen CD5 acts as a receptor and substrate for the protein-tyrosine kinase p56lck. *Mol Cell Biol.* **14**:2862-2870.

- Reedquist, K. A., Fukazawa, T., Druker, B., Panchamoorthy, G., Shoelson, S. E. & Band, H.** (1994). Rapid T-cell receptor-mediated tyrosine phosphorylation of p120, an Fyn/Lck Src homology 3 domain-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:4135-4139.
- Reth, M.** (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature.* **338**:383.
- Rossi, F., Gallina, A. & Milanesi, G.** (1996). Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system. *Virology.* **217**:397-403.
- Saksela, K., Cheng, G. & 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<sup>+</sup> viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J.* **14**:484-491.
- Salghetti, S., Mariani, R. & Skowronski, J.** (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:349-353.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schägger, H. & von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry.* **166**:368-379.
- Shaka, A. J. & Keeler, J.** (1987). Broadband spin decoupling in isotropic lipids. *Prog NMR Spectroscopy.* **19**:49-192.
- Shaka, A. J., Keeler, J., Frenkiel, T. & Freeman, R.** (1983). An improved sequence for broadband decoupling: Waltz-16. *J Magn Reson.* **52**:335-338.
- Shaka, A. J., Lee, C. J. & Pine, A.** (1988). Iterative schemes for bilinear operators; application to spin decoupling. *J Magn Reson.* **77**:274-293.
- Shenoy-Scaria, A. M., Gauen, L. K., Kwong, J., Shaw, A. S. & Lublin, D. M.** (1993). Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Cell Biol.* **13**:6385-6392.
- Sicheri, F. & Kuriyan, J.** (1997). Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol.* **7**:777-785.
- Silverman, R. & Resh, M. D.** (1992). Lysine residues form an integral component of a novel NH<sub>2</sub>-terminal membrane targeting motif for myristylated pp60<sup>V-Src</sup>. *J Cell Biol.* **119**:415-425.

- Sparks, A. B., Rider, J. E., Hoffman, N. G., Fowlkes, D. M., Quillam, L. A. & Kay, B. K.** (1996). Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:1540-1544.
- States, D. J., Haberkorn, R. A. & Ruben, D. J.** (1982). A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J Magn Reson.* **48**:286-292.
- Takemoto, Y., Furuta, M., Li, X. K., Strong-Sparks, W. J. & Hashimoto, Y.** (1995). LckBP1, a proline-rich protein expressed in haematopoietic lineage cells, directly associates with the SH3 domain of protein tyrosine kinase p56lck. *EMBO J.* **14**:3403-3414.
- Ting, A. T., Dick, C. J., Schoon, R. A., Karnitz, L. M., Abraham, R. T. & Leibson, P. J.** (1995). Interaction between lck and syk family tyrosine kinases in Fc gamma receptor-initiated activation of natural killer cells. *J Biol Chem.* **270**:16415-16421.
- Turner, B. G. & Summers, M. F.** (1999). Structural Biology of HIV. *J Mol Biol.* **285**:1-32.
- Turner, J. M., Brodsky, M. H., Irving, B. A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M. & Littman, D. R.** (1990). Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell.* **60**:755-765.
- Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M. & Bolen, J. B.** (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell.* **55**:301-308.
- Vincent, M. J., Raja, N. U. & Jabbar, M. A.** (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of chimeric envelope glycoproteins bearing the cytoplasmic and anchor domains of CD4: role of the cytoplasmic domain in Vpu-induced degradation in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* **67**:5538-5549.
- Vuister, G. W. & Bax, A.** (1993). Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J(HN-Ha) coupling constants in <sup>15</sup>N-enriched proteins. *J Am Chem Soc.* **115**:7772-7777.
- Weil, R. & Veillette, A.** (1996). Signal transduction by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Curr Top Microbiol Immunol.* **205**:63-87.
- Willbold, D. & Rösch, P.** (1996). Solution structure of the human CD4 (403-419) receptor peptide. *J Biomed Sci.* **3**:435-441.

- 
- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A. & Strebel, K.** (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol.* **66**:226-234.
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L. & Sykes, B. D.** (1995).  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR.* **6**:135-140.
- Wright, P. E. & Dyson, H. J.** (1999). Intrinsically Unstructured Proteins: Re-assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *J Mol Biol.* **293**:321-331.
- Wüthrich, K.** (1986). NMR of Proteins and Nucleic Acids. John Wiley & Sons, New York.
- Zhu, X., Kim, J. L., Newcomb, J. R., Rose, P. E., Stover, D. R., Toledo, L. M., Zhao, H. & Morgenstern, K. A.** (1999). Structural analysis of the lymphocyte-specific kinase Lck in complex with non-selective and Src family selective kinase inhibitors. *Structure Fold Des.* **7**:651-661.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	Absorption
BMRB	<i>BioMagResBank</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
ct	<i>constant time</i>
d	Durchmesser
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus type 1</i>
HSQC	<i>hetero single quantum correlated spectroscopy</i>
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
INEPT	<i>insensitive nuclei enhanced by polarization transfer</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
K	Kelvin
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
$K_D$	Dissoziationskonstante
LB	Luria-Bertani Medium
Lck	Lymphocyten Spezifische Kinase
LckU3	unique und SH3-Domäne der Lck (Aminosäuren 1-121)
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i>
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA
nm	Nanometer



---

NMR	Magnetische Kernspinresonanz
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>protein data bank</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
ppm	<i>parts per million</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Einheit
µl	Mikroliter
UV	ultravioletter Spektralbereich
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
W	Watt

## 9 ANHANG

### 9.1 Plasmide

#### 9.1.1 Lcku3

atgggctgtggctgcagctcacacccggaagatgactggatggaaaacatcgatgtgtgt  
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----  
 taccgacaccgacgtcgagtggtggccttctactgacctacctttttagctacacaca

M G C G C S S H P E D D W M E N I D V C

gagaactgccattatcccatagtcccactggatggcaagggcacgctgctcatccgaaat  
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----  
 ctcttgacggtaatatgggtatcaggggtgacctaccgttcccgtgacgagtaggcttta

E N C H Y P I V P L D G K G T L L I R N

ggctctgaggtgctgggacccactggttacctacgaaggctccaatccgccggttcccca  
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----  
 ccgagactccacgcccctgggtgaccaatggatgcttccgaggttaggcggccgaaggggt

G S E V R D P L V T Y E G S N P P A S P

ctgcaagacaacctgggttatcgctctgcacagctatgagccctctcacgacggagatctg  
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----  
 gacgttctgttggaccaatagcgagacgtgtcgatactcgggagagtgctgcctctagac

L Q D N L V I A L H S Y E P S H D G D L

ggctttgagaagggggaacagctccgcatcctggagcagagcggcgagtggtggaaggcg  
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----  
 ccgaaactcttcccccttgtcgagggcgtaggacctcgtctcgcgctcaccaccttcccg

G F E K G E Q L R I L E Q S G E W W K A

cagtccttgaccacgggcccaggaaggcttcatccccttcaattttgtggccaaagcgaac  
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----  
 gtcagggactggtgcccggtccttccgaagtaggggaagttaaaacaccggtttcgcttg

Q S L T T G Q E G F I P F N F V A K A N

agc

---

tcg

S

**9.1.2 CD4<sub>(394-433)</sub>**

TGCGTTTCGTTGCCGTCACCGTCGTCGTCAGGCTGAACGTATGTCCCAGATCAAACGTCTG

--+-----+-----+-----+-----+-----+-----

ACGCAAGCAACGGCAGTGGCAGCAGCAGTCCGACTTGCATACAGGGTCTAGTTTGCAGAC

a C V R C R H R R R Q A E R M S Q I K R L

CTGTCCGAAAAGAAAACCTTGTTCAGTGTCCGCACCGTTTCCAGAAGACGTGCTCCCCGATC

--+-----+-----+-----+-----+-----+-----

GACAGGCTTTTCTTTTGAACAGTCACAGGCGTGGCAAAGGTCTTCTGCACGAGGGGCTAG

a L S E K K T C Q C P H R F Q K T C S P I

TAA

--+

ATT

a \*

**9.1.3 HIV-1 Nef (Stamm SF2)**

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTATGGGTGGATGGTCTGCTATAAGGGAAAAGAATG

-----+-----+-----+-----+-----+-----+

TACCCACCGTTTACCAGTTTTGCATCATACCCACCTACCAGACGATATTCCTTTCTTAC

a M G G K W S K R S M G G W S A I R E R M

AGACGAGCTGAGCCACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGTATCTCGAGAC

-----+-----+-----+-----+-----+-----+

TCTGCTCGACTCGGTGCTCGACTCGGTTCGTCGTCCTACCCACCCTCGTCATAGAGCTCTG

a R R A E P R A E P A A D G V G A V S R D

CTGGAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACTAATGCTGATTGTGCC

-----+-----+-----+-----+-----+-----+

GACCTTTTTGTACCTCGTTAGTGTTCATCGTTATGTCGTCGATGATTACGACTAACACGG

a L E K H G A I T S S N T A A T N A D C A

TGGCTAGAAGCACAAAGAGGAGGAAGAGGTGGGTTTTCCAGTCAGACCTCAGGTACCTTTA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACCGATCTTCGTGTTCTCCTCCTTCTCCACCCAAAAGGTCAGTCTGGAGTCCATGGAAAT

a

W L E A Q E E E E V G F P V R P Q V P L

AGACCAATGACTTACAAGGCAGCTTTAGATATTAGCCACTTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCTGGTTACTGAATGTTCCGTCGAAATCTATAATCGGTGAAAAATTTTCTTTTCCCCCT

a

R P M T Y K A A L D I S H F L K E K G G

CTGGAAGGGCTAATTTGGTCCCAAAGAAGACAAGAGATCCTTGATCTGTGGATCTACCAC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GACCTTCCCGATTAAACCAGGGTTTCTTCTGTTCTCTAGGAACTAGACACCTAGATGGTG

a

L E G L I W S Q R R Q E I L D L W I Y H

ACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAATTACACACCAGGGCCAGGGATCAGATATCCA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TGTGTTCCGATGAAGGGACTAACCGTCTTAATGTGTGGTCCCGTCCCTAGTCTATAGGT

a

T Q G Y F P D W Q N Y T P G P G I R Y P

CTGACCTTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGAGAAGGTAGAAGAGGCC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GACTGGAAACCTACCACGAAGTTCGATCATGGTCAACTCGGTCTCTTCCATCTTCTCCGG

a

L T F G W C F K L V P V E P E K V E E A

AATGAAGGAGAGAACAACAGCTTGTTACACCCTATGAGCCTGCATGGGATGGAGGACGCG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TTACTTCTCTCTTGTGTCGAACAATGTGGGATACTCGGACGTACCCTACCTCCTGCGC

a

N E G E N N S L L H P M S L H G M E D A

GAGAAAGAAGTGTTAGTGTGGAGGTTTGACAGCAAAGTAGCATTTTCATCACATGGCCCGA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CTCTTTCTTACAATCACACCTCCAAACTGTCGTTTGATCGTAAAGTAGTGTACCGGGCT

a

E K E V L V W R F D S K L A F H H M A R

GAGCTGCATCCGGAGTACTACAAAGACTGCTGA

-----+-----+-----+-----

CTCGACGTAGGCCTCATGATGTTTCTGACGACT

a E L H P E Y Y K D C \*

## 9.2 Distanzbeschränkungen für die Strukturrechnungen für LckU3

### LckU3\_NOE.tbl

(resid 97 and name HE1) (resid 97 and name HZ2) 2.5 0.8 0.8	(resid 67 and name HN) (resid 66 and name HB) 2.2 0.6 0.6	(resid 102 and name HN) (resid 108 and name HA) 2.8 1.0 1.0
(resid 97 and name HE1) (resid 97 and name HH2) 4.4 2.5 1.6	(resid 67 and name HN) (resid 116 and name HB) 3.0 1.1 1.1	(resid 102 and name HN) (resid 101 and name HA) 2.1 0.5 0.5
(resid 97 and name HE1) (resid 97 and name HD1) 2.1 0.5 0.5	(resid 67 and name HN) (resid 67 and name HB) 2.6 0.8 0.8	(resid 102 and name HN) (resid 102 and name HA) 2.7 0.9 0.9
(resid 97 and name HE1) (resid 96 and name HB3) 3.6 1.7 1.7	(resid 67 and name HN) (resid 67 and name HG13) 3.0 1.1 1.1	(resid 102 and name HN) (resid 102 and name HB3) 2.6 0.6 0.6
(resid 111 and name HN) (resid 110 and name HD%) 3.3 1.3 1.3	(resid 67 and name HN) (resid 119 and name HB%) 6.0 1.4 1.4	(resid 102 and name HN) (resid 101 and name HG3) 2.8 0.9 0.9
(resid 111 and name HN) (resid 110 and name HB2) 3.1 1.2 1.2	(resid 67 and name HN) (resid 67 and name HG2%) 3.6 1.7 1.0	(resid 102 and name HN) (resid 101 and name HG2) 2.5 0.8 0.8
(resid 98 and name HE1) (resid 98 and name HZ2) 3.0 1.1 1.1	(resid 67 and name HN) (resid 116 and name HG2%) 3.3 1.3 1.3	(resid 102 and name HN) (resid 101 and name HB2) 3.1 1.2 1.2
(resid 98 and name HE1) (resid 98 and name HD1) 2.1 0.6 0.6	(resid 67 and name HN) (resid 66 and name HG2%) 2.9 1.1 1.1	(resid 102 and name HN) (resid 80 and name HD2%) 2.6 0.8 0.8
(resid 98 and name HE1) (resid 95 and name HA1) 3.4 1.5 1.5	(resid 101 and name HN) (resid 89 and name HN) 2.4 0.7 0.7	(resid 71 and name HN) (resid 84 and name HN) 4.3 2.3 1.7
(resid 98 and name HE1) (resid 93 and name HB3) 3.8 1.8 1.8	(resid 101 and name HN) (resid 100 and name HA) 2.1 0.6 0.6	(resid 71 and name HN) (resid 70 and name HA) 2.7 0.9 0.9
(resid 98 and name HE1) (resid 113 and name HB2) 3.4 1.5 1.5	(resid 101 and name HN) (resid 101 and name HA) 2.7 0.9 0.9	(resid 71 and name HN) (resid 71 and name HB3) 3.0 1.1 1.1
(resid 98 and name HE1) (resid 98 and name HE3) 3.7 1.7 1.7	(resid 101 and name HN) (resid 90 and name HA) 3.2 1.3 1.3	(resid 71 and name HN) (resid 70 and name HB3) 3.0 1.1 1.1
(resid 98 and name HE1) (resid 93 and name HG3) 3.9 1.9 1.9	(resid 101 and name HN) (resid 101 and name HB2) 2.5 0.8 0.8	(resid 71 and name HN) (resid 70 and name HB2) 3.4 1.4 1.4
(resid 69 and name HN) (resid 117 and name HN) 4.4 2.1 1.9	(resid 101 and name HN) (resid 89 and name HG2) 2.8 1.0 1.0	(resid 71 and name HN) (resid 84 and name HB2) 2.7 0.9 0.9
(resid 69 and name HN) (resid 116 and name HA) 2.7 0.9 0.9	(resid 101 and name HN) (resid 88 and name HB2) 3.1 1.2 1.2	(resid 77 and name HN) (resid 77 and name HA) 4.0 2.0 2.0
(resid 69 and name HN) (resid 68 and name HA) 2.2 0.6 0.6	(resid 101 and name HN) (resid 91 and name HD2%) 2.7 0.9 0.9	(resid 89 and name HN) (resid 88 and name HA) 2.1 0.5 0.5
(resid 69 and name HN) (resid 69 and name HD2%) 2.9 1.0 1.0	(resid 90 and name HN) (resid 65 and name HA) 3.0 1.1 1.1	(resid 89 and name HN) (resid 89 and name HB2) 2.3 0.7 0.7
(resid 100 and name HN) (resid 99 and name HB2) 3.7 1.7 1.7	(resid 90 and name HN) (resid 89 and name HA) 2.0 0.5 0.5	(resid 89 and name HN) (resid 89 and name HB3) 2.6 0.8 0.8
(resid 100 and name HN) (resid 99 and name HD2) 3.0 1.1 1.1	(resid 90 and name HN) (resid 64 and name HB2) 3.1 1.2 1.2	(resid 89 and name HN) (resid 89 and name HG3) 3.2 1.2 1.2
(resid 100 and name HN) (resid 90 and name HD1%) 3.1 1.2 1.2	(resid 90 and name HN) (resid 64 and name HB2) 3.1 1.2 1.2	(resid 89 and name HN) (resid 88 and name HB2) 2.8 1.0 1.0
(resid 100 and name HN) (resid 91 and name HD2%) 4.5 2.5 1.5	(resid 90 and name HN) (resid 90 and name HB) 2.3 0.7 0.7	(resid 89 and name HN) (resid 88 and name HB3) 2.7 0.9 0.9
(resid 91 and name HN) (resid 101 and name HN) 3.2 1.3 1.3	(resid 90 and name HN) (resid 90 and name HG13) 3.5 0.7 0.7	(resid 89 and name HN) (resid 103 and name HD1%) 2.8 1.0 1.0
(resid 91 and name HN) (resid 91 and name HA) 2.6 0.8 0.8	(resid 90 and name HN) (resid 89 and name HG2) 2.8 1.0 1.0	(resid 89 and name HN) (resid 88 and name HD2%) 3.2 1.3 1.3
(resid 91 and name HN) (resid 91 and name HB2) 2.7 0.9 0.9	(resid 90 and name HN) (resid 90 and name HG2) 2.5 0.8 0.8	(resid 109 and name HN) (resid 100 and name HN) 2.7 0.9 0.9
(resid 91 and name HN) (resid 91 and name HG) 2.0 0.9 0.9	(resid 90 and name HN) (resid 90 and name HD1%) 2.6 0.8 0.8	(resid 109 and name HN) (resid 108 and name HA) 2.1 0.5 0.5
(resid 91 and name HN) (resid 91 and name HB3) 3.7 0.8 0.8	(resid 90 and name HN) (resid 89 and name HN) 3.3 1.3 1.3	(resid 109 and name HN) (resid 101 and name HA) 3.0 1.1 1.1
(resid 91 and name HN) (resid 90 and name HD1%) 3.0 1.1 1.1	(resid 90 and name HN) (resid 90 and name HG2%) 2.8 1.0 1.0	(resid 109 and name HN) (resid 109 and name HA2) 2.6 0.8 0.8
(resid 91 and name HN) (resid 91 and name HD2%) 2.8 1.0 1.0	(resid 78 and name HN) (resid 79 and name HN) 2.7 0.9 0.9	(resid 109 and name HN) (resid 109 and name HA1) 2.6 0.8 0.8
OR	(resid 78 and name HN) (resid 77 and name HA) 2.1 0.6 0.6	(resid 109 and name HN) (resid 108 and name HG2) 3.4 1.5 1.5
(resid 91 and name HN) (resid 91 and name HD1%)	(resid 78 and name HN) (resid 78 and name HA1) 2.5 0.8 0.8	(resid 109 and name HN) (resid 108 and name HB2) 2.9 1.0 1.0
(resid 80 and name HN) (resid 110 and name HN) 3.0 1.1 1.1	(resid 78 and name HN) (resid 77 and name HB2) 3.2 1.3 1.3	(resid 109 and name HN) (resid 108 and name HB3) 2.6 0.8 0.8
(resid 80 and name HN) (resid 80 and name HA) 3.2 1.2 1.2	(resid 103 and name HN) (resid 102 and name HN) 3.4 1.4 1.4	(resid 109 and name HN) (resid 100 and name HB%) 3.8 1.8 1.8
(resid 80 and name HN) (resid 111 and name HG2%) 3.3 1.3 1.3	(resid 103 and name HN) (resid 102 and name HA) 2.1 0.6 0.6	(resid 109 and name HN) (resid 99 and name HG2) 3.9 1.9 1.9
(resid 66 and name HN) (resid 66 and name HB) 3.6 1.7 1.7	(resid 103 and name HN) (resid 103 and name HA) 2.5 0.8 0.8	(resid 109 and name HN) (resid 99 and name HD3) 2.8 1.0 1.0
(resid 66 and name HN) (resid 65 and name HB3) 3.0 1.1 1.1	(resid 103 and name HN) (resid 103 and name HB2) 2.1 0.5 0.5	(resid 109 and name HN) (resid 80 and name HB3) 2.7 0.9 0.9
(resid 66 and name HN) (resid 88 and name HN) 2.6 0.8 0.8	(resid 103 and name HN) (resid 103 and name HD1%) 2.8 1.0 1.0	(resid 109 and name HN) (resid 80 and name HD2%) 2.7 0.9 0.9
(resid 66 and name HN) (resid 65 and name HA) 1.9 0.5 0.5	(resid 85 and name HN) (resid 68 and name HN) 3.4 1.5 1.5	(resid 99 and name HN) (resid 99 and name HA) 2.8 1.0 1.0
(resid 66 and name HN) (resid 66 and name HA) 2.4 0.7 0.7	(resid 85 and name HN) (resid 85 and name HA2) 2.4 0.7 0.7	(resid 99 and name HN) (resid 92 and name HB3) 3.3 1.4 1.4
(resid 66 and name HN) (resid 65 and name HG) 3.2 1.3 1.3	(resid 85 and name HN) (resid 85 and name HA1) 2.2 0.6 0.6	(resid 99 and name HN) (resid 99 and name HB3) 2.7 0.9 0.9
(resid 66 and name HN) (resid 65 and name HB2) 2.7 0.9 0.9	(resid 85 and name HN) (resid 84 and name HA) 2.0 0.5 0.5	(resid 99 and name HN) (resid 99 and name HB2) 2.7 0.9 0.9
(resid 66 and name HN) (resid 66 and name HG1%) 2.4 0.7 0.7	(resid 85 and name HN) (resid 68 and name HB%) 2.2 0.6 0.6	(resid 110 and name HN) (resid 110 and name HD%) 2.8 1.0 1.0
(resid 66 and name HN) (resid 66 and name HG2%) 2.3 0.6 0.6	(resid 85 and name HN) (resid 84 and name HG3) 2.9 1.0 1.0	(resid 110 and name HN) (resid 79 and name HA) 2.2 0.6 0.6
(resid 98 and name HN) (resid 111 and name HN) 3.3 1.3 1.3	(resid 85 and name HN) (resid 84 and name HB2) 2.8 1.0 1.0	(resid 110 and name HN) (resid 109 and name HA2) 2.3 0.7 0.7
(resid 98 and name HN) (resid 98 and name HB2) 2.6 0.8 0.8	(resid 85 and name HN) (resid 67 and name HG2%) 3.3 1.3 1.3	(resid 110 and name HN) (resid 109 and name HA1) 2.4 0.7 0.7
(resid 83 and name HN) (resid 82 and name HD%) 3.0 1.2 1.2	(resid 77 and name HN) (resid 76 and name HB3) 3.9 1.9 1.9	(resid 110 and name HN) (resid 110 and name HB2) 2.3 0.7 0.7
(resid 83 and name HN) (resid 82 and name HA) 2.1 0.5 0.5	(resid 77 and name HN) (resid 77 and name HB3) 2.9 1.1 1.1	(resid 110 and name HN) (resid 80 and name HB3) 3.3 1.4 1.4
(resid 83 and name HN) (resid 83 and name HA) 2.8 1.0 1.0	(resid 88 and name HN) (resid 87 and name HA) 2.0 0.5 0.5	(resid 96 and name HN) (resid 95 and name HA2) 2.3 0.6 0.6
(resid 83 and name HN) (resid 82 and name HB3) 2.5 0.8 0.8	(resid 88 and name HN) (resid 88 and name HA) 2.8 1.0 1.0	(resid 93 and name HN) (resid 93 and name HA) 2.1 0.5 0.5
(resid 83 and name HN) (resid 82 and name HB2) 2.3 0.7 0.7	(resid 88 and name HN) (resid 67 and name HA) 2.8 1.0 1.0	(resid 93 and name HN) (resid 93 and name HA) 2.8 1.0 1.0
(resid 83 and name HN) (resid 86 and name HG2) 3.0 1.1 1.1	(resid 88 and name HN) (resid 87 and name HB3) 3.3 1.3 1.3	(resid 93 and name HN) (resid 92 and name HG3) 3.5 1.5 1.5
(resid 83 and name HN) (resid 86 and name HG3) 2.2 0.6 0.6	(resid 88 and name HN) (resid 87 and name HB2) 2.7 0.9 0.9	(resid 93 and name HN) (resid 92 and name HG2) 3.6 1.6 1.6
(resid 83 and name HN) (resid 83 and name HB2) 2.5 0.8 0.8	(resid 88 and name HN) (resid 88 and name HA) 2.7 0.9 0.9	(resid 93 and name HN) (resid 92 and name HB2) 3.3 1.4 1.4
(resid 83 and name HN) (resid 83 and name HB3) 2.5 0.8 0.8	(resid 88 and name HN) (resid 65 and name HD1%) 3.2 1.3 1.3	(resid 93 and name HN) (resid 92 and name HB3) 4.0 2.0 2.0
(resid 67 and name HN) (resid 117 and name HN) 2.8 0.7 0.7	(resid 88 and name HN) (resid 66 and name HG2%) 2.7 0.9 0.9	(resid 93 and name HN) (resid 93 and name HB3) 3.2 1.3 1.3
(resid 67 and name HN) (resid 116 and name HA) 3.5 1.5 1.5	(resid 102 and name HN) (resid 101 and name HN) 5.8 4.3 0.2	(resid 93 and name HN) (resid 93 and name HB2) 2.7 0.9 0.9
(resid 67 and name HN) (resid 66 and name HA) 2.0 0.5 0.5	(resid 102 and name HN) (resid 106 and name HN) 3.8 1.8 1.8	(resid 75 and name HN) (resid 76 and name HA) 2.4 0.7 0.7
(resid 67 and name HN) (resid 118 and name HA) 3.0 1.1 1.1		(resid 75 and name HN) (resid 75 and name HA) 3.1 1.2 1.2

(resid 75 and name HN) (resid 74 and name HA) 2.3 0.7 0.7  
(resid 75 and name HN) (resid 74 and name HB2) 3.0 1.1 1.1  
(resid 117 and name HN) (resid 116 and name HA) 2.3 0.7 0.7  
(resid 117 and name HN) (resid 66 and name HB) 3.0 1.1 1.1  
(resid 117 and name HN) (resid 116 and name HB) 2.6 0.8 0.8  
(resid 117 and name HN) (resid 117 and name HB%) 2.7 0.7 0.7  
(resid 117 and name HN) (resid 66 and name HG1%) 4.9 1.2 1.2  
(resid 117 and name HN) (resid 116 and name HG2%) 4.8 1.0 1.0  
(resid 117 and name HN) (resid 68 and name HA) 4.1 2.0 2.0  
(resid 68 and name HN) (resid 86 and name HN) 3.4 1.4 1.4  
(resid 68 and name HN) (resid 67 and name HA) 1.9 0.5 0.5  
(resid 68 and name HN) (resid 68 and name HA) 2.8 1.0 1.0  
(resid 68 and name HN) (resid 68 and name HB%) 2.2 0.6 0.6  
(resid 68 and name HN) (resid 67 and name HG13) 3.1 1.2 1.2  
(resid 68 and name HN) (resid 67 and name HG2%) 2.7 0.9 0.9  
(resid 108 and name HN) (resid 108 and name HA) 2.6 0.8 0.8  
(resid 108 and name HN) (resid 107 and name HA) 1.9 0.4 0.4  
(resid 108 and name HN) (resid 107 and name HB%) 2.8 0.9 0.9  
(resid 108 and name HN) (resid 108 and name HG3) 2.7 0.9 0.9  
(resid 108 and name HN) (resid 107 and name HB3) 3.0 1.1 1.1  
(resid 108 and name HN) (resid 108 and name HB2) 2.4 0.7 0.7  
(resid 108 and name HN) (resid 108 and name HB3) 2.7 0.9 0.9  
(resid 108 and name HN) (resid 109 and name HN) 3.8 1.8 1.8  
(resid 108 and name HN) (resid 80 and name HD1%) 3.2 1.3 1.3  
(resid 100 and name HA) (resid 99 and name HB2) 4.2 2.2 1.8  
(resid 64 and name HN) (resid 65 and name HN) 2.6 0.8 0.8  
(resid 64 and name HN) (resid 64 and name HB2) 2.5 0.8 0.8  
(resid 64 and name HN) (resid 64 and name HB3) 3.6 0.8 0.8  
(resid 72 and name HN) (resid 72 and name HD%) 3.3 1.4 1.4  
(resid 72 and name HN) (resid 82 and name HD%) 3.1 1.2 1.2  
(resid 72 and name HN) (resid 72 and name HA) 3.0 0.5 0.5  
(resid 72 and name HN) (resid 71 and name HB2) 2.9 1.0 1.0  
(resid 72 and name HN) (resid 72 and name HB3) 2.8 1.0 1.0  
(resid 95 and name HN) (resid 96 and name HN) 3.3 1.4 1.4  
(resid 95 and name HN) (resid 94 and name HB2) 2.7 0.9 0.9  
(resid 104 and name HN) (resid 103 and name HN) 2.4 0.7 0.7  
(resid 104 and name HN) (resid 105 and name HN) 2.3 0.7 0.7  
(resid 104 and name HN) (resid 104 and name HA) 2.4 0.7 0.7  
(resid 104 and name HN) (resid 102 and name HB3) 3.1 1.2 1.2  
(resid 104 and name HN) (resid 104 and name HB) 2.4 0.7 0.7  
(resid 104 and name HN) (resid 103 and name HB2) 2.5 0.8 0.8  
(resid 104 and name HN) (resid 104 and name HD%) 2.7 0.9 0.9  
(resid 104 and name HN) (resid 103 and name HD1%) 3.5 1.5 1.5  
(resid 95 and name HN) (resid 94 and name HN) 3.5 1.5 1.5  
(resid 95 and name HN) (resid 94 and name HA) 2.1 0.6 0.6  
(resid 95 and name HN) (resid 95 and name HA2) 2.4 0.7 0.7  
(resid 95 and name HN) (resid 95 and name HA1) 2.1 0.6 0.6  
(resid 87 and name HN) (resid 87 and name HA) 2.6 0.9 0.9  
(resid 87 and name HN) (resid 86 and name HA) 1.9 0.5 0.5  
(resid 87 and name HN) (resid 86 and name HG3) 2.3 0.6 0.6  
(resid 87 and name HN) (resid 86 and name HB2) 3.6 1.0 1.0  
(resid 87 and name HN) (resid 87 and name HB2) 2.5 0.5 0.5  
(resid 87 and name HN) (resid 86 and name HB3) 2.3 0.7 0.7  
(resid 87 and name HN) (resid 103 and name HD1%) 3.2 1.3 1.3  
(resid 119 and name HN) (resid 67 and name HN) 3.3 1.4 1.4  
(resid 119 and name HN) (resid 118 and name HN) 3.7 1.7 1.7  
(resid 119 and name HN) (resid 66 and name HA) 2.3 0.6 0.6  
(resid 119 and name HN) (resid 118 and name HA) 1.9 0.4 0.4  
(resid 119 and name HN) (resid 118 and name HB3) 2.9 1.1 1.1  
(resid 119 and name HN) (resid 118 and name HB2) 3.1 1.2 1.2  
(resid 119 and name HN) (resid 67 and name HB) 3.0 1.1 1.1  
(resid 119 and name HN) (resid 119 and name HB%) 2.8 0.6 0.6  
(resid 84 and name HN) (resid 71 and name HA) 2.7 0.9 0.9  
(resid 84 and name HN) (resid 84 and name HA) 2.7 0.9 0.9  
(resid 84 and name HN) (resid 83 and name HB2) 3.2 1.3 1.3  
(resid 84 and name HN) (resid 84 and name HB3) 2.1 0.6 0.6  
(resid 84 and name HN) (resid 71 and name HB3) 3.0 1.1 1.1  
(resid 81 and name HN) (resid 81 and name HA1) 2.6 0.8 0.8  
(resid 81 and name HN) (resid 81 and name HA2) 2.2 0.6 0.6  
(resid 81 and name HN) (resid 74 and name HG3) 3.2 1.3 1.3  
(resid 81 and name HN) (resid 74 and name HB3) 3.4 1.5 1.5  
(resid 81 and name HN) (resid 80 and name HG) 2.5 0.8 0.8  
(resid 81 and name HN) (resid 80 and name HD1%) 2.3 0.7 0.7  
(resid 81 and name HN) (resid 80 and name HB3) 3.3 1.4 1.4  
(resid 81 and name HN) (resid 80 and name HD2%) 3.4 1.4 1.4  
(resid 94 and name HN) (resid 93 and name HN) 3.2 1.2 1.2  
(resid 94 and name HN) (resid 98 and name HA) 2.9 1.0 1.0  
(resid 94 and name HN) (resid 94 and name HA) 2.8 1.0 1.0  
(resid 94 and name HN) (resid 93 and name HA) 2.2 0.6 0.6

(resid 94 and name HN) (resid 98 and name HD1) 2.9 1.0 1.0  
(resid 105 and name HN) (resid 107 and name HN) 3.2 1.2 1.2  
(resid 105 and name HN) (resid 106 and name HN) 2.3 0.7 0.7  
(resid 105 and name HN) (resid 105 and name HB) 2.7 0.9 0.9  
(resid 105 and name HN) (resid 104 and name HA) 3.0 1.1 1.1  
(resid 105 and name HN) (resid 104 and name HB) 2.5 0.8 0.8  
(resid 105 and name HN) (resid 106 and name HA2) 3.7 1.7 1.7  
(resid 105 and name HN) (resid 105 and name HG2%) 2.3 0.7 0.7  
(resid 86 and name HN) (resid 85 and name HN) 2.5 0.8 0.8  
(resid 86 and name HN) (resid 87 and name HN) 6.0 6.0 1.0  
(resid 86 and name HN) (resid 85 and name HA2) 2.7 0.9 0.9  
(resid 86 and name HN) (resid 86 and name HA) 2.5 0.8 0.8  
(resid 86 and name HN) (resid 85 and name HA1) 2.9 1.1 1.1  
(resid 86 and name HN) (resid 84 and name HA) 3.0 1.1 1.1  
(resid 86 and name HN) (resid 86 and name HG3) 6.0 6.0 1.0  
(resid 86 and name HN) (resid 86 and name HB2) 2.1 0.6 0.6  
(resid 86 and name HN) (resid 86 and name HB3) 2.4 0.7 0.7  
(resid 86 and name HN) (resid 104 and name HB3) 2.5 0.7 0.7  
(resid 107 and name HN) (resid 102 and name HB3) 2.7 0.9 0.9  
(resid 107 and name HN) (resid 102 and name HN) 3.3 1.4 1.4  
(resid 107 and name HN) (resid 106 and name HN) 2.2 0.6 0.6  
(resid 107 and name HN) (resid 107 and name HB3) 3.1 1.2 1.2  
(resid 107 and name HN) (resid 106 and name HA2) 3.0 1.1 1.1  
(resid 107 and name HN) (resid 107 and name HG3) 2.4 0.7 0.7  
(resid 107 and name HN) (resid 107 and name HB3) 2.4 1.0 1.0  
(resid 107 and name HN) (resid 107 and name HD2) 2.2 0.6 0.6  
(resid 120 and name HN) (resid 119 and name HN) 2.7 0.9 0.9  
(resid 120 and name HN) (resid 120 and name HA) 2.6 0.9 0.9  
(resid 120 and name HN) (resid 119 and name HA) 2.1 0.6 0.6  
(resid 120 and name HN) (resid 120 and name HB3) 3.1 1.2 1.2  
(resid 120 and name HN) (resid 118 and name HB3) 3.6 1.6 1.6  
(resid 120 and name HN) (resid 119 and name HB%) 4.5 0.8 0.8  
(resid 65 and name HN) (resid 65 and name HA) 2.4 0.7 0.7  
(resid 65 and name HN) (resid 64 and name HA) 6.0 6.0 1.0  
(resid 65 and name HN) (resid 65 and name HB3) 2.2 0.6 0.6  
(resid 65 and name HN) (resid 65 and name HG) 6.0 6.0 1.0  
(resid 65 and name HN) (resid 65 and name HD1%) 6.0 6.0 1.0  
(resid 65 and name HN) (resid 72 and name HD2%) 6.0 6.0 1.0  
(resid 82 and name HN) (resid 72 and name HN) 2.7 0.9 0.9  
(resid 82 and name HN) (resid 81 and name HN) 3.6 1.6 1.6  
(resid 82 and name HN) (resid 72 and name HD%) 3.0 1.1 1.1  
(resid 82 and name HN) (resid 72 and name HD%) 2.9 1.0 1.0  
(resid 82 and name HN) (resid 82 and name HA) 2.6 0.8 0.8  
(resid 82 and name HN) (resid 81 and name HA1) 2.2 0.6 0.6  
(resid 82 and name HN) (resid 81 and name HA2) 2.3 0.7 0.7  
(resid 82 and name HN) (resid 72 and name HD%) 3.0 1.1 1.1  
(resid 79 and name HN) (resid 80 and name HN) 4.2 2.3 1.8  
(resid 79 and name HN) (resid 79 and name HA) 2.7 0.9 0.9  
(resid 79 and name HN) (resid 78 and name HA2) 3.1 1.2 1.2  
(resid 79 and name HN) (resid 78 and name HA1) 2.9 1.1 1.1  
(resid 79 and name HN) (resid 79 and name HB2) 2.2 0.6 0.6  
(resid 79 and name HN) (resid 74 and name HB3) 4.5 3.3 1.3  
(resid 76 and name HN) (resid 79 and name HB2) 2.9 1.1 1.1  
(resid 76 and name HN) (resid 74 and name HB2) 5.0 3.1 1.1  
(resid 76 and name HN) (resid 75 and name HA) 2.9 1.0 1.0  
(resid 76 and name HN) (resid 76 and name HB2) 2.8 1.0 1.0  
(resid 97 and name HN) (resid 96 and name HN) 2.4 0.7 0.7  
(resid 97 and name HN) (resid 97 and name HD1) 2.9 1.1 1.1  
(resid 97 and name HN) (resid 98 and name HD1) 3.1 1.2 1.2  
(resid 97 and name HN) (resid 97 and name HA) 2.9 1.0 1.0  
(resid 97 and name HN) (resid 97 and name HB2) 2.3 0.6 0.6  
(resid 97 and name HN) (resid 96 and name HB3) 2.5 0.8 0.8  
(resid 97 and name HN) (resid 96 and name HA) 2.8 1.0 1.0  
(resid 92 and name HN) (resid 91 and name HN) 2.2 0.6 0.6  
(resid 92 and name HN) (resid 100 and name HA) 3.1 1.2 1.2  
(resid 92 and name HN) (resid 92 and name HA) 2.3 0.7 0.7  
(resid 92 and name HN) (resid 92 and name HB3) 3.0 1.1 1.1  
(resid 92 and name HN) (resid 99 and name HB3) 2.6 0.9 0.9  
(resid 92 and name HN) (resid 91 and name HB2) 2.5 0.8 0.8  
(resid 92 and name HN) (resid 91 and name HB3) 2.7 0.9 0.9  
(resid 92 and name HN) (resid 91 and name HD1%) 3.4 1.5 1.5  
OR  
(resid 92 and name HN) (resid 91 and name HD2%)  
(resid 92 and name HN) (resid 90 and name HG2%) 2.5 0.8 0.8  
(resid 101 and name HE21) (resid 101 and name HE22) 1.8 0.4 0.4  
(resid 101 and name HE21) (resid 101 and name HG3) 2.8 0.9 0.9  
(resid 106 and name HN) (resid 104 and name HN) 3.2 1.3 1.3  
(resid 106 and name HN) (resid 105 and name HB) 2.8 1.0 1.0  
(resid 106 and name HN) (resid 106 and name HA1) 2.1 0.6 0.6

(resid 106 and name HN) (resid 102 and name HB2) 2.5 0.8 0.8  
(resid 106 and name HN) (resid 106 and name HA2) 2.1 0.6 0.6  
(resid 106 and name HN) (resid 105 and name HG2%) 3.1 1.2 1.2  
(resid 115 and name HN) (resid 114 and name HN) 2.6 0.8 0.8  
(resid 115 and name HN) (resid 116 and name HN) 2.2 0.6 0.6  
(resid 115 and name HN) (resid 115 and name HA) 2.7 0.9 0.9  
(resid 115 and name HN) (resid 115 and name HB3) 2.7 0.9 0.9  
(resid 115 and name HN) (resid 115 and name HB2) 2.3 0.7 0.7  
(resid 115 and name HN) (resid 112 and name HB2) 3.6 1.6 1.6  
(resid 115 and name HN) (resid 116 and name HG2%) 3.0 1.1 1.1  
(resid 115 and name HN) (resid 112 and name HG2) 4.2 2.2 1.8  
(resid 73 and name HN) (resid 72 and name HN) 6.0 2.4 1.6  
(resid 73 and name HN) (resid 72 and name HD%) 2.7 0.9 0.9  
(resid 73 and name HN) (resid 72 and name HA) 2.0 0.5 0.5  
(resid 73 and name HN) (resid 73 and name HA) 2.6 0.8 0.8  
(resid 73 and name HN) (resid 72 and name HB2) 3.4 1.4 1.4  
(resid 73 and name HN) (resid 73 and name HG3) 3.0 1.1 1.1  
(resid 73 and name HN) (resid 73 and name HB3) 2.5 0.8 0.8  
(resid 73 and name HN) (resid 73 and name HB2) 2.4 0.7 0.7  
(resid 113 and name HN) (resid 114 and name HN) 3.5 1.6 1.6  
(resid 113 and name HN) (resid 113 and name HD%) 2.5 0.8 0.8  
(resid 113 and name HN) (resid 116 and name HB2) 2.7 0.9 0.9  
(resid 70 and name HN) (resid 69 and name HN) 2.2 0.6 0.6  
(resid 70 and name HN) (resid 70 and name HA) 2.7 0.9 0.9  
(resid 70 and name HN) (resid 70 and name HB2) 2.9 1.0 1.0  
(resid 70 and name HN) (resid 84 and name HB3) 5.2 1.0 1.0  
(resid 70 and name HN) (resid 69 and name HG) 3.5 1.6 1.6  
(resid 70 and name HN) (resid 69 and name HB2) 3.1 1.2 1.2  
(resid 70 and name HN) (resid 69 and name HB3) 3.3 1.4 1.4  
(resid 70 and name HN) (resid 69 and name HD2%) 3.4 1.5 1.5  
(resid 120 and name HD22) (resid 120 and name HD21) 1.8 0.4 0.4  
(resid 120 and name HD22) (resid 120 and name HB3) 3.1 1.2 1.2  
(resid 64 and name HD22) (resid 64 and name HD21) 1.8 0.4 0.4  
(resid 64 and name HD22) (resid 64 and name HB2) 3.4 1.5 1.5  
(resid 114 and name HD22) (resid 114 and name HD21) 2.1 0.5 0.5  
(resid 114 and name HN) (resid 116 and name HN) 3.6 1.6 1.6  
(resid 114 and name HN) (resid 113 and name HD%) 3.4 1.5 1.5  
(resid 114 and name HN) (resid 115 and name HA) 4.8 2.1 1.9  
(resid 87 and name HE21) (resid 87 and name HE22) 1.7 0.4 0.5  
(resid 87 and name HE21) (resid 87 and name HG2) 3.1 1.2 1.2  
(resid 87 and name HE21) (resid 87 and name HB3) 3.9 1.9 1.9  
(resid 116 and name HN) (resid 115 and name HA) 3.4 1.4 1.4  
(resid 116 and name HN) (resid 116 and name HG2%) 2.3 0.6 0.6  
(resid 107 and name HE22) (resid 107 and name HE21) 1.7 0.3 0.5  
(resid 101 and name HE22) (resid 101 and name HG3) 3.0 1.1 1.1  
(resid 101 and name HE22) (resid 101 and name HB2) 3.4 1.4 1.4  
(resid 87 and name HE22) (resid 87 and name HG2) 3.6 1.6 1.6  
(resid 93 and name HE21) (resid 93 and name HE22) 1.8 0.4 0.4  
(resid 108 and name HN) (resid 107 and name HN) 3.2 1.3 1.3  
(resid 64 and name HN) (resid 110 and name HN) 4.8 2.9 1.2  
(resid 66 and name HN) (resid 118 and name HA) 4.8 2.9 1.2  
(resid 66 and name HN) (resid 119 and name HB%) 4.2 1.8 1.8  
(resid 66 and name HN) (resid 88 and name HB3) 4.6 2.6 1.4  
(resid 79 and name HN) (resid 110 and name HN) 4.4 2.4 1.6  
(resid 68 and name HN) (resid 67 and name HN) 4.0 2.0 2.0  
(resid 68 and name HN) (resid 88 and name HN) 3.6 1.6 1.6  
(resid 68 and name HN) (resid 86 and name HB3) 4.1 2.1 1.9  
(resid 68 and name HN) (resid 116 and name HG1%) 5.2 3.4 0.8  
(resid 70 and name HN) (resid 116 and name HA) 5.0 3.2 1.0  
(resid 70 and name HN) (resid 115 and name HB3) 4.4 2.5 1.6  
(resid 73 and name HN) (resid 72 and name HE%) 4.1 2.1 1.9  
(resid 73 and name HN) (resid 74 and name HD3) 3.8 1.8 1.8  
(resid 71 and name HN) (resid 84 and name HA) 4.8 2.8 1.2  
(resid 71 and name HN) (resid 84 and name HG2) 4.8 2.8 1.2  
(resid 75 and name HN) (resid 72 and name HE%) 3.8 1.8 1.8  
(resid 80 and name HN) (resid 72 and name HD%) 4.4 2.5 1.6  
(resid 81 and name HN) (resid 80 and name HN) 4.7 2.8 1.3  
(resid 81 and name HN) (resid 82 and name HD%) 4.3 2.3 1.7  
(resid 82 and name HN) (resid 72 and name HB2) 3.8 1.8 1.8  
(resid 82 and name HN) (resid 73 and name HA) 3.4 1.4 1.4  
(resid 82 and name HN) (resid 72 and name HA) 3.4 1.4 1.4  
(resid 83 and name HN) (resid 82 and name HN) 3.9 1.9 1.9  
(resid 83 and name HN) (resid 68 and name HB%) 4.8 2.9 1.2  
(resid 84 and name HN) (resid 83 and name HN) 3.6 1.6 1.6  
(resid 84 and name HN) (resid 85 and name HN) 3.7 1.7 1.7  
(resid 84 and name HN) (resid 83 and name HG2) 3.4 1.4 1.4  
OR  
(resid 84 and name HN) (resid 83 and name HG3)  
(resid 86 and name HN) (resid 67 and name HG2%) 4.1 2.1 1.9

(resid 86 and name HN) (resid 83 and name HB3) 4.5 2.5 1.5	(resid 98 and name HE1) (resid 94 and name HA) 5.5 3.7 0.5	(resid 111 and name HD1%) (resid 115 and name HN) 4.5 2.5 1.5
(resid 86 and name HN) (resid 83 and name HN) 3.6 1.7 1.7	(resid 95 and name HN) (resid 97 and name HN) 5.8 4.2 0.2	(resid 111 and name HD1%) (resid 82 and name HE%) 3.0 1.1 1.1
(resid 87 and name HE22) (resid 87 and name HB3) 3.7 1.8 1.8	(resid 111 and name HN) (resid 100 and name HN) 3.4 1.5 1.5	(resid 111 and name HD1%) (resid 98 and name HE3) 2.8 1.0 1.0
(resid 87 and name HE21) (resid 65 and name HD2%) 3.6 1.7 1.7	(resid 64 and name HN) (resid 64 and name HD22) 4.2 2.2 1.8	(resid 111 and name HD1%) (resid 82 and name HZ) 3.3 1.4 1.4
(resid 87 and name HE21) (resid 65 and name HD1%) 3.6 1.6 1.6	(resid 68 and name HN) (resid 82 and name HD%) 5.1 3.2 0.9	(resid 111 and name HD1%) (resid 98 and name HD1) 4.2 2.2 1.8
(resid 87 and name HE22) (resid 65 and name HD1%) 3.7 1.7 1.7	(resid 89 and name HN) (resid 89 and name HD2) 4.6 2.7 1.4	(resid 111 and name HD1%) (resid 82 and name HD%) 3.6 1.6 1.6
(resid 88 and name HN) (resid 87 and name HN) 3.7 1.7 1.7	OR	(resid 111 and name HD1%) (resid 110 and name HA) 5.5 3.8 0.5
(resid 89 and name HN) (resid 101 and name HB3) 3.8 1.9 1.9	(resid 89 and name HN) (resid 89 and name HD3)	(resid 111 and name HD1%) (resid 100 and name HA) 3.8 1.8 1.8
(resid 90 and name HN) (resid 91 and name HN) 4.7 2.8 1.3	(resid 89 and name HN) (resid 102 and name HA) 4.5 2.6 1.5	(resid 111 and name HD1%) (resid 111 and name HA) 3.3 1.3 1.3
(resid 91 and name HN) (resid 90 and name HB) 3.7 1.7 1.7	(resid 65 and name HN) (resid 66 and name HN) 3.3 1.4 1.4	(resid 111 and name HD1%) (resid 90 and name HA) 5.2 3.4 0.8
(resid 93 and name HN) (resid 92 and name HN) 3.6 1.7 1.7	(resid 83 and name HN) (resid 88 and name HD1%) 6.0 1.4 1.4	(resid 111 and name HD1%) (resid 115 and name HB3) 4.0 2.0 2.0
(resid 92 and name HN) (resid 92 and name HG2) 3.8 1.8 1.8	(resid 115 and name HN) (resid 116 and name HA) 4.4 2.4 1.6	(resid 111 and name HD1%) (resid 115 and name HB2) 4.5 2.5 1.5
(resid 92 and name HN) (resid 92 and name HG3) 4.2 2.2 1.8	(resid 117 and name HN) (resid 66 and name HA) 4.4 1.7 1.7	(resid 111 and name HD1%) (resid 98 and name HB2) 2.8 1.0 1.0
(resid 94 and name HN) (resid 93 and name HG2) 4.5 2.6 1.5	(resid 72 and name HN) (resid 84 and name HB3) 5.5 3.8 0.5	(resid 111 and name HD1%) (resid 113 and name HA) 2.8 1.0 1.0
(resid 94 and name HN) (resid 93 and name HG3) 3.7 1.7 1.7	(resid 88 and name HN) (resid 88 and name HD2%) 4.2 2.2 1.8	(resid 111 and name HD1%) (resid 66 and name HB) 4.3 2.4 1.7
(resid 94 and name HN) (resid 93 and name HB3) 4.5 2.5 1.5	(resid 69 and name HN) (resid 116 and name HB) 3.8 1.8 1.8	(resid 111 and name HD1%) (resid 111 and name HB) 2.2 0.6 0.6
(resid 94 and name HN) (resid 92 and name HA) 5.2 3.4 0.8	(resid 120 and name HN) (resid 120 and name HB2) 2.9 1.0 1.0	(resid 111 and name HD1%) (resid 111 and name HG13) 2.2 0.6 0.6
	(resid 70 and name HN) (resid 70 and name HD2) 4.7 2.8 1.3	(resid 111 and name HD1%) (resid 111 and name HG2%) 2.1 0.6 0.6
	(resid 106 and name HN) (resid 103 and name HN) 6.0 6.0 0.0	
(resid 95 and name HN) (resid 98 and name HD1) 5.3 3.5 0.7	(resid 101 and name HN) (resid 111 and name HD1%) 4.3 2.3 1.7	(resid 111 and name HD1%) (resid 90 and name HD1%) 1.9 0.4 0.4
(resid 96 and name HN) (resid 97 and name HD1) 4.9 3.1 1.1	(resid 92 and name HN) (resid 90 and name HD1%) 3.6 1.6 1.6	(resid 111 and name HD1%) (resid 88 and name HD1%) 2.3 0.7 0.7
(resid 96 and name HN) (resid 98 and name HD1) 5.1 3.2 0.9	(resid 89 and name HN) (resid 100 and name HB%) 5.8 1.0 1.0	(resid 90 and name HG2%) (resid 91 and name HN) 2.6 0.8 0.8
(resid 97 and name HE1) (resid 96 and name HG2) 4.4 2.5 1.6	(resid 88 and name HN) (resid 65 and name HB3) 4.8 2.9 1.2	(resid 90 and name HG2%) (resid 99 and name HN) 3.3 1.4 1.4
(resid 97 and name HE1) (resid 97 and name HB2) 4.2 2.2 1.8	(resid 93 and name HE21) (resid 98 and name HB2) 4.3 2.3 1.7	(resid 90 and name HG2%) (resid 93 and name HN) 3.9 1.9 1.9
(resid 98 and name HN) (resid 98 and name HD1) 4.2 2.2 1.8	(resid 79 and name HN) (resid 110 and name HB2) 3.2 1.3 1.3	(resid 90 and name HG2%) (resid 64 and name HD21) 3.2 1.3 1.3
(resid 98 and name HN) (resid 99 and name HN) 4.5 2.5 1.5	(resid 65 and name HN) (resid 119 and name HB%) 6.0 1.1 1.0	(resid 90 and name HG2%) (resid 98 and name HE3) 2.7 0.9 0.9
(resid 98 and name HE1) (resid 95 and name HN) 5.2 3.3 0.8	(resid 97 and name HE1) (resid 96 and name HG3) 4.6 2.7 1.4	(resid 90 and name HG2%) (resid 98 and name HZ3) 3.6 1.6 1.6
(resid 98 and name HE1) (resid 93 and name HG2) 5.2 3.4 0.8	(resid 91 and name HN) (resid 99 and name HD2) 4.9 2.9 1.1	(resid 90 and name HG2%) (resid 64 and name HD22) 3.6 1.6 1.6
(resid 99 and name HN) (resid 98 and name HD1) 3.7 1.7 1.7	(resid 108 and name HN) (resid 101 and name HA) 4.3 2.3 1.7	(resid 90 and name HG2%) (resid 93 and name HE22) 4.1 2.1 1.9
(resid 99 and name HN) (resid 91 and name HN) 4.7 2.7 1.3	(resid 64 and name HN) (resid 64 and name HA) 2.5 0.8 0.8	(resid 90 and name HG2%) (resid 100 and name HA) 4.3 1.2 1.2
(resid 100 and name HN) (resid 91 and name HN) 4.5 2.5 1.5	(resid 64 and name HN) (resid 65 and name HD2%) 3.7 1.7 1.7	(resid 90 and name HG2%) (resid 98 and name HB3) 2.5 0.8 0.8
(resid 100 and name HN) (resid 101 and name HN) 4.7 2.7 1.3	OR	(resid 90 and name HG2%) (resid 98 and name HB2) 2.7 0.9 0.9
(resid 101 and name HN) (resid 101 and name HG2) 3.5 1.5 1.5	(resid 64 and name HN) (resid 65 and name HD1%)	(resid 90 and name HG2%) (resid 64 and name HB3) 3.7 1.7 1.7
(resid 101 and name HE21) (resid 91 and name HD2%) 4.7 2.8 1.3	(resid 104 and name HN) (resid 102 and name HA) 3.0 1.1 1.1	(resid 90 and name HG2%) (resid 90 and name HG13) 2.3 0.6 0.6
(resid 101 and name HE21) (resid 103 and name HG) 5.9 4.4 0.1	(resid 102 and name HN) (resid 106 and name HA1) 3.8 1.8 1.8	(resid 90 and name HG2%) (resid 93 and name HB3) 2.8 1.0 1.0
(resid 101 and name HE21) (resid 106 and name HA1) 4.2 2.2 1.8	(resid 102 and name HN) (resid 107 and name HG3) 4.5 2.6 1.5	(resid 90 and name HG2%) (resid 93 and name HG3) 2.8 1.0 1.0
(resid 101 and name HE22) (resid 106 and name HA1) 5.3 3.5 0.7	OR	(resid 90 and name HG2%) (resid 93 and name HG2) 2.6 0.8 0.8
(resid 101 and name HE21) (resid 108 and name HB3) 4.0 2.0 2.0	(resid 102 and name HN) (resid 107 and name HG2)	(resid 116 and name HG2%) (resid 69 and name HB) 2.5 1.5 1.5
(resid 101 and name HE22) (resid 108 and name HG3) 4.9 3.0 1.1	(resid 102 and name HN) (resid 108 and name HG3) 4.5 2.5 1.5	(resid 116 and name HG2%) (resid 98 and name HE3) 2.6 0.9 0.9
(resid 102 and name HN) (resid 88 and name HA) 5.3 3.5 0.7	(resid 97 and name HN) (resid 95 and name HA2) 2.8 1.0 1.0	(resid 116 and name HG2%) (resid 98 and name HZ3) 2.5 0.8 0.8
(resid 102 and name HN) (resid 100 and name HB%) 4.8 2.9 1.2	(resid 93 and name HN) (resid 94 and name HA) 3.9 1.9 1.9	(resid 116 and name HG2%) (resid 116 and name HA) 3.0 1.1 1.1
(resid 103 and name HN) (resid 87 and name HB3) 3.8 1.8 1.8	(resid 93 and name HN) (resid 94 and name HB2) 4.7 2.7 1.3	(resid 116 and name HG2%) (resid 68 and name HB) 4.8 2.8 1.2
(resid 104 and name HN) (resid 88 and name HD2%) 4.6 2.7 1.4	(resid 84 and name HN) (resid 84 and name HG3) 3.9 1.9 1.9	(resid 116 and name HG2%) (resid 118 and name HA) 3.8 1.8 1.8
(resid 104 and name HN) (resid 105 and name HB) 3.9 1.9 1.9	(resid 79 and name HN) (resid 77 and name HA) 2.8 1.0 1.0	(resid 116 and name HG2%) (resid 115 and name HB2) 4.5 2.5 1.5
(resid 105 and name HN) (resid 102 and name HB2) 3.4 1.4 1.4	(resid 64 and name HD22) (resid 64 and name HB2) 2.7 0.9 0.9	(resid 116 and name HG2%) (resid 66 and name HB) 3.1 1.2 1.2
(resid 105 and name HN) (resid 102 and name HN) 4.6 2.7 1.4	(resid 64 and name HD22) (resid 90 and name HB) 4.2 2.2 1.8	(resid 116 and name HG2%) (resid 88 and name HD1%) 3.4 1.4 1.4
(resid 105 and name HN) (resid 103 and name HN) 6.0 5.9 0.0	(resid 89 and name HE) (resid 89 and name HD2) 2.5 0.8 0.8	(resid 116 and name HG2%) (resid 98 and name HB2) 4.6 2.7 1.4
(resid 106 and name HN) (resid 80 and name HD1%) 4.5 2.5 1.5	OR	(resid 116 and name HG2%) (resid 111 and name HD1%) 2.3 0.7 0.7
(resid 107 and name HE22) (resid 107 and name HG3) 3.5 1.5 1.5	(resid 89 and name HE) (resid 89 and name HD3)	(resid 67 and name HG2%) (resid 87 and name HA) 3.2 1.3 1.3
(resid 68 and name HN) (resid 69 and name HN) 5.2 3.4 0.8	(resid 70 and name HD1) (resid 70 and name HB3) 3.1 1.2 1.2	(resid 67 and name HG2%) (resid 86 and name HA) 4.5 2.6 1.5
(resid 88 and name HN) (resid 88 and name HD1%) 3.5 1.5 1.5	(resid 70 and name HD1) (resid 115 and name HA) 3.5 1.5 1.5	(resid 67 and name HG2%) (resid 69 and name HA) 4.0 2.0 2.0
(resid 108 and name HN) (resid 80 and name HD2%) 4.6 2.6 1.4	(resid 84 and name HN) (resid 82 and name HD%) 4.3 2.3 1.7	(resid 67 and name HG2%) (resid 68 and name HB%) 3.5 1.5 1.5
(resid 109 and name HN) (resid 108 and name HG3) 4.0 2.0 2.0	(resid 94 and name HN) (resid 94 and name HB2) 2.5 0.8 0.8	(resid 67 and name HG2%) (resid 67 and name HB) 2.5 0.8 0.8
(resid 109 and name HN) (resid 99 and name HA) 3.9 1.9 1.9	(resid 90 and name HD1%) (resid 98 and name HE3) 2.7 0.9 0.9	(resid 67 and name HG2%) (resid 67 and name HG13) 3.0 1.2 1.2
(resid 109 and name HN) (resid 100 and name HA) 5.0 3.2 1.0	(resid 90 and name HD1%) (resid 89 and name HN) 4.0 2.0 2.0	(resid 67 and name HG2%) (resid 67 and name HG12) 2.4 0.7 0.7
(resid 110 and name HN) (resid 111 and name HN) 4.6 2.6 1.4	(resid 90 and name HD1%) (resid 98 and name HZ3) 3.3 1.3 1.3	(resid 68 and name HB%) (resid 69 and name HN) 2.7 0.9 0.9
(resid 110 and name HN) (resid 79 and name HB3) 3.5 1.5 1.5	(resid 90 and name HD1%) (resid 100 and name HA) 3.0 1.1 1.1	(resid 68 and name HB%) (resid 82 and name HD%) 2.1 0.6 0.6
OR	(resid 90 and name HD1%) (resid 90 and name HB) 2.7 0.9 0.9	(resid 68 and name HB%) (resid 84 and name HA) 2.4 0.7 0.7
(resid 110 and name HN) (resid 79 and name HB2)	(resid 90 and name HD1%) (resid 90 and name HG12) 2.2 0.6 0.6	(resid 68 and name HB%) (resid 86 and name HB2) 3.1 1.2 1.2
(resid 110 and name HN) (resid 80 and name HG) 4.9 3.0 1.1	(resid 90 and name HD1%) (resid 88 and name HD1%) 3.4 1.4 1.4	(resid 68 and name HB%) (resid 86 and name HB3) 2.7 0.9 0.9
(resid 110 and name HN) (resid 99 and name HA) 4.0 2.0 2.0	(resid 90 and name HD1%) (resid 90 and name HG2%) 2.2 0.6 0.6	(resid 68 and name HB%) (resid 111 and name HG2%) 6.0 1.0 1.0
(resid 110 and name HN) (resid 80 and name HA) 4.9 3.1 1.1	(resid 67 and name HD1%) (resid 67 and name HN) 3.9 1.9 1.9	(resid 68 and name HB%) (resid 88 and name HD2%) 3.2 1.3 1.3
(resid 111 and name HN) (resid 100 and name HB%) 4.2 2.2 1.8	(resid 67 and name HD1%) (resid 68 and name HN) 3.5 1.5 1.5	(resid 68 and name HB%) (resid 88 and name HD1%) 2.6 0.9 0.9
(resid 113 and name HN) (resid 112 and name HB2) 3.9 1.9 1.9	(resid 67 and name HD1%) (resid 87 and name HE21) 3.6 1.6 1.6	(resid 68 and name HB%) (resid 115 and name HE%) 3.2 1.3 1.3
(resid 113 and name HN) (resid 98 and name HN) 4.5 2.5 1.5	(resid 67 and name HD1%) (resid 87 and name HE22) 4.4 2.4 1.6	(resid 119 and name HB%) (resid 65 and name HB) 4.2 1.2 0.8
(resid 116 and name HN) (resid 115 and name HB3) 4.8 2.9 1.2	(resid 67 and name HD1%) (resid 87 and name HA) 3.2 1.3 1.3	(resid 119 and name HB%) (resid 67 and name HG12) 2.6 1.2 1.2
(resid 116 and name HN) (resid 115 and name HB2) 4.3 2.4 1.7	(resid 67 and name HD1%) (resid 85 and name HA2) 3.4 1.5 1.5	(resid 119 and name HB%) (resid 65 and name HD2%) 3.8 0.8 0.8
(resid 116 and name HN) (resid 116 and name HB) 3.8 1.8 1.8	(resid 67 and name HD1%) (resid 119 and name HA) 3.2 1.3 1.3	(resid 119 and name HB%) (resid 87 and name HE21) 3.7 2.9 1.1
(resid 116 and name HN) (resid 117 and name HN) 4.4 1.8 1.8	(resid 67 and name HD1%) (resid 86 and name HA) 3.1 1.2 1.2	(resid 119 and name HB%) (resid 87 and name HE22) 5.1 3.2 0.9
(resid 119 and name HN) (resid 66 and name HB) 3.5 1.5 1.5	(resid 67 and name HD1%) (resid 85 and name HA1) 3.4 1.4 1.4	(resid 119 and name HB%) (resid 65 and name HA) 4.5 2.6 1.5
(resid 120 and name HN) (resid 66 and name HG1%) 6.0 6.0 1.0	(resid 67 and name HD1%) (resid 87 and name HG3) 3.5 1.5 1.5	(resid 119 and name HB%) (resid 66 and name HA) 3.2 1.7 1.7
(resid 115 and name HN) (resid 82 and name HZ) 3.9 1.9 1.9	(resid 67 and name HD1%) (resid 87 and name HB2) 3.3 1.4 1.4	(resid 119 and name HB%) (resid 120 and name HB2) 6.1 3.3 0.9
(resid 90 and name HN) (resid 89 and name HD2) 5.0 3.1 1.0	(resid 67 and name HD1%) (resid 118 and name HB3) 6.0 6.0 1.1	OR
(resid 90 and name HN) (resid 100 and name HA) 4.3 2.3 1.7	(resid 67 and name HD1%) (resid 67 and name HB) 3.3 1.3 1.3	(resid 119 and name HB%) (resid 120 and name HB3)
(resid 90 and name HN) (resid 64 and name HA) 4.2 2.2 1.8	(resid 67 and name HD1%) (resid 119 and name HB%) 3.4 1.3 1.3	(resid 119 and name HB%) (resid 120 and name HA) 4.8 2.1 1.9
(resid 99 and name HN) (resid 100 and name HN) 4.5 2.5 1.5	(resid 111 and name HD1%) (resid 111 and name HN) 3.6 1.6 1.6	(resid 119 and name HB%) (resid 87 and name HG3) 6.0 4.9 1.0
(resid 99 and name HN) (resid 110 and name HD%) 5.2 3.4 0.8	(resid 111 and name HD1%) (resid 98 and name HN) 3.6 1.6 1.6	(resid 119 and name HB%) (resid 66 and name HB) 5.5 1.5 1.5
(resid 94 and name HN) (resid 99 and name HN) 4.1 2.1 1.9	(resid 111 and name HD1%) (resid 109 and name HN) 6.0 2.5 1.6	(resid 66 and name HG2%) (resid 117 and name HN) 4.8 1.4 1.4
(resid 94 and name HN) (resid 98 and name HE1) 4.2 2.2 1.8	(resid 111 and name HD1%) (resid 100 and name HN) 4.7 2.8 1.3	

(resid 66 and name HG2%) (resid 98 and name HE3) 3.6 1.6 1.6	(resid 104 and name HG2%) (resid 104 and name HA) 2.5 0.8 0.8	(resid 90 and name HA) (resid 91 and name HN) 2.0 0.5 0.5
(resid 66 and name HG2%) (resid 118 and name HA) 3.5 1.5 1.5	(resid 104 and name HG2%) (resid 86 and name HG2) 3.9 1.9 1.9	(resid 90 and name HA) (resid 90 and name HN) 2.6 0.8 0.8
(resid 66 and name HG2%) (resid 66 and name HB) 2.4 0.7 0.7	(resid 104 and name HG2%) (resid 86 and name HG3) 4.0 2.0 2.0	(resid 90 and name HA) (resid 92 and name HN) 3.1 1.2 1.2
(resid 66 and name HG2%) (resid 90 and name HG12) 2.7 0.9 0.9	(resid 104 and name HG2%) (resid 103 and name HN) 4.9 3.0 1.1	(resid 90 and name HA) (resid 100 and name HA) 2.2 0.6 0.6
(resid 66 and name HG2%) (resid 88 and name HB2) 2.3 0.7 0.7	(resid 104 and name HG2%) (resid 105 and name HG1) 5.0 3.2 1.0	(resid 90 and name HA) (resid 90 and name HB) 2.9 1.1 1.1
(resid 66 and name HG2%) (resid 66 and name HG1%) 2.0 0.5 0.5	(resid 104 and name HG2%) (resid 105 and name HB) 3.6 1.6 1.6	(resid 90 and name HA) (resid 90 and name HB2) 2.9 1.1 1.1
(resid 66 and name HG2%) (resid 116 and name HG1%) 2.3 0.7 0.7	(resid 117 and name HB%) (resid 69 and name HD1%) 2.6 0.5 2.5	(resid 90 and name HA) (resid 100 and name HG2%) 2.4 0.7 0.7
(resid 66 and name HG2%) (resid 88 and name HD1%) 2.5 0.8 0.8	(resid 117 and name HB%) (resid 118 and name HA) 4.9 2.1 1.9	(resid 90 and name HA) (resid 90 and name HD1%) 2.1 0.6 0.6
(resid 66 and name HG2%) (resid 98 and name HZ3) 4.6 2.6 1.4	(resid 117 and name HB%) (resid 116 and name HA) 4.5 1.7 1.7	(resid 90 and name HA) (resid 90 and name HG2%) 2.3 0.7 0.7
(resid 66 and name HG2%) (resid 119 and name HN) 4.9 3.0 1.1	(resid 117 and name HB%) (resid 67 and name HN) 4.1 1.4 1.4	(resid 108 and name HA) (resid 100 and name HN%) 3.8 1.8 1.8
(resid 66 and name HG1%) (resid 67 and name HN) 2.8 1.0 1.0	(resid 117 and name HB%) (resid 119 and name HN) 5.7 2.8 1.3	(resid 108 and name HA) (resid 101 and name HN) 3.7 1.7 1.7
(resid 66 and name HG1%) (resid 119 and name HN) 3.2 1.3 1.3	(resid 117 and name HB%) (resid 69 and name HN) 5.9 2.6 1.5	(resid 108 and name HA) (resid 107 and name HA) 4.9 1.0 1.0
(resid 66 and name HG1%) (resid 65 and name HN) 4.5 2.5 1.5	(resid 117 and name HB%) (resid 116 and name HG1%) 6.0 2.5 1.5	(resid 108 and name HA) (resid 109 and name HA2) 3.6 1.6 1.6
(resid 66 and name HG1%) (resid 98 and name HZ3) 2.9 1.1 1.1	(resid 117 and name HB%) (resid 116 and name HB) 5.2 1.2 1.2	(resid 108 and name HA) (resid 109 and name HA1) 3.9 1.9 1.9
(resid 66 and name HG1%) (resid 65 and name HA) 3.3 1.4 1.4	(resid 117 and name HB%) (resid 66 and name HB) 5.0 2.1 1.9	(resid 108 and name HA) (resid 108 and name HG3) 3.0 1.1 1.1
(resid 66 and name HG1%) (resid 66 and name HB) 2.3 0.7 0.7	(resid 65 and name HD1%) (resid 89 and name HD2) 3.7 1.7 1.7	(resid 108 and name HA) (resid 108 and name HG2) 2.4 0.7 0.7
(resid 66 and name HG1%) (resid 116 and name HB) 2.6 0.8 0.8	OR	(resid 108 and name HA) (resid 108 and name HB3) 2.6 0.8 0.8
(resid 66 and name HG1%) (resid 90 and name HG12) 2.5 0.8 0.8	(resid 65 and name HD1%) (resid 89 and name HD3)	(resid 108 and name HA) (resid 100 and name HB%) 4.4 2.5 1.6
(resid 66 and name HG1%) (resid 90 and name HG13) 2.6 0.8 0.8	(resid 65 and name HD1%) (resid 65 and name HA) 2.3 0.6 0.6	(resid 108 and name HA) (resid 80 and name HD1%) 2.9 1.1 1.1
(resid 66 and name HG1%) (resid 116 and name HG1%) 3.0 1.1 1.1	(resid 65 and name HD1%) (resid 89 and name HE) 4.0 2.0 2.0	(resid 108 and name HA) (resid 80 and name HD2%) 2.5 0.8 0.8
(resid 66 and name HG1%) (resid 88 and name HD1%) 5.1 3.3 0.9	(resid 65 and name HD1%) (resid 64 and name HN) 4.5 2.5 1.5	(resid 108 and name HA) (resid 108 and name HB2) 2.5 0.8 0.8
(resid 66 and name HG1%) (resid 118 and name HE2) 3.8 1.8 1.8	(resid 65 and name HD1%) (resid 90 and name HN) 3.1 1.2 1.2	(resid 110 and name HA) (resid 111 and name HN) 2.0 0.5 0.5
OR	(resid 65 and name HD1%) (resid 66 and name HN) 3.0 1.1 1.1	(resid 110 and name HA) (resid 100 and name HN) 2.8 1.0 1.0
(resid 66 and name HG1%) (resid 118 and name HE3)	(resid 65 and name HD1%) (resid 65 and name HG) 2.1 0.5 0.5	(resid 110 and name HA) (resid 110 and name HN) 2.7 0.9 0.9
(resid 105 and name HG2%) (resid 104 and name HN) 3.6 1.6 1.6	(resid 65 and name HD1%) (resid 65 and name HB2) 2.3 0.7 0.7	(resid 110 and name HA) (resid 110 and name HD%) 3.2 1.3 1.3
(resid 105 and name HG2%) (resid 107 and name HN) 3.8 1.8 1.8	(resid 103 and name HD1%) (resid 103 and name HB3) 2.4 0.6 0.6	(resid 110 and name HA) (resid 110 and name HB3) 2.0 0.6 0.6
(resid 105 and name HG2%) (resid 105 and name HG1) 2.6 0.8 0.8	(resid 88 and name HD1%) (resid 90 and name HN) 3.7 1.7 1.7	(resid 110 and name HA) (resid 110 and name HB2) 3.7 1.7 1.7
(resid 105 and name HG2%) (resid 105 and name HB) 2.2 0.6 0.6	(resid 88 and name HD1%) (resid 68 and name HN) 3.5 1.6 1.6	(resid 110 and name HA) (resid 99 and name HD3) 3.8 1.8 1.8
(resid 105 and name HG2%) (resid 106 and name HA1) 3.5 1.5 1.5	(resid 88 and name HD1%) (resid 82 and name HE%) 3.4 1.4 1.4	(resid 110 and name HA) (resid 111 and name HG12) 3.5 1.5 1.5
(resid 105 and name HG2%) (resid 102 and name HB2) 3.8 1.8 1.8	(resid 88 and name HD1%) (resid 82 and name HD%) 3.5 1.5 1.5	(resid 110 and name HA) (resid 99 and name HD2) 3.0 1.1 1.1
(resid 105 and name HG2%) (resid 104 and name HB) 2.7 0.9 0.9	(resid 88 and name HD1%) (resid 87 and name HA) 3.6 1.6 1.6	(resid 110 and name HA) (resid 100 and name HB%) 4.4 2.4 1.6
(resid 105 and name HG2%) (resid 107 and name HG2) 3.7 1.7 1.7	(resid 88 and name HD1%) (resid 86 and name HG3) 3.8 1.8 1.8	(resid 110 and name HA) (resid 111 and name HG13) 3.7 1.7 1.7
(resid 111 and name HG2%) (resid 106 and name HN) 2.9 1.0 1.0	(resid 88 and name HD1%) (resid 111 and name HB) 2.7 0.9 0.9	(resid 110 and name HA) (resid 99 and name HB2) 4.1 2.1 1.9
(resid 111 and name HG2%) (resid 100 and name HN) 3.5 1.5 1.5	(resid 88 and name HD1%) (resid 88 and name HB3) 2.3 0.7 0.7	(resid 110 and name HA) (resid 99 and name HB3) 4.0 2.0 2.0
(resid 111 and name HG2%) (resid 109 and name HN) 3.7 1.7 1.7	(resid 88 and name HD1%) (resid 80 and name HG) 4.1 2.1 1.9	(resid 110 and name HA) (resid 98 and name HN) 4.2 2.2 1.8
(resid 111 and name HG2%) (resid 82 and name HE%) 2.3 0.6 0.6	(resid 88 and name HD2%) (resid 88 and name HD1%) 2.2 0.6 0.6	(resid 110 and name HB3) (resid 111 and name HN) 2.9 1.1 1.1
(resid 111 and name HG2%) (resid 111 and name HE%) 5.4 2.4 1.0	(resid 88 and name HD2%) (resid 111 and name HB) 3.3 1.4 1.4	(resid 110 and name HB3) (resid 80 and name HN) 4.1 2.1 1.9
(resid 111 and name HG2%) (resid 82 and name HD%) 2.7 0.9 0.9	(resid 88 and name HD2%) (resid 80 and name HG) 3.2 1.3 1.3	(resid 110 and name HB3) (resid 110 and name HN) 2.5 0.8 0.8
(resid 111 and name HG2%) (resid 82 and name HZ) 3.6 1.7 1.7	(resid 88 and name HD2%) (resid 86 and name HB3) 3.3 1.4 1.4	(resid 110 and name HB3) (resid 110 and name HD%) 2.3 0.6 0.6
(resid 111 and name HG2%) (resid 110 and name HA) 3.7 1.7 1.7	(resid 88 and name HD2%) (resid 82 and name HE%) 2.8 1.0 1.0	(resid 110 and name HB3) (resid 97 and name HZ3) 5.0 3.1 1.0
(resid 111 and name HG2%) (resid 112 and name HD2) 3.0 1.1 1.1	(resid 88 and name HD2%) (resid 102 and name HA) 3.9 1.9 1.9	(resid 110 and name HB3) (resid 79 and name HA) 2.5 0.8 0.8
(resid 111 and name HG2%) (resid 80 and name HB3) 2.2 0.6 0.6	(resid 88 and name HD2%) (resid 87 and name HA) 3.9 1.9 1.9	(resid 110 and name HB3) (resid 99 and name HA) 4.1 2.1 1.9
(resid 111 and name HG2%) (resid 111 and name HB) 2.1 0.6 0.6	(resid 88 and name HD2%) (resid 82 and name HD%) 3.0 1.1 1.1	(resid 110 and name HB3) (resid 109 and name HA1) 4.3 2.3 1.7
(resid 111 and name HG2%) (resid 88 and name HD2%) 2.5 0.8 0.8	(resid 88 and name HD2%) (resid 82 and name HD%) 4.0 2.0 2.0	(resid 110 and name HB3) (resid 110 and name HB2) 2.3 0.7 0.7
(resid 111 and name HG2%) (resid 115 and name HE%) 5.4 2.4 1.0	(resid 88 and name HD2%) (resid 102 and name HN) 2.9 1.1 1.1	(resid 110 and name HB3) (resid 97 and name HA) 3.9 1.9 1.9
(resid 111 and name HG2%) (resid 98 and name HN) 4.3 2.3 1.7	(resid 88 and name HD2%) (resid 103 and name HN) 2.9 1.0 1.0	(resid 98 and name HA) (resid 98 and name HE1) 3.5 1.6 1.6
(resid 111 and name HG2%) (resid 90 and name HD1%) 4.8 1.0 1.0	(resid 88 and name HD2%) (resid 83 and name HN) 3.1 1.2 1.2	(resid 98 and name HA) (resid 98 and name HN) 2.7 0.9 0.9
(resid 116 and name HG1%) (resid 69 and name HN) 3.0 1.1 1.1	(resid 69 and name HD1%) (resid 86 and name HG3) 4.6 1.3 1.3	(resid 98 and name HA) (resid 99 and name HN) 2.1 0.5 0.5
(resid 116 and name HG1%) (resid 67 and name HN) 4.5 2.6 1.5	(resid 69 and name HD1%) (resid 117 and name HN) 4.8 1.4 1.4	(resid 98 and name HA) (resid 98 and name HE3) 3.5 1.5 1.5
(resid 116 and name HG1%) (resid 88 and name HN) 4.3 2.3 1.7	(resid 69 and name HD1%) (resid 116 and name HN) 4.0 2.0 2.0	(resid 98 and name HA) (resid 98 and name HE1) 4.2 2.0 0.6
(resid 116 and name HG1%) (resid 117 and name HN) 4.0 0.9 0.9	(resid 69 and name HD1%) (resid 116 and name HA) 4.0 2.0 2.0	(resid 98 and name HA) (resid 93 and name HA) 2.7 0.9 0.9
(resid 116 and name HG1%) (resid 115 and name HN) 3.5 1.5 1.5	(resid 69 and name HD1%) (resid 69 and name HA) 4.7 1.2 1.2	(resid 98 and name HA) (resid 98 and name HB3) 2.6 0.8 0.8
(resid 116 and name HG1%) (resid 98 and name HE3) 4.6 2.6 1.4	(resid 69 and name HD1%) (resid 69 and name HG) 2.3 0.7 0.7	(resid 98 and name HA) (resid 98 and name HB2) 2.9 1.0 1.0
(resid 116 and name HG1%) (resid 116 and name HN) 2.7 0.9 0.9	(resid 69 and name HD1%) (resid 69 and name HB3) 2.9 0.6 0.6	(resid 98 and name HA) (resid 98 and name HG2%) 3.6 1.6 1.6
(resid 116 and name HG1%) (resid 82 and name HZ) 3.2 1.3 1.3	(resid 91 and name HD1%) (resid 100 and name HN) 4.1 2.2 1.9	(resid 98 and name HB3) (resid 98 and name HE1) 4.5 2.5 1.5
(resid 116 and name HG1%) (resid 116 and name HA) 2.3 0.7 0.7	(resid 91 and name HD1%) (resid 91 and name HN) 3.3 1.3 1.3	(resid 98 and name HB3) (resid 98 and name HN) 2.7 0.9 0.9
(resid 116 and name HG1%) (resid 68 and name HA) 2.7 0.9 0.9	(resid 91 and name HD1%) (resid 101 and name HN) 3.2 1.3 1.3	(resid 98 and name HB3) (resid 99 and name HN) 2.7 0.9 0.9
(resid 116 and name HG1%) (resid 115 and name HB2) 3.1 1.2 1.2	(resid 91 and name HD1%) (resid 109 and name HN) 3.4 1.5 1.5	(resid 98 and name HB3) (resid 98 and name HD1) 3.2 1.3 1.3
(resid 116 and name HG1%) (resid 112 and name HD2) 4.0 2.0 2.0	(resid 91 and name HD1%) (resid 101 and name HE21) 4.5 1.3 1.3	(resid 98 and name HB3) (resid 99 and name HB3) 4.9 3.0 1.1
(resid 116 and name HG1%) (resid 66 and name HB) 3.3 1.3 1.3	(resid 91 and name HD1%) (resid 101 and name HE22) 4.0 2.0 2.0	(resid 98 and name HB3) (resid 111 and name HG13) 2.9 1.0 1.0
(resid 116 and name HG1%) (resid 68 and name HB%) 2.5 0.8 0.8	(resid 91 and name HD1%) (resid 108 and name HA) 3.8 1.8 1.8	(resid 98 and name HB3) (resid 100 and name HB%) 3.6 1.7 1.7
(resid 116 and name HG1%) (resid 69 and name HG) 3.5 1.5 1.5	(resid 91 and name HD1%) (resid 100 and name HA) 4.0 2.0 2.0	(resid 98 and name HB3) (resid 90 and name HD1%) 2.8 1.0 1.0
(resid 116 and name HG1%) (resid 111 and name HG2%) 4.8 1.0 1.0	(resid 91 and name HD1%) (resid 101 and name HA) 3.4 1.5 1.5	(resid 98 and name HB3) (resid 111 and name HD1%) 3.0 1.2 1.2
1.0	(resid 91 and name HD1%) (resid 91 and name HA) 3.4 1.5 1.5	(resid 98 and name HB2) (resid 90 and name HD1%) 2.9 1.0 1.0
(resid 116 and name HG1%) (resid 116 and name HG2%) 1.9 0.4 0.4	(resid 91 and name HD1%) (resid 108 and name HG3) 3.3 1.4 1.4	(resid 98 and name HB2) (resid 111 and name HG13) 2.6 0.8 0.8
(resid 116 and name HG1%) (resid 88 and name HD1%) 2.3 0.6 0.6	(resid 91 and name HD1%) (resid 108 and name HG2) 2.6 0.9 0.9	(resid 98 and name HB2) (resid 99 and name HB3) 6.0 1.7 1.0
(resid 69 and name HD2%) (resid 117 and name HN) 4.7 1.6 1.6	(resid 91 and name HD1%) (resid 91 and name HB3) 2.2 0.6 0.6	(resid 98 and name HB2) (resid 98 and name HB3) 1.8 0.4 0.4
(resid 91 and name HD2%) (resid 91 and name HN) 3.4 1.5 1.5	(resid 91 and name HD1%) (resid 91 and name HG) 2.2 0.6 0.6	(resid 98 and name HB2) (resid 98 and name HE3) 2.6 0.9 0.9
(resid 91 and name HD2%) (resid 92 and name HN) 3.5 1.6 1.6	(resid 91 and name HD1%) (resid 99 and name HG3) 2.9 1.0 1.0	(resid 98 and name HB2) (resid 98 and name HE1) 4.7 2.8 1.3
(resid 91 and name HD2%) (resid 101 and name HE22) 3.8 1.8 1.8	(resid 91 and name HD1%) (resid 99 and name HD2) 2.4 0.7 0.7	(resid 98 and name HB2) (resid 99 and name HN) 3.0 1.2 1.2
(resid 69 and name HD2%) (resid 116 and name HA) 3.6 1.7 1.7	(resid 100 and name HA) (resid 100 and name HN) 2.7 0.9 0.9	(resid 98 and name HB2) (resid 98 and name HE1) 3.8 1.8 1.8
(resid 91 and name HD2%) (resid 91 and name HA) 2.5 0.8 0.8	(resid 100 and name HA) (resid 91 and name HN) 2.4 0.7 0.7	(resid 88 and name HD1%) (resid 66 and name HN) 4.7 2.8 1.3
(resid 91 and name HD2%) (resid 89 and name HD3) 2.6 0.8 0.8	(resid 100 and name HA) (resid 89 and name HN) 3.6 1.6 1.6	(resid 82 and name HB3) (resid 82 and name HN) 3.3 1.4 1.4
(resid 69 and name HD2%) (resid 69 and name HG) 2.5 0.8 0.8	(resid 100 and name HA) (resid 90 and name HB) 3.5 1.6 1.6	(resid 82 and name HB3) (resid 82 and name HE%) 3.7 1.7 1.7
(resid 91 and name HD2%) (resid 91 and name HG) 2.3 0.7 0.7	(resid 100 and name HA) (resid 100 and name HB%) 2.0 0.5 0.5	(resid 82 and name HB3) (resid 82 and name HD%) 2.2 0.6 0.6
(resid 69 and name HD2%) (resid 69 and name HB3) 2.3 0.6 0.6	(resid 100 and name HA) (resid 91 and name HD2%) 3.1 1.2 1.2	(resid 82 and name HB3) (resid 86 and name HB2) 3.2 1.3 1.3
(resid 104 and name HG2%) (resid 105 and name HN) 3.5 1.5 1.5		(resid 82 and name HB3) (resid 80 and name HG) 3.4 1.5 1.5



(resid 82 and name HB3) (resid 68 and name HB%) 3.3 1.4 1.4	(resid 97 and name HA) (resid 111 and name HN) 3.7 1.7 1.7	(resid 119 and name HA) (resid 67 and name HG2%) 2.6 0.8 0.8
(resid 82 and name HB3) (resid 88 and name HD2%) 2.5 0.8 0.8	(resid 97 and name HA) (resid 98 and name HN) 1.9 0.5 0.5	(resid 114 and name HA) (resid 114 and name HN) 2.4 0.7 0.7
(resid 82 and name HB3) (resid 88 and name HD1%) 3.0 1.1 1.1	(resid 97 and name HA) (resid 113 and name HN) 3.1 1.2 1.2	(resid 114 and name HA) (resid 115 and name HN) 2.9 1.0 1.0
(resid 88 and name HD1%) (resid 88 and name HB2) 2.4 0.7 0.7	(resid 97 and name HA) (resid 97 and name HE3) 2.6 0.8 0.8	(resid 114 and name HA) (resid 116 and name HN) 3.0 1.1 1.1
(resid 86 and name HG2) (resid 87 and name HN) 3.5 0.9 0.9	(resid 97 and name HA) (resid 98 and name HD1) 3.9 1.9 1.9	(resid 114 and name HA) (resid 113 and name HD%) 3.5 1.6 1.6
(resid 86 and name HG2) (resid 86 and name HN) 3.0 1.1 1.1	(resid 97 and name HA) (resid 112 and name HA) 2.9 1.0 1.0	(resid 114 and name HA) (resid 114 and name HD22) 5.3 3.5 3.7
(resid 86 and name HG2) (resid 86 and name HA) 2.5 0.8 0.8	(resid 97 and name HA) (resid 97 and name HB3) 2.2 0.6 0.6	(resid 114 and name HA) (resid 116 and name HG2%) 3.4 1.4 1.4
(resid 86 and name HG2) (resid 82 and name HB2) 3.8 1.8 1.8	(resid 87 and name HA) (resid 68 and name HN) 3.3 1.4 1.4	(resid 114 and name HA) (resid 114 and name HB2) 2.1 0.6 0.6
(resid 86 and name HG2) (resid 86 and name HG3) 1.6 0.3 0.6	(resid 87 and name HA) (resid 87 and name HB3) 2.7 0.9 0.9	(resid 114 and name HA) (resid 114 and name HB3) 2.1 0.6 0.6
(resid 86 and name HG2) (resid 86 and name HB3) 2.3 0.7 0.7	(resid 87 and name HA) (resid 87 and name HG) 2.3 0.7 0.7	(resid 93 and name HA) (resid 98 and name HE1) 3.6 1.6 1.6
(resid 86 and name HG2) (resid 83 and name HB2) 3.1 1.2 1.2	(resid 87 and name HA) (resid 67 and name HG13) 3.4 1.4 1.4	(resid 93 and name HA) (resid 99 and name HN) 3.4 1.5 1.5
(resid 86 and name HG2) (resid 68 and name HB%) 4.1 2.1 1.9	(resid 87 and name HA) (resid 66 and name HG2%) 3.9 1.9 1.9	(resid 93 and name HA) (resid 98 and name HE3) 3.8 1.8 1.8
(resid 86 and name HG2) (resid 88 and name HD2%) 3.2 1.3 1.3	(resid 87 and name HA) (resid 67 and name HB) 3.8 1.8 1.8	(resid 93 and name HA) (resid 98 and name HD1) 2.7 0.9 0.9
(resid 86 and name HG2) (resid 88 and name HD1%) 4.4 2.4 1.6	(resid 65 and name HB3) (resid 65 and name HA) 2.5 0.8 0.8	(resid 93 and name HA) (resid 98 and name HB3) 3.2 1.3 1.3
(resid 86 and name HG3) (resid 68 and name HB%) 3.8 1.8 1.8	(resid 65 and name HB3) (resid 65 and name HB2) 1.8 0.4 0.4	(resid 93 and name HA) (resid 92 and name HA) 3.7 1.7 1.7
(resid 86 and name HG3) (resid 82 and name HB2) 3.5 1.5 1.5	(resid 65 and name HB3) (resid 65 and name HD2%) 2.7 0.9 0.9	(resid 93 and name HA) (resid 90 and name HG2%) 3.0 1.1 1.1
(resid 86 and name HG3) (resid 86 and name HA) 2.6 0.8 0.8	(resid 65 and name HB3) (resid 65 and name HD1%) 2.4 0.7 0.7	(resid 93 and name HA) (resid 93 and name HG3) 2.7 0.9 0.9
(resid 86 and name HB2) (resid 88 and name HN) 3.5 1.5 1.5	(resid 65 and name HB3) (resid 65 and name HB) 2.0 0.5 0.5	(resid 93 and name HA) (resid 93 and name HB2) 2.3 0.6 0.6
(resid 86 and name HB2) (resid 82 and name HD%) 4.3 2.3 1.7	(resid 116 and name HA) (resid 116 and name HN) 3.6 1.6 1.6	(resid 93 and name HA) (resid 93 and name HB3) 2.5 0.8 0.8
(resid 86 and name HB2) (resid 86 and name HG2) 2.4 0.7 0.7	(resid 116 and name HA) (resid 66 and name HB) 3.7 1.7 1.7	(resid 96 and name HA) (resid 98 and name HE1) 3.2 1.3 1.3
(resid 86 and name HB2) (resid 86 and name HG3) 3.6 1.0 1.0	(resid 111 and name HA) (resid 68 and name HB%) 3.8 1.8 1.8	(resid 96 and name HA) (resid 96 and name HN) 3.1 1.2 1.2
(resid 86 and name HB2) (resid 86 and name HB3) 2.1 0.5 0.5	(resid 111 and name HA) (resid 72 and name HD%) 2.8 1.0 1.0	(resid 96 and name HA) (resid 113 and name HB) 3.2 1.6 1.6
(resid 86 and name HB2) (resid 83 and name HB2) 3.1 1.2 1.2	(resid 111 and name HA) (resid 80 and name HN) 4.3 2.3 1.7	(resid 96 and name HA) (resid 113 and name HD%) 2.4 0.7 0.7
(resid 86 and name HB2) (resid 88 and name HG) 4.6 2.6 1.4	(resid 111 and name HA) (resid 82 and name HE%) 2.9 1.1 1.1	(resid 96 and name HA) (resid 113 and name HB2) 3.4 1.4 1.4
(resid 86 and name HB2) (resid 88 and name HD2%) 3.5 1.5 1.5	(resid 111 and name HA) (resid 97 and name HE3) 3.4 1.4 1.4	(resid 96 and name HA) (resid 113 and name HB3) 2.8 1.0 1.0
(resid 86 and name HB2) (resid 88 and name HD1%) 4.3 2.3 1.7	(resid 111 and name HA) (resid 111 and name HG13) 6.0 1.6 1.6	(resid 96 and name HA) (resid 96 and name HB) 2.4 0.7 0.7
(resid 86 and name HB3) (resid 88 and name HD1%) 3.6 1.6 1.6	(resid 111 and name HA) (resid 97 and name HZ3) 2.8 1.0 1.0	(resid 96 and name HA) (resid 96 and name HG3) 2.2 0.6 0.6
(resid 86 and name HB3) (resid 88 and name HG) 4.8 2.8 1.2	(resid 111 and name HA) (resid 112 and name HD2) 1.9 0.5 0.5	(resid 96 and name HA) (resid 96 and name HG2) 2.6 0.9 0.9
(resid 86 and name HB3) (resid 83 and name HB2) 3.8 1.8 1.8	(resid 111 and name HA) (resid 111 and name HB) 2.2 0.6 0.6	(resid 112 and name HA) (resid 98 and name HN) 3.9 1.9 1.9
(resid 86 and name HB3) (resid 86 and name HB3) 1.8 0.4 0.4	(resid 111 and name HA) (resid 111 and name HB3) 3.1 1.2 1.2	(resid 112 and name HA) (resid 113 and name HN) 2.0 0.5 0.5
(resid 86 and name HB3) (resid 82 and name HB2) 2.8 1.0 1.0	(resid 111 and name HA) (resid 111 and name HG2%) 2.3 0.6 0.6	(resid 112 and name HA) (resid 114 and name HN) 3.3 1.4 1.4
(resid 86 and name HB3) (resid 82 and name HB3) 3.4 1.4 1.4	(resid 111 and name HA) (resid 111 and name HG12) 3.1 1.2 1.2	(resid 112 and name HA) (resid 97 and name HE3) 3.4 1.5 1.5
(resid 86 and name HB3) (resid 86 and name HA) 2.5 0.8 0.8	(resid 111 and name HA) (resid 112 and name HG3) 3.1 1.2 1.2	(resid 112 and name HA) (resid 113 and name HD%) 4.0 2.0 2.0
(resid 86 and name HB3) (resid 82 and name HD%) 3.6 1.7 1.7	(resid 88 and name HA) (resid 103 and name HN) 2.6 0.9 0.9	(resid 112 and name HA) (resid 97 and name HN) 3.9 1.9 1.9
(resid 86 and name HB3) (resid 83 and name HN) 2.9 1.0 1.0	(resid 88 and name HA) (resid 101 and name HN) 3.1 1.2 1.2	(resid 112 and name HA) (resid 112 and name HG3) 2.9 1.0 1.0
(resid 86 and name HA) (resid 86 and name HB2) 2.5 0.8 0.8	(resid 88 and name HA) (resid 88 and name HD1%) 3.7 1.7 1.7	(resid 112 and name HA) (resid 112 and name HB3) 2.4 0.7 0.7
(resid 86 and name HA) (resid 87 and name HB2) 4.7 1.1 1.1	(resid 88 and name HA) (resid 88 and name HD2%) 2.4 0.7 0.7	(resid 112 and name HA) (resid 112 and name HB2) 2.8 1.0 1.0
OR	(resid 88 and name HA) (resid 103 and name HD1%) 2.9 1.0 1.0	(resid 112 and name HA) (resid 113 and name HB3) 3.6 1.6 1.6
(resid 86 and name HA) (resid 87 and name HB3)	(resid 88 and name HA) (resid 88 and name HB3) 2.2 0.6 0.6	(resid 84 and name HA) (resid 68 and name HN) 5.8 2.2 1.0
(resid 86 and name HA) (resid 68 and name HB%) 4.1 2.1 1.9	(resid 88 and name HA) (resid 88 and name HB2) 3.0 1.1 1.1	(resid 84 and name HA) (resid 70 and name HN) 3.4 1.4 1.4
(resid 86 and name HA) (resid 87 and name HA) 4.1 2.1 1.9	(resid 88 and name HA) (resid 88 and name HG) 2.9 1.0 1.0	(resid 84 and name HA) (resid 82 and name HD%) 4.1 2.1 1.9
(resid 100 and name HB%) (resid 100 and name HN) 3.0 1.2 1.2	(resid 88 and name HA) (resid 103 and name HG) 3.1 1.2 1.2	(resid 84 and name HA) (resid 67 and name HG2%) 4.0 2.0 2.0
(resid 100 and name HB%) (resid 91 and name HN) 3.0 1.2 1.2	(resid 89 and name HA) (resid 89 and name HN) 2.8 1.0 1.0	(resid 84 and name HA) (resid 84 and name HG2) 2.4 0.7 0.7
(resid 100 and name HB%) (resid 92 and name HN) 4.4 2.4 1.6	(resid 89 and name HA) (resid 65 and name HA) 2.3 0.7 0.7	(resid 84 and name HA) (resid 84 and name HG3) 2.6 0.9 0.9
(resid 100 and name HB%) (resid 82 and name HE%) 4.5 2.6 1.5	(resid 89 and name HA) (resid 65 and name HD1%) 2.3 0.6 0.6	(resid 84 and name HA) (resid 84 and name HB2) 2.1 0.6 0.6
(resid 100 and name HB%) (resid 98 and name HE3) 4.4 2.4 1.6	(resid 89 and name HA) (resid 89 and name HG2) 2.8 1.0 1.0	(resid 84 and name HA) (resid 69 and name HA) 3.8 1.8 1.8
(resid 100 and name HB%) (resid 98 and name HB2) 3.8 1.8 1.8	(resid 89 and name HA) (resid 89 and name HG3) 2.6 0.9 0.9	(resid 84 and name HA) (resid 85 and name HA1) 3.8 1.8 1.8
(resid 100 and name HB%) (resid 90 and name HB) 3.8 1.8 1.8	(resid 89 and name HA) (resid 89 and name HB2) 2.7 0.9 0.9	(resid 113 and name HA) (resid 98 and name HE1) 4.0 2.0 2.0
(resid 100 and name HB%) (resid 88 and name HD1%) 2.8 1.0 1.0	(resid 89 and name HA) (resid 65 and name HB2) 2.6 0.9 0.9	(resid 113 and name HA) (resid 98 and name HN) 4.3 2.3 1.7
(resid 100 and name HB%) (resid 111 and name HD1%) 2.2 0.6 0.6	(resid 89 and name HA) (resid 66 and name HD1%) 3.4 1.5 1.5	(resid 113 and name HA) (resid 67 and name HG2%) 3.4 1.5 1.5
(resid 100 and name HB%) (resid 88 and name HD2%) 2.1 0.6 0.6	(resid 89 and name HA) (resid 66 and name HN) 2.7 0.9 0.9	(resid 113 and name HA) (resid 113 and name HN) 2.6 0.8 0.8
(resid 100 and name HB%) (resid 90 and name HD1%) 2.4 0.7 0.7	(resid 82 and name HA) (resid 82 and name HD%) 3.1 1.2 1.2	(resid 113 and name HA) (resid 114 and name HN) 3.1 1.2 1.2
(resid 89 and name HG3) (resid 90 and name HN) 3.2 1.3 1.3	(resid 82 and name HA) (resid 82 and name HB3) 2.1 0.6 0.6	(resid 113 and name HA) (resid 116 and name HN) 4.1 2.1 1.9
(resid 89 and name HG3) (resid 89 and name HE) 3.7 1.7 1.7	(resid 82 and name HA) (resid 82 and name HB2) 2.2 0.6 0.6	(resid 113 and name HA) (resid 113 and name HD%) 3.3 1.4 1.4
(resid 89 and name HG3) (resid 101 and name HB3) 3.3 1.4 1.4	(resid 82 and name HA) (resid 86 and name HG3) 3.1 1.2 1.2	(resid 113 and name HA) (resid 111 and name HD1%) 3.9 1.9 1.9
(resid 89 and name HG3) (resid 91 and name HD2%) 3.0 1.2 1.2	(resid 82 and name HA) (resid 86 and name HB2) 3.7 1.7 1.7	(resid 113 and name HA) (resid 116 and name HG2%) 2.7 0.9 0.9
(resid 89 and name HG3) (resid 103 and name HD2%) 3.8 1.0 2.0	(resid 82 and name HA) (resid 88 and name HD2%) 3.6 1.6 1.6	(resid 113 and name HA) (resid 116 and name HB2) 2.2 0.6 0.6
(resid 101 and name HA) (resid 108 and name HA) 2.1 0.5 0.5	(resid 66 and name HA) (resid 118 and name HA) 2.9 1.1 1.1	(resid 113 and name HA) (resid 113 and name HB3) 2.6 0.8 0.8
(resid 101 and name HA) (resid 102 and name HB2) 3.4 1.5 1.5	(resid 66 and name HA) (resid 66 and name HB) 2.4 0.7 0.7	(resid 113 and name HA) (resid 112 and name HA) 3.6 1.6 1.6
(resid 101 and name HA) (resid 108 and name HG3) 4.4 2.4 1.6	(resid 66 and name HA) (resid 66 and name HG1%) 2.4 0.7 0.7	(resid 104 and name HA) (resid 104 and name HB) 3.2 0.5 0.5
(resid 101 and name HA) (resid 101 and name HB3) 3.0 1.1 1.1	(resid 66 and name HA) (resid 66 and name HG2%) 3.2 1.2 1.2	(resid 104 and name HA) (resid 103 and name HB3) 3.4 1.4 1.4
(resid 101 and name HA) (resid 101 and name HB2) 2.5 0.8 0.8	(resid 67 and name HA) (resid 67 and name HN) 3.2 1.3 1.3	(resid 71 and name HB3) (resid 72 and name HN) 2.7 0.9 0.9
(resid 101 and name HA) (resid 100 and name HB%) 3.7 1.7 1.7	(resid 67 and name HA) (resid 87 and name HA) 2.5 0.8 0.8	(resid 71 and name HB3) (resid 71 and name HB2) 1.7 0.4 0.5
(resid 101 and name HA) (resid 80 and name HD2%) 2.7 0.9 0.9	(resid 67 and name HA) (resid 67 and name HG2%) 2.7 0.9 0.9	(resid 71 and name HB3) (resid 72 and name HA) 3.6 1.6 1.6
(resid 79 and name HA) (resid 80 and name HN) 2.1 0.6 0.6	(resid 67 and name HA) (resid 67 and name HG12) 3.6 1.6 1.6	(resid 71 and name HB3) (resid 84 and name HB2) 3.6 1.6 1.6
(resid 79 and name HA) (resid 110 and name HD%) 3.9 1.9 1.9	(resid 67 and name HA) (resid 67 and name HG13) 3.0 1.1 1.1	(resid 118 and name HD2) (resid 118 and name HN) 3.0 1.1 1.1
(resid 79 and name HA) (resid 97 and name HZ3) 4.2 2.2 1.8	(resid 67 and name HA) (resid 67 and name HB) 2.9 1.0 1.0	(resid 118 and name HD3) (resid 118 and name HN) 3.4 1.5 1.5
(resid 79 and name HA) (resid 109 and name HA1) 3.3 1.3 1.3	(resid 67 and name HA) (resid 68 and name HB%) 3.2 1.3 1.3	(resid 118 and name HD3) (resid 119 and name HN) 3.5 1.5 1.5
(resid 79 and name HA) (resid 79 and name HB3) 2.6 0.8 0.8	(resid 67 and name HA) (resid 87 and name HB2) 4.0 2.0 2.0	(resid 118 and name HD2) (resid 119 and name HB) 3.4 1.5 1.5
(resid 79 and name HA) (resid 79 and name HB2) 2.5 0.8 0.8	(resid 73 and name HA) (resid 74 and name HD2) 2.1 0.5 0.5	(resid 118 and name HD2) (resid 120 and name HN) 4.3 2.3 1.7
(resid 79 and name HA) (resid 80 and name HB2) 4.3 2.3 1.7	(resid 73 and name HA) (resid 73 and name HB3) 2.7 0.9 0.9	(resid 118 and name HD3) (resid 120 and name HN) 4.0 2.0 2.0
(resid 79 and name HA) (resid 111 and name HG2%) 4.1 2.1 1.9	(resid 73 and name HA) (resid 73 and name HG3) 2.8 1.0 1.0	(resid 118 and name HD2) (resid 118 and name HE2) 2.9 1.1 1.1
(resid 79 and name HA) (resid 80 and name HB3) 3.2 1.3 1.3	(resid 68 and name HA) (resid 70 and name HN) 3.3 1.3 1.3	OR
(resid 65 and name HA) (resid 89 and name HN) 4.0 2.0 2.0	(resid 68 and name HA) (resid 116 and name HA) 2.9 1.0 1.0	(resid 118 and name HD2) (resid 118 and name HE3)
(resid 65 and name HA) (resid 118 and name HA) 3.9 1.9 1.9	(resid 68 and name HA) (resid 68 and name HB%) 2.4 0.7 0.7	(resid 118 and name HD3) (resid 118 and name HA) 2.9 1.1 1.1
(resid 65 and name HA) (resid 66 and name HG2%) 3.2 1.3 1.3	(resid 119 and name HA) (resid 67 and name HN) 4.1 2.1 1.9	(resid 118 and name HD3) (resid 118 and name HE3) 3.0 1.1 1.1
(resid 65 and name HG) (resid 64 and name HN) 3.9 1.9 1.9	(resid 119 and name HA) (resid 119 and name HN) 2.6 0.9 0.9	OR
(resid 65 and name HG) (resid 65 and name HA) 2.9 1.0 1.0	(resid 119 and name HA) (resid 119 and name HB%) 2.5 0.8 0.8	(resid 118 and name HD3) (resid 118 and name HE2)
(resid 65 and name HG) (resid 65 and name HD2%) 2.8 1.0 1.0		

(resid 118 and name HD3) (resid 118 and name HD2) 1.7 0.3 0.5  
(resid 118 and name HD3) (resid 118 and name HG3) 3.1 1.6 0.6  
(resid 118 and name HG3) (resid 118 and name HN) 3.6 1.6 1.6  
(resid 118 and name HG3) (resid 119 and name HN) 3.7 1.8 1.8  
(resid 118 and name HG3) (resid 118 and name HA) 3.0 1.1 1.1  
(resid 118 and name HG3) (resid 118 and name HE2) 2.3 0.7 0.7  
OR  
(resid 118 and name HG3) (resid 118 and name HE3)  
(resid 118 and name HB2) (resid 118 and name HN) 2.4 0.7 0.7  
(resid 118 and name HB3) (resid 118 and name HN) 3.4 0.7 0.7  
(resid 118 and name HB3) (resid 118 and name HE2) 3.8 1.8 1.8  
OR  
(resid 118 and name HB3) (resid 118 and name HE3)  
(resid 118 and name HB2) (resid 118 and name HE3) 4.0 2.0 2.0  
OR  
(resid 118 and name HB2) (resid 118 and name HE2)  
(resid 118 and name HB3) (resid 66 and name HG1%) 3.5 1.5 1.5  
(resid 118 and name HB2) (resid 66 and name HG1%) 3.4 1.4 1.4  
(resid 118 and name HA) (resid 118 and name HN) 2.5 0.8 0.8  
(resid 118 and name HA) (resid 66 and name HG1%) 2.2 0.6 0.6  
(resid 118 and name HA) (resid 119 and name HB%) 4.8 1.2 1.2  
(resid 118 and name HA) (resid 118 and name HD2) 2.5 0.8 0.8  
(resid 118 and name HA) (resid 118 and name HB3) 2.3 0.6 0.6  
(resid 118 and name HA) (resid 118 and name HB2) 2.4 0.7 0.7  
(resid 118 and name HA) (resid 66 and name HB) 3.0 1.1 1.1  
(resid 118 and name HB2) (resid 117 and name HB%) 5.8 1.6 1.6  
(resid 116 and name HB) (resid 116 and name HA) 2.8 1.0 1.0  
(resid 116 and name HB) (resid 116 and name HG1%) 2.3 0.6 0.6  
(resid 116 and name HB) (resid 66 and name HG2%) 2.4 0.7 0.7  
(resid 116 and name HB) (resid 116 and name HG2%) 2.3 0.6 0.6  
(resid 116 and name HB) (resid 69 and name HG) 4.5 2.5 1.5  
(resid 116 and name HB) (resid 66 and name HB) 2.7 0.9 0.9  
(resid 116 and name HB) (resid 88 and name HD1%) 4.2 2.2 1.8  
(resid 115 and name HB3) (resid 69 and name HA) 4.7 2.8 1.3  
(resid 115 and name HB3) (resid 82 and name HE%) 2.6 0.8 0.8  
(resid 115 and name HB3) (resid 115 and name HD%) 2.4 0.7 0.7  
(resid 115 and name HB3) (resid 82 and name HZ) 2.6 0.8 0.8  
(resid 115 and name HB2) (resid 115 and name HA) 2.9 1.0 1.0  
(resid 115 and name HB3) (resid 115 and name HB2) 2.1 0.5 0.5  
(resid 115 and name HB3) (resid 112 and name HD2) 4.0 2.0 2.0  
(resid 115 and name HB3) (resid 116 and name HG1%) 3.0 1.1 1.1  
(resid 115 and name HB3) (resid 112 and name HG2) 3.0 1.1 1.1  
(resid 115 and name HB3) (resid 112 and name HB3) 4.3 2.3 1.7  
(resid 115 and name HB3) (resid 112 and name HB2) 4.2 2.2 1.8  
(resid 115 and name HB3) (resid 111 and name HB) 3.7 1.7 1.7  
(resid 115 and name HB2) (resid 82 and name HE%) 2.8 1.0 1.0  
(resid 115 and name HB2) (resid 115 and name HD%) 2.6 0.8 0.8  
(resid 115 and name HB2) (resid 82 and name HZ) 2.6 0.8 0.8  
(resid 115 and name HB2) (resid 112 and name HD2) 2.8 1.0 1.0  
(resid 115 and name HB2) (resid 112 and name HG2) 2.7 0.9 0.9  
(resid 115 and name HB2) (resid 112 and name HB3) 4.0 2.0 2.0  
(resid 115 and name HB2) (resid 112 and name HB2) 3.3 1.4 1.4  
(resid 115 and name HB2) (resid 111 and name HB) 4.1 2.1 1.9  
(resid 115 and name HA) (resid 115 and name HD%) 2.7 0.9 0.9  
(resid 115 and name HA) (resid 70 and name HD2) 3.1 1.2 1.2  
(resid 115 and name HA) (resid 115 and name HB2) 2.7 0.9 0.9  
(resid 115 and name HA) (resid 69 and name HB2) 3.2 1.3 1.3  
(resid 115 and name HA) (resid 69 and name HD1%) 5.0 1.6 1.6  
(resid 114 and name HB3) (resid 114 and name HD21) 2.7 0.9 0.9  
(resid 114 and name HB3) (resid 114 and name HN) 2.8 1.0 1.0  
(resid 114 and name HB3) (resid 114 and name HD22) 3.0 1.1 1.1  
(resid 114 and name HB3) (resid 114 and name HB2) 2.0 0.5 0.5  
(resid 114 and name HB2) (resid 114 and name HD21) 2.9 1.0 1.0  
(resid 114 and name HB2) (resid 114 and name HN) 2.7 0.9 0.9  
(resid 114 and name HB2) (resid 114 and name HD22) 3.6 1.6 1.6  
(resid 113 and name HB2) (resid 114 and name HN) 3.3 1.4 1.4  
(resid 113 and name HB2) (resid 113 and name HD%) 2.6 0.8 0.8  
(resid 113 and name HB2) (resid 113 and name HB3) 1.9 0.5 0.5  
(resid 113 and name HB3) (resid 98 and name HE1) 3.5 1.5 1.5  
(resid 113 and name HB3) (resid 113 and name HN) 2.5 0.8 0.8  
(resid 113 and name HB3) (resid 114 and name HN) 3.4 1.5 1.5  
(resid 113 and name HB3) (resid 113 and name HD%) 2.7 0.9 0.9  
(resid 113 and name HB3) (resid 97 and name HB2) 3.4 1.5 1.5  
OR  
(resid 113 and name HB3) (resid 97 and name HB3)  
(resid 113 and name HA) (resid 97 and name HA) 4.7 2.8 1.3  
(resid 112 and name HD2) (resid 111 and name HN) 4.3 2.3 1.7  
(resid 112 and name HD2) (resid 97 and name HZ3) 2.5 0.8 0.8  
(resid 112 and name HD2) (resid 72 and name HD%) 2.9 1.0 1.0  
(resid 112 and name HD2) (resid 82 and name HZ) 2.5 0.8 0.8  
(resid 112 and name HD2) (resid 72 and name HE%) 2.4 0.7 0.7  
(resid 112 and name HD2) (resid 112 and name HA) 2.9 1.0 1.0  
(resid 112 and name HD2) (resid 112 and name HG3) 2.3 0.7 0.7  
(resid 112 and name HD2) (resid 112 and name HB3) 3.5 0.8 0.8  
(resid 112 and name HD2) (resid 111 and name HB) 2.1 0.6 0.6  
(resid 112 and name HD2) (resid 97 and name HE3) 3.3 1.4 1.4  
(resid 112 and name HD2) (resid 112 and name HB2) 3.5 1.5 1.5  
(resid 112 and name HG3) (resid 115 and name HN) 3.8 1.8 1.8  
(resid 112 and name HG2) (resid 82 and name HE%) 3.8 1.8 1.8  
OR  
(resid 112 and name HG3) (resid 82 and name HE%)  
(resid 112 and name HG3) (resid 115 and name HD%) 3.6 1.6 1.6  
(resid 112 and name HG2) (resid 97 and name HH2) 3.7 1.7 1.7  
(resid 112 and name HG3) (resid 72 and name HD%) 3.1 1.2 1.2  
(resid 112 and name HG3) (resid 72 and name HE%) 3.0 1.1 1.1  
(resid 112 and name HG2) (resid 82 and name HZ) 4.2 2.2 1.8  
OR  
(resid 112 and name HG3) (resid 82 and name HZ)  
(resid 112 and name HG3) (resid 115 and name HB2) 3.2 1.3 1.3  
(resid 112 and name HB2) (resid 115 and name HD%) 4.2 2.2 1.8  
(resid 112 and name HB3) (resid 115 and name HE%) 3.3 1.4 1.4  
(resid 112 and name HB2) (resid 112 and name HG3) 2.6 0.9 0.9  
(resid 112 and name HB2) (resid 112 and name HB3) 2.1 0.5 0.5  
(resid 112 and name HB3) (resid 115 and name HN) 3.9 1.9 1.9  
(resid 112 and name HB3) (resid 113 and name HN) 4.5 2.5 1.5  
(resid 112 and name HB3) (resid 114 and name HN) 3.7 1.7 1.7  
(resid 112 and name HB3) (resid 72 and name HD%) 3.6 1.6 1.6  
(resid 112 and name HB3) (resid 112 and name HG3) 2.7 0.9 0.9  
(resid 111 and name HB3) (resid 111 and name HE%) 2.6 0.8 0.8  
(resid 111 and name HG12) (resid 98 and name HN) 3.4 1.4 1.4  
(resid 111 and name HG12) (resid 82 and name HE%) 4.1 2.1 1.9  
(resid 111 and name HG12) (resid 98 and name HB3) 3.2 1.3 1.3  
(resid 111 and name HG12) (resid 98 and name HD2) 2.7 0.9 0.9  
(resid 111 and name HG12) (resid 112 and name HD2) 3.5 1.5 1.5  
(resid 111 and name HG13) (resid 111 and name HN) 2.7 0.9 0.9  
(resid 111 and name HG13) (resid 98 and name HN) 3.2 1.2 1.2  
(resid 111 and name HB3) (resid 111 and name HN) 3.5 1.6 1.6  
(resid 111 and name HB3) (resid 98 and name HE3) 3.8 1.8 1.8  
(resid 111 and name HB3) (resid 100 and name HA) 4.6 2.6 1.4  
(resid 111 and name HB3) (resid 112 and name HD2) 3.0 1.1 1.1  
(resid 111 and name HB2) (resid 111 and name HN) 3.5 1.6 1.6  
(resid 111 and name HB) (resid 82 and name HE%) 2.3 0.7 0.7  
(resid 111 and name HB) (resid 115 and name HE%) 5.7 1.7 1.0  
(resid 111 and name HB) (resid 82 and name HD%) 3.6 1.7 1.7  
(resid 111 and name HB) (resid 82 and name HZ) 3.2 1.3 1.3  
(resid 111 and name HB) (resid 111 and name HG12) 2.7 0.9 0.9  
(resid 111 and name HB) (resid 111 and name HG13) 2.5 0.8 0.8  
(resid 111 and name HG12) (resid 111 and name HD1%) 2.3 0.7 0.7  
(resid 111 and name HG12) (resid 111 and name HG2%) 2.4 0.7 0.7  
(resid 111 and name HG12) (resid 100 and name HB%) 2.3 0.7 0.7  
(resid 111 and name HG12) (resid 111 and name HG13) 1.8 0.4 0.4  
(resid 109 and name HA2) (resid 80 and name HN) 3.3 1.4 1.4  
(resid 109 and name HA2) (resid 110 and name HA) 4.3 2.3 1.7  
(resid 109 and name HA2) (resid 79 and name HA) 3.5 1.6 1.6  
(resid 109 and name HA2) (resid 109 and name HA1) 1.6 0.3 0.6  
(resid 109 and name HA2) (resid 80 and name HB3) 3.1 1.2 1.2  
(resid 108 and name HA2) (resid 80 and name HB2) 2.6 0.9 0.9  
(resid 108 and name HB2) (resid 101 and name HA) 3.5 1.5 1.5  
(resid 108 and name HB3) (resid 101 and name HA) 3.8 1.9 1.9  
(resid 108 and name HB3) (resid 91 and name HD1%) 2.9 1.0 1.0  
(resid 108 and name HB2) (resid 91 and name HD1%) 3.0 1.1 1.1  
(resid 108 and name HB2) (resid 108 and name HG2) 2.2 0.6 0.6  
(resid 108 and name HB3) (resid 108 and name HG2) 2.0 0.5 0.5  
(resid 108 and name HB3) (resid 108 and name HG3) 2.5 0.8 0.8  
(resid 108 and name HB2) (resid 108 and name HG3) 2.9 1.1 1.1  
(resid 108 and name HB3) (resid 108 and name HB2) 1.9 0.5 0.5  
(resid 107 and name HB3) (resid 107 and name HA) 2.5 0.8 0.8  
(resid 107 and name HB3) (resid 107 and name HB2) 1.4 0.2 0.8  
(resid 107 and name HB3) (resid 107 and name HG2) 2.3 0.7 0.7  
OR  
(resid 107 and name HB3) (resid 107 and name HG3)  
(resid 107 and name HB2) (resid 108 and name HN) 3.2 1.2 1.2  
(resid 107 and name HB2) (resid 107 and name HG3) 2.2 0.6 0.6  
OR  
(resid 107 and name HB2) (resid 107 and name HG2)  
(resid 107 and name HA) (resid 107 and name HG3) 2.4 0.7 0.7  
OR  
(resid 107 and name HA) (resid 107 and name HG2)  
(resid 107 and name HA) (resid 107 and name HB2) 2.2 0.6 0.6  
(resid 107 and name HA) (resid 80 and name HD1%) 3.5 1.5 1.5  
(resid 107 and name HG2) (resid 108 and name HN) 3.3 1.4 1.4  
(resid 107 and name HG2) (resid 107 and name HN) 2.9 1.1 1.1  
(resid 107 and name HG3) (resid 107 and name HE21) 3.1 1.2 1.2  
(resid 107 and name HG2) (resid 107 and name HE21) 3.1 1.2 1.2  
(resid 107 and name HG2) (resid 107 and name HE22) 3.9 1.9 1.9  
(resid 107 and name HG3) (resid 107 and name HA) 3.0 1.2 1.2  
(resid 107 and name HG2) (resid 107 and name HA) 2.8 1.0 1.0  
(resid 107 and name HG3) (resid 105 and name HB) 3.2 1.3 1.3  
(resid 107 and name HG3) (resid 80 and name HD1%) 3.3 1.4 1.4  
(resid 107 and name HG3) (resid 105 and name HG2%) 3.8 1.8 1.8  
OR  
(resid 107 and name HG2) (resid 105 and name HG2%)  
(resid 107 and name HG2) (resid 80 and name HD1%) 3.1 1.2 1.2  
(resid 107 and name HG2) (resid 107 and name HB3) 2.5 0.8 0.8  
(resid 107 and name HG3) (resid 107 and name HB3) 2.5 0.8 0.8  
(resid 107 and name HG2) (resid 105 and name HB) 2.8 1.0 1.0  
(resid 107 and name HG2) (resid 107 and name HB2) 3.0 1.1 1.1  
(resid 107 and name HG2) (resid 107 and name HB3) 1.7 0.3 0.5  
(resid 106 and name HA2) (resid 102 and name HN) 4.4 2.5 1.6  
(resid 106 and name HA2) (resid 101 and name HB22) 4.0 2.0 2.0  
(resid 106 and name HA2) (resid 103 and name HD1%) 4.7 2.7 1.3  
(resid 106 and name HA2) (resid 101 and name HG3) 3.1 1.2 1.2  
(resid 106 and name HA1) (resid 106 and name HE22) 3.9 1.9 1.9  
(resid 106 and name HA1) (resid 107 and name HN) 2.9 1.1 1.1  
(resid 106 and name HA1) (resid 101 and name HG3) 3.3 1.3 1.3  
(resid 106 and name HA1) (resid 101 and name HG2) 3.7 1.7 1.7  
(resid 106 and name HA1) (resid 106 and name HA2) 1.7 0.3 0.5  
(resid 105 and name HB) (resid 105 and name HG1) 2.8 1.0 1.0  
(resid 105 and name HB) (resid 105 and name HA) 1.6 0.3 0.6  
(resid 105 and name HB) (resid 107 and name HG2) 3.3 1.4 1.4  
(resid 105 and name HA) (resid 105 and name HG2%) 3.0 1.1 1.1  
(resid 105 and name HA) (resid 105 and name HN) 3.2 1.3 1.3  
(resid 107 and name HB2) (resid 105 and name HG1) 3.1 1.2 1.2  
(resid 107 and name HB3) (resid 105 and name HG1) 3.3 1.4 1.4  
(resid 107 and name HB3) (resid 105 and name HN) 3.9 1.9 1.9  
(resid 107 and name HG3) (resid 105 and name HG1) 4.3 2.3 1.7  
(resid 104 and name HB) (resid 86 and name HG3) 4.0 2.0 2.0  
(resid 104 and name HB) (resid 86 and name HG2) 3.7 1.7 1.7  
(resid 104 and name HB) (resid 104 and name HG2%) 2.0 0.5 0.5  
(resid 103 and name HA) (resid 104 and name HN) 3.5 1.5 1.5  
(resid 103 and name HA) (resid 105 and name HN) 3.7 1.7 1.7  
(resid 103 and name HA) (resid 106 and name HN) 5.0 3.1 1.0  
(resid 103 and name HG2) (resid 103 and name HD1%) 6.0 6.0 6.0  
(resid 103 and name HA) (resid 103 and name HB3) 2.0 0.5 0.5  
(resid 103 and name HB3) (resid 103 and name HN) 3.5 0.8 0.8  
(resid 103 and name HB3) (resid 104 and name HN) 2.8 1.0 1.0  
(resid 102 and name HB2) (resid 102 and name HN) 2.8 0.9 0.9  
(resid 102 and name HB2) (resid 107 and name HN) 4.0 2.0 2.0  
(resid 102 and name HB2) (resid 105 and name HG1) 4.1 2.1 1.9  
(resid 102 and name HB2) (resid 88 and name HD2%) 2.7 0.9 0.9  
(resid 102 and name HB2) (resid 80 and name HD1%) 3.1 1.2 1.2  
(resid 102 and name HB3) (resid 105 and name HN) 3.3 1.3 1.3  
(resid 102 and name HB3) (resid 106 and name HN) 2.8 1.0 1.0  
(resid 102 and name HB3) (resid 102 and name HB2) 1.9 0.4 0.4  
(resid 102 and name HB3) (resid 88 and name HD2%) 2.9 1.1 1.1  
(resid 102 and name HB3) (resid 105 and name HG2%) 3.5 1.5 1.5  
(resid 102 and name HB3) (resid 101 and name HA) 4.0 2.0 2.0  
(resid 102 and name HB3) (resid 105 and name HG1) 3.5 1.5 1.5  
(resid 102 and name HB3) (resid 106 and name HA1) 3.7 1.6 0.6  
(resid 102 and name HB2) (resid 106 and name HA1) 2.4 0.7 0.7  
(resid 101 and name HG2) (resid 101 and name HE21) 2.7 0.9 0.9  
(resid 101 and name HG2) (resid 108 and name HA) 3.8 1.8 1.8  
(resid 101 and name HG2) (resid 88 and name HA) 2.7 0.9 0.9  
(resid 101 and name HB3) (resid 102 and name HN) 3.2 1.3 1.3  
(resid 101 and name HB3) (resid 101 and name HE21) 3.3 1.4 1.4  
(resid 101 and name HB3) (resid 101 and name HE22) 4.2 2.2 1.8  
(resid 101 and name HB3) (resid 108 and name HA) 3.7 1.7 1.7  
(resid 101 and name HB3) (resid 101 and name HA) 3.6 1.6 1.6  
(resid 101 and name HB3) (resid 101 and name HN) 3.4 1.4 1.4  
(resid 101 and name HB2) (resid 102 and name HN) 3.1 1.2 1.2  
(resid 101 and name HB2) (resid 101 and name HE21) 3.2 1.2 1.2  
(resid 101 and name HB2) (resid 101 and name HE22) 4.2 2.2 1.8  
(resid 101 and name HB2) (resid 108 and name HA) 3.4 1.5 1.5  
(resid 101 and name HG2) (resid 91 and name HD1%) 3.1 1.2 1.2  
(resid 101 and name HG2) (resid 101 and name HB2) 2.2 0.6 0.6  
(resid 101 and name HG2) (resid 101 and name HG3) 1.9 0.4 0.4

(resid 101 and name HB3) (resid 91 and name HD1%) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 101 and name HB3) (resid 101 and name HB2) 1.9 0.4 0.4  
 (resid 101 and name HB3) (resid 101 and name HG2) 2.2 0.6 0.6  
 (resid 101 and name HG3) (resid 91 and name HD1%) 3.0 1.1 1.1  
 (resid 101 and name HG3) (resid 101 and name HB2) 2.3 0.7 0.7  
 (resid 101 and name HB2) (resid 91 and name HD1%) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 101 and name HG3) (resid 108 and name HA) 6.0 4.4 0.0  
 (resid 99 and name HB2) (resid 91 and name HN) 4.5 2.5 1.5  
 (resid 99 and name HB2) (resid 92 and name HN) 2.9 1.0 1.0  
 (resid 99 and name HB2) (resid 110 and name HD%) 3.7 1.7 1.7  
 (resid 99 and name HB3) (resid 91 and name HN) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 99 and name HB3) (resid 100 and name HN) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 99 and name HG3) (resid 100 and name HN) 3.8 1.8 1.8  
 (resid 99 and name HG3) (resid 99 and name HN) 3.6 1.6 1.6  
 (resid 99 and name HG3) (resid 110 and name HD%) 3.5 1.5 1.5  
 (resid 99 and name HG3) (resid 109 and name HA1) 4.0 2.0 2.0  
 (resid 99 and name HD2) (resid 110 and name HN) 3.5 1.5 1.5  
 (resid 99 and name HD3) (resid 110 and name HN) 3.3 1.3 1.3  
 (resid 99 and name HD3) (resid 100 and name HN) 3.1 1.2 1.2  
 (resid 99 and name HA) (resid 110 and name HA) 2.2 0.6 0.6  
 (resid 99 and name HA) (resid 99 and name HN) 2.6 0.9 0.9  
 (resid 99 and name HA) (resid 100 and name HN) 2.0 0.5 0.5  
 (resid 99 and name HA) (resid 111 and name HN) 3.0 1.2 1.2  
 (resid 99 and name HA) (resid 99 and name HD3) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 99 and name HA) (resid 99 and name HD2) 2.8 1.0 1.0  
 (resid 99 and name HA) (resid 100 and name HB%) 3.4 1.4 1.4  
 (resid 99 and name HA) (resid 99 and name HG3) 3.3 1.3 1.3  
 (resid 99 and name HA) (resid 99 and name HB2) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 99 and name HA) (resid 99 and name HB3) 2.6 0.8 0.8  
 (resid 99 and name HB2) (resid 92 and name HB2) 3.0 1.1 1.1  
 (resid 99 and name HB2) (resid 92 and name HB2) 2.9 1.0 1.0  
 (resid 99 and name HB2) (resid 99 and name HB3) 1.9 0.4 0.4  
 (resid 99 and name HB2) (resid 99 and name HG3) 3.0 1.1 1.1  
 (resid 99 and name HB2) (resid 91 and name HB2) 3.4 1.4 1.4  
 (resid 99 and name HB3) (resid 99 and name HD2) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 99 and name HB3) (resid 91 and name HB2) 2.8 1.0 1.0  
 (resid 99 and name HG3) (resid 99 and name HD3) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 99 and name HG3) (resid 99 and name HD2) 2.2 0.6 0.6  
 (resid 99 and name HG3) (resid 99 and name HE3) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 99 and name HG3) (resid 91 and name HG) 2.2 0.6 0.6  
 (resid 99 and name HG3) (resid 99 and name HB3) 2.4 0.7 0.7  
 (resid 99 and name HD2) (resid 99 and name HB3) 1.8 0.4 0.4  
 (resid 99 and name HD2) (resid 99 and name HB2) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 99 and name HD3) (resid 99 and name HB2) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 99 and name HD3) (resid 99 and name HB3) 2.9 1.0 1.0  
 (resid 99 and name HE3) (resid 110 and name HD%) 3.5 1.5 1.5  
 (resid 99 and name HE2) (resid 110 and name HD%) 3.6 1.6 1.6  
 (resid 99 and name HE3) (resid 91 and name HD1%) 3.0 1.1 1.1  
 (resid 99 and name HE2) (resid 91 and name HD1%) 2.9 1.1 1.1  
 (resid 99 and name HE3) (resid 99 and name HD3) 2.8 1.0 1.0  
 (resid 99 and name HE3) (resid 99 and name HD3) 3.4 1.4 1.4  
 (resid 99 and name HE3) (resid 99 and name HD2) 3.3 1.4 1.4  
 (resid 99 and name HE2) (resid 99 and name HD2) 3.2 1.3 1.3  
 (resid 99 and name HE2) (resid 99 and name HG3) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 99 and name HE3) (resid 99 and name HB2) 3.7 1.7 1.7  
 (resid 99 and name HE2) (resid 99 and name HB2) 3.3 1.4 1.4  
 (resid 99 and name HE2) (resid 108 and name HB3) 3.6 1.6 1.6  
 (resid 99 and name HE3) (resid 108 and name HB3) 3.7 1.7 1.7  
 (resid 97 and name HB3) (resid 98 and name HN) 3.1 1.2 1.2  
 (resid 97 and name HB3) (resid 97 and name HN) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 97 and name HB3) (resid 97 and name HE3) 2.9 1.1 1.1  
 (resid 96 and name HG3) (resid 96 and name HN) 3.2 1.3 1.3  
 (resid 96 and name HG3) (resid 97 and name HN) 4.2 2.2 1.8  
 (resid 96 and name HG3) (resid 113 and name HD%) 3.6 1.6 1.6  
 (resid 96 and name HG2) (resid 96 and name HN) 3.2 1.3 1.3  
 (resid 96 and name HG2) (resid 97 and name HN) 4.3 2.4 1.7  
 (resid 96 and name HG2) (resid 97 and name HD1) 4.0 2.0 2.0  
 (resid 96 and name HG2) (resid 113 and name HD%) 3.7 1.7 1.7  
 (resid 96 and name HG2) (resid 96 and name HB3) 1.8 0.4 0.4  
 OR  
 (resid 96 and name HG2) (resid 96 and name HB2)  
 (resid 96 and name HB3) (resid 96 and name HN) 3.0 1.1 1.1  
 (resid 96 and name HB3) (resid 97 and name HD1) 3.7 1.7 1.7  
 (resid 96 and name HB3) (resid 113 and name HD%) 3.5 1.5 1.5  
 (resid 95 and name HA2) (resid 96 and name HB3) 3.6 1.6 1.6  
 OR  
 (resid 95 and name HA2) (resid 96 and name HB2)  
 (resid 95 and name HA2) (resid 96 and name HG2) 4.5 2.5 1.5  
 (resid 95 and name HA1) (resid 96 and name HB3) 3.8 1.8 1.8

OR

(resid 95 and name HA1) (resid 96 and name HB2)  
 (resid 95 and name HA1) (resid 96 and name HG2) 4.0 2.0 2.0  
 (resid 95 and name HA1) (resid 97 and name HN) 3.2 1.3 1.3  
 (resid 95 and name HA1) (resid 96 and name HN) 2.4 0.7 0.7  
 (resid 94 and name HA) (resid 94 and name HB2) 2.4 0.7 0.7  
 (resid 94 and name HB2) (resid 92 and name HG2) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 94 and name HB2) (resid 92 and name HG3) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 94 and name HB2) (resid 92 and name HB3) 3.8 1.8 1.8  
 (resid 93 and name HB3) (resid 93 and name HE2%) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 93 and name HB3) (resid 90 and name HB) 3.3 1.4 1.4  
 (resid 93 and name HB2) (resid 98 and name HE1) 4.2 2.2 1.8  
 (resid 93 and name HB2) (resid 94 and name HN) 4.1 2.1 1.9  
 (resid 93 and name HB2) (resid 98 and name HE2) 4.2 2.2 1.8  
 (resid 93 and name HB2) (resid 93 and name HE22) 4.4 2.4 1.6  
 (resid 93 and name HB2) (resid 93 and name HB3) 1.8 0.4 0.4  
 (resid 93 and name HB2) (resid 93 and name HG2) 2.3 0.6 0.6  
 (resid 93 and name HB2) (resid 93 and name HD2%) 2.8 1.0 1.0  
 (resid 93 and name HG2) (resid 93 and name HN) 3.3 1.4 1.4  
 (resid 93 and name HG2) (resid 98 and name HE3) 4.2 2.2 1.8  
 (resid 93 and name HG2) (resid 93 and name HE21) 4.0 2.0 2.0  
 (resid 93 and name HG2) (resid 98 and name HE2) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 93 and name HG2) (resid 93 and name HA) 2.9 1.0 1.0  
 (resid 93 and name HG2) (resid 93 and name HB3) 2.0 0.5 0.5  
 (resid 93 and name HG3) (resid 93 and name HN) 3.5 1.5 1.5  
 (resid 93 and name HG3) (resid 98 and name HB3) 4.4 2.4 1.6  
 (resid 93 and name HG3) (resid 93 and name HE21) 3.5 1.5 1.5  
 (resid 93 and name HG3) (resid 93 and name HE22) 3.5 1.5 1.5  
 (resid 93 and name HG2) (resid 92 and name HG3) 3.2 1.3 1.3  
 (resid 93 and name HG3) (resid 93 and name HB3) 2.3 0.6 0.6  
 (resid 92 and name HB2) (resid 99 and name HN) 3.0 1.1 1.1  
 (resid 92 and name HB2) (resid 92 and name HN) 2.8 1.0 1.0  
 (resid 92 and name HB2) (resid 92 and name HA) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 91 and name HB3) (resid 100 and name HB3) 3.7 1.7 1.7  
 (resid 91 and name HB3) (resid 91 and name HA) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 91 and name HB3) (resid 92 and name HG3) 3.8 1.8 1.8  
 (resid 91 and name HB3) (resid 91 and name HD1%) 2.2 0.6 0.6  
 OR  
 (resid 91 and name HB3) (resid 91 and name HD2%)  
 (resid 91 and name HB2) (resid 91 and name HA) 2.6 0.8 0.8  
 (resid 91 and name HB2) (resid 92 and name HG3) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 91 and name HB2) (resid 100 and name HA) 5.8 1.7 1.7  
 (resid 91 and name HB2) (resid 91 and name HD1%) 2.1 0.6 0.6  
 (resid 91 and name HB2) (resid 91 and name HB3) 1.7 0.4 0.5  
 (resid 91 and name HG) (resid 101 and name HN) 3.1 1.2 1.2  
 (resid 91 and name HG) (resid 92 and name HN) 3.7 1.7 1.7  
 (resid 91 and name HG) (resid 100 and name HA) 2.6 0.9 0.9  
 (resid 91 and name HG) (resid 91 and name HA) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 91 and name HG) (resid 90 and name HA) 3.0 1.1 1.1  
 (resid 91 and name HA) (resid 92 and name HN) 3.0 1.1 1.1  
 (resid 90 and name HG13) (resid 98 and name HE3) 2.9 1.1 1.1  
 (resid 90 and name HG13) (resid 98 and name HZ3) 3.4 1.5 1.5  
 (resid 90 and name HG13) (resid 90 and name HA) 3.4 1.5 1.5  
 (resid 90 and name HG13) (resid 90 and name HG12) 1.7 0.4 0.5  
 (resid 90 and name HG13) (resid 90 and name HD1%) 2.1 0.5 0.5  
 (resid 90 and name HG12) (resid 98 and name HE3) 3.4 1.5 1.5  
 (resid 90 and name HG12) (resid 90 and name HG2%) 2.3 0.7 0.7  
 (resid 90 and name HB) (resid 64 and name HB2) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 90 and name HB) (resid 90 and name HG2%) 2.1 0.6 0.6  
 (resid 90 and name HB) (resid 90 and name HG13) 2.3 0.6 0.6  
 (resid 90 and name HB) (resid 90 and name HG12) 2.4 0.7 0.7  
 (resid 89 and name HD2) (resid 101 and name HN) 4.2 2.2 1.8  
 (resid 89 and name HD2) (resid 89 and name HE) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 89 and name HD3) (resid 89 and name HE) 2.8 1.0 1.0  
 (resid 89 and name HD3) (resid 101 and name HE22) 2.8 1.0 1.0  
 (resid 89 and name HD2) (resid 91 and name HD2%) 4.0 1.0 1.0  
 (resid 89 and name HD3) (resid 89 and name HG2) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 89 and name HD2) (resid 103 and name HD2%) 3.2 1.3 1.3  
 (resid 89 and name HD3) (resid 103 and name HD2%) 3.1 1.2 1.2  
 (resid 89 and name HD2) (resid 89 and name HG3) 2.4 0.7 0.7  
 (resid 89 and name HD3) (resid 89 and name HG3) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 89 and name HD2) (resid 101 and name HB3) 6.0 1.3 1.3  
 (resid 89 and name HD3) (resid 101 and name HB3) 3.6 1.6 1.6  
 (resid 89 and name HD3) (resid 89 and name HD2) 1.4 0.2 0.8  
 (resid 89 and name HG2) (resid 89 and name HN) 3.2 1.3 1.3  
 (resid 89 and name HG2) (resid 89 and name HE) 3.5 1.5 1.5  
 (resid 89 and name HG2) (resid 89 and name HD2) 2.3 0.6 0.6

(resid 89 and name HG2) (resid 89 and name HG3) 1.8 0.4 0.4  
 (resid 89 and name HG2) (resid 89 and name HB3) 2.2 0.6 0.6  
 (resid 89 and name HG2) (resid 89 and name HB2) 2.4 0.7 0.7  
 (resid 89 and name HG2) (resid 101 and name HB3) 3.1 1.2 1.2  
 (resid 89 and name HB2) (resid 90 and name HN) 3.5 1.0 1.0  
 (resid 89 and name HB2) (resid 89 and name HE) 3.5 1.5 1.5  
 (resid 89 and name HB3) (resid 101 and name HN) 3.1 1.2 1.2  
 (resid 89 and name HB3) (resid 89 and name HE) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 89 and name HB3) (resid 89 and name HA) 3.1 1.2 1.2  
 (resid 89 and name HB3) (resid 103 and name HD2) 2.6 0.8 0.8  
 (resid 89 and name HB3) (resid 89 and name HD2) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 89 and name HB3) (resid 91 and name HD2%) 3.4 1.5 1.5  
 (resid 89 and name HB2) (resid 103 and name HD2%) 2.4 0.7 0.7  
 (resid 89 and name HB3) (resid 89 and name HD2) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 89 and name HB2) (resid 89 and name HB3) 1.7 0.4 0.5  
 (resid 88 and name HG) (resid 86 and name HG3) 3.3 1.4 1.4  
 (resid 88 and name HB2) (resid 88 and name HN) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 88 and name HB3) (resid 101 and name HN) 3.3 1.4 1.4  
 (resid 88 and name HB2) (resid 66 and name HN) 3.8 1.8 1.8  
 (resid 87 and name HG2) (resid 88 and name HN) 3.4 1.4 1.4  
 (resid 87 and name HG3) (resid 88 and name HN) 3.3 1.4 1.2  
 (resid 87 and name HG2) (resid 87 and name HA) 2.6 0.9 0.9  
 (resid 87 and name HG2) (resid 67 and name HG2%) 3.1 1.2 1.2  
 (resid 87 and name HG2) (resid 67 and name HD1%) 2.9 1.0 1.0  
 (resid 87 and name HG2) (resid 67 and name HG13) 3.4 1.4 1.4  
 (resid 87 and name HG2) (resid 87 and name HB2) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 87 and name HG2) (resid 87 and name HB3) 1.8 0.4 0.4  
 (resid 87 and name HG2) (resid 87 and name HG3) 1.8 0.4 0.4  
 (resid 87 and name HG3) (resid 88 and name HN) 3.3 1.4 1.4  
 (resid 87 and name HG3) (resid 87 and name HN) 3.0 1.1 1.1  
 (resid 87 and name HG3) (resid 87 and name HE21) 2.8 1.0 1.0  
 (resid 87 and name HG3) (resid 87 and name HE22) 3.6 1.6 1.6  
 (resid 87 and name HG3) (resid 87 and name HA) 2.7 0.9 0.9  
 (resid 87 and name HG3) (resid 86 and name HA) 3.4 1.5 1.5  
 (resid 87 and name HG3) (resid 87 and name HB3) 2.8 0.4 0.4  
 (resid 87 and name HG3) (resid 67 and name HB) 4.1 2.1 1.9  
 (resid 87 and name HG3) (resid 67 and name HG13) 3.4 1.5 1.5  
 (resid 87 and name HG3) (resid 67 and name HG12) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 87 and name HG3) (resid 67 and name HG2%) 4.6 1.8 0.8  
 (resid 87 and name HB2) (resid 87 and name HE21) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 87 and name HB2) (resid 103 and name HD1%) 4.0 2.0 2.0  
 (resid 87 and name HB2) (resid 86 and name HA) 5.1 1.2 1.2  
 (resid 87 and name HB2) (resid 87 and name HG3) 2.2 0.6 0.6  
 (resid 87 and name HB2) (resid 103 and name HB3) 2.6 0.8 1.8  
 (resid 87 and name HB2) (resid 103 and name HD1%) 2.2 0.6 0.6  
 (resid 87 and name HB2) (resid 67 and name HG13) 3.6 1.6 1.6  
 (resid 85 and name HA1) (resid 68 and name HN) 4.4 2.4 1.6  
 (resid 85 and name HA1) (resid 68 and name HB%) 3.0 1.2 1.2  
 (resid 85 and name HA1) (resid 67 and name HB) 4.1 2.2 1.9  
 (resid 85 and name HA1) (resid 67 and name HG13) 3.6 1.6 1.6  
 (resid 85 and name HA1) (resid 84 and name HG3) 3.4 1.4 1.4  
 (resid 85 and name HA1) (resid 67 and name HG12) 3.3 1.3 1.3  
 (resid 85 and name HA1) (resid 67 and name HG2%) 2.6 0.8 0.8  
 (resid 85 and name HA2) (resid 85 and name HA1) 1.7 0.3 0.5  
 (resid 85 and name HA2) (resid 68 and name HB%) 6.0 1.3 1.3  
 (resid 85 and name HA2) (resid 67 and name HG13) 6.0 2.0 1.0  
 (resid 85 and name HA2) (resid 84 and name HG2%) 3.9 1.9 1.9  
 (resid 85 and name HA2) (resid 67 and name HG12) 3.8 1.8 1.8  
 (resid 85 and name HA2) (resid 67 and name HG2%) 3.0 1.1 1.1  
 (resid 84 and name HE2) (resid 69 and name HD1%) 6.0 1.9 1.0  
 (resid 84 and name HE2) (resid 84 and name HG3) 2.4 0.7 0.7  
 (resid 84 and name HE2) (resid 84 and name HD3) 2.2 0.6 0.6  
 OR  
 (resid 84 and name HE2) (resid 84 and name HD2)  
 (resid 84 and name HE2) (resid 69 and name HA) 3.7 1.7 1.7  
 (resid 84 and name HD2) (resid 84 and name HN) 4.3 2.3 1.7  
 (resid 84 and name HD2) (resid 85 and name HN) 3.7 1.7 1.7  
 (resid 84 and name HD3) (resid 84 and name HE2) 2.4 0.7 0.7  
 (resid 84 and name HD2) (resid 84 and name HE2) 2.4 0.7 0.7  
 (resid 84 and name HD3) (resid 84 and name HA) 3.6 1.7 1.7  
 (resid 84 and name HD2) (resid 84 and name HA) 4.1 2.1 1.9  
 (resid 84 and name HD3) (resid 84 and name HG2) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 84 and name HD2) (resid 84 and name HG2) 2.5 0.8 0.8  
 (resid 84 and name HD2) (resid 84 and name HG3) 2.6 0.8 0.8  
 (resid 84 and name HD3) (resid 84 and name HG3) 2.3 0.7 0.7  
 (resid 84 and name HG2) (resid 84 and name HN) 4.2 2.2 1.8  
 (resid 84 and name HG2) (resid 70 and name HN) 4.4 2.4 1.6  
 (resid 84 and name HG2) (resid 69 and name HA) 3.6 1.6 1.6



(resid 65 and name HB2) (resid 65 and name HA) 2.6 0.8 0.8  
(resid 65 and name HB2) (resid 65 and name HG) 3.6 1.0 1.0  
(resid 65 and name HB2) (resid 119 and name HB%) 3.8 1.2 1.2  
(resid 65 and name HB2) (resid 65 and name HD2%) 2.6 0.8 0.8  
(resid 64 and name HB3) (resid 65 and name HN) 3.5 1.5 1.5  
(resid 64 and name HB2) (resid 65 and name HN) 3.6 1.6 1.6  
(resid 64 and name HB2) (resid 64 and name HD21) 2.6 0.9 0.9  
(resid 64 and name HB3) (resid 64 and name HD21) 2.6 0.9 0.9  
(resid 64 and name HB3) (resid 90 and name HG12) 3.7 1.7 1.7  
(resid 64 and name HB2) (resid 90 and name HG12) 3.6 1.6 1.6  
(resid 64 and name HB3) (resid 90 and name HB) 2.9 1.0 1.0  
(resid 64 and name HB3) (resid 64 and name HB2) 1.6 0.3 0.6  
(resid 64 and name HB2) (resid 89 and name HG2) 4.0 2.0 2.0  
(resid 64 and name HB2) (resid 90 and name HD1%) 4.0 2.0 2.0  
(resid 64 and name HB2) (resid 90 and name HG2%) 3.6 1.6 1.6  
(resid 64 and name HB3) (resid 90 and name HD1%) 3.6 1.6 1.6  
(resid 64 and name HB3) (resid 89 and name HG2) 3.9 1.9 1.9  
(resid 65 and name HD2%) (resid 87 and name HB3) 3.1 1.2 1.2  
(resid 92 and name HA) (resid 91 and name HN) 4.0 2.0 2.0  
(resid 92 and name HA) (resid 92 and name HB3) 2.2 0.6 0.6  
(resid 115 and name HB3) (resid 82 and name HD%) 3.4 1.5 1.5  
(resid 69 and name HD1%) (resid 69 and name HB2) 3.3 0.8 0.8  
(resid 69 and name HD2%) (resid 69 and name HB2) 2.5 0.8 0.8  
(resid 66 and name HG1%) (resid 118 and name HN) 3.6 1.6 1.6  
(resid 118 and name HG3) (resid 120 and name HN) 4.4 2.4 1.6  
(resid 118 and name HB2) (resid 120 and name HN) 4.0 2.0 2.0  
(resid 87 and name HB2) (resid 103 and name HN) 4.6 2.6 1.4  
(resid 87 and name HB2) (resid 66 and name HN) 4.6 2.6 1.4  
(resid 90 and name HG2%) (resid 93 and name HE21) 5.0 3.1 1.0  
(resid 99 and name HD2) (resid 92 and name HN) 4.6 2.7 1.4  
(resid 99 and name HG3) (resid 92 and name HN) 4.0 2.0 2.0  
(resid 99 and name HB2) (resid 98 and name HA) 4.8 2.8 1.2  
(resid 99 and name HB3) (resid 100 and name HA) 4.0 2.0 2.0  
(resid 89 and name HD3) (resid 101 and name HN) 4.9 3.0 1.1  
(resid 89 and name HD3) (resid 89 and name HN) 5.3 3.5 0.7  
(resid 89 and name HD2) (resid 89 and name HN) 4.2 2.2 1.8  
(resid 103 and name HG) (resid 103 and name HA) 2.6 0.9 0.9  
(resid 103 and name HG) (resid 104 and name HN) 4.1 2.1 1.9  
(resid 103 and name HG) (resid 89 and name HN) 3.4 1.4 1.4  
(resid 103 and name HG) (resid 103 and name HN) 2.8 1.0 1.0  
(resid 120 and name HA) (resid 120 and name HB3) 2.5 0.8 0.8  
OR  
(resid 120 and name HA) (resid 120 and name HB2)  
(resid 120 and name HB2) (resid 120 and name HD22) 4.0 2.0 2.0  
(resid 120 and name HB3) (resid 120 and name HA) 3.6 1.6 1.6  
(resid 120 and name HB2) (resid 120 and name HA) 3.1 1.2 1.2  
(resid 65 and name HB2) (resid 88 and name HN) 5.7 4.1 0.3  
(resid 74 and name HG2) (resid 81 and name HN) 3.6 1.6 1.6  
(resid 74 and name HG3) (resid 75 and name HN) 4.6 2.7 1.4  
(resid 74 and name HG3) (resid 74 and name HA) 3.4 1.5 1.5  
(resid 74 and name HG3) (resid 81 and name HA2) 3.4 1.4 1.4  
(resid 74 and name HG3) (resid 73 and name HA) 3.6 1.6 1.6  
(resid 67 and name HG2%) (resid 69 and name HN) 5.2 3.4 0.8  
(resid 70 and name HB3) (resid 69 and name HN) 4.6 2.7 1.4  
(resid 70 and name HB2) (resid 69 and name HN) 4.7 2.8 1.3  
(resid 86 and name HB2) (resid 68 and name HN) 4.6 2.7 1.4  
(resid 64 and name HB3) (resid 89 and name HG3) 4.2 2.2 1.8  
(resid 80 and name HA) (resid 80 and name HB3) 2.6 0.9 0.9  
(resid 80 and name HA) (resid 80 and name HB2) 2.2 0.6 0.6  
(resid 80 and name HA) (resid 81 and name HN) 2.1 0.5 0.5  
(resid 96 and name HB2) (resid 113 and name HD%) 3.1 1.2 1.2  
(resid 96 and name HB2) (resid 97 and name HD1) 3.5 1.5 1.5  
(resid 96 and name HB2) (resid 96 and name HN) 3.3 1.3 1.3  
(resid 96 and name HB2) (resid 96 and name HA) 2.5 0.8 0.8  
(resid 102 and name HB2) (resid 103 and name HN) 3.5 1.6 1.6  
(resid 102 and name HB3) (resid 103 and name HN) 4.3 2.3 1.7  
(resid 118 and name HE3) (resid 98 and name HE3) 6.0 4.5 0.0  
OR  
(resid 118 and name HE2) (resid 98 and name HE3)  
(resid 117 and name HB%) (resid 66 and name HG1%) 5.8 2.3 0.8

### 9.3 Dihedrale Winkelbeschränkungen für die Strukturrechnungen von LckU3

#### Lcku3\_phi\_dihedrals.tbl

```
! Lcku3 3JHNHA Couplings
! 66 J= 9.38
assign (resid 65 and name C ) (resid 66 and name N )
      (resid 66 and name CA) (resid 66 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 68 J=4.20
assign (resid 67 and name C ) (resid 68 and name N )
      (resid 68 and name CA) (resid 68 and name C ) 1.00 -60.00 20.00 2
! 73 J= 8.23
assign (resid 72 and name C ) (resid 73 and name N )
      (resid 73 and name CA) (resid 73 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 75 J= 9.11
assign (resid 74 and name C ) (resid 75 and name N )
      (resid 75 and name CA) (resid 75 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 76 J= 8.33
assign (resid 75 and name C ) (resid 76 and name N )
      (resid 76 and name CA) (resid 76 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 77 J= 2.30
assign (resid 76 and name C ) (resid 77 and name N )
      (resid 77 and name CA) (resid 77 and name C ) 1.00 -60.00 20.00 2
! 86 J= 4.79
assign (resid 85 and name C ) (resid 86 and name N )
      (resid 86 and name CA) (resid 86 and name C ) 1.00 -60.00 20.00 2
! 88 J= 9.04
assign (resid 87 and name C ) (resid 88 and name N )
      (resid 88 and name CA) (resid 88 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 89 J= 8.46
assign (resid 88 and name C ) (resid 89 and name N )
      (resid 89 and name CA) (resid 89 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 91 J= 9.03
assign (resid 90 and name C ) (resid 91 and name N )
      (resid 91 and name CA) (resid 91 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 93 J= 8.54
assign (resid 92 and name C ) (resid 93 and name N )
      (resid 93 and name CA) (resid 93 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 98 J= 8.72
assign (resid 97 and name C ) (resid 98 and name N )
      (resid 98 and name CA) (resid 98 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 100 J= 9.27
assign (resid 99 and name C ) (resid 100 and name N )
      (resid 100 and name CA) (resid 100 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 101 J= 9.04
assign (resid 100 and name C ) (resid 101 and name N )
      (resid 101 and name CA) (resid 101 and name C ) 1.00 -120.00 40.00 2
! 102 J= 5.92
assign (resid 101 and name C ) (resid 102 and name N )
```

```

(resid 102 and name CA) (resid 102 and name C) 1.00 -60.00 20.00 2
! 104 J= 8.19
assign (resid 103 and name C) (resid 104 and name N)
(resid 104 and name CA) (resid 104 and name C) 1.00 -120.00 40.00 2
! 105 J= 8.29
assign (resid 104 and name C) (resid 105 and name N)
(resid 105 and name CA) (resid 105 and name C) 1.00 -120.00 40.00 2
! 108 J= 8.21
assign (resid 107 and name C) (resid 108 and name N)
(resid 108 and name CA) (resid 108 and name C) 1.00 -120.00 40.00 2
! 111 J= 8.83
assign (resid 110 and name C) (resid 111 and name N)
(resid 111 and name CA) (resid 111 and name C) 1.00 -120.00 40.00 2
! 116 J= 9.17
assign (resid 115 and name C) (resid 116 and name N)
(resid 116 and name CA) (resid 116 and name C) 1.00 -120.00 40.00 2
! 117 J= 8.0
assign (resid 116 and name C) (resid 117 and name N)
(resid 117 and name CA) (resid 117 and name C) 1.00 -120.00 40.00 2
! 118 J= 4.0
assign (resid 117 and name C) (resid 118 and name N)
(resid 118 and name CA) (resid 118 and name C) 1.00 -60.00 20.00 2
! 120 J= 8.00
assign (resid 119 and name C) (resid 120 and name N)
(resid 120 and name CA) (resid 120 and name C) 1.00 -120.00 40.00 2

```

## 9.4 CNS-Protokoll für eine Strukturrechnung an LckU3

### anneal.inp

```

{+ file: anneal.inp +}
{+ directory: nmr_calc +}
{+ description: dynamical annealing with NOEs, coupling constants,
chemical shift restraints starting from extended
strands or pre-folded structures. +}
{+ authors: Gregory Warren, Michael Nilges, John Kuszewski,
Marius Clore and Axel Brunger +}
{+ copyright: Yale University +}

{+ reference: Clore GM, Gronenborn AM, Tjandra N, Direct structure refinement
against residual dipolar couplings in the presence of rhombicity
of unknown magnitude., J. Magn. Reson., 131, In press, (1998) +}
{+ reference: Clore GM, Gronenborn AM, Bax A, A robust method for determining
the magnitude of the fully asymmetric alignment tensor of
oriented macromolecules in the absence of structural
information., J. Magn. Reson., In press (1998) +}
{+ reference: Garrett DS, Kuszewski J, Hancock TJ, Lodi PJ, Vuister GW,
Gronenborn AM, Clore GM, The impact of direct refinement against
three-bond HN-C alpha H coupling constants on protein structure
determination by NMR., J. Magn. Reson. Ser. B, 104(1),
99-103, (1994) May +}
{+ reference: Kuszewski J, Qin J, Gronenborn AM, Clore GM, The impact of direct
refinement against 13C alpha and 13C beta chemical shifts on

```

protein structure determination by NMR., J. Magn. Reson. Ser. B, 106(1), 92-6, (1995) Jan +}

{+ reference: Kuszewski J, Gronenborn AM, Clore GM, The impact of direct refinement against proton chemical shifts on protein structure determination by NMR., J. Magn. Reson. Ser. B, 107(3), 293-7, (1995) Jun +}

{+ reference: Kuszewski J, Gronenborn AM, Clore GM, A potential involving multiple proton chemical-shift restraints for nonstereospecifically assigned methyl and methylene protons. J. Magn. Reson. Ser. B, 112(1), 79-81, (1996) Jul. +}

{+ reference: Nilges M, Gronenborn AM, Brunger AT, Clore GM, Determination of three-dimensional structures of proteins by simulated annealing with interproton distance restraints: application to crambin, potato carboxypeptidase inhibitor and barley serine proteinase inhibitor 2. Protein Engineering 2, 27-38, (1988) +}

{+ reference: Nilges M, Clore GM, Gronenborn AM, Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms. FEBS Lett. 239, 129-136. (1988) +}

{+ reference: Rice LM, Brunger AT, Torsion Angle Dynamics: Reduced Variable Conformational Sampling Enhances Crystallographic Structure Refinement., Proteins, 19, 277-290 (1994) +}

```

{+ reference: Stein EG, Rice LM, Brunger AT, Torsion angle molecular
dynamics: a new efficient tool for NMR structure calculation.,
J. Mag. Res. Ser. B 124, 154-164 (1997) +}

{+ reference: Tjandra N, Garrett DS, Gronenborn AM, Bax A, Clore GM, Defining
long range order in NMR structure determination from the
dependence of heteronuclear relaxation times on rotational
diffusion anisotropy. Nature Struct. Biol., 4(6), 443-9,
(1997) June +}

{+ reference: Tjandra N, Omichinski JG, Gronenborn AM, Clore GM, Bax A, Use of
dipolar 1H-15N and 1H-13C couplings in the structure
determination of magnetically oriented macromolecules in
solution. Nature Struct. Biol., 4(9), 732-8, (1997) Sept +}

! Data taken from: Qin J, Clore GM, Kennedy WP, Kuszewski J, Gronenborn AM,
! The solution structure of human thioredoxin complexed with
! its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal.,
! Structure, 4(5), 613-620, 1996 May 15.

{- Guidelines for using this file:
- all strings must be quoted by double-quotes
- logical variables (true/false) are not quoted
- do not remove any evaluate statements from the file -}

{- begin block parameter definition -} define(

=====          molecular          structure
=====);

{* parameter file(s) *}
{====>} par.1="CNS_TOPPAR:protein-allhdg.param";
{====>} par.2="";
{====>} par.3="";
{====>} par.4="";
{====>} par.5="";

{* structure file(s) *}
{====>} struct.1="lck.mtf";
{====>} struct.2="";
{====>} struct.3="";
{====>} struct.4="";
{====>} struct.5="";

{* input coordinate file(s) *}
{====>} pdb.in.file.1="lck_extended.pdb";
{====>} pdb.in.file.2="";
{====>} pdb.in.file.3="";

=====          atom          selection
=====);

{* input "backbone" selection criteria for average structure generation *}
{* for protein (name n or name ca or name c)
for nucleic acid (name O5' or name C5' or name C4' or name C3'
or name O3' or name P) *}
{====>} pdb.atom.select=(name n or name ca or name c);

=====          refinement          parameters
=====);

{* type of molecular dynamics for hot phase *}
{+ choice: "torsion" "cartesian" +}
{====>} md.type.hot="torsion";

{* type of molecular dynamics for cool phase *}
{+ choice: "torsion" "cartesian" +}
{====>} md.type.cool="torsion";

```

```

{* refine using different initial velocities or coordinates
(enter base name in "input coordinate files" field) *}
{+ choice: "veloc" "coord" +}
{====>} md.type.initial="veloc";

{* seed for random number generator *}
{* change to get different initial velocities *}
{====>} md.seed=634;

{* select whether the number of structures will be either trial or
accepted structures and whether to print only the trial, accepted,
both sets of structures. *}
{+ list: The printing format is as follows:
trial = pdb.out.name + _#.pdb , accepted = pdb.out.name + a_#.pdb +}

{* are the number of structures to be trials or accepted? *}
{+ choice: "trial" "accept" +}
{====>} flg.trial.struc="accept";
{* number of trial or accepted structures *}
{====>} pdb.end.count=30;

{* print accepted structures *}
{+ choice: true false +}
{====>} flg.print.accept=true;
{* print trial structures *}
{+ choice: true false +}
{====>} flg.print.trial=false;

{* calculate an average structure for either the trial or
accepted structure. If calculate accepted average is false then
an average for the trial structures will be calculated. *}

{* calculate an average structure? *}
{+ choice: true false +}
{====>} flg.calc.ave.struct=false;
{* calculate an average structure for the accepted structures? *}
{+ choice: true false +}
{====>} flg.calc.ave.accept=false;
{* minimize average coordinates? *}
{+ choice: true false +}
{====>} flg.min.ave.coor=false;

=====          torsion          dynamics          parameters
=====);

{* maximum unbranched chain length *}
{* increase for long stretches of polyaniline or for nucleic acids *}
{====>} md.torsion.maxlength=50;

{* maximum number of distinct bodies *}
{====>} md.torsion.maxtree=4;

{* maximum number of bonds to an atom *}
{====>} md.torsion.maxbond=6;

===== parameters for high temperature annealing stage =====

{* temperature (proteins: 50000, dna/rna: 20000) *}
{====>} md.hot.temp=50000;
{* number of steps (proteins: 1000, dna/rna: 4000) *}
{====>} md.hot.step=1000;
{* scale factor to reduce van der Waals (repel) energy term *}
{====>} md.hot.vdw=0.1;
{* scale factor for NOE energy term *}
{====>} md.hot.noe=150;
{* scale factor for dihedral angle energy term (proteins: 100, dna/rna: 5) *}

```



```

{====>} md.hot.cdih=100;
{* molecular dynamics timestep *}
{====>} md.hot.ss=0.015;

{===== parameters for the first slow-cool annealing stage =====}

{* temperature (cartesian: 1000, torsion: [proteins: 50000, dna/rna: 20000]) *}
{====>} md.cool.temp=50000;
{* number of steps *}
{====>} md.cool.step=1000;
{* scale factor for final van der Waals (repel) energy term
(cartesian: 4.0, torsion: 1.0) *}
{====>} md.cool.vdw=1.0;
{* scale factor for NOE energy term *}
{====>} md.cool.noe=150;
{* scale factor for dihedral angle energy term *}
{====>} md.cool.cdih=200;
{* molecular dynamics timestep (cartesian: 0.005, torsion: 0.015) *}
{====>} md.cool.ss=0.015;
{* slow-cool annealing temperature step (cartesian: 25, torsion: 250) *}
{====>} md.cool.tmpstp=250;

{===== parameters for a second slow-cool annealing stage =====}

{* cartesian slow-cooling annealing stage to be used only with torsion
slow-cool annealing stage *}
{* this stage is only necessary when the macromolecule is a protein
greater than 160 residues or in some cases for nucleic acids *}

{* use cartesian cooling stage? *}
{+ choice: true false +}
{====>} md.cart.flag=true;
{* temperature *}
{====>} md.cart.temp=2000;
{* number of steps *}
{====>} md.cart.step=3000;
{* scale factor for initial van der Waals (repel) energy term *}
{====>} md.cart.vdw.init=1.0;
{* scale factor for final van der Waals (repel) energy term *}
{====>} md.cart.vdw.finl=4.0;
{* scale factor for NOE energy term *}
{====>} md.cart.noe=150;
{* scale factor for dihedral angle energy term *}
{====>} md.cart.cdih=200;
{* molecular dynamics timestep *}
{====>} md.cart.ss=0.005;
{* slow-cool annealing temperature step *}
{====>} md.cart.tmpstp=25;

{===== parameters for final minimization stage =====}

{* scale factor for NOE energy term *}
{====>} md.pow.noe=75;
{* scale factor for dihedral angle energy term *}
{====>} md.pow.cdih=400;
{* number of minimization steps *}
{====>} md.pow.step=200;
{* number of cycles of minimization *}
{====>} md.pow.cycl=10;

{=====                               noe                data
=====}

{- Important - if you do not have a particular data set then
set the file name to null ("") -}

{* NOE distance restraints files. *}

```

```

{* restraint set 1 file *}
{====>} nmr.noe.file.1="lauf12.tbl";
{* restraint set 2 file *}
{====>} nmr.noe.file.2="run19_amb.tbl";
{* restraint set 3 file *}
{====>} nmr.noe.file.3="";
{* restraint set 4 file *}
{====>} nmr.noe.file.4="";
{* restraint set 5 file *}
{====>} nmr.noe.file.5="";

{* NOE averaging modes *}

{* restraint set 1 *}
{+ choice: "sum" "cent" "R-6" "R-3" "symm" +}
{====>} nmr.noe.ave.mode.1="sum";
{* restraint set 2 *}
{+ choice: "sum" "cent" "R-6" "R-3" "symm" +}
{====>} nmr.noe.ave.mode.2="sum";
{* restraint set 3 *}
{+ choice: "sum" "cent" "R-6" "R-3" "symm" +}
{====>} nmr.noe.ave.mode.3="R-6";
{* restraint set 4 *}
{+ choice: "sum" "cent" "R-6" "R-3" "symm" +}
{====>} nmr.noe.ave.mode.4="sum";
{* restraint set 5 *}
{+ choice: "sum" "cent" "R-6" "R-3" "symm" +}
{====>} nmr.noe.ave.mode.5="sum";

{=====                               hydrogen        bond        data
=====}

{* hydrogen-bond distance restraints file. *}
{====>} nmr.noe.hbnd.file="";

{* enter hydrogen-bond distance averaging mode *}
{+ choice: "sum" "cent" "R-6" "R-3" "symm" +}
{====>} nmr.noe.ave.mode.hbnd="R-6";

{=====                               3-bond        J-coupling        data
=====}

{* the default setup is for the phi dihedral *}

{* Class 1 *}

{* 3-bond J-coupling non-glycine restraints file *}
{====>} nmr.jcoup.file.1="";
{* 3-bond J-coupling non-glycine potential *}
{+ choice: "harmonic" "square" "multiple" +}
{====>} nmr.jcoup.pot.1="harmonic";
{* 3-bond J-coupling non-glycine force value *}
{====>} nmr.jcoup.force.1.1=1;
{* 3-bond j-coupling multiple class force second value *}
{====>} nmr.jcoup.force.2.1=0;
{* 3-bond j-coupling Karplus coefficients *}
{* the default values are for phi *}
{====>} nmr.jcoup.coef.1.1=6.98;
{====>} nmr.jcoup.coef.2.1=-1.38;
{====>} nmr.jcoup.coef.3.1=1.72;
{====>} nmr.jcoup.coef.4.1=-60.0;

{* Class 2 *}

{* 3-bond j-coupling glycine restraints files *}
{====>} nmr.jcoup.file.2="";
{* 3-bond J-coupling glycine potential *}

```

```

{* The potential for the glycine class must be multiple *}
{+ choice: "harmonic" "square" "multiple" +}
{====>} nmr.jcoup.pot.2="multiple";
{* 3-bond J-coupling first force value *}
{====>} nmr.jcoup.force.1.2=1;
{* 3-bond j-coupling glycine or multiple force second value *}
{====>} nmr.jcoup.force.2.2=0;
{* 3-bond j-coupling Karplus coefficients *}
{* the default values are for glycine phi *}
{====>} nmr.jcoup.coef.1.2=6.98;
{====>} nmr.jcoup.coef.2.2=-1.38;
{====>} nmr.jcoup.coef.3.2=1.72;
{====>} nmr.jcoup.coef.4.2=0.0;

===== 1-bond heteronuclear J-coupling data
=====

{* Class 1 *}

{* 1-bond heteronuclear j-coupling file *}
{====>} nmr.oneb.file.1="";
{* 1-bond heteronuclear j-coupling potential *}
{+ choice: "harmonic" "square" +}
{====>} nmr.oneb.pot.1="harmonic";
{* 1-bond heteronuclear j-coupling force value *}
{====>} nmr.oneb.force.1=1.0;

===== alpha/beta carbon chemical shift data =====

{* Class 1 *}

{* carbon, alpha and beta, chemical shift restraints file *}
{====>} nmr.carb.file.1="";
{* carbon, alpha and beta, chemical shift restraint potential *}
{+ choice: "harmonic" "square" +}
{====>} nmr.carb.pot.1="harmonic";
{* carbon, alpha and beta, chemical shift restraint force value *}
{====>} nmr.carb.force.1=0.5;

===== proton chemical shift data
=====

{* Class 1 *}

{* class 1 proton chemical shift restraints file *}
{====>} nmr.prot.file.1="";
{* class 1 proton chemical shift potential *}
{+ choice: "harmonic" "square" "multiple" +}
{====>} nmr.prot.pot.1="harmonic";
{* class 1 proton chemical shift force value *}
{====>} nmr.prot.force.1.1=7.5;
{* 2nd class 1 proton chemical shift force value for multi *}
{====>} nmr.prot.force.2.1=0;
{* class 1 proton chemical shift violation cutoff threshold *}
{====>} nmr.prot.thresh.1=0.3;

{* Class 2 *}

{* class 2 proton chemical shift restraints file *}
{====>} nmr.prot.file.2="";
{* class 2 proton chemical shift potential *}
{+ choice: "harmonic" "square" "multiple" +}
{====>} nmr.prot.pot.2="harmonic";
{* class 2 proton chemical shift force value *}
{====>} nmr.prot.force.1.2=7.5;
{* 2nd class 2 proton chemical shift force value for multi *}
{====>} nmr.prot.force.2.2=0;

```

```

{* class 2 proton chemical shift violation cutoff threshold *}
{====>} nmr.prot.thresh.2=0.3;

{* Class 3 *}

{* class 3 proton chemical shift restraints file *}
{====>} nmr.prot.file.3="";
{* class 3 proton chemical shift potential *}
{+ choice: "harmonic" "square" "multiple" +}
{====>} nmr.prot.pot.3="harmonic";
{* class 3 proton chemical shift force value *}
{====>} nmr.prot.force.1.3=7.5;
{* 2nd class 3 proton chemical shift force value for multi *}
{====>} nmr.prot.force.2.3=0;
{* class 3 proton chemical shift violation cutoff threshold *}
{====>} nmr.prot.thresh.3=0.3;

{* Class 4 *}

{* class 4 proton chemical shift restraints file *}
{====>} nmr.prot.file.4="";
{* class 4 proton chemical shift potential *}
{+ choice: "harmonic" "square" "multiple" +}
{====>} nmr.prot.pot.4="multiple";
{* class 4 proton chemical shift force value *}
{====>} nmr.prot.force.1.4=7.5;
{* 2nd class 4 proton chemical shift force value for multi *}
{====>} nmr.prot.force.2.4=0;
{* class 4 proton chemical shift violation cutoff threshold *}
{====>} nmr.prot.thresh.4=0.3;

===== diffusion anisotropy restraint data =====

{* fixed or harmonically restrained external axis *}
{+ choice: "fixed" "harm" +}
{====>} nmr.dani.axis="harm";

{* Class 1 *}

{* diffusion anisotropy restraints file *}
{====>} nmr.dani.file.1="";
{* diffusion anisotropy potential *}
{+ choice: "harmonic" "square" +}
{====>} nmr.dani.pot.1="harmonic";
{* diffusion anisotropy initial force value *}
{====>} nmr.dani.force.init.1=0.01;
{* diffusion anisotropy final force value *}
{====>} nmr.dani.force.finl.1=1.0;
{* diffusion anisotropy coefficients *}
{* coef: <Tc> <anis> <rhombcity> <wh> <wn> *}

{* Tc = 1/2(Dx+Dy+Dz) in <ns> *}
{====>} nmr.dani.coef.1.1=13.1;
{* anis = Dz/0.5*(Dx+Dy) *}
{====>} nmr.dani.coef.2.1=2.1;
{* rhombicity = 1.5*(Dy-Dx)/(Dz-0.5*(Dy+Dx)) *}
{====>} nmr.dani.coef.3.1=0.0;
{* wH in <MHz> *}
{====>} nmr.dani.coef.4.1=600.13;
{* wN in <MHz> *}
{====>} nmr.dani.coef.5.1=60.82;

===== susceptibility anisotropy restraint data =====

{* fixed or harmonically restrained external axis *}
{+ choice: "fixed" "harm" +}
{====>} nmr.sani.axis="harm";

```

```

{* Class 1 *}

{* susceptibility anisotropy restraints file *}
{====>} nmr.sani.file.1="";
{* susceptibility anisotropy potential *}
{+ choice: "harmonic" "square" +}
{====>} nmr.sani.pot.1="harmonic";
{* susceptibility anisotropy initial force value *}
{====>} nmr.sani.force.init.1=0.01;
{* susceptibility anisotropy final force value *}
{====>} nmr.sani.force.finl.1=50.0;
{* susceptibility anisotropy coefficients *}
{* coef: <DFS> <axial> <rhombicity>;
  a0+a1*(3*cos(theta)^2-1)+a2*(3/2)*sin(theta)^2*cos(2*phi) *}

{* DFS = a0 *}
{====>} nmr.sani.coef.1.1=-0.0601;
{* axial = a0-a1-3/2*a2 *}
{====>} nmr.sani.coef.2.1=-8.02;
{* rhombicity = a2/a1 *}
{====>} nmr.sani.coef.3.1=0.4;

{=====              other      restraint      data
=====}

{* dihedral angle restraints file *}
{* Note: the restraint file MUST NOT contain restraints
  dihedral or end *}
{====>} nmr.cdih.file="Lcku3_phi_dihedrals.tbl";

{* DNA-RNA base planarity restraints file *}
{* Note: include weights as Spscale in the restraint file *}
{====>} nmr.plan.file="";
{* input planarity scale factor - this will be written into Spscale *}
{====>} nmr.plan.scale=150;

{* NCS-restraints file *}
{* example is in inputs/xtal_data/eg1_ncs_restrain.dat *}
{====>} nmr.ncs.file="";

{=====              input/output      files
=====}

{* base name for input coordinate files *}
{====>} pdb.in.name="";

{* base name for output coordinate files *}
{====>} pdb.out.name="LAUF14/lcke";

{=====
=====}
{  things below this line do not normally need to be changed  }
{  except for the torsion angle topology setup if you have      }
{  molecules other than protein or nucleic acid                  }
{=====
=====}

flg.cv.flag=false;
flg.cv.noe=false;
flg.cv.coup=false;
flg.cv.cdih=false;
flg.dgsa.flag=false;
nmr.cv.numpart=10;

) {- end block parameter definition -}

checkversion 1.0

```

```

evaluate ($log_level=quiet)

structure
  if (&struct.1 # "") then
    @&&struct.1
  end if
  if (&struct.2 # "") then
    @&&struct.2
  end if
  if (&struct.3 # "") then
    @&&struct.3
  end if
  if (&struct.4 # "") then
    @&&struct.4
  end if
  if (&struct.5 # "") then
    @&&struct.5
  end if
end

if ( &BLANK%pdb.in.file.1 = false ) then
  coor @&&pdb.in.file.1
end if
if ( &BLANK%pdb.in.file.2 = false ) then
  coor @&&pdb.in.file.2
end if
if ( &BLANK%pdb.in.file.3 = false ) then
  coor @&&pdb.in.file.3
end if

parameter
  if (&par.1 # "") then
    @&&par.1
  end if
  if (&par.2 # "") then
    @&&par.2
  end if
  if (&par.3 # "") then
    @&&par.3
  end if
  if (&par.4 # "") then
    @&&par.4
  end if
  if (&par.5 # "") then
    @&&par.5
  end if
end

if ( $log_level = verbose ) then
  set message=normal echo=on end
else
  set message=off echo=off end
end if

parameter
  nbonds
  repel=0.80
  rexp=2 irexp=2 rcon=1.
  nbxmod=3
  wmin=0.01
  cuttnb=6.0 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
  tolerance=1.5
end
end

{- Read experimental data -}

```

```

@CNS_NMRMODULE:readdata ( nmr=&nmr;
                        flag=&flag;
                        output=$nmr; )

{- Read and store the number of NMR restraints -}

@CNS_NMRMODULE:restraintnumber ( num=$num; )

{- Set mass values -}

do (fbeta=10) (all)
do (mass=100) (all)

evaluate ($nmr.trial.count = 0) {- Initialize current structure number -}
evaluate ($nmr.accept.count = 0) {- Initialize number accepted -}
evaluate ($nmr.counter = 0)
evaluate ($nmr.prev.counter = -1)

@CNS_NMRMODULE:initave ( ave=$ave;
                        ave2=$ave2;
                        cv=$cv;
                        ener1=$ener1;
                        ener2=$ener2;
                        flag=&flag;
                        nmr.prot=&nmr.prot; )

{- Zero the force constant of disulfide bonds. -}
parameter
bonds ( name SG ) ( name SG ) 0. TOKEN
end

{- define a distance restraints for each disulfide bond, i.e.,
treat it as if it were an NOE. -}
for $ss_rm_id_1 in id ( name SG ) loop STRM
for $ss_rm_id_2 in id ( name SG and
                        bondedto ( id $ss_rm_id_1 ) ) loop
STR2
if ($ss_rm_id_1 > $ss_rm_id_2) then
pick bond ( id $ss_rm_id_1 ) ( id $ss_rm_id_2 ) equil
evaluate ($ss_bond=$result)
noe
assign ( id $ss_rm_id_1 ) ( id $ss_rm_id_2 ) $ss_bond 0.1 0.1
end
end if
end loop STR2
end loop STRM

{- Count the number of residues and determine molecule type -}
identify (store9) (tag)
evaluate ($nmr.rsn.num = $SELECT)
identify (store9) ( tag and ( resn THY or resn CYT or resn GUA or
resn ADE or resn URI ))
evaluate ($nmr.nucl.num = $SELECT)

{- Improve geometry for torsion angle molecular dynamics -}
evaluate ($flag_tad=false)
if ( &md.type.hot = "torsion" ) then
if ($nmr.nucl.num > 0) then
flag exclude * include bond angl impr dihedral vdw end
minimize powell nstep=2000 drop=10. nprint=100 end
else
flag exclude * include bond angl impr vdw end
minimize powell nstep=2000 drop=10. nprint=100 end
end if
evaluate ($flag_tad=true)
end if

```

```

if ( &md.type.cool="torsion" ) then
evaluate ($flag_tad=true)
end if

if (&nmr.dani.axis = "harm") then
do (harmonic=20.0) (resid 500 and name OO)
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Z )
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name X )
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Y )
do (harmonic=0.0) (not (resid 500))
restraints harmonic exponent=2 end
elseif (&nmr.sani.axis = "harm") then
do (harmonic=20.0) (resid 500 and name OO)
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Z )
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name X )
do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Y )
do (harmonic=0.0) (not (resid 500))
restraints harmonic exponent=2 end
end if

do (refx=x) ( all )
do (refy=y) ( all )
do (refz=z) ( all )

set seed=&md.seed end

{- Begin protocol to generate structures -- loop until done -}
while (&pdb.end.count > $nmr.counter) loop main

{- Set parameter values -}
parameter
nbonds
repel=0.80
rexp=2 irexp=2 rcon=1.
nbxmod=3
wmin=0.01
cutnb=6.0 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
tolerance=1.5
end
end

evaluate ($nmr.trial.count = $nmr.trial.count + 1)

if (&md.type.initial = "coord") then
if ($nmr.trial.count < &pdb.end.count) then
evaluate ($coor_count = $nmr.trial.count)
evaluate ($coor_count_init=0.)
else
evaluate ($coor_count_init=$coor_count_init+1)
evaluate ($coor_count = $coor_count_init)
if ($coor_count_init > &pdb.end.count ) then
evaluate ($coor_count = 1)
end if
end if
set remarks=reset end
evaluate ($in_file = &pdb.in.name + "_" + encode($coor_count) + ".pdb")
coor @@@$in_file
else
do (x=refx) ( all )
do (y=refy) ( all )
do (z=refz) ( all )
end if

if (&nmr.dani.axis = "fixed" ) then
fix
select=(resname ANI)

```

```

end
elseif (&nmr.sani.axis = "fixed") then
  fix
  select=(resname ANI)
end
end if

do ( vx = maxwell(0.5) ) ( all )
do ( vy = maxwell(0.5) ) ( all )
do ( vz = maxwell(0.5) ) ( all )

flags exclude *
  include bond angle dihe impr vdw
  noe cdih coup oneb carb ncs dani
  sani harm end

{- scaling of nmr restraint data during hot dynamics -}

@CNS_NMRMODULE:scalehot ( md=&md;
  nmr=&nmr;
  input.noe.scale=&md.hot.noe;
  input.cdih.scale=&md.hot.cdih; )

{- Zero the force constant of disulfide bonds. -}
parameter
  bonds ( name SG ) ( name SG ) 0. TOKEN
end

if ($flag_tad=true) then

  {- initialize torsion dynamics topology for this iteration -}

  dyna torsion
  topology
    maxlength=&md.torsion.maxlength
    maxtree=&md.torsion.maxtree
    maxbond=&md.torsion.maxbond
    {- All dihedrals w/ (force constant > 23) will be locked -}
    {- This keeps planar groups planar -}
    kdihmax = 23.
    @CNS_TOPPAR:torsionmdmods
  end
end
end if

{- High temperature dynamics -}

if ( &md.type.hot = "torsion" ) then

  igroup
    interaction (chemical h* ) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
    interaction (not chemical h* ) (not chemical h*) weights * 1 vdw
&md.hot.vdw
  end
end

  dyna torsion
  emperiodic=500
  vscale = false
  tcoupling = true
  timestep = &md.hot.ss
  nstep = &md.hot.step
  nprint = 50
  temperature = &md.hot.temp
end
else
  evaluate ($md.hot.nstep1=int(&md.hot.step* 2. / 3. ))

```

```

  evaluate ($md.hot.nstep2=int(&md.hot.step* 1. / 3. ))
  noe asymptote * 0.1 end
  parameter nbonds repel=1. end end
  igroup
    interaction (chemical h* ) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
    interaction (not chemical h* ) (not chemical h*) weights * 1 angl 0.4
  impr 0.1
    vdw &md.hot.vdw end
  end

  dynamics cartesian
  emperiodic=500
  vscale = true
  tcoupling=false
  timestep=&md.hot.ss
  nstep=$md.hot.nstep1
  nprint=50
  temperature=&md.hot.temp
end

  noe asymptote * 1.0 end
  igroup
    interaction (chemical h* ) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
    interaction (not chemical h* ) (not chemical h*) weights * 1 vdw
&md.hot.vdw end
  end

  dynamics cartesian
  emperiodic=500
  vscale = true
  tcoupling=false
  timestep=&md.hot.ss
  nstep=$md.hot.nstep2
  nprint=50
  temperature=&md.hot.temp
end

end if

{- The first slow-cooling with torsion angle dynamics -}

flags include plan end

{- Increase the disulfide bond force constants to their full strength -}
parameter
  bonds ( name SG ) ( name SG ) 1000. TOKEN
end

evaluate ($final_t = 0)

evaluate ($ncycle = int((&md.cool.temp-$final_t)/&md.cool.tmpstp))
evaluate ($nstep = int(&md.cool.step/$ncycle))

evaluate ($ini_vdw = &md.hot.vdw)
evaluate ($fin_vdw = &md.cool.vdw)
evaluate ($vdw_step = ($fin_vdw-$ini_vdw)/$ncycle)

if (&md.type.cool = "cartesian") then

  evaluate ($vdw_step = (&md.cool.vdw/&md.hot.vdw)^(1/$ncycle))
  evaluate ($ini_rad = 0.9)
  evaluate ($fin_rad = 0.8)
  evaluate ($rad_step = ($ini_rad-$fin_rad)/$ncycle)
  evaluate ($radius = $ini_rad)

  do (vx=maxwell(&md.cool.temp)) ( all )
  do (vy=maxwell(&md.cool.temp)) ( all )

```

```

do (vz=maxwell(&md.cool.temp)) ( all )

end if

{- set up nmr restraint scaling -}

evaluate ($kdani.inter.flag=false)
evaluate ($ksani.inter.flag=false)
evaluate ($kdani.cart.flag=false)
evaluate ($ksani.cart.flag=false)
if (&md.cart.flag=true) then
  evaluate ($kdani.inter.flag=true)
  evaluate ($ksani.inter.flag=true)
  @CNS_NMRMODULE:scalecoolsetup ( kdani=$kdani;
    ksani=$ksani;
    nmr=&nmr;
    input.noe.scale=&md.cool.noe;
    input.cdih.scale=&md.cool.cdih;
    input.ncycle=$ncycle; )
  evaluate ($kdani.cart.flag=true)
  evaluate ($ksani.cart.flag=true)
else
  @CNS_NMRMODULE:scalecoolsetup ( kdani=$kdani;
    ksani=$ksani;
    nmr=&nmr;
    input.noe.scale=&md.cool.noe;
    input.cdih.scale=&md.cool.cdih;
    input.ncycle=$ncycle; )
end if

evaluate ($bath = &md.cool.temp)
evaluate ($k_vdw = $ini_vdw)

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool <= $ncycle) loop cool
  evaluate ($i_cool = $i_cool + 1)

  igroup
    interaction (chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
    interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 vdw $k_vdw end
  end

  if ( &md.type.cool = "torsion" ) then
    dynamics torsion
    emremove=true
    vscale = true
    tcoup = false
    timestep = &md.cool.ss
    nstep = $nstep
    nprint = $nstep
    temperature = $bath
  end
else
  dynamics cartesian
  cmremove=true
  vscale = true
  tcoup = false
  timestep = &md.cool.ss
  nstep = $nstep
  nprint = $nstep
  temperature = $bath
end
end if

if (&md.type.cool = "cartesian") then
  evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius-$rad_step))
  parameter nbonds repel=$radius end end

```

```

  evaluate ($k_vdw=min($fin_vdw,$k_vdw*$svdw_step))
else
  evaluate ($k_vdw= $k_vdw + $svdw_step)
end if
evaluate ($bath = $bath - &md.cool.tmpstp)

@CNS_NMRMODULE:scalecool ( kdani=$kdani;
  ksani=$ksani;
  nmr=&nmr; )

end loop cool

{- A second slow-cooling with cartesian dynamics -}

evaluate ($flag_cart=false)
if (&md.cart.flag=true) then
  if (&md.type.cool = "torsion") then

    evaluate ($flag_cart=true)

    dynamics torsion
      topology
      reset
      end
    end

    evaluate ($cart_nucl_flag=false)
    if ($nmr.nucl.num > 0) then
      evaluate ($cart_nucl_flag=true)
      parameter
        nbonds
        repel=0
        nbxmod=5
        wmin=0.01
        tolerance=0.5
        cutnb=11.5 ctonnb=9.5 ctofnb=10.5
        rdie vswitch switch
      end
    end
    flags include elec end
  end if

  evaluate ($ncycle=int((&md.cart.temp-$final_t)/&md.cart.tmpstp))
  evaluate ($nstep=int(&md.cart.step/$ncycle))

  evaluate
($svdw_step=(&md.cart.vdw.finl/&md.cart.vdw.init)^(1/$ncycle))
  evaluate ($ini_rad=0.9)
  evaluate ($fin_rad=0.8)
  evaluate ($rad_step=($ini_rad-$fin_rad)/$ncycle)
  evaluate ($radius=$ini_rad)

  @CNS_NMRMODULE:scalecoolsetup ( kdani=$kdani;
    ksani=$ksani;
    nmr=&nmr;
    input.noe.scale=&md.cart.noe;
    input.cdih.scale=&md.cart.cdih;
    input.ncycle=$ncycle; )

  do (vx=maxwell(&md.cart.temp)) ( all )
  do (vy=maxwell(&md.cart.temp)) ( all )
  do (vz=maxwell(&md.cart.temp)) ( all )

  evaluate ($bath=&md.cart.temp)
  evaluate ($k_vdw=&md.cart.vdw.init)

  evaluate ($i_cool = 0)

```

```

while ($i_cool <= $necycle) loop cart
  evaluate ($i_cool = $i_cool + 1)

  igrp
    interaction (chemical h*) (all) weights * 1 vdw 0. elec 0. end
    interaction (not chemical h*) (not chemical h*) weights * 1 vdw
Sk_vdw
  end
end

dynamics cartesian
  vscale = true
  tcoup = false
  timestep = &md.cart.ss
  nstep = $nstep
  nprint = $nstep
  temperature = $bath
end

if ($cart_nucl_flag=false) then
  evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius-$rad_step))
  parameter nbonds repel=$radius end end
end if
evaluate ($k_vdw=min(&md.cart.vdw.fin,$k_vdw*$svdw_step))
evaluate ($bath=$bath-&md.cart.tmpstp)

@CNS_NMRMODULE:scalecool ( kdani=$kdani;
  ksani=$ksani;
  nmr=&nmr; )

end loop cart

end if
end if

{- reset torsion angle topology -}
if ( $flag_tad=true ) then
  if ($flag_cart=false) then
    dynamics torsion
    topology
    reset
  end
end
end if
end if

{- Final minimization -}

{- turn on proton chemical shifts -}

flags include prot end

noe
  scale * &md.pow.noe
end

restraints dihedral
  scale = &md.pow.cdih
end

```

```

igrp interaction ( all ) ( all ) weights * 1 end end

evaluate ($count=0 )
evaluate ($nmr_min.num=0.)
while (&md.pow.cycl > $count) loop pmini

  evaluate ($count=$count + 1)
  minimize powell nstep=&md.pow.step drop=10.0 nprint=25 end
  evaluate ($nmr_min.num=$nmr_min.num + $mini_cycles)

end loop pmini

{- translate the geometric center of the structure to the origin -}
if ($num.dani > 0. ) then
elseif ($num.sani > 0. ) then
else
  show ave ( x ) ( all )
  evaluate ($geom_x=-$result)
  show ave ( y ) ( all )
  evaluate ($geom_y=-$result)
  show ave ( z ) ( all )
  evaluate ($geom_z=-$result)
  coor translate vector=( $geom_x $geom_y $geom_z ) selection=( all ) end
end if

@printaccept ( ave=$ave;
  ave2=$ave2;
  cv=$cv;
  ener1=$ener1;
  ener2=$ener2;
  flag=&flag;
  md=&md;
  nmr=&nmr;
  num=$num;
  output=$nmr;
  pdb=&pdb; )

end loop main

@CNS_NMRMODULE:calcave ( ave=$ave;
  ave2=$ave2;
  cv=$cv;
  ener1=$ener1;
  ener2=$ener2;
  flag=&flag;
  md=&md;
  nmr=&nmr;
  num=$num;
  output=$nmr;
  pdb=&pdb; )

stop

```





## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die immer währende Unterstützung während meines gesamten Studiums und während der Promotion.

Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die Überlassung des überaus interessanten Themas, sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit, für lange und fruchtbare Diskussionen während und ausserhalb der Arbeitszeit und dafür, dass eine Finanzierung immer gewährleistet war.

Prof. Paul Rösch danke ich für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl zu Beginn der Promotion und seine Unterstützung.

Dr. Andrea Preusser danke ich für gemeinsame und dadurch nicht mehr ganz so langweilige Stunden am Fluoreszenzspektrometer und ihre Unterstützung bei der Präparation von Nef und CD4.

Thomas Stangler danke ich für seinen physikalischen Beistand bei vielen, vielen Fragen rund um die NMR und für ausgiebige Diskussionen in unserer gemeinsamen autodidaktischen Strukturrechnungs-Lernzeit. Ganz besonders möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei Fritz Haubensak bedanken, der bei sämtlichen Computerproblemen immer eine Lösung parat hatte und stets zur Stelle war, wenn ein Rechner mal wieder nicht das tat, was er sollte.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung NMR-Spektroskopie des IMB bedanke ich mich, dass sie mich der NMR ein gutes Stück näher gebracht haben und für alle Fragen ein offenes Ohr hatten.

Für die Erfüllung der ständigen Klonwünsche danke ich Gesa Jonas und Dr. Silke Hoffmann, Dr. Ute Stündl danke ich für das Korrekturlesen des Manuskripts und so manche entspannende Kaffeestunde.

Allen Mitarbeitern der Abteilung StrEvoBio des IMB Jena möchte ich ganz herzlich danken für das tolle Arbeitsklima und die nette Atmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank geht an Petra Galgóczy, die während mancher Durststrecke die Motivationslücken immer wieder aufzufüllen wusste.

Abschließend danke ich der Universität Bayreuth für die Gewährung des Stipendiums zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses in Bayern, dem SFB 466 und der DFG für die finanzielle Unterstützung der Promotion.

## Erklärung

---

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Jena, 18.02.2002

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Lars Briese'.

(Lars Briese)