

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
Summary	XV
Zusammenfassung	XVII
1 Einleitung	1
1.1 Das spezifische Immunsystem	2
1.1.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR-Komplex)	3
1.1.2 Der Korezeptor CD4	5
1.2 Proteine in Wechselwirkung mit Membranen	6
1.2.1 Periphere Membranproteine	6
1.2.2 Membranverankerte Proteine	7
1.3 Das humane Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1)	8
1.3.1 Aufbau und Genetik des HI-Virus	9
1.3.2 Die Rolle des CD4-Moleküls bei der Infektion	10
1.3.3 Das akzessorische Virus Protein U (VpU)	10
1.4 NMR-Spektroskopie	12
1.4.1 Geschichte, Entwicklung und Eigenschaften der NMR	12
1.4.2 NMR-Untersuchungen an Modellmembransystemen	16
1.5 Ziele der Arbeit	17
2 Material	19
2.1 Bakterienstämme	19
2.2 Plasmide	19
2.3 Oligonukleotide	21
2.4 Biochemikalien, Chemikalien und Kits	22
2.5 Enzyme, Proteine und Antikörper	23
2.6 Größenmarker	23
2.7 Sonstige Materialien	23

2.8	Semiautomatische Chromatographie	25
2.9	Datenbanken und Informationen zu DNA- und Aminosäuresequenzen sowie Strukturen von Proteinen	25
3	Methoden	27
3.1	DNA-Isolierung	27
3.2	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	27
3.3	DNA-Gelelektrophorese	28
3.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	28
3.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
	3.5.1 DNA-Amplifikation	29
	3.5.2 Kolonie-PCR mit <i>E. coli</i>	30
3.6	Klonierungstechniken	30
	3.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	30
	3.6.2 Herstellung von „blunt ends“	31
	3.6.3 Dephosphorylierung	31
	3.6.4 Ligation von DNA	31
3.7	DNA-Sequenzierung	32
3.8	Bakterienkultur	33
	3.8.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	33
	3.8.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	33
	3.8.3 Transformation von <i>E. coli</i>	34
3.9	SDS-PAGE nach Laemmli	34
	3.9.1 Prozess der Gelelektrophorese	34
	3.9.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	35
3.10	Expression von rekombinanten Proteinen	36
3.11	Zellaufschluss	37
	3.11.1 Nativer Zellaufschluss ohne Detergenzien	38
	3.11.2 Seminativer Zellaufschluss mit Detergenzien	38
3.12	Proteinreinigungen	39
	3.12.1 Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose	39
	3.12.2 Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	40
	3.12.3 Pufferwechsel durch Größenausschlusschromatographie	40
	3.12.4 Abspaltung des Fusionspartners mit Thrombin bzw. PreScission	41
	3.12.5 Reversed Phase Chromatographie (RPC)	42
3.13	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	43
3.14	Fluoreszenzspektroskopie	44
3.15	Lichtstreuung	45
3.16	Präparation und Einsatz von Lipid-Vesikeln	46
	3.16.1 Herstellung von Lipid-Vesikeln	46
	3.16.2 Extrusionsverfahren zur Herstellung asymmetrischer Vesikel	47
	3.16.3 Inkorporationstest mittels Zentrifugationsassay	48
	3.16.4 Bindungstests mittels Zentrifugationsassay	48

3.17	Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie	49
3.17.1	Präparation von NMR-Proben	49
3.17.2	NMR-Experimente	50
3.17.2.1	Resonanzzuordnung	50
3.17.2.2	Analyse mit Hilfe der sekundärstruktur-relevanten chemischen Verschiebungen	54
3.17.2.3	Bestimmung des heteronuklearen (^1H - ^{15}N)-NOE	55
3.17.2.4	Abschätzung der Proteindynamik aus Resonanzsignalbreiten im (^1H - ^{15}N)-TROSY	55
3.17.2.5	Bestimmung skalarer Kopplungskonstanten	56
3.17.2.6	$\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschexperimente	57
3.17.2.7	Messung Transferierter Dipolarer Kopplungen (TrDC)	58
3.17.2.8	Analyse der Differenz der chemischen Verschiebungen bei molekularen Wechselwirkungen	59
3.17.3	NOE-Zuordnung und Strukturberechnung	59
3.17.3.1	Interproton-Distanzeinschränkung	59
3.17.3.2	Strukturberechnung	60
4	Experimente und Ergebnisse	61
4.1	Das HIV-1 VpUcyt	63
4.1.1	Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins VpUcyt aus <i>E. coli</i>	63
4.1.2	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	64
4.1.3	Fluoreszenzspektroskopie	67
4.1.4	NMR-Spektroskopie an freiem und mizellengebundenem VpUcyt	68
4.1.4.1	Sequenzielle Resonanzzuordnung des freien VpUcyt	68
4.1.4.2	Sequenzielle Resonanzzuordnung des mizellengebundenen VpUcyt	73
4.1.4.3	(^1H - ^{15}N)-HSQC-Experimente des VpUcyt mit und ohne DPC	76
4.1.4.4	Sekundärstrukturanalyse mittels chemischer Verschiebungen	78
4.1.4.5	Der heteronukleare (^1H - ^{15}N)-NOE	78
4.1.4.6	Dynamikabschätzung über Linienbreiten im (^1H - ^{15}N)-TROSY-Spektrum	80
4.1.4.7	Bestimmung der skalaren $^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ -Kopplungskonstanten	82
4.1.4.8	Bestimmung und Analyse der struktureinschränkenden Parameter aus NOE-Korrelationen	83
4.1.4.9	3D-Strukturberechnung und -analyse	85
4.1.5	NMR-Spektroskopie an mizellengebundenem, phosphoryliertem VpUcyt (VpUcyt $^{2\text{P}}$)	92
4.1.5.1	Einfluss der Mizellenumgebung auf den Phosphorylierungsprozess	92
4.1.5.2	Kartierung und Zuordnung der chemischen Verschiebungen des VpUcyt $^{2\text{P}}$	93

4.1.5.3	Sekundärstrukturanalyse mittels chemischer Verschiebungen	94
4.1.5.4	Der heteronukleare (^1H - ^{15}N)-NOE	96
4.1.5.5	Dynamikabschätzung über Linienbreiten im (^1H - ^{15}N)-TROSY-Spektrum	97
4.1.5.6	Kartierung der Phosphorylierungsstelle auf der Oberfläche des mizellengebundenen VpUcyt	98
4.1.6	VpUcyt in Wechselwirkung mit POPC-Vesikeln	100
4.2	Der Wildtyp des humanen CD4	103
4.2.1	Konstruktion des Initialklons pET43b-CD4tmcyt	103
4.2.2	Klonierung an verschiedene Tags und Schnittstellen	104
4.2.3	Expression und Reinigung des CD4tmcyt	107
4.2.4	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	108
4.2.5	Inkorporation des CD4tmcyt-Proteins in POPC-Vesikel	109
4.2.6	Wechselwirkung des membraninsertierten CD4tmcyt-Proteins mit HIV-1 VpUcyt	110
4.2.7	NMR-Spektroskopie	111
4.3	Die Variante des humanen CD4	114
4.3.1	Klonierung, Expression und Reinigung des CD4mut	114
4.3.2	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	116
4.3.3	Inkorporation des CD4mut-Proteins in POPC-Vesikel	117
4.3.4	Wechselwirkung des membraninsertierten CD4mut-Proteins mit HIV-1 VpUcyt	118
4.3.5	NMR-Spektroskopie	120
4.3.5.1	Temperaturoptimierung mittels 2D-NMR	120
4.3.5.2	Homo- und heteronukleare 2D-NMR-Spektroskopie an CD4mut	121
4.3.5.3	Sequenzielle Zuordnung der Rückgratamidgruppen	123
4.3.5.4	Zuordnung der Seitenketten-Resonanzen des CD4mut	125
4.3.5.5	Vollständigkeit der Resonanzzuordnung	125
4.3.5.6	Sekundärstrukturbestimmung mittels chemischer Verschiebungen	126
4.3.5.7	Der heteronukleare (^1H - ^{15}N)-NOE	127
4.3.5.8	Bestimmung und Analyse der struktureinschränkende Parameter aus NOE-Korrelationen	128
4.3.5.9	Strukturberechnung und -analyse des mizelleninsertierten CD4mut-Proteins	130
4.3.5.10	Austauscheffekte mit dem Lösungsmittel	137
5	Diskussion	139
5.1	Das HIV-1 VpUcyt	140
5.1.1	Proteinreinigung liefert große Mengen an hochreinem rekombinantem VpUcyt	140

5.1.2	NMR-spektroskopische Experimente ermöglichten nahezu vollständige Resonanzzuordnung	140
5.1.3	Lösungsstruktur des VpUcyt in Anwesenheit von Mizellen	140
5.1.3.1	VpUcyt ist in Abwesenheit von Mizellen unstrukturiert	141
5.1.3.2	VpUcyt besitzt in Anwesenheit von Mizellen eine wohldefinierte Sekundärstruktur	141
5.1.3.3	Mizellengebundenes VpUcyt ist zeitweise tertiär gefaltet	143
5.1.3.4	Vergleichsstruktursuche in Datenbanken liefert kein humanes Analog	146
5.1.4	Phosphorylierung von S53 und S57 hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins	147
5.1.4.1	Helizes 2 und 3 verändern ihre Proportionen infolge der Phosphorylierung	147
5.1.4.2	Sekundärstruktur in der Phosphorylierungsregion wird stabilisiert	148
5.1.5	Modell des membrangebundenen VpUcyt-Proteins	149
5.2	Das CD4tmcyt	150
5.2.1	Klonierungsstrategie lieferte vielseitiges Vektorkonstrukt für Membranproteine	150
5.2.2	Effizientes Reinigungsprotokoll erlaubt Gewinnung großer Mengen hochreinen CD4tmcyt-Proteins	150
5.2.3	CD4tmcyt kann nahezu verlustfrei in Liposomen inkorporiert werden	152
5.2.4	CD4tmcyt ist funktionell und bindet VpUcyt	152
5.2.5	Die strukturelle Charakterisierung des CD4tmcyt in Mizellen ist möglich	152
5.2.6	CD4tmcyt-Konstrukt erlaubt Komplexstudien mit Wechselwirkungspartnern in Membrananwesenheit	153
5.3	Das CD4mut	154
5.3.1	Die Mutagenese von CD4tmcyt zu CD4mut und dessen Reinigung verliefen erfolgreich	154
5.3.2	CD4mut und CD4tmcyt sind strukturell und funktionell ähnlich	155
5.3.2.1	Konformation des CD4mut ist nahezu unbeeinflusst von den Mutationen	155
5.3.2.2	CD4mut bindet VpUcyt mit einer Dissoziationskonstanten im höheren mikromolaren Bereich	155
5.3.3	Resonanzzuordnung des CD4mut ist nahezu vollständig	156
5.3.4	Lösungsstruktur des CD4mut-Proteins in Mizellen	156
5.3.4.1	Die Transmembrandomäne ist eine reguläre α -Helix	157
5.3.4.2	Seitenkettenarchitektur und große Seitenketten positionieren die Transmembranhelix in der Membran	158
5.3.4.3	Die zytoplasmatische Domäne beinhaltet eine stabile, amphipatische α -Helix	159

5.3.4.4	Das Bindemotif für HIV-1 VpU und andere Wechselwirkungspartner ist teilweise unstrukturiert	160
5.3.4.5	Der C-Terminus ist unstrukturiert und sehr flexibel	161
5.3.5	Modell des membraninsertierten CD4mut-Proteins	161
5.4	Modell: Die Wechselwirkung zwischen CD4 und HIV-1 VpU	163
5.5	Ausblick	164
A	Anhang	167
A.1	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	167
A.2	Ein- und Dreibuchstaben-Aminosäure-Kode	170
	Literaturverzeichnis	171
	Danksagung	187