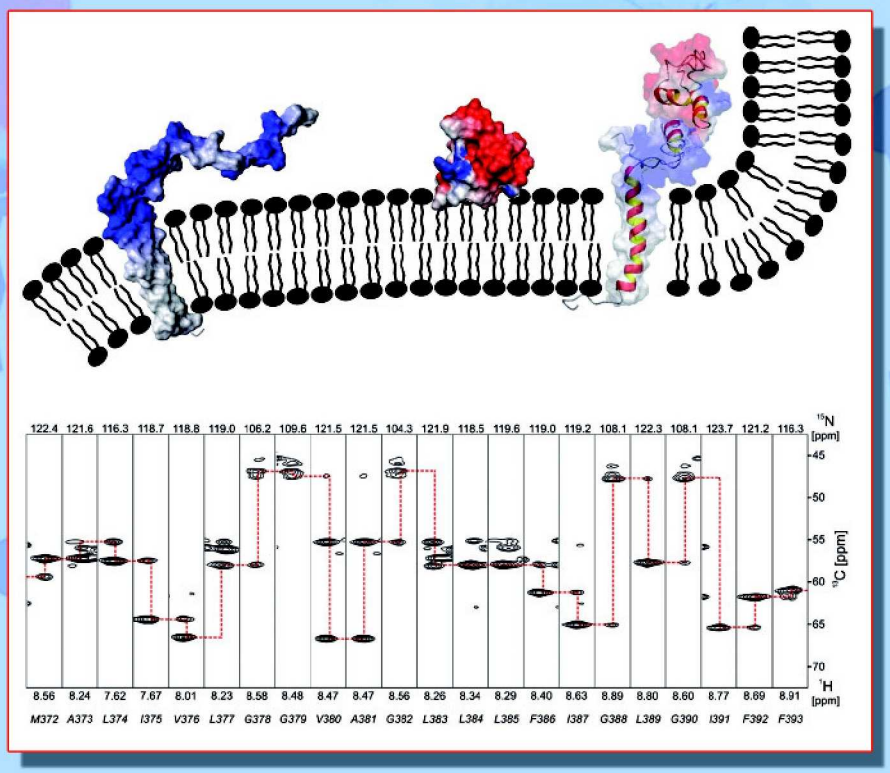


Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)

Marc Wittlich

JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM

Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 2

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Neurowissenschaften und Biophysik (INB)
Molekulare Biophysik (INB-2)

Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)

Marc Wittlich

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 2

ISSN 1866-1785 ISBN 978-3-89336-510-4

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb:	Forschungszentrum Jülich GmbH Zentralbibliothek, Verlag D-52425 Jülich Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103 e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de Internet: http://www.fz-juelich.de/zb
Umschlaggestaltung:	Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH
Druck:	Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH
Copyright:	Forschungszentrum Jülich 2008

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 2

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2007)

ISSN 1866-1785
ISBN 978-3-89336-510-4

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter http://www.fz-juelich.de/zb/juwel

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

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-Gelektrophorese 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 *E. coli* 30
3.6 Klonierungstechniken 30
3.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme 30
3.6.2 Herstellung von „blund 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 *E. coli*-Stämmen 33
3.8.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen 33
3.8.3 Transformation von *E. coli* 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 (^{1}H-^{15}N)-NOE 55
3.17.2.4 Abschätzung der Proteindynamik aus Resonanzsignalbreiten im (^{1}H-^{15}N)-TROSY 55
3.17.2.5 Bestimmung skalarer Kopplungskonstanten 56
3.17.2.6 H_2O/D_2O-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 *E. coli* 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 (^{1}H-^{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 (^{1}H-^{15}N)-NOE 78
4.1.4.6 Dynamikabschätzung über Linienbreiten im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum 80
4.1.4.7 Bestimmung der skalaren $^3J_{H^\alpha H^N}$-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^{2P}) 92
4.1.5.1 Einfuss der Mizellenumgebung auf den Phosphorylierungsprozess 92
4.1.5.2 Kartierung und Zuordnung der chemischen Verschiebungen des VpUcyt^{2P} 93

4.1.5.3 Sekundärstrukturanalyse mittels chemischer Verschiebungen 94
4.1.5.4 Der heteronukleare (^{1}H-^{15}N)-NOE 96
4.1.5.5 Dynamikabschätzung über Linienbreiten im (^{1}H-^{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 (^{1}H-^{15}N)-NOE 127
4.3.5.8 Bestimmung und Analyse der struktureinschränkenden 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**

Abbildungsverzeichnis

1.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex 4
1.2 Schematische Darstellung des Korezeptors CD4 5
1.3 Klassifizierung von Membranproteinen 7
1.4 Das Virion des HIV 8
1.5 Das Genom des HIV 9
1.6 Schematische Darstellung des akzessorischen Virus Protein U (VpU) 11
1.7 Polypeptidkette mit Standardnomenklatur für Atome und Torsionswinkel; Darstellung von NOE-Korrelationen 13
1.8 1D ^{1}H NMR-Spektrum eines Proteins 14
1.9 Stärke verschiedener Kopplungskonstanten 16
1.10 Typische Modellmembransysteme 17

2.1 Größenmarker für Proteingele 24

3.1 Theoretisches Multiplettschema im nichtentkoppelten (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Experiment 56

4.1 Aminosäuresequenz des HIV-1 VpUcyt 63
4.2 Expression und Reinigung des VpUcyt-Proteins 64
4.3 Reversed Phase Chromatographie (RPC) des VpUcyt-Eluates 65
4.4 Fern-UV-CD-Spektren von VpUcyt mit und ohne DPC-Mizellen 66
4.5 (^{1}H-^{15}N)-HSQC-, (^{1}H-^{13}C)-HSQC- und (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektren von mizellenfreiem VpUcyt 69
4.6 Sequenzspezifische Resonanzzuordnung des Proteinrückgrates mittels 3D HNCACB-Spektrum 70
4.7 (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum des freien VpUcyt mit zugeordneten $H^{N}N$-Paaren 71
4.8 (^{1}H-^{15}N)-HSQC-, (^{1}H-^{13}C)-HSQC- und (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektren von VpUcyt in micellenhaltiger Lösung 72
4.9 (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum des mizellengebundenen VpUcyt mit zugeordneten $H^{N}N$-Paaren 74
4.10 (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Experimente des VpUcyt mit und ohne DPC, Änderung der chemischen Verschiebungen aufgrund DPC-Zugabe 76
4.11 Sekundärstrukturanalyse mittels sekundärer chemischer Verschiebungen für freies und mizellengebundenes VpUcyt 77

4.12 (^{1}H-^{15}N)-NOE-Spektren des freien und mizellengebundenen VpUcyt 79
4.13 (^{1}H-^{15}N)-Hetero-NOE-Werte des freien und mizellengebundenen VpUcyt . 80
4.14 ^{1}H Linienbreiten aus (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum für freies und mizellengebundenes VpUcyt 81
4.15 $^3J_{H^\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten für freies und mizellengebundenes VpUcyt . 82
4.16 Anzahl der Distanzeinschränkungen für die Berechnung der räumlichen Struktur des VpUcyt 84
4.17 Sekundärstrukturtypische NOE-Kreuzkorrelationen für mizellengebundenes VpUcyt 85
4.18 Sekundärstrukturelemente und Tertiärfaltung des mizellengebundenen VpUcyt aus der Strukturberechnung 87
4.19 RMSD-Werte pro Aminosäurerest 88
4.20 Ramachandran-Plot für die 20 energieärmsten berechneten Konformere des mizellengebundenen VpUcyt 89
4.21 Oberflächendarstellung des energieärmsten Konformers des VpUcyt mit Ladungsverteilung 91
4.22 (^{1}H-^{15}N)-HSQCs von VpUcyt und VpUcyt^{2P}, Änderung der chemischen Verschiebungen aufgrund Phosphorylierung 93
4.23 Sekundärstrukturanalyse mittels sekundärer chemischer Verschiebungen für VpUcyt^{2P} 95
4.24 (^{1}H-^{15}N)-Hetero-NOE-Werte für VpUcyt^{2P} 97
4.25 ^{1}H Linienbreiten aus (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum für VpUcyt^{2P} 98
4.26 Oberflächendarstellung der durch die Phosphorylierung von S53 und S57 betroffenen Residuen im mizellengebundenen, nicht-phosphorylierten VpUcyt 99
4.27 (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum ohne Protonenrefokussierung des freien VpUcyt 100
4.28 Werte für TrDC des an die POPC-Vesikel gebundenen VpUcyt in Abhängigkeit von der Sequenzposition 102
4.29 Schematischer Aufbau des Fusionsproteins und des finalen CD4tmcyt-Proteins 104
4.30 Umpufferung und Reversed Phase Chromatographie (RPC) für CD4tmcyt 106
4.31 Expression und Reinigung des CD4tmcyt-Proteins 107
4.32 Circulardichroismus (CD)-Spektrum des CD4tmcyt 108
4.33 Rekonstitution des CD4tmcyt in POPC-Vesikel 109
4.34 Wechselwirkung des membraninsertierten CD4tmcyt mit HIV-1 VpUcyt . . 110
4.35 (^{1}H-^{15}N)-TROSY-, (^{1}H-^{13}C)-HSQC- und (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektren von mizelleninsertiertem CD4tmcyt 113
4.36 Proteinsequenz des CD4mut 115
4.37 Expression und Reinigung des CD4tmcyt-Proteins 115
4.38 Umpufferung und Reversed Phase Chromatographie (RPC) für CD4mut . 116
4.39 Circulardichroismus (CD)-Spektren des CD4mut 117
4.40 Rekonstitution des CD4mut in POPC-Vesikel 118
4.41 Wechselwirkung des membraninsertierten CD4tmcyt mit HIV-1 VpUcyt . . 119
4.42 (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektren zur Optimierung der Messtemperatur 120

4.43 (^{1}H-^{15}N)-TROSY-, (^{1}H-^{13}C)-HSQC- und (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektren von mizelleninsertiertem CD4mut 122
4.44 Sequenzspezifische Resonanzzuordnung des Proteinrückgrades mittels 3D HNCA-Spektrum 123
4.45 (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum des CD4mut mit zugeordneten H^NN-Paaren . 124
4.46 Sekundärstrukturanalyse mittels sekundärer chemischer Verschiebungen für CD4mut 126
4.47 (^{1}H-^{15}N)-NOE-Spektren des CD4mut 127
4.48 (^{1}H-^{15}N)-Hetero-NOE-Werte des CD4mut 128
4.49 Anzahl der Distanzeinschränkungen für die Strukturberechnung für CD4mut 129
4.50 Sekundärstrukturtypische NOE-Kreuzkorrelationen für CD4mut 131
4.51 Strukturelle Darstellung der Transmembranhelix des CD4mut 132
4.52 Strukturelle Darstellung der zytoplasmatischen Helix des CD4mut 133
4.53 Ramachandran-Plot für die 20 berechneten Konformere des CD4mut . . . 134
4.54 Oberflächendarstellung eines repräsentativen Konformers des CD4mut mit Ladungsverteilung 136
4.55 Stärke des Wasser-Amid-NOE und H_2O-/D_2O-Austauschraten der CD4mut-Amidprotonen 138

5.1 Grenzstrukturen für VpUcyt aus dieser Arbeit und aus Willbold et al. (1997) 145
5.2 Modell für membrangebundenes VpUcyt-Protein 149
5.3 Modell für membraninsertiertes CD4mut-Protein 161
5.4 Modell für die Wechselwirkung zwischen VpUcyt und CD4mut 163

Tabellenverzeichnis

2.1 *E. coli*-Bakterienstämme 19
2.2 Benutzte und konstruierte Plasmide 20
2.3 Verwendete Oligonukleotide 21
2.4 Biochemikalien, Chemikalien und Kits 22
2.5 Enzyme, Proteine und Antikörper 23
2.6 Sonstige Materialien 24

3.1 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese 29
3.2 Puffer und Gel zur DNA-Sequenzierung 32
3.3 Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen 34
3.4 Puffer und Gele zur SDS-PAGE 35
3.5 Puffer zur Coomassie-Färbung 36
3.6 Verwendete Medien 37
3.7 Puffer zum nativen Zellaufschluss 38
3.8 Puffer zum seminativen Zellaufschluss 39
3.9 Arbeitspuffer zur IMAC 40
3.10 Proteolyse-Puffer 41
3.11 NMR-Puffer 45
3.12 Lipid-Vesikel-Puffer 47
3.13 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente für VpUcyt 51
3.14 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente für CD4mut 52

4.1 Analyse der CD-Spektren des VpUcyt-Proteins mit CDPro 66
4.2 Daten zur Fluoreszenzmessung des VpUcyt 67
4.3 PCR-Ansatz und -Prozedur zur Konstruktion des Initialklons pET43b_CD4tmcyt 103

Summary

The transmembrane glycoprotein CD4 (cluster determinant 4) plays a prominent role in the adaptive immune response. CD4 is displayed primarily on the surface of T helper cells, but also on subsets of memory and regulatory T lymphocytes. Binding of the lymphocyte specific tyrosine kinase p56LcK to the cytoplasmic domain of CD4 is crucial for antigen receptor-mediated signal transduction. The human immunodeficiency virus (HIV) utilizes CD4 as the main receptor for T-cell invasion. The virus has developed multiple strategies for down-regulation of CD4 in infected cells. The HIV-1 protein U (VpU) is an accessory protein responsible for enhancement of virus particle release and downregulation of CD4. Physical interactions of viral proteins VpU and Nef with the cytoplasmic tail of CD4 initiate a cascade of events leading to degradation of CD4. Phosphorylation of serines 53 and 57 of VpU plays an essential role in CD4 downregulation.

Aim of this work was the cloning and production of the interacting fragments of human CD4 and HIV-1 VpU, as well as their structural and dynamical characterisation using NMR-, CD-spectroscopical and molecular biology methods. As the specified interaction of CD4 and VpU takes place close to the membrane of the endoplasmic reticulum, most observations were performed in presence of model membrane systems. To insure in vitro complex binding between CD4 and ligands (e.g. VpU, Nef, p56lck) in direct membrane proximity, CD4 was decided to be membrane-anchored with its transmembrane domain.

CD4 is a protein of 58 kDa. It consists of an extracellular domain of 370 amino acids, a short transmembrane region, and a cytoplasmic domain of 40 amino acids at the C-terminal end. We investigated the structure of the 62 C-terminal residues of CD4, comprising its transmembrane and cytoplasmic domains. A synthetic gene encoding CD4 amino acid residues 372 to 433 was cloned; heterologous expression and purification of the CD4 fragment was carried out. The incorporation of the recombinant wild-type CD4tmcyt fragment in lipid membranes and physical interaction with the cytoplasmic domain of VpU (VpUcyt) was demonstrated by centrifugation assays followed by reversed phase chromatographic analysis of the composition of the proteoliposomes. Circular dichroism (CD) spectroscopy of CD4tmcyt in dodecylphosphocholine (DPC) micelles yields about 40% α-helical content. High resolution NMR spectra of uniformly $^{13}C/^{15}N$-labeled CD4tmcyt peptide in membrane simulating DPC micelles proves the possibility of solution NMR studies of this CD4 fragment and its molecular complexes.

For easier handling, a cystein-free variant of CD4tmcyt was constructed (CD4mut). The five cysteine residues of the cytoplasmic region have been replaced with serine and histidine residues in the polypeptide CD4mut. Uniformly ^{15}N and ^{13}C labeled protein was recombinantly expressed in *E. coli* and purified. Functional binding activity of CD4mut to protein VpUcyt was verified, the K_d of this complex was estimated to be 250 μM or lower. Close to complete NMR resonance assignment of the ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N spins of CD4mut was accomplished. The secondary structure of CD4mut in membrane simulating DPC micelles was characterized based on secondary chemical shift analysis, NOE-based proton-proton distances, and circular dichroism spectroscopy. A stable transmembrane

helix and a short amphipathic helix in the cytoplasmic region were identified. The fractional helicity of the cytoplasmic helix appears to be stabilized in the presence of DPC micelles, although the extension of this helix is reduced in comparison to previous studies on synthetic peptides in aequous solution.
The 81-residue transmembrane protein VpU consists of a transmembrane domain of 21 amino acids, a short stretch of basic amino acids, and an acidic cytoplasmic domain of 42 amino acids. We studied the cytoplasmic domain in presence and absence of membrane-mimicking micelles, respectively, using NMR- and CD-spectroscopical methods. Additionally, structural consequences of phosphorylation of two serine residues in VpUcyt were examined. As VpUcyt is largely unstructured in aequous buffer, a significant amount of α-helical secondary structure is observed upon addition of DPC micelles. An amphipatic helix comprising residues I39 to E48 (helix 2) and a second helix comprising residues L64 to R70 (helix 3) are derived, differing in rigidity and helicity. Additional helical turns are detected in the loop region between the helices and at the C-terminus. Furthermore, a tertiary fold is derived from NOE distance constraints showing helices 2 and 3 in antiparallel conformation, while the interhelical region and the C-terminus contact well above the helix-helix plane. Upon phosphorylation of Ser53 and Ser57, overall structure of VpUcyt seems unchanged, while the rigidity in the interhelical region seems to increase concomitant with a slight N-terminal extension of helix 3 and a C-terminal destabilization of helix 2.

Zusammenfassung

Das Transmembranglycoprotein CD4 (cluster determinant 4) spielt eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunabwehr. CD4 wird vornehmlich auf der Oberfläche von T-Helferzellen präsentiert, aber ebenso auf einer Teilmenge von Gedächtnis- und regulatorischen T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Die Bindung der lymphozytenspezifischen Kinase p56LcK an die zytoplasmatische Domäne des CD4 ist entscheidend für die Antigenrezeptor-vermittelte Signaltransduktion. Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) nutzt CD4 als primären Rezeptor zur T-Zell-Invasion. Das Virus hat vielfache Strategien entwickelt, um das CD4 von infizierten Zellen herunterzuregulieren. Das HIV-1 Protein U (VpU) ist ein akzessorisches Protein, das für die Verstärkung der Viruspartikelfreisetzung und die Herunterregulierung des CD4 verantwortlich ist. Die physikalische Wechselwirkung der viralen Proteine Nef und VpU mit der zytoplasmatischen Domäne des CD4 initiiert eine Kaskade von Ereignissen, die zur Degradation des CD4 führt. Die Phosphorylierung der Serine 53 und 57 im VpU spielt eine entscheidende Rolle bei der Herunterregulierung des CD4.

Das Ziel dieser Arbeit war die Klonierung und Produktion der interagierenden Fragmente des humanen CD4 und des HIV-1 VpU, ebenso ihre strukturelle und dynamische Charakterisierung mittels NMR-, CD-spektroskopischer und molekularbiologischer Methoden. Da die beschriebene Wechselwirkung zwischen CD4 und VpU in direkter Nähe zur Membran des Endoplasmatischen Retikulums stattfindet, wurden nahezu alle Experimente in Anwesenheit von Modellmembransystemen durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die Komplexbindung zwischen CD4 und seinen Liganden (z.B. VpU, Nef, p56LcK) in vitro in direkter Membrannähe stattfindet, wurde das CD4 mit seiner Transmembrandomäne in der Membran verankert.

CD4 ist ein Molekül mit einem Gewicht von 58 kDa. Es besteht aus einer extrazellulären Domäne von 370 Aminosäuren, einer kurzen Transmembranregion, und einer zytoplasmatischen Domäne von 40 Aminosäuren am C-terminalen Ende. In dieser Arbeit wurde die Struktur der 62 C-terminalen Residuen des CD4, welche die Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen beinhalten, untersucht. Ein für die CD4-Aminosäuren 372 bis 433 kodierendes, synthetisches Gen wurde kloniert; die heterologe Expression und die Reinigung wurden durchgeführt. Die Inkorporation des rekombinanten Wildtyp-CD4tmcyt-Fragmentes in Lipidmembranen und die physikalische Wechselwirkung mit der zytoplasmatischen Domäne des VpU (VpUcyt) wurde mit Hilfe eines Zentrifugationsassays, gefolgt durch Reversed Phase Chromatographie-Analyse der Proteoliposomenzusammensetzung, gezeigt. Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie an CD4tmcyt in Dodecylphosphocholin (DPC)-Mizellen zeigte einen Gehalt an α-Helix von etwa 40%. Hochaufgelöste NMR-Spektren von $^{13}C/^{15}N$-markiertem CD4tmcyt-Peptid in membransimulierenden DPC-Mizellen beweisen, dass Flüssig-NMR-Studien an diesem CD4-Fragment und seinen molekularen Komplexen möglich sind.

Zur einfacheren Handhabung wurde eine Cystein-freie Variante des CD4tmcyt konstruiert (CD4mut). Die fünf Cystein-Residuen der zytoplasmatischen Domäne des CD4tmcyt wur-

den gegen Serin- bzw. Histidin-Residuen im CD4mut-Polypeptid ausgetauscht. Uniform ^{13}C und ^{15}N markiertes Protein wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und danach aufgereinigt. Die funktionelle Bindungsaktivität des CD4mut an das VpUcyt wurde bestätigt, der K_d dieses Komplexes wurde mit 250 μM oder stärker bemessen. Nahezu vollständige NMR-Resonanzzuordnung der ^{1}H-, ^{13}C-, and ^{15}N-Spins des CD4mut wurde erreicht. Die Sekundärstruktur des CD4mut in membransimulierenden DPC-Mizellen wurde mit Hilfe der sekundären chemischen Verschiebungen, NOE-abgeleiteten Proton-Proton-Abständen und CD-Spektroskopie ermittelt. Es wurden eine stabile Transmembranhelix, sowie eine kurze amphipatische Helix in der zytoplasmatischen Domäne identifiziert. Die fraktionale Helizität der zytoplasmatischen Helix scheint in Anwesenheit von DPC-Mizellen stabilisiert zu sein, obwohl ihre Ausdehnung im Vergleich zu vorherigen Studien an synthetischen Peptiden verringert ist.

Das 81 Aminosäuren lange Transmembranprotein VpU besteht aus einer Transmembrandomäne von 21 Aminosäuren, einem kurzen Abschnitt basischer Residuen und einer sauren zytoplasmatischen Domäne von 42 Aminosäuren. In dieser Arbeit wurde die zytoplasmatische Domäne exprimiert, gereinigt und in An- und Abwesenheit von DPC-Mizellen mittels NMR- und CD-spektroskopischer Methoden analysiert. Zusätzlich wurden die strukturellen Auswirkungen der Phosphorylierung von zwei Serinen im VpUcyt untersucht. Während das VpUcyt in wässriger Lösung nahezu unstrukturiert vorliegt, so kommt es durch Zugabe von DPC-Mizellen zur Formation einer signifikanten α-helikalen Sekundärstruktur. Es konnten eine amphipatische Helix einschliesslich der Residuen I39 bis E48 (Helix 2) und eine zweite Helix einschliesslich der Residuen L64 bis R70 (Helix 3) ermittelt werden, die sich in Rigidität und Helizität unterscheiden. Zusätzlich konnten weitere helikale Windungen in der interhelikalen Region und dem C-Terminus festgestellt werden. Ausserdem konnte eine teritäre Faltung aus den NOE-abgeleiteten Distanzeinschränkungen abgeleitet werden, die Helix 2 und 3 in antiparalleler Konformation zeigt, während die interhelikale Region und der C-Terminus oberhalb der Helix-Helix-Ebene in Kontakt miteinander stehen. Durch die Phosphorylierung der Serine 53 und 57 scheint die Gesamtstruktur des VpUcyt unverändert zu sein, während die Rigidität der interhelikalen Region zuzunehmen und mit einer geringfügigen N-terminalen Erweiterung von Helix 3 und einer C-terminalen Schwächung von Helix 2 einherzugehen scheint.

Kapitel 1

Einleitung

Die zellulären Bestandteile des Blutes stammen von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab, die aufgrund ihrer Differenzierbarkeit als pluripotent bezeichnet werden. Aus ihnen entwickeln sich zunächst die lymphatische und die myeloide Vorläuferzelle.

Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen. Diese Zellen tragen zur angeborenen Immunität bei und bilden die erste Abwehrlinie gegen Pathogene.
Granulozyten wandern zu Entzündungsherden und werden nach ihrer (dortigen) Differenzierung in neutrophile, eosinophile oder basophile Zellen als Effektorzellen eingesetzt, um andere Zellen des Immunsystems zu aktivieren. Ausserdem können neutrophile Zellen Fremdkörper mittels Phagozytose aufnehmen und zerstören.
Makrophagen sind primär phagozytische Zellen, die Krankheitserreger aufnehmen und intrazellulär verdauen. Sie aktivieren durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen andere Zellen der Immunabwehr und lösen unter anderem auch Entzündungsreaktionen aus.
Dendritische Zellen nehmen Antigene in peripheren Bereichen auf und präsentieren sie in den Lymphknoten den Lymphozyten, die durch die Antigenerkennung aktiviert werden.
Mastzellen setzen nach der Aktivierung Substanzen (z.B. Histamine) frei, welche die Gefässpermeabilität beeinflussen. Sie aktivieren eosinophile und basophile Zellen, sind an der Parasitenabwehr beteiligt und können allergische Entzündungen auslösen.

Aus den lymphatischen Vorläuferzellen differenzieren sich zwei Hauptgruppen von Lymphozyten; die B-Lymphozyten und die T-Lymphozyten. Sie regulieren die adaptive Immunantwort und bilden das spezifische Immunsystem (siehe Kapitel 1.1). B-Lymphozyten reifen im Knochenmark, sie entwickeln sich nach der Aktivierung zu Plasmazellen und sind für die Antikörperproduktion verantwortlich. Die T-Lymphozyten bilden zwei Klassen, von denen eine bei der Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen wird, die infizierte Zellen abtöten können. Die zweite Klasse umfasst T-Zellen, die B-Zellen sowie Makrophagen aktivieren können.

1.1 Das spezifische Immunsystem

Das adaptive Immunsystem besitzt die Fähigkeit, Pathogene spezifisch zu erkennen. Diese Eigenschaft beruht auf der klonalen Selektion von Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren, die dafür verantwortlich ist, dass jeder Lymphozyt an seiner Oberfläche Rezeptoren einer einzigen Spezifität besitzt. Daher wird auch zwischen Rezeptoren für körperfremde Antigene und körpereigene Autoantigene unterschieden, wobei Zellen mit Rezeptoren für ubiquitäre Autoantigene schon in einer frühen Entwicklungsphase zerstört werden.

B-Lymphozyten vermitteln die humorale Immunantwort, die sich gegen freie Antigene richtet. Die Antigenerkennung erfolgt über Immunglobuline (Ig), die von B-Zellen mit einem großen Spektrum von Antigenspezifitäten synthetisiert werden. Membrangebundenes Ig auf der B-Zelloberfläche dient als Antigenrezeptor und heißt B-Zell-Rezeptor (BCR). Bindet ein spezifisches Antigen an den BCR, so wird es durch die B-Zelle aufgenommen, zerlegt und in Form von Peptidfragmenten am Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (major histocompatibility complex class II, MHC-Klasse II) präsentiert. Die präsentierten Antigenfragmente werden durch spezifische CD4-T-Zellen erkannt, wodurch die B-Zelle von der CD4-T-Zelle zur Entwicklung in antikörperproduzierende Plasmazellen angeregt wird (gekoppelte Erkennung, linked recognition).

T-Lymphozyten vermitteln die zelluläre Immunantwort, die sich gegen zellgebundene Antigenfragmente richtet. Die im Thymus reifenden Zellen entwickeln sich entweder zu CD4- oder zu CD8-Zellen. Die Erkennung von Antigenfragmenten findet über den T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR-Komplex, siehe Kapitel 1.1.1) statt. Dazu ist es notwendig, dass die Antigenfragmente von körpereigenen MHC-Molekülen präsentiert werden. Der T-Zell-Rezeptor interagiert sowohl mit dem Antigenfragment, als auch mit dem MHC-Molekül. Der Unterschied zwischen CD4- und CD8-T-Zellen besteht unter anderem in den Zelloberflächenproteinen CD4 und CD8 sowie in der von ihnen erkannten Klasse von MHC-Molekülen. CD4-T-Zellen binden an das MHC-Klasse-II-Molekül, das unter anderem von antigenpräsentierenden Zellen (APC) und B-Zellen präsentiert wird. CD8-T-Zellen erkennen dagegen nur das MHC-Klasse-I-Molekül, das unterschiedlich stark von allen anderen Zelltypen exprimiert wird.

Die Bindung zwischen dem TCR und den MHC-Molekülen ist nur effizient, wenn sie durch Assoziation von CD4- oder CD8-Molekülen unterstützt wird. Diese binden dabei an bestimmte Teile des MHC-Moleküls. Daher werden CD4 und CD8 auch als Korezeptoren bezeichnet. Die Funktion und Eigenschaft des CD4-Korezeptor-Moleküls wird in Kapitel 1.1.2 näher erläutert. Neben der Bindung TCR:Peptid/MHC benötigt eine T-Zelle zur Aktivierung ein zweites, kostimulierendes Signal, welches von derselben APC geliefert werden muss, auf der die T-Zelle das spezielle Antigenfragment erkannt hat. Als kostimulierende Moleküle sind B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) bekannt. Man findet sie ausschliesslich auf der Zelloberfläche von Zellen, die das T-Zell-Wachstum anregen können. Der Rezeptor

für CD80 und CD86 auf der T-Zelle ist CD28. Bindet eine T-Zelle über ihren TCR und den Korezeptor CD4 bzw. CD8 den MHC/Antigen-Komplex, so wird eine Differenzierung durch eine zusätzliche Bindung der B7-Moleküle an CD28 eingeleitet.

Aktivierte T-Zellen entwickeln sich zu bewaffneten Effektorzellen, die beim nächsten Zusammentreffen mit ihrem spezifischen Antigen ohne Kostimulierung zum Immunangriff übergehen. CD8-T-Zellen differenzieren sich nach ihrer Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen abtöten können. CD4-T-Zellen entwickeln sich entweder zu T_H1-Zellen (Aktivierung von Makrophagen, Anregung von zytotoxischen T-Zellen zur Proliferation) oder zu T_H2-Zellen (Anregung von B-Zellen zur Antikörperproduktion).

1.1.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR-Komplex)

Die spezifische Antigenfragmenterkennung einer T-Zelle wird über den TCR-Komplex (siehe Abbildung 1.1) vermittelt. Die Spezifität ergibt sich über die zufällige Neuordnung weniger Gensegmente auf den Chromosomen 7 und 14, die für die variable Region des TCR kodieren.
Der TCR besteht zum einen aus dem zum TCR-Komplex gehörenden $\alpha : \beta$-Heterodimer für die Peptid:MHC-Liganden-Antigenerkennung und -bindung, zum anderen aus vier anderen Signalketten (zwei ϵ-, eine δ-, eine γ-Kette), die als CD3 bezeichnet werden und für die Signalübertragung benötigt werden. Zusätzlich ist der Rezeptorkomplex mit einem Homodimer von ζ-Ketten assoziiert, das nach der Antigenbindung Signale ins Zellinnere sendet. Jede CD3-Kette besitzt eine Tyrosinaktivierungssequenz von Immunrezeptoren (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs; ITAMs), jede ζ-Kette drei.
Zur Aktivierung einer T-Zelle ist neben der Bindung des TCR an den MHC-Komplex die Erkennung des MHCs durch den jeweiligen Korezeptor (CD4 bzw. CD8), sowie die Kostimulierung durch B7-Moleküle nötig. Diese Aktivierung startet eine Signalkaskade ins Zellinnere. Da der TCR-Komplex selbst keine Enzymaktivität besitzt und deswegen der Zelle die Bindung eines Antigenfragmentes nicht selbst signalisieren kann, werden hierzu Proteintyrosinkinasen rekrutiert. Im ersten Schritt werden die Proteintyrosinkinasen p56LcK und p59Fyn durch die Rezeptor-Proteinphosphatase CD45 aktiviert. Durch die Bindung eines Peptid:MHC-Liganden an den T-Zell-Rezeptor und seinen Korezeptor werden Korezeptor und CD45 zusammengebracht. Dadurch ist es CD45 möglich, die konstituiv mit dem jeweiligen Korezeptor assoziierten Tyrosinkinasen p56LcK und p59Fyn zu aktivieren. Die dann durch p56LcK phosphorylierten ITAMs können nun hochaffin die SH2-Domänen der Proteintyrosinkinase ZAP-70 binden. Daraufhin wird ZAP-70 durch p56LcK aktiviert und kann durch Phosphorylierung z.B. des Substrates LAT (linker of activation in T-cells) eine Signalkaskade auslösen. Am Ende der Signalkaskade steht die Freisetzung von Effektormolekülen, bei denen es sich unter anderem um Zytotoxine und Zytokine handelt. Zytotoxine werden von zytotoxischen CD8-T-Zellen freigesetzt und können nach Eindringen in die Zielzelle Apoptose auslösen. Zytokine werden von CD4-T-Zellen sezerniert und binden an spezifische Rezeptoren der Zielzelle. Das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) bewirkt z.B. die Proliferation von T-Zellen und regt B-Zellen zur Antikörperproduktion an.

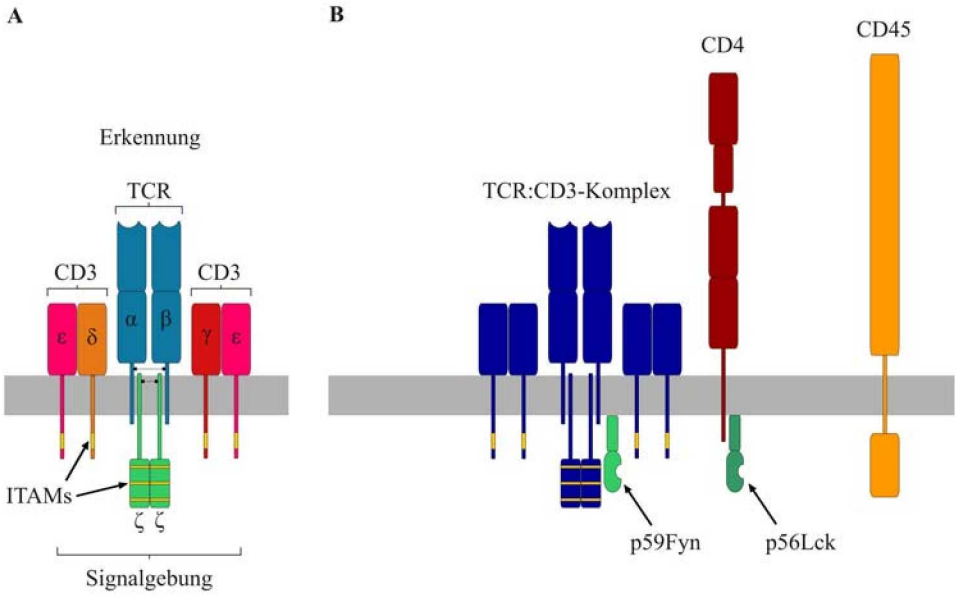


Abbildung 1.1: **A** Schematischer Aufbau des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR-Komplex). Die Erkennung des Peptid:MHC-Liganden erfolgt über Bindung an das T-Zell-Rezeptor-α : β-Heterodimer (blau). Da diese Bindung dadurch der Zelle nicht direkt signalisiert werden kann, sind dem funktionstüchtigen Komplex vier andere Signalketten assoziiert, die gesamt als CD3 bezeichnet werden. CD3 besteht extrazellulär aus zwei ϵ-, einer δ- und einer γ-Kette, jede Kette besitzt intrazellulär ein ITAM-Motiv (gelb). Zur Signalgebung wird zusätzlich ein Homodimer von ζ-Ketten benötigt, in dem jede Kette drei ITAM-Motive besitzt (gelb). Die Transmembrandomäne jeder Kette im TCR-Komplex ist entweder positiv oder negativ geladen. **B** Dem TCR:CD3-Komplex ist sein Korezeptor (hier CD4, braun) assoziiert. Zur Signalübertragung werden Proteintyrosinkinasen aus der Src-Familie rekrutiert. Nachdem der TCR-Komplex und sein Korezeptor ein Peptid:MHC-Liganden gebunden haben, kann die Tyrosinphosphatase CD45 (gelb) inhibitorische Phosphatgruppen entfernen und damit p56LcK (hellgrün) und p59Fyn (dunkelgrün) aktivieren. Diese beiden Tyrosinkinasen phosphorylieren die ITAMs in CD3ϵ- und den ζ-Ketten, damit dort ZAP-70 gebunden und aktiviert werden kann. ZAP-70 phosphoryliert LAT und löst so eine Signalkaskade aus. (verändert nach: Janeway et al. (2002), Seiten 211 und 218)

1.1.2 Der Korezeptor CD4

Die spezielle Funktion des CD4-T-Zell-Korezeptors CD4 (cluster determinant 4, CD4) wurde in den vorangegangenen Abschnitten bereits angedeutet.
Das humane CD4 ist ein Typ I T-Zell Glycoprotein mit einer molekularen Masse von etwa 50 kDa. Es besteht aus 433 Aminosäuren, davon sind etwa 371 Aminosäuren extrazellulär, etwa 22 Aminosäuren transmembran und etwa 40 Aminosäuren zytoplasmatisch (siehe Abbildung 1.2). Der extrazelluläre Teil des CD4 besteht aus 4 Ig-ähnlichen Domänen. Die aminoterminale D1-Domäne des V-Types ist starr mit der darauffolgenden D2-Domäne des C2-Types verbunden. Nach einem kurzen, flexiblen Teil folgen die D3- und D4-Domänen des C2-Types. Es wird vermutet, dass die Domänen D1 und D2 an der MHC-Klasse-II-Bindung beteiligt sind, wobei es zu einer direkten Wechselwirkung mit der β2-Kette des MHC-Klasse II kommt (Maddon et al. 1986). Röntgenstrukturuntersuchungen zeigen, dass die Domänen des extrazellulären Teils aus wohlgefalteten β-Strängen bestehen (Wang et al. 1990, Ryu et al. 1990, Kwong et al. 1990). Desweiteren konnte bestimmt werden, dass die Verbindung zwischen den Fragmenten D1D2 und D3D4 der extrazellulären Domäne beweglich ist (Wu et al. 1997). Die Struktur der Transmembrandomäne ist weitgehend unbekannt, ihr wird außerdem keine signalgebende Funktion zugeordnet. Der zytoplasmatische Teil des CD4 ist mittels NMR-spektroskopischer und CD-spektroskopischer Methoden mehrfach untersucht worden, die Ergebnisse unterscheiden sich deutlich. Wray et al. (1998) untersuchten das Fragment CD4(396-433) in TFE-haltiger Lösung und konnten neben unstrukturierten Bereichen eine α-Helix von R402 bis K417 feststellen. Das wesentlich kürzere Peptid CD4(403-419) bildet in TFE-freier, wässriger Lösung eine α-Helix zwischen den Residuen Q403 und R412 aus (Willbold & Rösch 1996), während dies für die vollständige zytoplasmatische Domäne CD4(396-433) nicht der Fall ist (Wray et al. 1998, Kim et al. 2003). Die Cysteine an den Sequenzpositionen 394 und 397 können palmitoyliert werden (Crise & Rose 1992), was einen Einfluss auf Proteinrecycling,

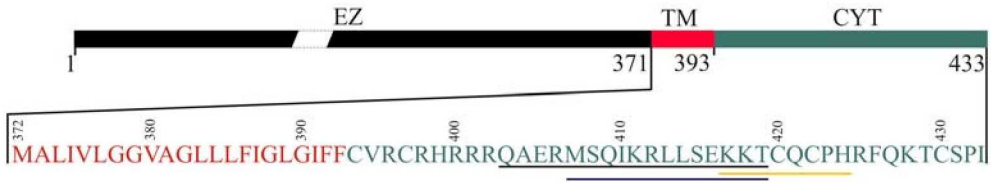


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Korezeptors CD4. Einer 371 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne (EZ, schwarz, hier verkürzt dargestellt), folgt eine 22 Aminosäuren lange Transmembrandomäne (TM, rot). Die 40 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne (CYT, grün) ist Bindungspartner für verschiedene körpereigene und virale Proteine. Das HIV-1 Virus Protein U (VpU) bindet an die Aminosäuren 403 bis 419 (schwarz unterstrichen, Vincent et al. (1993)), das HIV-1 „negative factor“ (Nef)-Protein bindet an die Aminosäuresequenz 407 bis 419 (blau unterstrichen, Aiken et al. (1994)). Die für die Signalübertragung essentielle Proteintyrosinkinase p56LcK bindet an die Aminosäuresequenz 417 bis 424 (gelb unterstrichen, Shaw et al. (1990)).

Diffusion oder Signalgebung haben kann. Zwei weitere Cysteine an den Sequenzpositionen 420 und 422 gehören zu einem acht Aminosäuren langen Motif, das an der Bindung der Proteintyrosinkinase p56LcK beteiligt ist. Das Motif kann als „+ + X C X C P“ repräsentiert werden, in dem „+“ eine basische und X eine beliebige Aminosäure darstellt (Shaw et al. 1990). In diesem Motif sind besonders die Residuen C420, C422 und P423 hochkonserviert.
Neben seinen zellulären Funktionen ist der Korezeptor CD4 ein Ziel und Hauptrezeptor für das humane Immundefizienz-Virus (HIV) (Dalgleish et al. 1984, Klatzmann et al. 1984, Sattentau & Weiss 1988, Chen & Maldarelli 1993, siehe auch Kapitel 1.3). Der extrazelluläre Teil des CD4 wird durch das Hüllglykoprotein gp120 (SU) des HIV gebunden, was die Aufnahme des Virus in die Zelle unterstützt. Einmal in die Zelle eingedrungen, beginnt das HIV mit der Degradation des vorhandenen CD4, indem verschiedene virale Proteine an verschiedenen Orten in der Zelle mit dem zytoplasmatischen Teil des CD4 wechselwirken und das gesamte CD4-Molekül so zur Degradation markieren. Das virale Protein U (VpU) wechselwirkt mit neu synthetisierten, im Endoplasmatischen Retikulum befindlichen CD4-Molekülen. Dabei kommt den zytoplasmatischen, α-helikal angeordneten Residuen 403 bis 419 im CD4 eine entscheidende Bedeutung zu (Vincent et al. 1993). Um bereits zellmembranständige CD4-Moleküle zu entfernen, wechselwirkt das virale Protein Nef (negative factor) mit den Residuen 407 bis 419 im zytoplasmatischen Teil des CD4 und markiert das Molekül so zur Degradation (Aiken et al. 1994).

1.2 Proteine in Wechselwirkung mit Membranen

Membranen bilden die physischen Begrenzungen von Kompartimenten. Durch ihre selektive Permeabilität wird einer beschränkten Klasse von Molekülen der Transport von einem zum anderen Kompartiment ermöglicht. Chemische Signale (oder Energie) können durch die Wirkungen bestimmter Moleküle (z.B. Enzyme, Ionenpumpen, Rezeptoren) zwischen den von der Grenzfläche getrennten Kompartimenten übertragen werden.
Membranen zeichnen sich durch ihre amphipatische Struktur aus: sie besitzen eine hydrophobe mittlere Schicht, die durch eine hydrophile Außenschicht begrenzt wird. Man unterscheidet zwischen Transmembranproteinen, peripheren Membranproteinen und Glycophospholipid-verankerten Proteinen (Petty 1993). Die Klassen der verschiedenen Membranproteine sind in Abbildung 1.3 illustriert.
Ort der membranständigen Proteinsynthese ist das rauhe Endoplasmatische Retikulum, wogegen Membranlipide im glatten Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden.

1.2.1 Periphere Membranproteine

Periphere oder „extrinsische“ Proteine besitzen keine wohldefinierten hydrophoben Sequenzen, die eine Verankerung in der Lipid-Doppelschicht ermöglichen würden. Sie sind

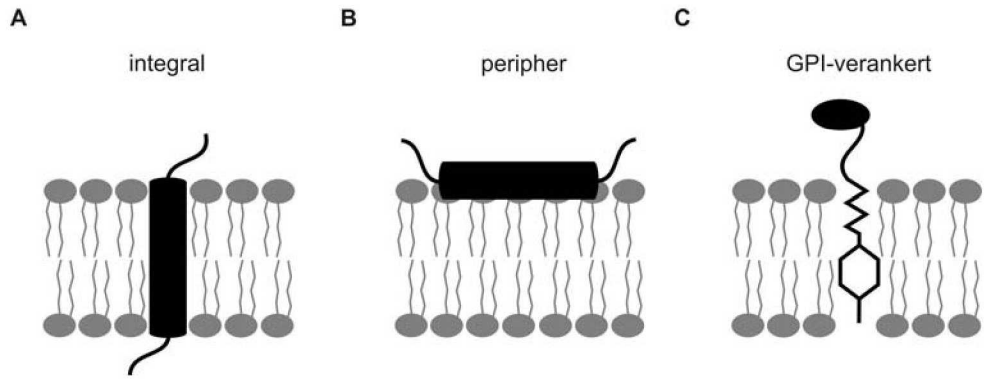


Abbildung 1.3: Klassifizierung von Membranproteinen. Membranproteine können in drei Klassen aufgrund funktioneller Kriterien eingeteilt werden. **A** Integrale Membranproteine können nur durch Zerstörung der Membran extrahiert werden. **B** Periphere Membranproteine können durch vergleichsweise milde Bedingungen von der Membran gelöst werden. **C** Glycophospholipid-verankerte Proteine können durch spezifische Phospholipasen freigesetzt werden. Darstellung nach Petty (1993).

vorwiegend durch elektrostatische Kräfte an die polaren Kopfgruppen der Phospholipide oder an andere Proteine gebunden. Die Behandlung der Membran mit hypotonischen Lösungen, Medien hoher Ionenstärke oder die Entfernung divalenter Kationen ist oftmals ausreichend, um periphere Membranproteine von der Membranoberfläche zu lösen.
Bei peripheren (Membran-) Proteinen handelt es sich z.B. um signalverarbeitende Proteine wie Proteintyrosinkinasen (z.B. p56LcK), die direkt mit dem membranständigen Rezeptor wechselwirken, oder um Enzyme, die z.B. posttranslationale Veränderungen an Membranproteinen vornehmen.
Ein Beispiel für ein körperfremdes, virales peripheres (Membran-) Protein ist das Nef-Protein (negative factor) des HIV-1. Nef ist verantwortlich für die Clathrin-abhängige Endozytose des Korezeptors CD4 von der Plasmamembran und seine lysosomale Degradation (Aiken et al. 1994, Margottin et al. 1996).

1.2.2 Membranverankerte Proteine

Membranproteine unterscheiden sich durch die Tiefe ihres Eindringens in die Lipid-Doppelschicht. Partiell in die Membran eingebaute Proteine sind durch hydrophobe Peptidanteile in der Membran verankert, wogegen integrale (oder Transmembran-) Proteine mit einer oder mehreren 20 bis 30 Aminosäuren langen hydrophoben Domänen die Lipid-Doppelschicht durchdringen. Strukturell bestehen die Membrandomänen der Proteine aus α-Helizes oder mehrfachen β-Strängen. Sie besitzen ausserdem eine definierte Orientierung zur Membranebene. Zur Gruppe der Transmembran-Proteine gehören vor allem Rezeptoren und Ionenkanäle, die Wechselwirkungen zwischen dem extra- und

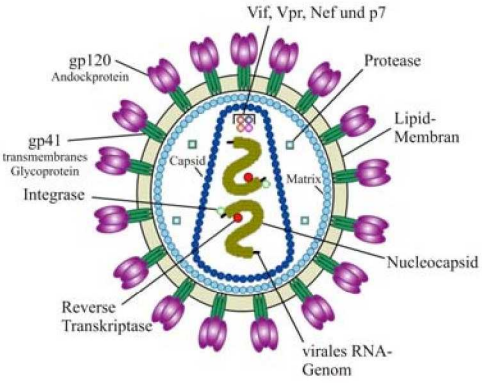
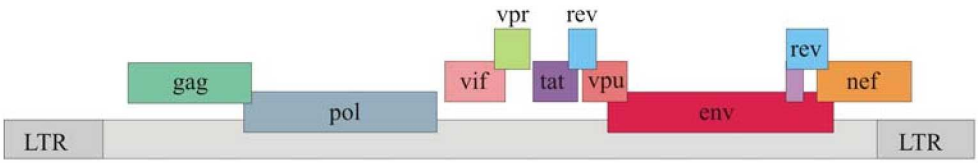


Abbildung 1.4: Das Virion des HIV. Das Virus mit einem Durchmesser von 100 nm ist von einer Lipoproteinhülle umgeben, in das env-Glycoproteine eingelagert sind, die aus einem externen Anteil (gp120) und einem Transmembranteil (gp41) bestehen. Innerhalb der viralen Matrix befinden sich die Protease und das Capsid, indem sich die in zwei Kopien vorliegende RNA und einige für die Vermehrung essentiellen Proteine befinden. Dabei handelt es sich um die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), und Integrase, sowie um die Proteine Vif, Vpr, Nef und p7. (verändert nach http://de.wikipedia.org/wiki/HIV)

intrazellulären Bereich vermitteln und an der Signaltransduktion beteiligt sind.
Eine letzte Untergruppe der Membranproteine sind Proteine, bei denen es durch posttranslationale Modifikationen möglich wird, in der Membran verankert zu werden. Der Korezeptor CD4 ist ein Beispiel für ein Transmembranprotein, bei dessen Transmembrandomäne ausser der Verankerung des Proteins in der Membran keine weitere Funktion bekannt ist. Im Gegensatz dazu ist das Virus Protein U (VpU) des HIV (siehe Kapitel 1.4) ein Transmembranprotein, bei dem die Transmembrandomäne unter anderem eine Ionenkanalaktivität besitzt (Schubert & Strebel 1994).

1.3 Das humane Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1)

Die bis heute unheilbare Krankheit AIDS (acquired immunodeficiency syndrome, erworbenes Immundefizienzsyndrom) wurde zum ersten mal 1981 beschrieben und 1983 als virale Infektion identifiziert (Arbeitsgruppe Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris und gleichzeitig Robert Gallo, Leiter des Tumorvirus-Labors am NIH). Aus Lymphozyten von AIDS-Patienten wurden Retroviren isoliert, die zunächst LAV (lymphadenopathy-associated virus) genannt und der Gruppe der HTLV (human T-cell leukemia virus, humanes T-Zell-Leukämie-Virus) zugeordnet wurden. Weitere Forschung zeigte jedoch, dass das gefundene Virus eine neue Spezies darstellte und wurde daraufhin HIV genannt. Aufgrund von Sequenzunterschieden verschiedener Stämme wird die Kategorie der HI-Viren in verschiedene Unterkategorien unterteilt.
Das Virus scheint seinen Ursprung in Afrika zu haben. Spätere serologische Untersuchungen ergaben, dass in der Bevölkerung bereits vor 1980 sporadisch Antikörper gegen HIV vorhanden waren. Die weltweite HIV-Epidemie begann Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts. Speziell Länder der dritten Welt leiden unter großen Zuwachszahlen infizierter Menschen, da dort Schutzmaßnahmen (wie Kondome während des Geschlechts-



Gen		Genprodukt/Funktion
gag	gruppenspez. Antigen	Proteine für Viruskern und -matrix
pol	Polymerase	Reverse Transkriptase, Protease und Integrase
env	Virushülle	Transmembranglycoproteine
tat	Transaktivator	Transkriptionsverstärker
rev	Regulator der viralen Expression	Transkriptexport aus Zellkern
vif	Infektiosität	beeinflußt Infektiosität der Viruspartikel
vpr	virales R-Protein	DNA-Transport, Virionenproduktion, Zellzyklusstop
vpu	virales U-Protein	verstärkt Virusfreisetzung, stimuliert CD4-Abbau
nef	negativer Kontrollfaktor	Virenreplikation, Abwärtsregulierung CD4 & MHC-II

Abbildung 1.5: Die Gene und daraus resultierende Proteine des HIV Typ 1. Das RNA-Genom besitzt die retroviral typischen LTR-Sequenzen, die für die Integration in das Wirtsgenom und die Regulation der viralen Gene wichtig sind. Wie durch die grafische Darstellung angedeutet, kann das Genom in drei Leserastern abgelesen werden; damit wird durch Überlappung der Gene viel Information in einem verhältnismässig kleinen Genom kodiert. (verändert nach Janeway et al. (2002))

verkehrs) wenig verbreitet sind und oftmals abgelehnt werden.
HI-Viren werden häufig durch Kontakt mit den Körperflüssigkeiten Blut, Sperma, Vaginalsekret und Muttermilch von Infizierten übertragen. Potentielle Eintrittspforten sind frische, noch blutende Wunden und Schleimhäute (Bindehaut, Mund-, Nasen-, Vaginal- und Analschleimhaut) bzw. nicht ausreichend verhornte, leicht verletzliche Stellen der Außenhaut (Eichel, Innenseite der Vorhaut, Anus).

Das HIV gehört zur Lentivirenuntergruppe der Retroviren und ist vom Typ her exogen. Das bedeutet, dass das Virus bereits alle Informationen für den Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln in seinem Genom mit sich führt.
Zur Vermehrung des Virus werden Zellen benötigt, die den Korezeptor CD4 auf der Zelloberfläche tragen. Hierbei handelt es sich um CD4-T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (Eigenschaft des zellulären Tropismus).

1.3.1 Aufbau und Genetik des HI-Virus

Das von einer Lipidhülle umgebene, kugelförmige Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 100 nm. In diese Hülle eingebettet sind env-Glycoproteine, die aus einem externen

Anteil (gp120) und einem Transmembrananteil (gp41) bestehen. Dem gp120 kommt bei der Bindung des Virus an die CD4-Rezeptormoleküle eine entscheidende Bedeutung zu (siehe Kapitel 1.3.2). Die einzelsträngige RNA des HIV liegt in zwei Kopien im Viruskapsid vor, das auch die für die Replikation notwendigen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase und Protease enthält (siehe Abbildung 1.4).

Das HIV-Genom (siehe Abbildung 1.5) besteht aus neun Genen, die von langen terminalen Wiederholungen (long terminal repeats, LTRs) eingerahmt werden. Neben den drei retroviralen Hauptgenen gag, pol, env besitzt das HIV-Genom die sechs Gene vif, vpu, vpr, tat, rev und nef, die für die akzessorischen Proteine selben Namens kodieren. Die Leseraster der einzelnen Gene sind teilweise überlappend. Die akzessorischen Proteine erhöhen die Infektiosität auf verschiedene Weise. Eigenschaften und Aufgaben des viralen Proteins U (VpU) werden in Kapitel 1.3.3 näher beschrieben.

1.3.2 Die Rolle des CD4-Moleküls bei der Infektion

Das HIV bindet über das Oberflächenglycoprotein gp120 an den zellulären Korezeptor CD4. Durch eine konformationelle Änderung im gp120 erreicht das Virus die für den Eintritt nötige zweite gp120-vermittelte Bindung an einen Rezeptor der CD4-tragenden Zellen. Dabei handelt es sich zumeist um die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 (Deng et al. 1996). Nach der Bindung von gp120 an CD4 und Chemokinrezeptor kommt es zu einer Konformationsveränderung, bei der das virale Membranglycoprotein gp41 von außen her zugänglich wird. Daraufhin kommt es zur Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle (Chan et al. 1997). Durch die Verschmelzung mit der Membran werden das Virusgenom und die Enzyme RT, Integrase und Protease in die Zelle eingeschleust.
Um eine Superinfektion einer schon betroffenen Zelle mit weiteren HI-Viren zu verhindern, muss die Möglichkeit eines weiteren Vireneintritts in die Zelle ausgeschlossen werden. Dazu dient das virale Protein Nef (negative factor), das die Abwärtsregulierung membranständiger CD4-Korezeptoren veranlasst (Margottin et al. 1996). Mit Hilfe des VpU (viral protein U) verhindert das Virus die Nachführung neu exprimierter CD4-Moleküle an die Zelloberfläche und die Bindung des CD4 an das virale gp160-Protein, indem es die proteasomale Degradation des CD4 durch Markierung bereits im Endoplasmatischen Retikulum veranlasst (Willey et al. 1992).

1.3.3 Das akzessorische Virus Protein U (VpU)

Das VpU ist ein akzessorisches Protein des HIV, das die Viruspartikelfreisetzung verstärkt und die Abwärtsregulierung des Korezeptors CD4 veranlasst (Schubert & Strebel 1994). Für den Eintritt in eine Wirtszelle ist die Wechselwirkung zwischen gp120 und CD4 von entscheidender Bedeutung, daher kommt es zur hochaffinen Bindung von gp120 zu CD4. Das VpU verhindert die Bindung zwischen dem Hüllvorläuferprotein gp160 (aus dem das gp120 und das gp41 prozessiert wird) und CD4 (Willey et al. 1992), die nach der Synthese im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind, indem es das CD4 zur Degradation



Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des akzessorischen Virus Protein U (VpU). Einer kurzen C-terminalen Sequenz (schwarz) folgt eine 21 Aminosäuren lange Transmembrandomäne (TM, grün), die nach einer kurzen basischen Sequenz (B, gelb, 11 Aminosäuren) mit der vorwiegend sauren, 42 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Domäne (CYT, grün) verbunden ist. Im Bereich einer α-Helix (Helix 2) liegt die Bindestelle des VpU mit dem Korezeptor CD4 (Residuen 39 bis 46, schwarz unterstrichen, Margottin et al. (1996)). Nummerierung und Aminosäuresequenz entsprechen der des HIV-Isolates HV1S1.

durch das Proteasom markiert. Ausserdem wurde eine Kationenkanalaktivität in der Plasmamembran für das VpU beobachtet (Ewart et al. 1996).
Das 81 Aminosäuren lange HIV-1 VpU lässt sich strukturell in drei Bereiche einteilen (siehe auch Abbildung 1.6). Einer etwa 21 Aminosäuren langen Transmembrandomäne folgt eine kurze Sequenz basischer Aminosäuren, die eine Funktion bei der Verankerung in die Membran besitzt. Dieser basischen Domäne folgt eine sehr saure, 42 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne. Während die Transmembrandomäne eine durchgehend α-helikale Struktur zeigt (Park et al. 2003), ist die zytoplasmatische Domäne in eine Tertiärstruktur von amphipatischen α-helikalen Sekundärstrukturelementen gefaltet (Willbold et al. 1997). Moleküldynamische Simulationen am VpU in einer Lipid-/Membranumgebung unterstützen die durch Aminosäuresequenzanalyse vorhergesagte Existenz einer Transmembranhelix und das Auftreten zweier amphipatischer Helizes im zytoplasmatischen Teil (Sun 2003, Lemaitre et al. 2006).
Die Abwärtsregulierung der nach der Synthese im Endoplasmatischen Retikulum befindlichen CD4-Korezeptor-Moleküle wird duch die Bindung der zytoplasmatischen Domäne des VpU mit der zytoplasmatischen Domäne des CD4 induziert. Mutationsstudien zeigen, dass C-terminale Residuen und die Konservierung einer möglichen membrannahen amphipatischen Helix (Helix 2) im VpU für die Bindung nötig sind (Margottin et al. 1996). Die im CD4 beteiligten Residuen befinden sich in der Sequenz 402 bis 420 (Bour et al. 1995a,b). Ein Alignment aller HIV-1 VpU-Sequenzen zeigt eine hohe Konservierung der Residuen 48 bis 59. Die in dieser Region befindlichen Serine 53 und 57 werden durch die Casein Kinase II (CK2, Schubert et al. (1994)) phosphoryliert und spielen daraufhin eine wichtige Rolle bei der Degradation des CD4, sind aber nicht an der direkten Bindung zwischen VpU und CD4 beteiligt (Schubert & Strebel 1994; Vincent & Jabbar 1995). Phosphoryiertes VpU bindet das humane βTrC-Protein, das Teil des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist. Zu diesem Komplex gehört das Skp1-Protein, das über die Bindung an das βTrCP räumliche Nähe an das CD4 erfährt und so Lysin-Residuen ubiquitinylieren kann. Dadurch ist das CD4 für die Degradation durch das Proteasom markiert (Margottin et al. 1998).

1.4 NMR-Spektroskopie

Die Bestimmung atomar aufgelöster Strukturen biologischer Makromoleküle ist eine der Voraussetzungen, um ihre Funktionsmechanismen zu verstehen. Bekannte Funktionen von Molekülen lassen sich erklären, im Falle neu identifizierter Moleküle können mit Hilfe der 3D-Struktur potentielle Funktionen vorhergesagt werden.

1.4.1 Geschichte, Entwicklung und Eigenschaften der NMR

In den letzten Jahrzehnten haben sich zur Aufklärung von räumlichen Strukturen vor allem zwei Methoden durchgesetzt.
Die Röntgenkristallographie nutzt die Beugung von Röntgenstrahlen an den Elektronenorbitalen und liefert über die Elektronendichteverteilung strukturelle Informationen über das kristallisierte Molekül. Nachteil des 1912 erstmalig von Max Laue an Kupfersulfatkristallen durchgeführten Verfahrens ist, dass nur kristallisierte Festkörper untersucht werden können.
Die Kernresonanzspektroskopie (NMR von engl. 'nuclear magnetic resonance', kernmagnetische Resonanz) ist eine Methode, die auf den quantenmechanischen magnetischen Eigenschaften des Atomkerns beruht. Alle Atomkerne, die eine ungerade Anzahl an Protonen oder Neutronen enthalten, besitzen ein intrinsisches magnetisches Moment und einen Drehimpuls. Mit der NMR werden Kerne mit magnetischem Moment gemessen, in dem sie in einem konstanten äußeren Magnetfeld ausgerichtet und dann durch senkrechte, alternierende Magnetfelder gestört werden. Die darauffolgende Resonanz auf die Störung wird aufgenommen und analysiert. Die 1946 von Bloch et al. (1946) und Purcell et al. (1946) unabhängig voneinander durchgeführten ersten NMR-Experimente in flüssiger und fester Phase gehen auf die Entdeckung des Kernspins durch Otto Stern 1933 zurück. Seitdem findet die technisch stark verfeinerte NMR Anwendung in Bereichen der Physik, Chemie, Biologie, Materialforschung, Pharmazie und Medizin (in Verbindung mit tomographischer Bildgebung).

In der vorliegenden Arbeit wird die NMR-Spektroskopie zur Aufklärung der räumlichen Struktur verschiedener biologischer Makromoleküle unter semiphysiologischen Lösungsbedingungen verwendet (Williamson et al. 1995, Wüthrich 1986).
Die Größe der untersuchbaren Moleküle und -komplexe ist für die Flüssig-NMR nach oben hin beschränkt. Die effektive Rotationskorrelationszeit τ_C, welche die thermische Bewegung des untersuchten Biomoleküls charakterisiert, steigt stark mit dem Molekulargewicht oder der Komplexgröße an. Die daraus resultierende transversale Spinrelaxation verursacht erhebliche Linienverbreiterung, welche mit Verringerung der spektralen Auflösung und Empfindlichkeit oder sogar dem vollständigen Signalverlust einhergeht. Zusätzlich limitiert die schnelle transversale Spinrelaxation die Länge der Pulssequenz, wodurch ein effizienter Polarisationstransfer verhindert wird (Stangler et al. 2006). Größere Makromoleküle oder supramolekulare Komplexe können mit Hilfe der Röntgenkristallographie oder

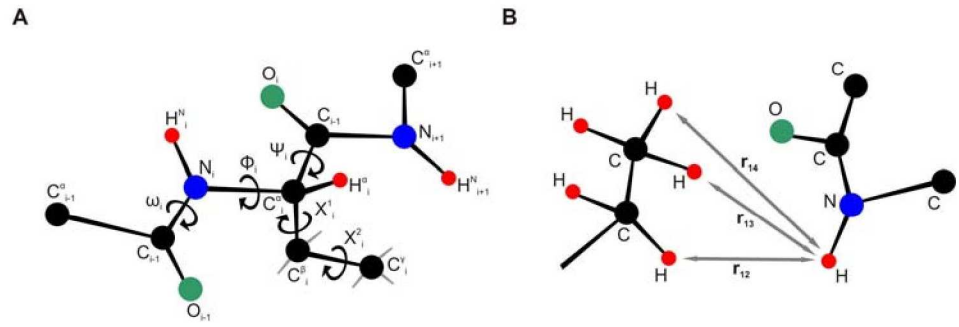


Abbildung 1.7: **A** Polypeptidkette mit der Standardnomenklatur für Atome und Torsionswinkel (Wüthrich 1986). Der Übersichtlichkeit halber wurden nur β- und γ-Kohlenstoff der Seitenkette angezeigt, deren offene Bindungen wurden grau angedeutet. **B** Beispiel für interresiduelle NOE-Kontakte in einem Polypeptid. Das an einen Stickstoff gebundene Proton hat Raumkopplungen mit umliegenden Protonen, die nicht weiter als etwa 5 Å entfernt sind.

der Festkörper-NMR untersucht werden.
Ein Vorteil der NMR liegt neben der Aufklärung der räumlichen Struktur in der Möglichkeit, dynamische Eigenschaften der Moleküle auf verschiedenen Zeitskalen in Lösung zu charakterisieren (PalmerIII 1997, Kay 1998, Gardner & Kay 1998), die räumliche Struktur von nur partiell strukturierten Molekülen zu charakterisieren (Wagner 1997), Proteinfaltungsprozesse zu untersuchen (Dyson & Wright 1998) und Ligandeninteraktionen zu identifizieren (Shuker et al. 1996).
Bei der NMR-basierten Bestimmung der räumlichen Struktur muss zunächst möglichst jede beobachtete Resonanz den einzelnen Kernspins im Molekül zugeordnet werden. Mittels struktureinschränkender Parameter z.B. aus Kern-Overhauser-Effekt-Experimenten (Nuclear Overhauser Enhancement, NOE, Proton-Proton-Abstände), skalaren ^3J-Kopplungskonstanten (Torsionswinkel-Einschränkungen) oder residuellen dipolaren Kopplungen (Orientierung von internuklearen Vektoren) können Strukturmodelle berechnet werden. Abbildung 1.7 A zeigt eine Polypeptidkette mit der Standardnomenklatur für Atome und Torsionswinkel, in Abbildung 1.7 B ist ein Beispiel für interresiduelle NOE-Kontakte dargestellt. Die Berechnung der räumlichen Struktur wird dann mit Hilfe von Distanzgeometrie und/oder Moleküldynamik-Simulationen durchgeführt.

Das eindimensionale (1D) NMR-Experiment besteht zum einen aus einer Präparationsphase, während der das Spinsystem durch einen Puls eine definierte Auslenkung aus dem Gleichgewichtszustand erfährt, und zum anderen aus einer Detektionsphase, in der die Resonanz der Spins auf die Auslenkung beobachtet wird. Das detektierte Signal klingt aufgrund von Relaxationseffekten mit der sogenannten T2-Zeit ab, daher wird das Signal mit FID (von engl. 'free induction decay', freier Induktionszerfall) bezeichnet. Das 1D ^{1}H-Spektrum eines kleinen Proteins ist in Abb. 1.8 gezeigt (verändert nach Stangler et al.

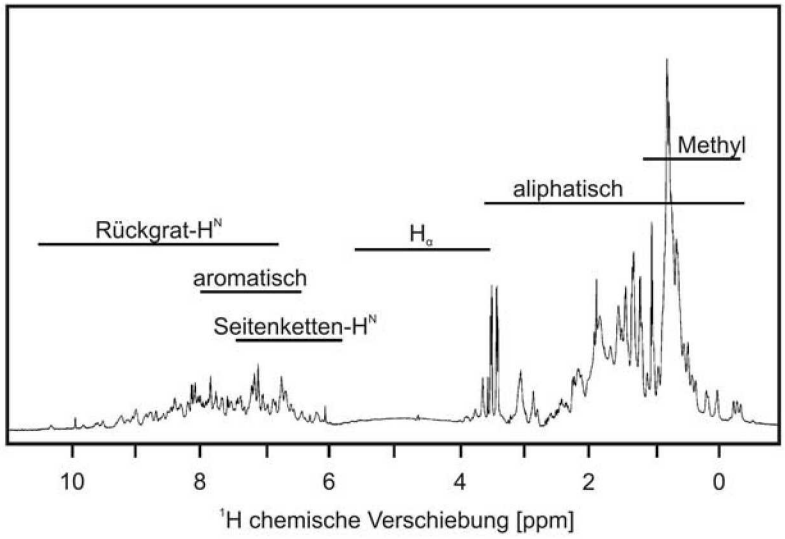


Abbildung 1.8: Hochaufgelöstes ^{1}H NMR-Spektrum eines kleinen Proteins. Die typischen Bereiche der chemischen Verschiebungen der Protonen im Protein sind angegeben (verändert nach Stangler et al. (2006)).

2006). Die unterschiedliche Abschirmung des externen Magnetfeldes aufgrund des elektrischen Umfeldes der einzelnen Protonen ist Ursache für die Frequenzdispersion. Protonen mit vergleichbarem chemischen Umfeld häufen sich bei bestimmten chemischen Verschiebungen. Es ist jedoch zu erkennen, dass es zu starken Überlagerungen in den verschiedenen Bereichen der chemischen Verschiebung kommt, die eine Zuordnung der einzelnen Resonanzen praktisch unmöglich macht.

Die Einführung einer zweiten Dimension (Jeener 1971) und die Weiterentwicklung der FT-Technik (Aue et al. 1976) erlaubte die erste vollständige sequenzspezifische Zuordnung eines Proteins mit 58 Aminosäuren (Wagner & Wüthrich 1982). Mit Hilfe der 2D-NMR werden Signalüberlagerungen im 1D-Spektrum mittels verschiedener Korrelationen zwischen einzelnen Kernspins aufgelöst. Die 2D-NMR ermöglicht die Zuordnung von Proteinen bis zu einer Größe von etwa 80 Aminosäuren, bei größeren Proteinen kommt es im 2D-Spektrum zu deutlichem Signalüberlapp. Die Entwicklung von uniformer Isotopenanreicherung mit ^{13}C und ^{15}N durch bakterielle Überexpression der zu untersuchenden Biomoleküle (Macintosh & Dahlquist 1990, Lemaster 1994) erlaubt die Beobachtung von Korrelationen zwischen Heterokernen und Protonen.

Die Realisierung von höherdimensionalen NMR-Experimenten kann durch die Kombination von 2D-Experimenten erreicht werden (Oschkinat et al. 1988). Daher kann

die n-dimensionale NMR konzeptionell als einfache Extension der 2D-NMR betrachtet werden. Mehrdimensionale, homonukleare NMR-Experimente werden jedoch durch schwache ^{1}H-^{1}H-Kopplungen beeinträchtigt (siehe Abb. 1.9). Der Magnetisierungstransfer zwischen zwei Atomkernen ist abhängig von der skalaren Kopplungskonstante J. Die Idee, heteronukleare J-Kopplungen für den Magnetisierungstransfer bei mit ^{13}C und/oder ^{15}N hochangereicherten Proteinen zu nutzen, erweiterte mit Beginn der 1990er Jahre das Spektrum an Pulssequenzen deutlich. Relativ starke J-Einbindungskopplungen (siehe Abb. 1.9) zwischen ^{13}C- und ^{15}N-Kernen erlauben einen effizienten Polarisationstransfer selbst in Proteinen mit deutlich mehr als 100 Aminosäuren. Technisch wird der Magnetisierungstransfer durch Wartezeiten in der Pulsfolge realisiert, die proportional zu $1/J$ sind. Das bedeutet, dass die Wartezeit zwischen verschiedenen Pulsen umso größer wird, je kleiner die Kopplungskonstante der betroffenen Kerne miteinander ist. Je nach Relaxationsverhalten der Kerne kann während der Wartezeit bereits ein substanzieller Anteil der Magnetisierung und damit des messbaren Signals verloren gehen. Von besonderem Vorteil ist, dass der Resonanzüberlapp durch die Erhöhung der Dimensionalität eines NMR-Experimentes auf 3 oder 4 Dimensionen deutlich verringert wird (Oschkinat et al. 1988, Fesik & Zuiderweg 1988).

Methodische Entwicklungen in der NMR-Spektroskopie wurden nicht zuletzt durch die Geräteentwicklungen der Hersteller vereinfacht. Höhere Magnetfeldstärken zur Steigerung von Auflösung und Empfindlichkeit, innovative Spektrometerelektronik und leistungsfähigere Computersysteme zur Datenaufnahme und -analyse stellen einen Teil dieser Verbesserungen dar. Die kryogene Kühlung des Radiofrequenzteiles eines Probenkopfes erlaubt die Minimierung des elektronischen Rauschens, während die Proteinprobe bei biologisch relevanten Temperaturen gemessen werden kann (Styles et al. 1984, Hajduk et al. 1999). Die Einführung von gepulsten Magnetfeldgradienten in Verbindung mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen hatte besonders positive Auswirkung auf die Protein-NMR (Bax 1994). Durch Nutzung der gepulsten Magnetfeldgradienten konnte die Länge des benötigten Phasenzyklus deutlich verringert werden (Bax & Pochapsky 1992).

Die Verschiebung der Molekülgrößengrenze zu höheren noch untersuchbaren Molekulargewichten hin wird wesentlich duch die Entwicklung weiterer Techniken zur Bestimmung von struktureinschränkenden Parametern beinflusst. Als Beispiele seien TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy)-basierte NMR-Techniken (Pervushin et al. 1997; Pervushin et al. 1998; Wüthrich 1998), selektive Isotopenmarkierung (Hajduk et al. 2000), Deuterierung der Moleküle (Lemaster 1994; Gardner & Kay 1998), residuelle dipolare Kopplungskonstanten (Tjandra & Bax 1997) und Winkel zwischen Bindungsvektoren (Reif et al. 1997; Case 1998) genannt. Erste aufgelöste NMR-Spektren eines 870 kDa-Proteins erreichten Fiaux et al. (2002). Salzmann et al. (2000) führten Resonanzzuordnungen und Sekundärstrukturanalyse eines 110 kDa-Proteins durch. Die genannten Weiterentwicklungen verbessern auch die Untersuchung von Dynamik- (Ishima & Torchia 2003; Brüschweiler 2003), Bindungs- (Meyer & Peters 2003; Dehner & Kessler 2005) und Faltungsprozessen (Zeeb & Balbach 2004).

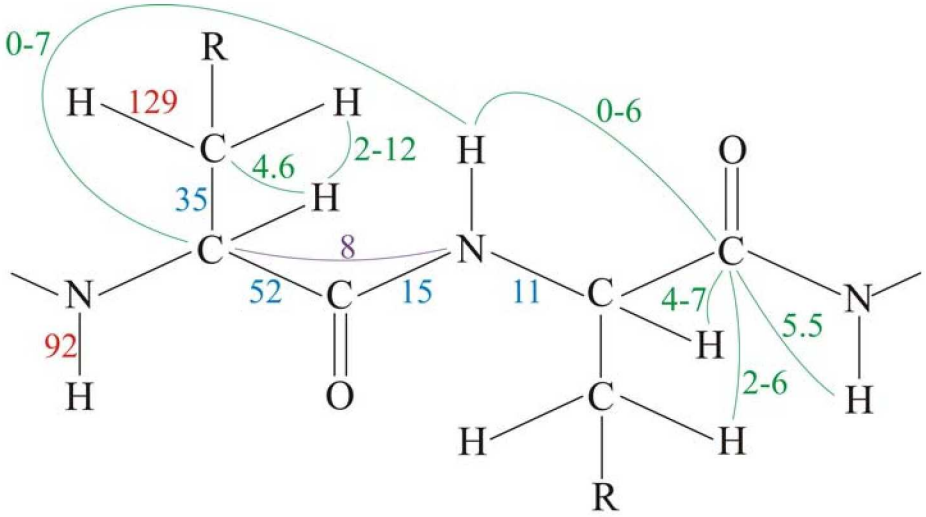


Abbildung 1.9: Die Stärke verschiedener Kopplungskonstanten J in einem biologischen Makromolekül. In blau dargestellt sind direkte CC- oder CN-Kopplungskonstanten, in violett indirekte CC- oder CN-Kopplungskonstanten, in rot direkte CH- oder NH-Kopplungskonstanten, und in grün indirekte CH- oder NH-Kopplungskonstanten. Der Magnetisierungtransfer zwischen koppelnden Kernen ist proportional zu $1/J$, was technisch durch Wartezeiten in einer Pulsfolge realisiert wird. (angepasst nach http://www.cryst.bbk.ac.uk/pps2/projects/schirra/images/bbcup_1.gif)

1.4.2 NMR-Untersuchungen an Modellmembransystemen

Um wasserunlösliche oder auch membranständige biologische Makromoleküle untersuchen zu können, muss das Zielmolekül in organische Lösungsmittel gebracht werden oder in Modellmembransysteme rekonstituiert werden. Da organische Lösungsmittel meist denaturierende Wirkung besitzen und in Organismen nicht vorkommen, ist man auf membransimulierende Detergenzien oder Lipide angewiesen.
Die am häufigsten genutzten Modellmembransysteme sind Mizellen, Bizellen oder Vesikel (siehe Abbildung 1.10). Mizellare Systeme sind der Theorie nach Systeme unterschiedlicher Größe, die aus ein- oder zweikettigen Detergenz- bzw. Lipidmolekülen bestehen. Sie bilden sich, wenn die Konzentration des gewählten Detergenz die cmc (critical micelle concentration, kritische Mizellenkonzentration) übersteigt. Aufgrund ihrer sphärischen Struktur können sie nicht im Magnetfeld ausgerichtet werden. Bizellen bestehen zumeist aus den zwei verschiedenen Lipiden DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) und DHPC (1,2-Diheptanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine), die eine Lipiddoppelschicht mit einem hydrophoben Kern und einer hydrophilen Oberfläche bilden. Dazu werden die Lipide in einem organischen Lösungsmittel gemischt und danach nach Vakuumtrocknung in wässriger Lösung rekonstituiert. Liposomen sind aus Lipiden bestehende Gebilde, die auch mehre-

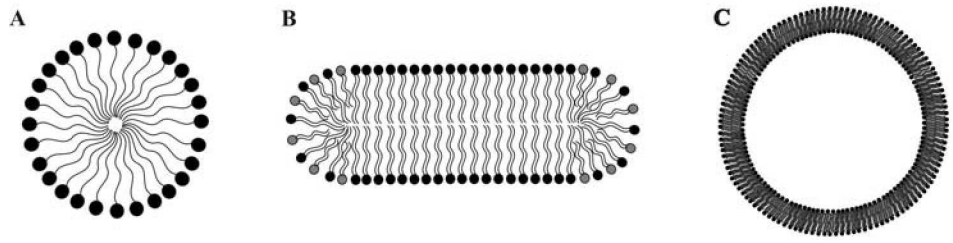


Abbildung 1.10: Darstellung typischer Modellmembransysteme. Die Detergenz- bzw. Lipidmoleküle haben eine polare, hydrophile Kopfgruppe (ausgefüllte Kreise) und einen hydrophoben Schwanz (gewellte Linie). **A** Mizellen bestehen im Idealfall aus der ausreichenden Zahl an Detergenz-Molekülen (hier einkettig), die ein sphärisches System bilden. **B** Bizellen bestehen aus einem längerkettigen Lipid (Moleküle mit schwarzer Kopfgruppe) und einem kürzerkettigen Lipid (graue Kopfgruppe). Die kürzerkettigen Lipidmoleküle werden vorzüglich im Bereich der Krümmungen eingebaut. **C** Unilamellare Vesikel besitzen einen mit Puffer gefüllten Innenraum. Diese Vesikel sind deutlich größer als die beiden anderen dargestellten Systeme.

re Schichten aus Lipid aufweisen können. Sie bestehen aus Verbindungen mit verschieden langen hydrophoben Ketten und unterschiedlichen Kopfgruppen. Um von einer eher sphärischen Form zu einer elongierten Form zu kommen wird ein Extrusionsverfahren angewandt (siehe Kapitel 3), womit eine Vorzugsrichtung erzeugt werden kann und ein Ausrichten im Magnetfeld möglich wird. Die Vesikel besitzen einen Innenraum, der von der wässrigen Lösung gefüllt ist, jedoch nicht mit der Lösung ausserhalb des Vesikels in Kontakt steht (Sanders & Schwonek 1993, Sanders & Oxenoid 2000). Die Membran wirkt dabei als Barriere für Wassermoleküle und Salzionen.

1.5 Ziele der Arbeit

Das humane CD4 ist ein Typ I T-Zell Glycoprotein, das als Korezeptor während der TCR-/MHC-Klasse-II-Wechselwirkung fungiert. Es besitzt eine extrazelluläre Domäne, die mit der β2-Kette des MHC-Klasse-II-Moleküls interagiert (Maddon et al. 1986). Der extrazelluläre Teil ist mit einer Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert, der keine signalgebende Funktion zugeordnet wird. Der zytoplasmatische Teil des CD4 kann verschiedene Aufgaben übernehmen, wie zum Beispiel die Wechselwirkung mit der Proteintyrosinkinase p56LcK (Shaw et al. 1990). Neben seinen zellulären Aufgaben ist das CD4 Hauptrezeptor für das humane Immundefizienz-Virus (HIV) (Dalgleish et al. 1984, Klatzmann et al. 1984, Sattentau & Weiss 1988, Chen & Maldarelli 1993, siehe auch Kapitel 1.3). Der extrazelluläre Teil des CD4 spielt für den Viruseintritt in die Zelle eine entscheidende Rolle, während die zytoplasmatische Domäne Ziel für akzessorische Proteine des HIV-1 ist, nachdem eine Zelle infiziert wurde. Zellmembranständiges CD4 wird durch Interaktion mit dem viralen Nef-Protein zur Internalisierung und Degradation durch das Proteasom markiert (Aiken et al. 1994).
Das Virus Protein U (VpU) ist ein akzessorisches Membranprotein des HIV-1, das sich

strukturell wie funktionell in zwei Bereiche unterteilen läßt. Während der Transmembrandomäne unter anderem eine Kationenkanalaktivität zugeschrieben wird (Ewart et al. 1996), interagiert die zytoplasmatische Domäne des VpU mit der zytoplasmatischen Domäne des CD4-Korezeptors. Ziel dieser Wechselwirkung, deren Ort das Endoplasmatische Retikulum ist, ist die Markierung des CD4-Proteins zur proteasomalen Degradation (Willey et al. 1992). Bereits zellmembranständiges CD4 wird durch das HIV-1 Nef herunterreguliert (Margottin et al. 1996). Aufgrund der vollständigen Entfernung der CD4-Moleküle ist die T-Zelle nicht mehr in der Lage, ihrer immunologischen Funktion nachzukommen. Global kommt es zur lethalen Schwächung des Immunsystems und schließlich zum Tod durch opportunistische Infektionen.
Die Komplexbildung zwischen den zytoplasmatischen Domänen von CD4 und VpU ist von entscheidender Bedeutung für die proteasomale Degradation neu synthetisierten CD4-Proteins. Das strukturelle Verständnis der beteiligten Proteine im Einzelnen und des Komplexes im Gesamten ist von besonderer Bedeutung für therapeutische Ansätze.

Ziel dieser Arbeit war die strukturelle und dynamische Charakterisierung der beteiligten Proteine mit molekularbiologischen und NMR-spektroskopischen Methoden. Da der beschriebene Prozess in direkter Nähe der Membran des Endoplasmatischen Retikulums stattfindet, ist die Anwesenheit eines Modellmembransystems während der Untersuchung von großer Wichtigkeit. Um die Membrannähe während der Versuche sicherzustellen, sollte eine Komponente inklusive ihrer Membrandomäne beobachtet werden. Dazu wurde das CD4 mit Transmembran- und zytoplasmatischer Domäne kloniert, da für die Transmembrandomäne des VpU eine Pentamerisierung aufgrund der Ionenkanalaktivität zu erwarten ist (Ewart et al. 1996).
Die Produktion ausreichender Mengen eines (Trans-)Membranproteins stellt molekularbiologisch noch immer eine Herausforderung dar. Daher sollte auf dem Weg zum strukturellen Studium des Proteins ein Standard-Reinigungsprotokoll für Membranproteine entwickelt werden.
Nachdem die zytoplasmatische Domäne des VpU (VpUcyt) und die Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen des CD4 (CD4mut) mit verschiedenen Methoden studiert worden sind, sollten die gelösten Strukturen in Bezug auf ihre Funktion diskutiert werden. Daran anschließend sollten Vorhersagen über den atomar aufgelösten Komplex der beiden Proteine gemacht werden.

Von besonderem Interesse bei den hier untersuchten Komponenten ist, dass es noch keine strukturellen Untersuchungen zum Verhalten der beiden Proteine in Anwesenheit von Modellmembransystemen gibt. Durch die Membran wird eine Anisotropie in der Umgebung der Proteine verursacht, die sowohl auf die Lösungsmittelzugänglichkeit, als auch auf die elektrostatische und/oder hydrophobe Wechselwirkung der Sequenzabschnitte innerhalb der Proteine oder des gesamten Komplexes einwirkt. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit der Membranen von essentieller Bedeutung für die biologische Funktionalität der beteiligten Proteine ist.

Kapitel 2

Material

2.1 Bakterienstämme

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

Tabelle 2.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
E. coli TOP10	F^-, *mcrA*, Δ(*mrr* − *hsd*RMS−*mcr*BC), Φ80d*lacZ*ΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R, *rec*A1, *ara*D139, Δ(*ara* − *leu*)7697, *gal*U, *gal*K, *rps*L, (Str^R), *end*A1, *nup*G	
XL10 Gold	Tet^R, $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB - hsdSMR - mrr)173$, *endA*1, *supE*44, $thi-1$, *recA*1, *gyrA*96, *relA*1, *lac*, Hte, [F′, *proAB*, $lacI^qZ\Delta M15$, Tn10, (Tet^R), Amy, Cam^R]^a	Stratagene
MACH-1	F^-, Φ80d$lacZ\Delta$M15, $\Delta lacX74$, $hsdR(r_B^-, m_B^-)$, $\Delta recA1398$, *endA*1, *tonA*	Invitrogen
E. coli BL21	*E. coli* B, F^-, *dcm*, *ompT*, $hsdS(r_B^-, m_B^-)$, *gal*	
E. coli c43 *DE*3	*E. coli* B, F^-, *dcm*, *ompT*, $hsdS(r_B^-, m_B^-)$, *gal*, λ(DE3)	Miroux & Walker (1996)

2.2 Plasmide

Tabelle 2.2 zeigt eine Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide.

Tabelle 2.2: Auflistung der in dieser Arbeit benutzten und konstruierten Plasmide.

Plasmidname	Resistenz	Eigenschaft	Quelle
		vorliegende Plasmide	
pGEX-4T2	Ampicillin	Expressionsvektor	Amersham Biosciences
pET43b	Ampicillin	Expressionsvektor	
pGEV2-IgT	Ampicillin	Expressionsvektor	(Huth et al. 1997)
pET15b_kombi	Ampicillin	Expressionsvektor	diese Arbeitsgruppe
pBluescript-II-SK(+)	Ampicillin	Klonierungsvektor	
pTKK19xb/ub_ubi	Kanamycin	Expressionsvektor	Kohno et al. (1998)
		Plasmid mit integriertem *vpu*-Gen	
pGEX-4T2-VpUcyt	Ampicillin	mit integriertem *vpu*-Gen (39-81), kodierend für HIV-1 VpUcyt	diese Arbeitsgruppe
		Plasmide mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), Wildtyp	
pET43b-CD4tmcyt	Ampicillin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4tmcyt	diese Arbeit
pGEV2-CD4tmcyt	Ampicillin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4tmcyt	diese Arbeit
pET15b_kombi-CD4tmcyt	Ampicillin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4tmcyt	diese Arbeit
pTKK19xb/ub_ubi-CD4tmcyt	Kanamycin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4tmcyt	diese Arbeit
pTKK19xb/ub_ubi-Thr-CD4tmcyt	Kanamycin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4tmcyt	diese Arbeit
pTKK19xb/ub_ubi-EK-CD4tmcyt	Kanamycin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4tmcyt	diese Arbeit
pTKK19xb/ub_ubi-FXa-CD4tmcyt	Kanamycin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4tmcyt	diese Arbeit
pTKK19xb/ub_ubi-PS-Thr-CD4tmcyt	Kanamycin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4tmcyt	diese Arbeit
		Plasmide mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), ΔCys-Variante, CD4mut	
pGEV2-CD4mut	Ampicillin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4mut	diese Arbeit
pET15b_kombi-CD4mut	Ampicillin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4mut	diese Arbeit
pBluescript-II-CD4mut	Ampicillin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4mut	diese Arbeit
pTKK19xb/ub_ubi-CD4mut	Kanamycin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4mut	diese Arbeit
pTKK19xb/ub_ubi-Thr-CD4mut	Kanamycin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4mut	diese Arbeit
pTKK19xb/ub_ubi-EK-CD4mut	Kanamycin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4mut	diese Arbeit
pTKK19xb/ub_ubi-FXa-CD4mut	Kanamycin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4mut	diese Arbeit
pTKK19xb/ub_ubi-PS-Thr-CD4mut	Kanamycin	mit integriertem *cd4*-Gen (372-433), kodierend für humanes CD4mut	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (siehe Tabelle 2.3) zur Konstruktion, Amplifikation und Sequenzierung verschiedener Konstrukte wurden von der Firma BioTeZ (Berlin, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Name	Nukleotidsequenz
5′_*pET43b_CD4tmcyt*	AGG AGG GCG GCC GCC GCC CCC GGG GCA GCA TGG CTC TGA TCG TTC TGG GTG GTG TTG CTG GTC TGC TGC TGT TCA TCG GTC TGG GTA TCT TCT TCT GCG TTC GTT GCC GTC ACC GTC GTC GTC AGG C
3′_*pET43b_CD4tmcyt*	CCT CCT CTG CAG CTC GAG TCA GAT CGG GGA GCA GGT TTT CTG GAA ACG GTG CGG GCA CTG GCA GGT TTT TTT TTC GGA CAG CAG ACG TTT GAT CTG GGA CAT ACG TTC AGC CTG ACG ACG ACG G
5′_*pUbi_CD4tmcyt*	p-ATG GCT CTG ATC GTT CTG GG
5′_*pGEV2_CD4tmcyt*	GGA GGA GGA TCC ATG GCT CTG ATC GTT CTG GG
3′_*pGEV2_CD4tmcyt*	GGA GGA GCG GCC GCT TAG ATC GGG GAG CAG GT
5′_*pUbiThr_CD4tmcyt*	CTG GTG CCG CGC GGA TCC ATG GCT CTG ATC GTT CTG GG
5′_*pUbiPreScThr_CD4tmcyt*	CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GTG CCG CGC GGA TCC ATG GCT CTG ATC GTT CTG GG
3′_*pUbiPreScThr_CD4tmcyt*	GGA GGA GCG GCC GCT TAG ATC GGG GAG CAG GTC TTC TGG AAA CGG TGC GGG CAC TGG CAG GTC TTC TTC TCG GAC AGC AGA CGT
5′_*CD4_mut_C394S/ C397S*	GGT ATC TTC TTC TCT GTT CGT TCT CGT CAC CGT CG
3′_*CD4_mut_C420S/ C422S/C430H*	GGA GGA GCG GCC GCT TAG ATC GGG GAA TGG GTT TTC TGG AAA CGG TGC GGA GAC TGA GAG GTT TTT TTT TCG GAC
3′_*CD4_mut_C430H*	GGA GGA GCG GCC GCT TAG ATC GGG GAA TGG GTT TTC TGG AAA CG
3′_*pGEV2_CD4mut*	GGA GGA GCG GCC GCT TAG ATC GGG GAA TGG GTT TTC TG
5′_*pUbiThr_CD4mut*	CTG GTG CCG CGC GGA TCC ATG GCT CTG ATC GTT CTG GG
5′_*pUbiEntero_CD4mut*	GAT GAC GAC GAC AAG ATG GCT CTG ATC GTT CTG GG
5′_*pUbiFactorXa_CD4mut*	ATC GAA GGT CGT ATG GCT CTG ATC GTT CTG GG
3′_*pUbiPreScThr_CD4mut*	GGA GGA GCG GCC GCT TAG ATC GGG GAA TGG GTC TTC TGG AAA CGG TGC GGA GAC TGA GAG GTC TTC TTC TCG GAC AGC AGA CGT
T7 − Promoter	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
T7 − Terminator	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
5′_*M13(−20)*	GTA AAA CGA CGG CCA GT
pBlue_reverse	TTT TTT TTG GAA ACA GCT ATG ACC AT

2.4 Biochemikalien, Chemikalien und Kits

Alle nicht in Tabelle 2.4 aufgeführten Chemikalien wurden in *p.a.* oder vergleichbarer Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (München) bezogen.

Tabelle 2.4: Die verwendeten Biochemikalien, Chemikalien und Kits.

Material	Bezugsquelle
ABI PRISM® FA Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Rodgau
Acrylamid 4K Lösung (30%)(Mix 29:1)	AppliChem, Darmstadt
Agarose NuSieve GTG	Fluka, Neu-Ulm
Agarose Seakem GTG	Fluka, Neu-Ulm
Agarose MP	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumchlorid [^{15}N]	Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich
Complete Protease-Inhibitor-Mix	Roth, Karlsruhe
Desoxy-Nukleosid-Triphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/BRL, Eggenstein
Glukose [^{13}C]	Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Midi Nucleobond AX 20 und AX 100 Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleo Spin Kit	Macherey-Nagel, Düren
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
$d_3$8-Dodecyl-PCho (DPC)	Euriso-top, Saarbrücken
1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
1,2-Diheptanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DHPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (POPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Acetonitril, HPLC Grade	Roth, Karlsruhe
Kanamycin-Sulfat	Calbiochem, Darmstadt
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Bonn

2.5 Enzyme, Proteine und Antikörper

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme, Proteine und Antikörper sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5: Die verwendeten Enzyme, Proteine und Antikörper.

Enzym	Bezugsquelle
SmaI, *XhoI*, *NotI*, *BamHI* *mph*1103*I*	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Vent-Polymerase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main
Fast – Link DNA Ligase	EpiCentre Biozym, Oldendorf
*T*4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
*T*4 DNA Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase (*SAP*)	MBI Fermentas, Leon-Rot
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
DNAse A	AppliChem, Darmstadt
RNAse I	Promega, Mannheim
Thrombin-Protease	Roth, Karlsruhe
PreScission-Protease	diese Arbeitsgruppe
Faktor Xa-Protease	Qiagen, Hilden
Yeast Ubiquitin Hydrolase	diese Arbeitsgruppe
Enterokinase	Roth, Karlsruhe
Anti-His-HRP-konjugiert	Qiagen, Hilden
β-Galactosidase (β-Gal)	Promega, Mannheim

2.6 Größenmarker

Zur Analyse der Proteingrößen auf einem SDS-Gel (siehe Kapitel 3.9) wurden die in Abbildung 2.1 dargestellten Größenmarker verwendet.

2.7 Sonstige Materialien

Alle restlichen, nicht in Tabelle 2.6 verwendeten Materialien wurden von den Firma VWR International (Darmstadt), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf) und Sartorius (Göttingen) bezogen.

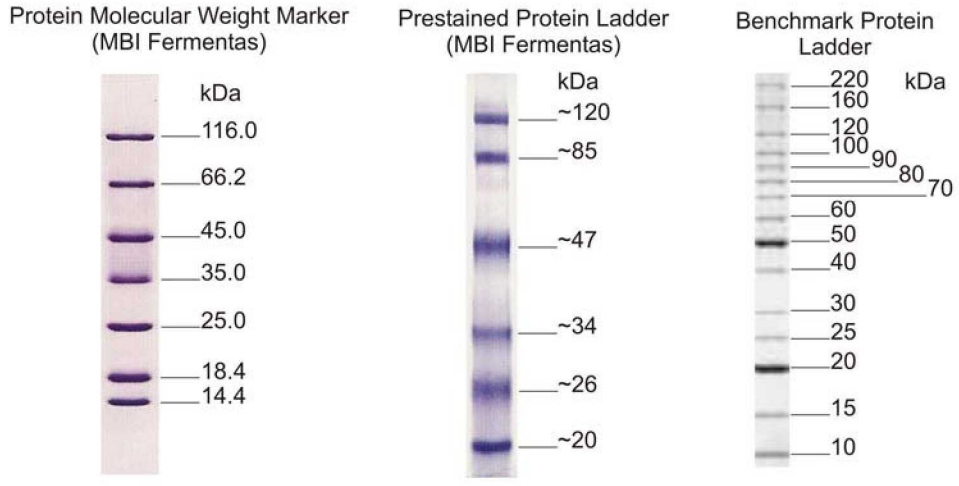


Abbildung 2.1: Graphische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Größenmarker für Proteingele.

Tabelle 2.6: Sonstige in dieser Arbeit verwendeten Materialien.

Material	Bezugsquelle
Rotilabi Sterilfilter (0.22μm)	Roth, Karlsruhe
Immobilon Westernblotmembranen	Millipore, Eschborn
0,1 μm Nucleopore Track-Etch Membrane	Northern Lipids Inc., Westbrook Mall, Kanada
0,2 μm Nucleopore Track-Etch Membrane	Northern Lipids Inc., Westbrook Mall, Kanada
0,4 μm HTTP Isopore Membrane Filters	Millipore, Eschborn
Drain Discs Whatman Nucleopore	Northern Lipids Inc., Westbrook Mall, Kanada

2.8 Semiautomatische Chromatographie

Der erste Schritt einer in dieser Arbeit durchgeführten Chromatographie wurde mit folgenden Materialien in selbstgepackten Säulen durchgeführt:

Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Ni^{2+}-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden

Weitere Schritte wurden mit Hilfe eines „ÄKTApurifier"-Systems der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) durchgeführt, bei dem folgende Säulen zum Einsatz kamen:

HiPrep 26/10 Desalting Column	Amersham Biosciences, Freiburg
Resource 15 RPC 3ml	Amersham Bioscienes, Freiburg
SP 250/10 Nucleosil 100-7 C18	Macherey-Nagel, Düren
EC 250/4.6 Nucleosil 300-7 C4	Macherey-Nagel, Düren

2.9 Datenbanken und Informationen zu DNA- und Aminosäuresequenzen sowie Strukturen von Proteinen

Für die Analyse von Proteinsequenzen (z.B. zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten, des isoelektrischen Punktes oder der Molekularmasse) wurde ein Web-Tool der französischen Universität Aix-Marseilles (http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html) verwendet. Für die Information zu DNA- und Aminosäuresequenzen von Proteinen wurde die Datenbank EMBL-EBI des European Informatics Institute (http://srs.ebi.ac.uk) benutzt. Die PDB-Datenbank diente zur Recherche nach vorhandenen Proteinstrukturen (http://www.rcsb.org/pdb).

Kapitel 3

Methoden

3.1 DNA-Isolierung

Die Reinigung von kleineren Mengen an Plasmid-DNA (10 bis 30 μg) für die PCR, zur Transformation und zur DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des Nucleo Spin Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers basierend auf der Methode der alkalischen Lyse nach Ish-Horowicz & Burke (1981). Dabei wurden 5 bis 10 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur verwendet.

Größere Mengen von Plasmid-DNA (ca. 100 μg) wurden mit Hilfe des Nucleobond AX100 Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach dem Protokoll des Herstellers gewonnen. Je nach Bedarf wurden 50 ml („high-copy plasmid") oder 200 ml („low-copy plasmid") einer *E. coli*-Übernachtkultur verwendet.

3.2 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch vergleichende Abschätzung von DNA-Bandenintensitäten. Hierzu wurde in einer DNA-Gelelektrophorese zusätzlich ein geeichter Standard aufgetragen. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde die Intensität der unbestimmten DNA-Bande mit der des Standards unter UV-Licht verglichen.

Eine zweite Methode ist die photometrische Vermessung der DNA-Lösung gemäß Sambrook et al. (1989). Eine optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) von eins entspricht bei einer optischen Weglänge von 1 cm in der Lösung in etwa einer DNA-Konzentration von 50 μg/ml.

3.3 DNA-Gelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der kontinuierlichen Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe, sowie zur Reinigung und Identifizierung von DNA-Fragmenten.

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung von in Flüssigkeit dispergierten geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld (Dechwer et al. 1999). Die negativ geladenen Partikel bewegen sich hierbei zur Anode, die positiv geladenen zur Kathode. Die Trennschärfe der Elektrophorese hängt entscheidend von der Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen ab. Diese ist wiederum abhängig von der Form und der Größe der Teilchen, ihrer Ladung, dem pH-Wert, der Temperatur, sowie der Viskosität des Agarosegels und der elektrischen Feldstärke. Daher legen kleinere DNA-Fragmente im elektrischen Feld eine größere Strecke zurück als größere Fragmente.

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte in Horizontalelektrophorese-Geräten (Amersham Biosciences, Freiburg). Je nach Größe des zu analysierenden DNA-Fragmentes wird eine 0,8- bis 2,5-%ige (w/v) Agaroselösung in 1-fach TAE-Puffer mit 1 mg/ml Ethidiumbromid (EtBr) hergestellt (Sambrook et al. 1989; siehe auch Tabelle 3.1). Zur analytischen Auftrennung wurde die Agarose MP (AppliChem, Darmstadt) verwendet. Bei der präparativen Agarosegel-Elektrophorese (niedrige Spannungen und größere Probentaschen als bei analytischen Gelen) wurden für Fragmente mit Molekülgrößen kleiner als 1 kb die NuSieve GTG-Agarose (Fluka, Neu-Ulm) und für Fragmente größer als 1 kb die Seakem GTG-Agarose (Fluka, Neu-Ulm) benutzt. Vor dem Auftrag der DNA-Probe wurde diese mit etwa 1/5 (v/v) 5-fach DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung wurde je nach Elektrophorese-Gerät bei einer konstanten Spannung von 80 bis 100 V durchgeführt. Die Detektion mit UV-Durchlicht und die Dokumentation der Ergebnisse der Elektrophorese erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems GelDoc 2000 (BioRad, München; Software „Quantity One“, Version 5.01).

3.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente mit Hilfe der DNA-Gelelektrophorese wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht aus dem Gel isoliert. Die Aufreinigung erfolgte dann unter Verwendung des QiaExII-Kits (Qiagen, Hilden) nach der Anleitung des Herstellers.

Diese Methode wurde für die Reinigung von PCR-Ansätzen und von enzymatisch gespaltenen Vektoren verwendet.

Tabelle 3.1: Puffer zur DNA-Gelelektrophorese.

Agaroselösung	1-fach TAE-Puffer	5-fach DNA-Auftragspuffer
0,8 bis 2,5 % (w/v) Agarose	40 mM Tris-acetat	50 mM EDTA
in 1-fach TAE-Puffer	1 mM EDTA	50 % (w/v) Glycerin
1 mg/l EtBr	pH 8,0	wahlweise:
		0,15 % (w/v) Bromphenolblau
		und/oder:
		0,15 % (w/v) Xylencyanol

3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR, Mullis & Faloona (1987)) ist eine in-vitro-Technik zur selektiven Amplifikation von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Nukleinsäurestrang, bei der die gewünschten Sequenzen in kürzester Zeit um Faktoren von 10^6 bis 10^8 vermehrt werden können.
Bei der PCR läßt man den Nukleinsäurestrang (Vorlage, Template) mit zwei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primer), deren Sequenzen komplementär zu den Anfangs- und Endsequenzen der zu amplifizierenden DNA gewählt sind, reagieren. Zusätzlich enthält der Ansatz ein Gemisch der einzelnen für die DNA-Extension nötigen Nukleotide (dNTP). Jeder Reaktionszyklus beinhaltet eine Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Kettenverlängerung. Es kommt zu einer Verdopplung der DNA und damit zur exponentiellen Anreicherung der zu amplifizierenden DNA-Sequenz.

Die Methode der PCR wird sowohl analytisch zum spezifischen Nachweis bestimmter Nukleinsäuren, als auch präparativ zur Herstellung rekombinanter Gene eingesetzt.

3.5.1 DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation von (rekombinanter) DNA wurden PCR-Ansätze mit 1-fach PCR-Puffer, 100 μM dNTPs, 1 μM 5'-Primer, 1 μM 3'-Primer und 1U/50 μl *Vent*-Polymerase (NEB, Frankfurt/Main) angesetzt. Als Template wurde 1 ng/μl gereinigte (Plasmid-) DNA eingesetzt.
Die Einzelschritte jeder PCR wurden entsprechend der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Stückes den Erfordernissen angepasst. Einer anfänglichen Denaturierung der DNA bei 95 °C (30 bis 60 s) folgte ein variables, zyklisches Dreitemperaturprogramm für 25 bis 30 Zyklen (Denaturierung bei 95 °C für 25 bis 30 s, Anlagerung der Primer bei 55 bis 57 °C für 25 bis 30 s, Kettenverlängerung bei 72 °C für 25 bis 30 s) und eine abschließende Kettenverlängerung für 2 min bei 72 °C.

Die PCR-Reaktionen wurden ausschließlich in einem Thermocycler PTC-200 der Firma Biozym (Oldendorf) durchgeführt.
Bei der präparativen Amplifikation von DNA wurde nach Beendigung der Synthese der gesamte PCR-Ansatz über DNA-Gelelektrophorese auf das Vorhandensein von DNA-Fragmenten der gewünschten Größe überprüft (siehe Kapitel 3.3). Diese DNA-Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert und wie in Kapitel 3.4 beschrieben aufgereinigt.

3.5.2 Kolonie-PCR mit *E. coli*

Eine Kolonie-PCR erlaubte das Auffinden von transformierten *E. coli*-Klonen mit Vektoren, die das gewünschte Insert-DNA-Fragment enthalten (Kapitel 3.8.3). Dazu mußte die DNA zuvor nicht isoliert werden.
Ein Teil einer *E. coli*-Kolonie wurde von einer Kulturplatte in 20 μl ("low-copy-Plasmid", z.B. pET-Vektoren) bzw. 50 μl („high-copy-Plasmid", z.B. pTKK19xb/ub_ubi-Vektor) TE-Puffer, pH 8,0, 1 % (v/v) Nonidet P-40 überführt, resuspendiert und durch zehnminütiges Erhitzen auf 95 °C lysiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) wurde dann 1 μl des Ansatzes für eine PCR (Ansatzgröße 10 μl) eingesetzt. Als Primer dienten, wenn nicht anders angegeben, der T7-Promoter-Primer und der T7-Terminator-Primer, die flankierend zur Multiple Cloning Site (MCS) eines Vektors Bindestellen besitzen. Nach Beendigung der PCR wurde der gesamte Ansatz mit 5-fach DNA-Auftragspuffer versetzt und mit Hilfe der DNA-Gelelektrophorese analysiert. Trug ein Vektor nicht das gewünschte Insert, so zeigte die PCR-Analyse nur ein Fragment, dessen Größe die Anzahl von Nukleotiden zwischen den jeweiligen Primern widerspiegelte. Positive Klone hingegen zeigten ein um das jeweilige Insert vergrößertes Fragment. Die abschließend als positiv erkannten Klone wurden in 5 bis 10 ml LB-Medium angezogen (Kapitel 3.8.1), die DNA isoliert (Kapitel 3.1) und anschließend mittels Sequenzierung (Kapitel 3.7) überprüft.

3.6 Klonierungstechniken

3.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Für die Linearisierung von Plasmiden und für die Klonierung von PCR-DNA-Fragmenten wurden diese mit Restriktionsenzymen verdaut.

Die käuflich erworbenen Restriktionsenzyme und dazu gelieferten Reaktionspuffer wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet. Für die Spaltung von DNA wurde in der Regel 1 U Restriktionsenzym pro 1 μg DNA eingesetzt. Ein Reaktionsansatz wurde 2 bis 3 h bei 37 °C inkubiert; bei der Linearisierung eines Plasmides folgte hierauf zusätzlich eine Dephosphorylierung (Kapitel 3.6.3). Jeder Verdau-Ansatz wurde anschließend mit 5-fach DNA-Auftragspuffer versetzt, parallel zu einem DNA-Größenmarker auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Darauf folgte jeweils eine Extraktion der DNA-Fragmente aus den Agarosegelen (Kapitel 3.4).

3.6.2 Herstellung von „blund ends“

Der Plasmidvektor pTKK19xb/ub_ubi erlaubt das Klonieren am 5'-Ende eines DNA-Inserts über eine „blund-end“-Schnittstelle. Dazu wurde das Plasmid wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben mit dem Enzym *mph1103I* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) linearisiert. Nach adäquater Verdauzeit wurde das Enzym durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min inaktiviert. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes auf Raumtemperatur wurden 1 U *T4*-DNA-Polymerase und 0,1 mM dNTPs hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurde die *T4*-DNA-Polymerase durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min inaktiviert. Anschließend wurde der Ansatz mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 3.3) und das Plasmid wurde gereinigt (Kapitel 3.4). Das 3'-Ende des DNA-Insert-Fragmentes wurde über eine *NotI*-Schnittstelle kloniert. Dazu wurde der gereinigte Plasmidvektor mit dem Enzym *NotI* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben verdaut, dephosphoryliert (Kapitel 3.6.3) und nach DNA-Gelelektrophorese (Kapitel 3.3) gereinigt (Kapitel 3.4) und stand damit zur Ligation (Kapitel 3.6.4) zur Verfügung.

3.6.3 Dephosphorylierung

Um eine mögliche Religation der Vektorenden von gespaltenen DNA-Molekülen zu verhindern wurden die 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe der *Shrimp Alkalinen Phosphatase* (*SAP*; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) entfernt. Dazu wurde zu jedem Verdauansatz 1 U *SAP* pro 1 μg DNA gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Eine direkte Zugabe zum Verdauansatz war möglich, da die *SAP* in jedem der benutzten Puffer volle Aktivität besaß. Anschließend wurde der Ansatz wie bereits in Kapitel 3.6.1 beschrieben weiterverarbeitet.

3.6.4 Ligation von DNA

Für die Insertion eines DNA-Fragmentes in ein zuvor linearisiertes Plasmid wurden verschiedene DNA-Ligasen verwendet. Handelte es sich um zwei „sticky ends“, dann wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (*T4*-DNA-Ligase; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Wurde jedoch über ein „blund end“ kloniert, dann wurde die *Fast-Link*-Ligase (EpiCentre Biozym, Oldendorf) verwendet.
Für die Ligation wurde 100 ng Plasmidvektor und ein zehn- bis fünfzigfacher Überschuss an Insert-DNA mit 1 mM ATP und 1 U jeweiliger DNA-Ligase inkubiert. Die Ligation wurde üblicherweise bei 16 °C für 16 h durchgeführt. Anschließend wurden verschiedene *E. coli*-Klonierungsstämme mit 1/5 bis 1/2 (maximal 10 μl) des Ligationsansatzes transformiert (Kapitel 3.8.3).

Tabelle 3.2: Puffer und Gel zur DNA-Sequenzierung.

Fällmix	Formamid-Laufpuffer
1 Teil (v/v) 7,5 M	20 mM EDTA, pH 8,8
Ammoniumacetat pH 5,2	6 mg/ml Blue Dextran
6 Teile (v/v) Ethanol	in deionisiertem Formamid

10-fach TBE-Puffer	5 % Acrylamidgel
0,9 M Tris	18 g Harnstoff
0,9 M Borsäure	5 ml Long Ranger Gel Solution (50 %)
20 mM EDTA, pH 8,2	25 μl TEMED
	250 μl 10 % APS

3.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde gemäß der enzymatischen Dideoxy-Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz enthält dabei jeweils nur einen 5'- oder 3'-Primer, da die Sequenzreaktion eine Art „Einzelstrang-PCR" darstellt. Im Terminator-Mix sind neben dNTPs auch ddNTPs enthalten, an denen keine Strangverlängerung mehr erfolgen kann. Während des Elongationsschrittes erfolgt somit ein Kettenabbruch, der statistisch an jeder Position im zu sequenzierenden Molekül erfolgen kann. Die so markierten DNA-Fragmente verschiedener Länge können später bei ihrer Auftrennung auf Polyacrylamidgelen mittels eines Laserstrahles erkannt und unterschieden werden. Als Startpunkt dienen die eingesetzten 3'- oder 5'-Primer.

Für die Reaktion wurde der „ABI PRISM FS Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" der Firma Perkin Elmer (Rodgau) verwendet. Zur Sequenzierung von pTKK19xb/ub_ubi-Vektor-DNA wurden als Primer T7-Terminator-Primer oder T7-Promoter-Primer verwendet. Jede Reaktion wurde in einem Volumen von 10 μl angesetzt, jeder Ansatz enthielt 3 μl Big Dye-Mix, 0,5 bis 1 μg DNA und 5 pmol/μl Primer. Die Sequenzierungs-PCR wurde in einem Thermocycler PTC-200 (Biozym, Oldendorf) mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 5 s bei 95 °C und 25 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 96 °C, 10 s Anlagerung der Primer bei 55 °C und 4 min Kettenverlängerung bei 60 °C.

Daran anschließend wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Dafür wurde zu den PCR-Ansätzen je 120 μl des Fällmix gegeben und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3300 rpm für 1 h bei 4 °C wurde das entstandene Pellet zweimal mit 120 μl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 3300 rpm für 15 min bei 4 °C wurde das DNA-Pellet bei 80 °C getrocknet. Für den Sequenzierungslauf wurden die Proben in 2 bis 3 μl Formamid-Laufpuffer resuspendiert, kurz vor Auftrag 2 min auf 90 °C erhitzt und dann auf Eis aufbewahrt. Zur Auftrennung

wurde ein 5 %-iges Acrylamidgel verwendet; die Auswertung erfolgte mit dem Computer unter Verwendung der ABI-Software.

Einige Sequenzierungen wurden auch von der Firma Seqlab (Berlin) durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend der im Internet genannten Erfordernisse vorbereitet (http://www.seqlab.de). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels des frei verfügbaren Programmes ChromasPro (http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html).

3.8 Bakterienkultur

3.8.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Zur Kultivierung der verschiedenen Genkonstrukte wurden die *E. coli*-Stämme DH5α, TOP10, XL10Gold und MACH-1 verwendet. Die Proteinexpression erfolgte mit dem Stamm *E. coli* BL21 (für pGEX-Vektoren, in dieser Arbeit zur Expression des VpUcyt) beziehungsweise *E. coli* c43(DE3) (für pTKK19xb/ub_ubi- und pET-Vektoren, in dieser Arbeit für alle CD4-Konstrukte). Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in Medium mit 50 μg/ml des jeweiligen Antibiotikums unter Schütteln (170 rpm; Unitron, Infors-HT, Einsbach) bzw. auf LB-Agarplatten über Nacht. Zellen mit dem Plasmid pTKK19xb/ub_ubi enthielten eine Resistenz gegen Kanamycin, alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Vektoren verliehen eine Resistenz gegen Ampicillin. Die Flüssigkulturen wurden mit einer Einzelkolonie von einer frischen LB-Agarplatte oder aus Glycerinkulturen angeimpft.
Die Zelldichte wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt, wobei eine OD_{600} von 1 einer Dichte von etwa 10^9 Zellen/ml Kultur entspricht. Für die Langzeitkonservierung wurden 300 μl einer dichten Übertag-Bakterienkultur mit 700 μl 70 %-igem Glycerin gemischt und sofort bei -80 °C eingefroren.

3.8.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Von einer frischen SOB-Platte wurden mehrere *E. coli*-Kolonien in 300 ml SOB-Medium überführt (siehe auch Tabelle 3.3). Nach Inkubation in einem Schüttler (Unitron, Infors-HT, Einsbach) bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,3 bis 0,4 wurden die Zellen in 6×50 ml Aliquots aufgeteilt und 15 min auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation (Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) für 15 min bei 3500 rpm und 4 °C wurden die Bakterienpellets in je 10 ml eisgekühltem TFB-I-Puffer aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterienpellets in je 2 ml eisgekühltem TFB-II-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Für den späteren Gebrauch wurden Aliquots von 200 μl in Mikroreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3.3: Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen.

SOB-Medium	TFB-I-Puffer	TFB-II-Puffer
20 g/l Trypton	30 mM Na-acetat	10 mM MOPS
5 g/l Hefeextrakt	50 mM $MgCl_2$	75 mM $CaCl_2$
8,5 mM NaCl	100 mM NaCl	10 mM NaCl
2,5 mM KCl	10 mM $CaCl_2$	15 % Glycerin
10 mM $MgCl_2$	15 % Glycerin	pH 7,0
0,2 % (w/v) Glukose	pH 6,0	

3.8.3 Transformation von *E. coli*

Die bei -80 °C gelagerten kompetenten Bakterienzellen (Kapitel 3.8.1 und 3.8.2) wurden zur Transformation mit Ligationsansatz (siehe Kapitel 3.6.4) bzw. mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt und dann für etwa 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 1 min eine Hitzeaktivierung der Zellen bei 42 °C ohne Schütteln und nach Zugabe von 1 ml antibiotikafreien LB-Mediums eine Inkubation von 45 bis 60 min bei 37 °C in einem Schüttler. Danach wurden 100 μl und 900 μl der Bakteriensuspension auf je eine antibiotikaenthaltende LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Es konnten sich daher nur Bakterien vermehren, die über das enthaltene Plasmid eine Resistenz gegen das jeweilige Antibiotikum erzeugten. Im Falle der Transformation eines Ligationsansatzes (siehe Kapitel 3.6.4) wurden die auf der Platte gewachsenen Kolonien durch eine Kolonie-PCR (Kapitel 3.5.2) weiter untersucht. Zur Expression von Proteinen konnten die gewachsenen Expressionskulturen direkt in Medium überführt werden.

3.9 SDS-PAGE nach Laemmli

3.9.1 Prozess der Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis) bestehend aus einem Sammel- und Trenngel nach Laemmli (1970) (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.4) angewandt. Die SDS-Gelelektrophorese ist eine Methode, die Substanzen im Wesentlichen nach Molekülgröße in einem elektrischen Feld auftrennt. Bei der Probenvorbereitung wird das anionische Detergenz SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) im Überschuss zur Proteinlösung hinzugegeben und die Probe anschließend auf 95 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Das SDS formt anionische Mizellen, welche die Eigenladungen von Proteinen überdecken. Pro 1 g Protein binden etwa 1,4 g SDS, so dass die Proteine eine konstante Ladungsdichte aufweisen. Damit wird die spezifische Ladung, d.h. Ladung pro Masse, zum entscheidenden Faktor für die Auftrennung. Das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol hat die Aufgabe, Disulfidbrücken reduktiv zu spalten.

Tabelle 3.4: Puffer und Gele zur SDS-PAGE nach Laemmli (1970).

5 % Sammelgel	15 % Trenngel
16,8 % (v/v) Acrylamid 30 %	50 % (v/v) Acrylamid 30 %
125 mM Tris-HCl, pH 6,8	375 mM Tris-HCl pH 8,8
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS
0,1 % (v/v) 10 % APS	0,1 % (v/v) 10% APS
0,1 % TEMED	0,04 % TEMED

1-fach SDS-Laufpuffer	4-fach Probenpuffer
50 mM Tris-HCl	200 mM Tris-HCl pH 6,8
385 mM Glycerin	8 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) SDS	8 % (v/v) β-Mercaptoethanol
pH 8,3	40 % (v/v) Glycerin
	3 g/l Bromphenolblau

Nach Probenauftrag in die Geltaschen wird eine Konzentrierung der Proben im Sammelgel dadurch erreicht, dass sich im Gel andere Ionen (Leitionen) als im Elektrodengefäß (Folgeionen) befinden. Dabei wandert das Leition am schnellsten und zieht die Proteine nach sich, während das Folgeion am langsamsten wandert und die Proteine somit vor sich her schiebt. Die damit in einer schmalen, scharf begrenzten Zone hochkonzentrierten Proteine bewegen sich Richtung Anode, bis sie an die Grenzschicht des engporigen Trenngels gelangen. Duch den plötzlich hohen Reibungswiderstand entsteht ein Stau, der die Zonenschärfe weiter erhöht. Das niedermolekulare Folgeion ist davon nicht betroffen und überholt die Proteine.

Die Gelläufe wurden in vertikalen Plattenelektrophoresekammern durchgeführt (Mighty Small II, Hoefer/Amersham Biosciences, Freiburg), die Gele maßen 10 cm $\times$ 15 cm bei einer Dicke von 0,75 cm.
Die Gelproben wurden vor dem Lauf im Verhältnis 1:4 mit einem 4-fach Probenpuffer nach Laemmli (1970) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 bis 40 mA pro Gel für etwa 1 h. Im Anschluss wurden die Gele mit Coomassie gefärbt (Kapitel 3.9.2).

3.9.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte mit Coomassie-Färbelösung (Tabelle 3.5). Nach der Gelelektrophorese wurde das Trenngel in circa 100 ml Coomassie-Färbelösung für 30 bis 60 min unter Schütteln inkubiert. Zur schnelleren Färbung wurde

Tabelle 3.5: Puffer zur Coomassie-Färbung von Proteingelen.

Coomassie-Färbelösung	Entfärber-Lösung
25 % Isopropanol 10 % Essigsäure 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R250 in H_2O	10 % Essigsäure

die Gelfärbelösung für etwa 2 min unter ständiger Beobachtung in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde das Gel entweder mit Entfärberlösung oder durch Aufkochen in Wasser bis zum gewünschten Grad entfärbt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Gerät GelDoc 2000 (BioRad, München) unter Normallicht.

3.10 Expression von rekombinanten Proteinen

Nach Verifizierung der DNA-Sequenz der Plasmide wurden entsprechend den Anforderungen kompetente *E. coli*-Zellen mit der Plasmid-DNA transformiert. Es wurden *E. coli* BL21-Zellen mit pGEX-4T2-VpUcyt-Plasmiden und *E. coli* c43(DE3)-Zellen mit den jeweiligen CD4-Konstrukten transformiert.

Die Zellanzucht erfolgte stets in mit Schikanen versehenen Erlenmeyerkolben bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm (Unitron, Infors-HT, Einsbach). Zur Herstellung einer Vorkultur wurde eine adäquate Menge LB-Flüssigmedium mit 100 μM entsprechenden Antibiotikums versetzt und mit einer Kolonie von einer LB-Agarplatte oder mit einer kleinen Menge einer Glycerinkultur inokuliert und bis zum erreichen einer hohen Dichte inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur je nach benutztem Antibiotikum (hier: Ampicillin oder Kanamycin) zentrifugiert (3000×g, 3 min , RT; Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), das Pellet in frischem LB-Medium resuspendiert und damit die Expressionskultur auf eine OD_{600} von etwa 0,1 eingestellt. Diese Kultur wurde unter Schütteln solange inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,6 bis 0,8 erreicht war (je nach Medium und Kultur 2 bis 3 Stunden). Die Proteinexpression wurde dann mit 1 mM IPTG induziert und noch 4 h (bei Expression mit *E. coli* BL21 pGEX-4T2-VpUcyt) bzw. 4 h bis über Nacht (bei Expression der CD4-Konstrukte) unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Die Expression wurde durch Zentrifugation der Kultur bei 6000×g für 25 min (Zentrifuge Avanti J-20XP, Beckmann-Coulter, Palo Alto, USA) geerntet. Nach einmaligem Waschen der Bakterienpellets mit PBS-Puffer wurden diese zur Lagerung bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.
Die Überexpression des gewünschten Proteins wurde mit Hilfe der SDS-PAGE (Kapitel 3.9) überprüft. Dazu wurden vor Induktion und zu verschiedenen Zeiten danach Aliquots der Expressionskultur entnommen.

Tabelle 3.6: Verwendete Medien.

LB-Medium	M9-Minimalmedium
10 g/l Trypton	9,1 g/l $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
5 g/l Hefeextrakt	3 g/l $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
5 g/l NaCl	0,5 g/l NaCl
	0,5 g/l $[^{15}N]H_4Cl$
	100 μM $CaCl_2$
	2 mM $MgSO_4$
	10 μM Fe(III)-citrat
	4 g/l Glukose bzw. 2 g/l $[^{13}C]$-Glukose
	0,2 % (v/v) TS2 (Spurenelemente)
	5 mg/l Thiaminhydrochlorid
	Vitamincocktail

Spurenelemente	Vitamincocktail
30 mg/l $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1 mg/l Biotin
58,8 mg/l $ZnSO_4 \cdot H_2O$	1 mg/l Cholinchlorid
300 mg/l H_3BO_3	1 mg/l Folsäure
200 mg/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1 mg/l Nicotinamid
20 mg/l $NiCl_2 \cdot 2H_2O$	1 mg/l Natrium-*D*-panthothenat
10 mg/l $CuCl_2 \cdot 2H_2O$	1 mg/l Pyridoxalhydrochlorid
900 mg/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,1 mg/l Riboflavin
20 mg/l Na_2SeO_3	

Zur Herstellung isotopenmarkierten Proteins für die NMR-Spektroskopie wurde anstatt des LB-Mediums isotopenangereichertes M9-Minimalmedium verwendet (siehe Tabelle 3.6).

3.11 Zellaufschluss

Die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Proteine HIV-1 VpUcyt (zytoplasmatischer Teil des HIV-1 Virus Protein U, VpUcyt, Aminosäuren 39 bis 81) und CD4 (Wildtyp (CD4tmcyt) und Mutante (CD4mut) in verschiedenen Vektorkonstrukten, Transmembran- und zytoplasmatische Domäne, Aminosäuren 372 bis 433) unterscheiden sich deutlich in ihrem Reinigungsverhalten. Das wasserlösliche VpUcyt läßt sich ohne besondere Additiva wie z.B. Detergenzien reinigen (Kapitel 3.11.1, 3.12.1, 3.12.4, 3.12.5), wohingegen das CD4 aufgrund der wasserunlöslichen Transmembrandomäne nicht ohne Additiva gereinigt werden kann und durch die Gesamtheit seiner Eigenschaften einen speziell abgestimmten Reinigungsweg erfordert (Kapitel 3.11.2, 3.12.2, 3.12.3, 3.12.4, 3.12.5).

Tabelle 3.7: Puffer zum nativen Zellaufschluss.

1-fach PBS-Puffer	GST-Lysispuffer
140 mM NaCl	1-fach PBS-Puffer
2,7 mM KCl	100 μg/ml Lysozym
10 mM Na_2HPO_4	20 μg/ml DNAse A
1,8 mM KH_2PO_4	1 Tablette/40 ml Complete Protease-Inhibitor EDTA-frei
pH 7,3	

3.11.1 Nativer Zellaufschluss ohne Detergenzien

Für den nativen Zellaufschluss wurden die Zellpellets in 4 ml GST-Lysispuffer (siehe Tabelle 3.7) pro Gramm Nasszellgewicht aufgenommen und resuspendiert. Diese Lösung wurde 1 h unter Rühren bei 11 °C inkubiert und dann mittels eines Ultraschallstabes (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) 3 mal für 30 s bei Stärke 6 auf Eis sonifiziert. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (45 min, 48400×g; Zentrifuge Avanti J-20XP, Beckmann-Coulter, Palo-Alto, USA) entfernt. Der zellfreie Rohextrakt wurde für die weitere Reinigung aufbewahrt.

3.11.2 Seminativer Zellaufschluss mit Detergenzien

Eine Lösung des CD4-(Fusions)-Proteins in nativen Puffersystemen (z.B. in 50 mM Natriumphosphatpuffer, 300 mM NaCl, pH 8,0) ohne Additiva war nicht möglich. Die Zugabe von bis zu 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinium-Hydrochlorid zeigte ebenfalls kaum Wirkung. Das entwickelte Puffersystem ist in Tabelle 3.8 dargestellt. Die letztendlich in dieser Arbeit verwendeten CD4-Konstrukte (Wildtyp und Mutante) wurden mit einem N-terminalen $(His)_{10}$-Tag, gefolgt von der Ubiquitin-Sequenz, einem Linker und der Sequenz des Zielproteins (Abb. 4.29 und Abb. 4.36) exprimiert.

Ein Zellpellet wurde für den Zellaufschluss in 5 bis 6 ml (pro 1 g Nasszellgewicht) Resuspensions-Puffer aufgenommen und homogenisiert. Nach der Sonifikation (3 mal, 50 % duty cycle, je 35 Pulse der Stärke 6; Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) wurde der Lösung das gleiche Volumen Lysis-Puffer und 8 mM $MgCl_2$ hinzugefügt. Einer Inkubation der Lösung für 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur folgte das Abtrennen der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (12000×g, 20 min; Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). Der zellfreie Rohextrakt wurde für die weitere Reinigung aufbewahrt. Eine Wiederholung der angegebenen Schritte konnte die Proteinausbeute leicht erhöhen.

Tabelle 3.8: Puffer zum seminativen Zellaufschluss.

Resuspensions-Puffer	Lysis-Puffer
50 mM Tris-HCl pH 8,0	50 mM Tris-HCl pH 8,0
25 % (w/v) Sucrose	1 % (v/v) Triton-X-100
0,1 % NaN_3	1 % (w/v) freie Cholinsäure
1 Tablette/50 ml Complete	600 mM NaCl
Protease-Inhibitor EDTA-frei	0,1 % NaN_3
wahlweise jeweils 14 mM β-Mercaptoethanol	

3.12 Proteinreinigungen

3.12.1 Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose

Der erste Reinigungsschritt für GST-Fusionsproteine erfolgte an Gutathion-Sepharose 4B (GSH-Sepharose 4B, Amersham Biosciences, Freiburg). Dabei beruht das Prinzip auf der Bindung der Glutathion-S-Transferase (GST) an den Liganden Gutathion, der kovalent an die Sepharose gekoppelt ist. Eine anschließende Elution der GST-Fusionsproteine kann durch reduziertes Glutathion stattfinden, es ist aber auch möglich, an der Säule die Fusion zu spalten (siehe Kapitel 3.12.4).

Zunächst wurde eine leere Chromatographie-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) mit 2 ml GSH-Sepharose pro Gramm Nasszellgewicht befüllt. Nach Ablassen des Ethanols wurde das Säulenmaterial mit 3 Säulenvolumen H_2O gespült und dann mit 10 Säulenvolumen 1-fach PBS-Puffer equilibriert. Die Säule wurde im Gravitationsflussverfahren betrieben.
Das Säulenmaterial wurde in der Chromatographie-Säule mit dem zellfreien Rohextrakt (siehe Kapitel 3.11.1) für 1 bis 2 h auf einem Rollschüttler inkubiert. Danach wurde der zellfreie Rohextrakt aus der Säule abgelassen und das Säulenmaterial wurde mit 30 Säulenvolumen 1-fach PBS-Puffer gewaschen.
Je nach Wunsch konnte das Protein mit 25 ml Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM reduziertes Glutathion) in 5 ml-Fraktionen vom Säulenmaterial eluiert werden, oder es konnte sofort mit der Abspaltung des Affinitätstags (Kapitel 3.12.4) fortgefahren werden.

Zur Erfolgskontrolle wurden vom zellfreien Rohextrakt vor und nach dem Säulenauftrag, der Waschfraktion, dem Säulenmaterial mit Fusionsprotein und ggf. den Elutionsfraktionen Proben entnommen und per SDS-PAGE analysiert.

Tabelle 3.9: Arbeitspuffer zur IMAC.

Arbeitspuffer	
50 mM Tris pH 8,0	300 mM NaCl
12,5 % (w/v) Sucrose	0,5 % (v/v) Triton-X-100
0,5 % (w/v) freie Cholinsäure	8 mM $MgCl_2$
0,1 % NaN_3	1 Tablette/500 ml Complete Protease-
wahlweise 14 mM β-Mercaptoethanol	Inhibitor-Mix

3.12.2 Affinitätschromatographie an Ni^{2+}-NTA-Agarose

Die Reinigung des Fusionsproteins mit Polyhistag wurde mit der Ni^{2+}-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das Prinzip der IMAC (immobilized-metal affinity chromatography, Porath et al. (1975)) beruht auf der Wechselwirkung eines mit Metallionen beladenen, chelatbildenden Liganden (hier NTA, Nitriloacetic Acid) mit dem Polyhistag. Das NTA besetzt vier der sechs Ligandenbindungsstellen des Nickelions, die restlichen beiden interagieren stark spezifisch mit dem Polyhistag. Die Elution der Polyhis-Fusionsproteine von der Ni^{2+}-NTA-Agarose erfolgte durch Kompetition mit Imidazol.

Zur Aufreinigung der Polyhis-Fusionsproteine wurde eine leere Chromatographie-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) mit 2 ml Agarose pro 1 ml Nasszellgewicht befüllt. Nach Ablassen des Ethanols wurde das Säulenmaterial zunächst mit 5 Säulenvolumen H_2O gespült und dann mit 5 Säulenvolumen Arbeitspuffer equilibriert. Die Säule wurde im Gravitationsflussverfahren betrieben.
Der zellfreie Rohextrakt wurde appliziert, danach wurde das Säulenmaterial mit 10 Säulenvolumen Arbeitspuffer gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte schrittweise mit ansteigender Imidazolkonzentration. Je 10 Säulenvolumen Arbeitspuffer (Tabelle 3.9) wurden mit 20 mM, 50 mM, 100 mM, 300 mM und 500 mM Imidazol, pH 8,0, versetzt und nacheinander aufgetragen. Die Elutionslösung mit 300 mM Imidazol wurde in 10 ml-Aliquots aufgefangen.

Zur Kontrolle wurden vom zellfreien Rohextrakt vor und nach dem Säulenauftrag, vom Waschpuffer und den jeweiligen Elutionspuffern nach dem Säulendurchlauf Proben entnommen, die dann per SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert wurden.

3.12.3 Pufferwechsel durch Größenausschlusschromatographie

Die in den Elutionsfraktionen enthaltenen Fusionsproteine wurden mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie in Proteolyse-Puffer überführt. Bei der Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) findet die Trennung aufgrund des hydrodynamischen Volumens

Tabelle 3.10: Der Proteolyse-Puffer zur Spaltung der Polyhis-Ubiquitin-CD4-Konstrukte.

Proteolyse-Puffer
50 mM Tris-HCl pH 8,0
150 mM NaCl
0,5 % Triton-X-100
wahlweise 3 mM DTT

der Moleküle in Lösung statt. Die Trennsäulen sind mit porösem, hochvernetztem Polymer gefüllt. Die Diffusion der Moleküle in die Poren des Polymers ist größenabhängig, damit verweilen kleine Moleküle länger auf der Säule als große. Die Wahl der Porengröße bestimmt somit den Größentrennungsbereich des Materials.

Die am Chromatographie-System ÄKTApurifier (Amersham Biosciences, Freiburg) angebrachte Entsalzungs-GPC-Säule HiLoad 16/10 Desalting (Amersham Biosciences, Freiburg) hat ein Säulenvolumen von ca. 53 ml und ein Ladevolumen von 12 ml. Das Säulenmaterial ist so gewählt, dass Bestandteile größer als 5 kDa von Bestandteilen kleiner als 5 kDa (z.B. Salze) getrennt werden. Nachdem die Säule mit Proteolyse-Puffer (Tabelle 3.10) equilibriert wurde, konnten die ausgewählten Fraktionen aus der IMAC (Kapitel 3.12.2) aufgetragen werden. Die Flussrate betrug jeweils 5 ml/min. Nach Beendigung eines Laufes befand sich das Fusionsprotein vollständig in Proteolyse-Puffer.

3.12.4 Abspaltung des Fusionspartners mit Thrombin bzw. PreScission

Das GST-VpUcyt-Fusionsprotein aus dem pGEX-4T2-Vektor enthält eine Erkennungssequenz für die Thrombin-Protease. Durch proteolytische Spaltung wurde eine Trennung des amminoterminalen Affinitätstags Glutathion-S-Transferase (GST) vom VpUcyt erreicht. Dazu wurde das gereinigte, an der GSH-Sepharose immobilisierte Fusionsprotein (Kapitel 3.12.1) mit 20 NIH-U Thrombin pro mg in 2 Säulenvolumen 1-fach PBS-Puffer für 4 bis 5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das nun in Lösung befindliche VpUcyt aus der Chromatographie-Säule abgelassen und mit 1 mM PMSF versetzt. Die chromatographische Trennung von Protease und VpUcyt erfolgte mit Hilfe der Reversed Phase Chromatographie (RPC, Kapitel 3.12.5).

Das Konstrukt, aus dem letztendlich das CD4 (Wildtyp wie auch Mutante) resultierte, bestand aus einer Polyhis-Ubiquitin-CD4-Fusion mit einer Erkennungsstelle für die Human Rhinovirus 3C-Protease (PreScission). Damit ist die Abspaltung des aminoterminalen Polyhis-Ubiquitintags vom CD4 möglich. Dazu wurde das in Proteolyse-Puffer überführte Fusionsprotein (Kapitel 3.12.3) mit zusätzlich 2 mM DTT und frisch gereinigter PreScission-Protease (ca. 0,25 mg/ml) versetzt und 6 h bei RT inkubiert.

3.12.5 Reversed Phase Chromatographie (RPC)

Der jeweils letzte Reinigungsschritt der in dieser Arbeit vorgestellten Reinigungsstrategien wurde mit der Methode der Reversed Phase Chromatographie (RPC) durchgeführt. Bei der RPC wird das Proteingemisch mit der mobilen Phase durch die Trennsäule (stationäre Phase) gepumpt und wechselwirkt dabei mit dem aus unpolar beschichtetem Silicagel bestehenden Säulenmaterial. Bei dem hier genutzten Gradiententrennverfahren wird die Polarität der mobilen Phase stetig reduziert, so dass es zu einer Freisetzung der Substanzen entsprechend ihrer Polarität kommt. Die RPC kann unter Verwendung flüchtiger Puffersubstanzen erfolgen, so dass nach einer Vakuumtrocknung reines Protein zurück bleibt.

Das nach der Spaltung eluierte VpUcyt-Gemisch wurde direkt in eine Resource 15 RPC 3 ml-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) injiziert, die an ein ÄKTA purifer-System montiert war. Die Säule wurde mit einem Fluss von 2 ml/min bei 11 °C und einer mobilen Phase bestehend aus 50 mM Ammoniumacetat, pH 7,2, betrieben; die Proteine wurden durch einen Gradienten von 0 bis 60 % Acetonitril in 50 mM Ammoniumacetat, pH 7,2, eluiert. Nach der Elution wurden die fraglichen Fraktionen per SDS-PAGE analysiert und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

Für die Trennung der Spaltprodukte nach Spaltung der Polyhis-Ubiquitin-CD4-Fusion musste zunächst das in großer Menge vorhandene Triton-X-100 entfernt werden, um ein Verstopfen der RPC-Säule zu verhindern. Dazu wurde eine TCA (Trichloro acetic acid, Trichloressigsäure)-Fällung des Spaltansatzes durchgeführt. Zu jedem Ansatz wurde 10 % (v/v) auf 4 °C temperierte TCA-Lösung hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurde der Ansatz zentrifugiert (15000×g, 30 min) und zweimal mit 100 %-igem Aceton (-20 °C) gewaschen. Diese Waschschritte entfernten das Triton-X-100 fast vollständig. Das resultierende Proteinpellet wurde getrocknet und dann in RPC-Resuspensionspuffer (40 % Acetonitril in 0,09 % TFA) wieder aufgelöst. Die resuspendierte Proteinlösung wurde dann in eine SP 250/10 Nucleosil 100-7 C18-Säule (Macherey-Nagel, Düren) injiziert. Als mobile Phase diente 0,1 % TFA (Trifluro acetic acid, Trifluoressigsäure) in H_2O, die Elution der Komponenten erfolgte mit einem Gradienten über 80 % Acetonitril in 0,08 % TFA. Die Säule wurde bei RT mit einem Fluss von 6 ml/min betrieben. Nach Beendigung der Chromatographie wurden die fraglichen Fraktionen per SDS-PAGE analysiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurde der flüchtige Puffer mit Hilfe einer Lyophille (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode) abgezogen.

3.13 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie im UV-Bereich des Spektrums zur Analyse von Proteinsekundärstrukturelementen. Unter Circulardichroismus versteht man die Differenz in der Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht. CD wird als Funktion der Wellenlänge gemessen; man erhält eine mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest, gemittelt über die Zeit. Biologische Makromoleküle werden als optisch aktiv bezeichnet, da sie vor allem wegen ihrer asymmetrischen Elemente im Bereich des Proteinrückgrates und der aromatischen Aminosäuren CD hervorrufen. Dieser CD wird durch die asymmetrische Substitution des C_α-Atoms jeder Aminosäure (mit Ausnahme des Glycins) und der konkreten Elektronenkonfiguration der Peptidbindung hervorgerufen. Schlussendlich führt das zu den spezifischen und im Wesentlichen von der Konformation der Proteine bestimmten CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 180 nm bis 260 nm.

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturelemente der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden Fern-UV-CD-Messungen mit einem Jasco J810 CD-Spektropolarimeter (Jasco, Groß-Umstadt) durchgeführt. Die verwendete rechteckige Quarzglas-Suprasil-Küvette QS (Hellma, Müllheim) hatte eine optische Weglänge von 0,1 cm.
Die CD-Spektren für 45 μM CD4tmcyt/mut wurden in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer (200 mM DPC-d38, 0,02 % (w/v) NaN_3, pH 6,2) jeweils mit und ohne 150 mM NaCl bei 30 bis 50 °C aufgenommen. Die Proben für CDtmcyt wurden zusätzlich mit 2 mM DTT versetzt, um Oxidation der Cysteine zu verhindern. Fern-UV-Spektren wurden zwischen 260 und 185 nm mit der 'continuous-scan'-Methode gewonnen (Aufnahmegeschwindigkeit 20 nm/min; Bandbreite 1 nm; Zeitkonstante 8 s; Akkumulation von 8 Spektren).
Die Fern-UV-CD-Spektren für 53 μM VpUcyt wurden in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer (100 mM KF, 0,02 % (w/v) NaN_3, pH 6,2) jeweils mit und ohne DPC-d38 mit der 'step-scan'-Methode aufgenommen (Standard-Bandbreite 1 nm; Response-Zeit 4 s; Akkumulation von 8 Spektren).
Bei allen Spektren wurde als Kontrolle und als Hintergrundmessung das jeweilige Pufferspektrum aufgezeichnet. Die Spektren wurden nach Subtraktion des Hintergrundes ausgewertet.

Die quantitative Analyse der CD-Spektren wurde mit Hilfe des CDPro-Softwarepaketes durchgeführt (Sreerama & Woody 2000), nachdem die gewonnenen Daten in molaren CD umgerechnet worden waren. Mathematisch gilt hier folgender Zusammenhang (Sreerama & Woody 2004):

$$\Delta\epsilon = \frac{[\Theta]_{MRW}}{3298} = \frac{MRW \cdot \Theta}{3298 \cdot 10 \cdot d \cdot c} \tag{3.1}$$

$\Delta\epsilon$: molarer CD pro Aminosäurerest [Grad·M^{-1}·m^{-1}]

$[\Theta]_{MRW}$: mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest [Grad·cm^2·dmol^{-1}]

[MRW]: molare Rest-Masse; Quotient aus molekularer Masse und N-1, wobei N die Anzahl der Aminosäuren ist

Θ: gemessene Elliptizität [Grad]

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

c: Konzentration des Proteins/Peptids [g/ml]

Das CDPro-Softwarepaket beinhaltet die drei Auswertemethoden CONTIN/LL (Provencher & Glockner 1981), SELCON3 (Sreerama & Woody 1993) und CDSSTR (Johnson 1999). Während dieses Prozesses wird den experimentellen Daten eine Linearkombination von CD-Spektren angepasst, die von Proteinen mit bekannter Kristallstruktur gewonnen wurden. Dieser Datensatz wird als „Basissatz" bezeichnet und gilt für alle Algorithmen. Für die aktuelle Arbeit wurde standardmäßig der Datensatz SDP48 verwendet, der Referenz-CD-Spektren von 43 löslichen und 5 denaturierten Proteinen im Wellenlängenbereich von 190 bis 240 nm enthält (Sreerama & Woody 2000).

3.14 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine Methode zur Analyse struktureller und dynamischer Eigenschaften von Biomolekülen. Dabei wird ein Fluorophor durch Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge in einen elektronisch angeregten Zustand überführt. Durch die dann detektierbare spontane Emission von Licht kehrt das System in seinen Grundzustand zurück.
Bei der intrinsischen Fluoreszenzspektroskopie kann im Wesentlichen nur die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäure Tryptophan verwendet werden. Die Anregungswellenlänge des Tryptophan-Indolringes liegt bei etwa 280 nm, die Fluoreszenzemission erfolgt bei 300 bis 350 nm (Lottspeich & Zorbas 1998).

Im Falle der zytoplasmatischen Domäne des HIV-1 VpU (VpUcyt) wurde untersucht, welche Veränderung das Tryptophan an der Sequenzposition 76 (W76) bei Zugabe von mizellenhaltiger Lösung erfährt. Dazu wurde qualitativ untersucht, ob es bei Zugabe von DPC-Mizellenlösung zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums kommt. Zur Kontrolle wurde freies Tryptophan ebenfalls mit DPC-Mizellenlösung versetzt, um nach dem Versuch beurteilen zu können, ob die Verschiebung des Emissionsmaximums nur auf die Wechselwirkung des Tryptophans mit der Mizelle zurückzuführen ist, oder ob es einen Anteil gibt, der von der Konformation des VpUcyt herrührt.

Die Messungen wurden an einem PerkinElmer LS55 Lumineszenz-Photometer (PerkinElmer, Boston, USA) durchgeführt. Dabei wurde die Anregungswellenlänge auf 280 nm

Tabelle 3.11: Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten mizellenhaltigen NMR-Puffer

DPC-freier NMR-Puffer	DPC-enthaltender NMR-Puffer
20 mM Sörensen Phosphat Puffer	20 mM Sörensen Phosphat Puffer
100 mM NaCl	100 mM NaCl (VpUcyt)
	150 mM NaCl (CD4tmcyt/mut)
	100 mM DPC-d_{38} (VpUcyt)
	200 mM DPC-d_{38} (CD4tmcyt/mut)
0,02 % (w/v) NaN_3	0,02 % (w/v) NaN_3
pH 6,2	pH 6,2

eingestellt und ein Emissionsspektrum von 300 bis 400 nm aufgenommen. Es wurde eine jeweils adäquate Menge VpUcyt oder freies Trp in 200 μl DPC-freiem NMR-Puffer gelöst (siehe Tabelle 3.11) und in 120 μl Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) bei einer konstanten Temperatur von 30 °C (Temperierer Thermo Haake 10, Thermo Haake, Karlsruhe) gemessen. Die jeweiligen Mengen wurden so gewählt, dass man ein sehr gutes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis erhielt. In einem zweiten Schritt wurde die Messung mit DPC-haltigem NMR-Puffer (siehe Tabelle 3.11) wiederholt. Der Hintergrund wurde bestimmt, indem man Messungen mit Puffer ohne Protein oder freies Trp durchführte.

3.15 Lichtstreuung

Bei einem Lichtstreuexperiment wird ein kollimierter, einfach polarisierter Lichtstrahl (z.B. von einem Laser) auf eine Lösung gestrahlt. Der Strahl erfährt dabei Streuung, die charakteristisch für das streuende Objekt ist. Man unterscheidet zwischen der statischen (Rayleigh-) Streuung und der dynamischen (quasielastischen) Lichtstreuung.

Die statische Lichtstreuung erlaubt die direkte Messung der molekularen Masse und auch der Stoichometrie größerer Komplexe wie z.B. Vesikel. Makromoleküle, deren Größe viel kleiner als die Laserwellenlänge sind, können als Punktstreuquellen behandelt werden und rufen somit isotrope Streuung in der Ebene senkrecht zur Laserpolarisationsrichtung hervor. Ist die Größe der Makromoleküle jedoch ähnlich oder größer als die Laserwellenlänge, dann können Phasenvarianzen zu destruktiver oder konstruktiver Interferenz führen und damit zu einer Winkelabhängigkeit der Streuintensität. Aus dieser Winkelabhängigkeit kann unter verschiedenen Annahmen (z.B. müssen die Makromoleküle deutlich kleiner als die Wellenlänge sein; Anzahl der Streuzentren pro Molekül; Formfaktor; Dispersivität) der RMS (Root Mean Square)-Radius und die Masse abgeleitet werden.

Die dynamische Lichtstreuung ermöglicht über die Messung der Diffusionsrate der Substanzen die Bestimmung der Größenverteilung im untersuchten Ansatz. Dieser hydro-

dynamische Radius hängt von der Masse und der Form der untersuchten Bestandteile ab. Beim dynamischen Lichtstreuexperiment beobachtet man die Zeitabhängigkeit der Lichtstreuintensität in einem kleinen Volumen (Voxel) der Lösung. Die Fluktuation der Lichtstreuintensität ist direkt abhängig von der Brown'schen Molekularbewegung aus dem Voxel heraus und in dieses hinein.

Die Lichtstreuung ist eine adäquate Methode zur Bestimmung räumlicher Parameter von Lipid-Vesikeln (White et al. 1996; Jin et al. 1999; Pencer et al. 2001).
In dieser Arbeit wurden beide Methoden verwendet, um Lipid-Vesikel zu charakterisieren. Die verwendete Lichtstreuapparatur war eine im Hause konstruierte Einzelkomponentenanlage. Der verwendete Laser (Stabilite 2017, Spectra-Physics, Eschbach) wurde mit einer Leistung von 300 mW betrieben. Die gemessenen Proben hatten jeweils eine Konzentration von 1 mg/ml und wurden vor Messung beim Einfüllen in die Küvette mittels eines Extruders gefiltert.

3.16 Präparation und Einsatz von Lipid-Vesikeln

Das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt des CD4-Moleküls benötigt wegen seiner Transmembrandomäne eine Modellmembranumgebung (vgl. Kapitel 1.4.2). Neben der Verwendung von DPC-Mizellensystemen (siehe Kapitel 3.17.1) kamen in dieser Arbeit Vesikelsysteme zum Einsatz. Diese gewährleisten eine hohe Ähnlichkeit zur in der Natur vorkommenden Membranen und eröffnen Möglichkeiten für spezielle NMR-Messtechniken. Um bei späteren NMR-spektroskopischen Untersuchungen spezielle Messtechniken zur Beobachtung sogenannter residueller dipolarer Kopplungen (residual dipolar coupling, RDC, siehe Kapitel 3.17.2.7) anwenden zu können, musste eine Ausrichtung der Moleküle im Magnetfeld erreicht werden. Für das membraninsertierte CD4 wurde dieses durch eine Ausrichtung des Modellmembransystems (Vesikel) erreicht. Dazu werden die Vesikel durch ein Extrusionsverfahren in eine asymmetrische Form gebracht. Der Nachweis der Inkorporation des CD4 in die Vesikel und der Wechselwirkung zwischen CD4 und VpUcyt wurde mit einem Zentrifugationsassay erreicht (White et al. 1998, Buser & McLaughlin 1997)

3.16.1 Herstellung von Lipid-Vesikeln

Das in dieser Arbeit verwendete Lipid POPC (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) lag in einer Konzentration von 2 mg/ml in 100 % Chloroform gelöst vor. Eine Lösung mit der Gesamtlipidmenge wurde mit 30 % Methanol versetzt und dann unter einem feinen Strahl gasförmigen Stickstoffs getrocknet. Der entstandene Lipidfilm wurde mit 1 ml Cyclohexan aufgelöst und homogenisiert. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurde das Lösungsmittel über Nacht unter Vakuum vollständig abgezogen. Der

Tabelle 3.12: Der Lipid-Vesikel-Puffer zur Herstellung (asymmetrischer) Vesikel.

Vesikelpuffer
20 mM Natriumphosphat pH 6,8
73 mM NaCl
0,02 % NaN_3
10 % (v/v) D_2O

so entstandene weiße, watteähnliche Lipidball konnte dann in Vesikelpuffer (Tabelle 3.12) aufgenommen werden, was zu einer leicht trüben Lösung führte.
Um die vorliegenden mehrschaligen Vesikel in ihrer Größe und Form zu homogenisieren, konnten je nach weiterer Verwendung zwei Verfahren angewendet werden. Wurden möglichst kleine, relativ uniforme Vesikel benötigt (zum Beispiel für Zentrifugationsassays, siehe Kapitel 3.16.3), dann wurde die Vesikellösung mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) für 3 × 30 s bei mittlerer Leistung (Stufe 4, 50 % duty cycle) sonifiziert. Für die Herstellung elongierter, asymmetrischer Vesikel kam ein spezielles Extrusionsverfahren zum Einsatz (Kapitel 3.16.2).
Die Herstellung von CD4-enthaltenden Vesikeln erfolgte mit dem oben beschriebenen Verfahren. Dazu wurde zu Beginn der Prozedur das in 70 % Chloroform/30 % Methanol gelöste CD4-Protein (in einem Mengenverhältnis von 0,2 mg CD4 in 20 mg POPC) mit dem in 70 % Chloroform/30 % Methanol gelösten POPC gemischt, bevor das Lösungsmittel mit gasförmigem Stickstoff abgeblasen wurde.

3.16.2 Extrusionsverfahren zur Herstellung asymmetrischer Vesikel

Durch fünfmaliges Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei Raumtemperatur werden mehrschalige Vesikel aufgebrochen („freeze-thaw cycles“). Mit Hilfe eines Lipidvesikel-Extruders (Lipex Extruder, Northern Lipids Inc., Westbrook Mall, Kanada) wurden die Lipidvesikel durch Anwendung verschiedenporiger Filter verkleinert und elongiert. Fünfmaligem Extrudieren durch einen Filter mit 400 nm Porengröße (Millipore, Eschborn) folgte zehnmaliges Extrudieren durch einen Filter mit 200 nm Porengröße. Von dieser Lösung wurde eine ausreichende Menge für NMR-spektroskopische Untersuchungen entnommen, der Rest wurde zehnmal durch einen Filter mit 100 nm Porengröße extrudiert und stand dann ebenfalls für NMR-spektroskopische Untersuchungen und Lichtstreuexperimente zur Verfügung.

3.16.3 Inkorporationstest mittels Zentrifugationsassay

Zum Nachweis der erfolgreichen Inkorporation des CD4-Moleküls in die Vesikelmembran wurde ein Zentrifugationsassay eingesetzt. Dazu wurden kleine, uniforme, CD4-enthaltende Vesikel wie in Kapitel 3.16.1 beschrieben hergestellt. Um den Puffer zu tauschen, wurde die Probe durch Ultrazentrifugation (TL-10 Optima, Beckmann-Coulter, Palo Alto, USA) bei 80000 rpm für 30 min bei 20 °C pelletiert und der Überstand sorgfältig entfernt. Das Zentrifugationspellet wurde in D_2O (Reinheit größer als 99 %) aufgenommen und homogenisiert. Durch Ultraschall-Behandlung (wie in Kapitel 3.16.1) wurden uniforme Vesikel erzeugt. Aufgrund der Dichteverhältnisse ergab sich nach erneuter Ultrazentrifugation bei 90000 rpm für 2 h bei 20 °C folgendes Ergebnis: Das Lipid-Vesikel-Pellet befand sich auf der D_2O-Lösung, etwaige nichtlösliche/aggregierte Proteine lagerten sich am Boden der D_2O-Lösung ab und konnten so von den Vesikeln getrennt werden. Nach der Zentrifugation wurde das Lipid-Vesikel-Pellet vorsichtig von der D_2O-Lösung getrennt und im analogen Volumen zum Überstand aufgenommen.
Daraufhin wurden die Pellet- und Überstandfraktion mittels Reversed Phase Chromatographie (RPC, vgl. Kapitel 3.12.5) analysiert. Dazu wurde die gesamte Pufferfraktion (der auch die resuspendierten, vormals nicht-gelösten Bestandteile enthielt) auf eine EC 250/4.6 Nucleosil 300-7 C4-RPC-Säule (Macherey-Nagel, Düren) aufgetragen. Die Säule wurde an einem ÄKTApurifier-System (Amersham Biosciences, Freiburg) mit einem Fluss von 1 ml/min bei RT betrieben. Als mobile Phase diente 0,1 % TFA in H_2O, die Elution der gebundenen Bestandteile wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 80 % Acetonitril in 0,08 % TFA in H_2O erreicht. Zur Analyse des resuspendierten Vesikel-Pellets konnte nur ein Bruchteil der Suspension auf die Säule aufgetragen werden, damit es nicht zu einer Verstopfung der Säule kam.
Die interessierenden Fraktionen eines Chromatographie-Laufes wurden lyophilisiert und per SDS-PAGE analysiert. Durch Analyse der Signalintensitäten im Chromatogramm unter Einbeziehung der Verhältnisse von analysierter Überstand- und Pelletfraktion konnte der Erfolg der Inkorporation der CD4-Moleküle in die Lipid-Vesikel quantitativ abgeschätzt werden.

3.16.4 Bindungstests mittels Zentrifugationsassay

Als Methode zur Studie von Wechselwirkungen zwischen nicht-membranständigen, löslichen Proteinen mit Membranen und/oder membranständigen Proteinen kam ein modifizierter Zentrifugationsassay zur Anwendung. Dabei sollte wegen der Wechselwirkung des löslichen Proteins mit der Membranfraktion (Lipide bzw. eingebautes Membranprotein) das Mengenverhältnis des löslichen Bindungspartners zwischen Lipid-Vesikel-Pelletfraktion und Überstand/ungebundener Fraktion verschoben werden. Durch quantitative RPC-Analyse der relativen Proteinkonzentrationen kann dann auf eine mögliche Wechselwirkung bzw. die Bindungsaffinität geschlossen werden.
Es wurden kleine, uniforme CD4-enthaltende Lipid-Vesikel wie in Kapitel 3.16.1 herge-

stellt. Die Suspension wurde mit adäquater Menge nicht-membranständigem, löslichem Bindepartner versetzt. Nach Kontrolle des pH-Wertes wurde die Lösung bei 90000 rpm für 2 h bei 20 °C ultrazentrifugiert, das Vesikel-Pellet daraufhin sorgfältig vom Überstand getrennt.
Überstand und Pellet wurden, ebenso wie in Kapitel 3.16.3 beschrieben, mit Hilfe der RPC analysiert, wobei besonders auf die aufgetragene Menge geachtet werden musste.
Ein Vergleich der Signalintensitäten des Bindepartners in Überstand- und Pelletfraktion mit den tatsächlichen Volumenverhältnissen von Überstand und Pellet nach der Zentrifugation erlaubt Aussagen über eine eventuelle Bindung.

3.17 Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie

Die Messung der NMR-Spektren wurde an Varian^{UNITY} *INOVA*-Spektrometern mit Protonenlarmorfrequenzen von 600 MHz und 800 MHz (Varian, Palo Alto, USA) durchgeführt, die mit XYZ-PFG-^{1}H{^{13}C,^{15}N}-Probenköpfen ausgestattet waren. Zur starken Verbesserung der Empfindlichkeit standen kryogen gekühlte Probenköpfe (*Cold Probes*; Varian, Palo Alto, USA) zur Verfügung.
Die nach der Datenaufnahme gespeicherten Datensätze wurden mit den Programmen VNMRJ (Version 1.1D, Varian, Palo Alto, USA) und NMRPipe (Version 2.3; Delaglio et al. (1995)) prozessiert. Für die Visualisierung und Auswertung wurden die Programme NMRDraw (Version 1.7; Delaglio et al. (1995)) und CARA (Version 1.3.1; Keller (2004)) verwendet.
Zur iterativen Identifizierung von NOE-Resonanzen, deren Zuordnung und Kalibrierung wurde das Software-Paket RADAR verwendet. Dieses Programm zur automatischen NOE-Spektrenanalyse verknüpft die Routinen ATNOS (Herrmann et al. 2002a) und CANDID (Herrmann et al. 2002b), die auf Raumstrukturberechnungen mittels Torsionswinkeldynamik durch das Programm DYANA (Güntert et al. 1997) basieren.

3.17.1 Präparation von NMR-Proben

Für die Spektrenaufnahme wurden die lyophilisierten, reinen Proteine mit einer Konzentration von im Allgemeinen 0,5 bis 1 mM in dem für das Experiment vorgesehenen Puffer aufgenommen. Der jeweilige Puffer enthielt in der Regel 10 % (v/v) D_2O und 0,02 % (w/v) Natriumazid (NaN_3).

Es wurden mizellenhaltige NMR-Proben zur Untersuchung des VpUcyt präpariert, indem das Detergenz (DPC) zuvor in Puffer gelöst und zuletzt das Protein hinzugegeben wurde. Mit Hilfe einer Mikro-pH-Elektrode wurde der pH gemessen und wenn nötig mit 0,1 M NaOH-Lösung auf den gewünschten Wert eingestellt.
Zur Präparation mizellenhaltiger CD4-NMR-Proben wurde das CD4 in RPC-Resuspensionspuffer (40 % Acetonitril, 0,09 % TFA) aufgenommen und dann mit

dem in Puffer gelösten Detergenz gemischt. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurde die Probe unter Vakuum gefriergetrocknet und dann in der adäquaten Menge H_2O/D_2O-Gemisches wieder aufgenommen. Der pH wurde mit einer Mikro-pH-Elektrode kontrolliert und gegebenenfalls wie beschrieben eingestellt.

Zur Messung lipidhaltiger Proben wurden die Vesikel wie in Kapitel 3.16.1 beschrieben hergestellt.

Die Messungen erfolgten in für den jeweiligen Probenkopf optimalen NMR-Probenröhrchen der Firma Shigemi (Tokyo, Japan). Es wurden 5mm-Shigemi-Rundröhrchen des Types BMS-005V und 3×6-mm-Rechteckröhrchen des Types „S-Tube“ verwendet.

3.17.2 NMR-Experimente

Die Quadraturdetektion in den indirekten Dimensionen wurde durch die States-TPPI-Methode erreicht (Marion et al. 1989). Für die Breitband-$^{13}C/^{15}N$-Entkopplung während der direkten Detektionsperiode wurden GARP- (Shaka & Keeler 1987) und WURST-Sequenzen (Kupce & Freeman 1995) verwendet. Als Mischsequenz während TOCSY-Spinlockperioden wurde das DIPSI-3-Schema (Shaka et al. 1988) genutzt, die ^1H-Breitbandentkopplung wurde durch die WALTZ-16-Sequenz erreicht (Shaka et al. 1983).
Bei der Detektion der TROSY-Spektren wurde während der Akquisitionszeit nicht Breitband-entkoppelt, um selektiv die ^1H-Hochfeld- und ^{15}N-Hochfeld-Resonanz des Signalquartetts detektieren zu können. Die drei weiteren Kreuzkorrelationssignale wurden durch die Pulssequenz unterdrückt (Pervushin et al. 1997).
Die ^1H- und ^{13}C-chemischen Veschiebungen wurden direkt auf DSS referenziert ($\delta_{DSS} = 0$ ppm). Die ^{15}N-chemischen Verschiebungen wurden mittels des Frequenzverhältnisses $\nu(^{15}N)/\nu(^1H) = 0{,}101329118$ indirekt auf die ^1H-Methylfrequenz von DSS referenziert (Wishart et al. 1995b).
Die Parameter aller verwendeten NMR-Experimente sind in den Tabellen 3.13 und 3.14 dargestellt.

3.17.2.1 Resonanzzuordnung

Der erste Schritt bei der Bestimmung von räumlichen Strukturen oder dynamischen Eigenschaften von Proteinen ist die Resonanzzuordnung. Dabei wird jedem Spin in einem Protein die jeweilige Resonanz im Spektrum zugeorndet.
Zu Beginn erfolgte die sequenzielle Zuordnung der Proteinrückgrat-Amidgruppen im (^1H-^{15}N)-HSQC-Spektrum, sowie der C^α- und ggf. Seitenketten-C^β-Resonanzen mit Hilfe der 3D Tripelresonanz-Spektren HNCACB (Wittekind & Mueller 1993) oder CBCANH (Grzesiek & Bax 1992a). In diesen Experimenten werden die Amidresonanzen H^N

Tabelle 3.13: Akquisitions- und Prozessierungsparameter der verwendeten NMR-Experimente für VpUcyt. sw1 bis sw3: aufgenommene spektrale Weite in der jeweiligen Dimension, t1 bis t3: aufgenommene komplexe Punkte in der jeweiligen Dimension, nt: Anzahl der Wiederholung der Experimente, d1: Delayzeit zwischen zwei Experimenten, mix: Mischzeit in TOCSY- oder NOESY-Experimenten, $^{15}N/^{13}C$: Trägerfrequenz für den jeweiligen Kern, ω_1 bis ω_3: Anzahl der realen Punkte nach Prozessierung (Fourier-Transformation, Zero-Filling und Einschränkung der spektralen Weite) in der jeweiligen Dimension.

Experiment	sw_1 [ppm]	t_1 [Pkt]	sw_2 [ppm]	t_2 [Pkt]	sw_3 [ppm]	t_3 [Pkt]	nt	d1 [s]	mix [ms]	^{15}N [ppm]	^{13}C [ppm]	ω_1 [Pkt]	ω_2 [Pkt]	ω_3 [Pkt]
2D (^{1}H-^{15}N)-HSQC	12,5	1704	24,7	512	-	-	4	1,3	-	117,8	-	2934	4096	-
2D (^{1}H-^{15}N)-TROSY	12,5	1704	29,6	256	-	-	4	1,3	-	117,8	-	2934	4096	-
2D (^{13}C-^{1}H)-HSQC(aliphatisch)	13,3	1024	66,7	512	-	-	8	1,3	-	-	39,7	1537	4096	-
2D (^{13}C-^{1}H)-HSQC(aromatisch)	12,5	1280	32,3	256	-	-	4	1,3	-	-	124,8	820	4096	-
2D (^{13}C-^{1}H)-ct-HSQC(aliphatisch)	13,3	1024	66,7	512	-	-	8	1,3	-	-	39,7	1537	4096	-
3D HNHA	13,3	1360	6,0	160	25,8	60	8	1,3	-	115,5	-	538	512	64
3D HNCO	13,3	1360	18,7	112	25,8	60	4	1,3	-	117,0	178,0	538	128	64
3D HNCACB	13,3	1366	60,7	250	41,7	110	8	1,0	-	118,2	39,7	308	512	256
3D HN(CO)CA	13,3	1366	26,7	180	31,7	84	8	1,0	-	118,2	54,6	539	512	128
3D HC(CO)NH	9,3	952	64	256	31,7	76	8	1,0	12,1	118,2	39,6	318	512	128
3D HCCH-COSY	5,0	256	5,0	300	63,3	254	4	1,0	-	-	41,6	256	512	512
3D HCCH-TOCSY (D_2O)	5,0	512	5,0	180	73,3	314	4	1,25	-	-	41,6	256	512	512
3D (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-TOCSY-HSQC	13,3	1366	10,0	360	23,3	56	8	1,3	80	117,6	-	615	1024	64
2D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY(aromatisch)(D_2O)	12,5	1200	10	500	-	-	64	1,3	200	-	-	3277	312	-
2D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY(aromatisch)(H_2O)														
2D (^{1}H-^{1}H)-NOESY	9,3	784	9,3	560	-	-	32	1,5	50	-	-	8192	8192	-
2D (^{1}H-^{1}H)-NOESY	10,0	1600	10,0	800	-	-	64	1,3	80	-	-	7967	8192	-
2D (^{1}H-^{1}H)-NOESY	10,0	960	10,0	620	-	-	80	1,3	100	-	-	3984		4096
2D (^{1}H-^{1}H)-NOESY	10,0	960	10,0	620	-	-	80	1,3	200	-	-	3984		4096
2D (^{1}H-^{1}H)-NOESY	10,0	960	10,0	620	-	-	80	1,3	300	-	-	3984		4096
2D (^{1}H-^{1}H)-NOESY	10,0	960	10,0	620	-	-	80	1,3	400	-	-	3984		4096
3D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY(aliphatisch)(D_2O)	12,5	1200	5,0	200	37,0	116	16	1,3	200	-	29,6	1639	1024	128
3D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY(aliphatisch)(H_2O)	13,3	1024	6,3	200	38,6	114	16	1,3	200	-	30,6	769	1024	128
3D (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-NOESY-HSQC	12,5	1704	10,0	300	24,7	66	16	1,3	250	117,8	-	734	512	128
Casein-Kinase-II-Test														
2D (^{1}H-^{15}N)-HSQC	13,3	1366	27,5	256	-	-	8	1,3	-	-	119,3	2764	4096	-
2D HNCA	13,3	1366	33,3	40	-	-	1024	1,3	-	-	46,3	385	64	-
2D CBCA(CO)NH	13,3	1366	50,0	50	-	-	1024	1,3	-	-	46,5	385	64	-
2D (^{13}C-^{1}H)-HSQC(aliphatisch)	13,3	1024	60,0	220	-	-	32	1,3	-	-	40,9	3685	4096	-

Tabelle 3.14: Akquisitions- und Prozessierungsparameter der verwendeten NMR-Experimente für CD4. sw1 bis sw3: aufgenommene spektrale Weite in der jeweiligen Dimension, t1 bis t3: aufgenommene komplexe Punkte in der jeweiligen Dimension, nt: Anzahl der Wiederholung der Experimente, d1: Delayzeit zwischen zwei Experimenten, mix: Mischzeit in TOCSY- oder NOESY-Experimenten, $^{15}N/^{13}C$: Trägerfrequenz für den jeweiligen Kern, ω_1 bis ω_3: Anzahl der realen Punkte nach Prozessierung (Fourier-Transformation, Zero-Filling und Einschränkung der spektralen Weite) in der jeweiligen Dimension.

Experiment	sw_1 [ppm]	t_1 [Pkt]	sw_2 [ppm]	t_2 [Pkt]	sw_3 [ppm]	t_3 [Pkt]	nt	d1 [s]	mix [ms]	^{15}N [ppm]	^{13}C [ppm]	ω_1 [Pkt]	ω_2 [Pkt]	ω_3 [Pkt]
2D (^{1}H-^{15}N)-TROSY	12,5	1704	24,7	256	-	-	8	1,3	-	114,6	-	2294	4096	-
2D (^{1}H-^{15}N)-TROSY (D_2O)														
2D (^{1}H-^{13}C)-HSQC (aliphatisch)	13,3	1024	93,3	512	-	-	16	1,2	-	-	44,8	3072	4096	-
2D (^{1}H-^{13}C)-ct-HSQC (aliphatisch)	13,3	1362	73,3	512	-	-	4	1,1	-	-	38,9	3072	4096	-
2D (^{1}H-^{13}C)-HSQC (aromatisch)	10,0	1120	32,5	400	-	-	16	1,3	-	-	131,7	2049	4096	-
2D (HB)CB(CGCD)HD (aromatisch)	10,0	1024	32,5	80	-	-	512	1,3	-	-	41,7	2049	4096	-
2D (HB)CB(CGCDCE)HE (aromatisch)	16,7	1706	30,2	74	-	-	256	1,5	-	-	36,9	1474	4096	-
2D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY (aromatisch)	10,0	960	2,5	240	-	-	128	1,3	80	-	-	3925	4096	-
3D (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-TOCSY-HSQC	10,0	1024	10,0	160	27,5	60	40	1,3	80	115,2	-	1024	368	64
3D TROSY-CBCA(CO)NH	16,7	1708	53,3	94	27,5	44	40	1,4	-	115,2	46,5	493	512	256
3D CBCANH	16,7	1708	53,3	94	27,5	62	40	1,3	-	115,2	46,5	493	512	256
3D TROSY-HBHA(CO)NH	10,0	1020	4,2	50	25,8	60	80	1,1	-	115,4	-	368	512	256
3D TROSY-HNCA	16,7	1704	30,2	140	27,5	66	24	1,4	-	115,2	58,0	493	512	256
3D TROSY-HNCO	13,3	1360	13,3	70	31,7	76	16	1,2	-	115,2	177,7	615	512	256
3D (H)CCH-TOCSY (D_2O)	10,0	1200	36,2	220	36,2	108	8	1,1	15,6	-	28,8	1229	1024	128
3D H(C)CH-TOCSY (D_2O)	5,0	426	5,0	204	36,2	150	8	1,1	15,6	-	30,6	1024	512	256
3D H(C)CH-COSY (D_2O)	5,0	420	5,0	210	36,2	150	8	1,1	-	-	28,6	1024	512	256
3D H(C)CH-COSY (D_2O)	10,0	848	5,0	400	35,8	144	4	1,3	-	-	28,8	1024	615	256
3D HCACO	13,3	1024	14,0	42	33,3	68	40	1,3	-	-	58,4	308	128	64
3D (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-NOESY-HSQC	13,3	1366	10,0	300	25,8	60	16	1,3	150	114,8	-	461	512	64
3D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY (aliphatisch)(D_2O)	10,0	960	5,5	202	35,8	144	16	1,3	80	-	27,6	982	512	256
3D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY (aliphatisch)(D_2O)														
2D (^{1}H-^{1}H)-NOESY	10,0	960	10,0	600	-	-	64	1,3	50	-	-	3925	4096	-
2D (^{1}H-^{1}H)-NOESY	10,0	960	10,0	700	-	-	64	1,3	80	-	-	7850	8192	-
2D (^{1}H-^{15}N)-TROSY	13,3	1360	37,5	256	-	-	16	1,5	-	118,1	-	2151	4096	-

und N mit den C^{α}- und C^{β}-Resonanzen derselben Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_i^{\alpha}/C_i^{\beta}$) und gleichzeitig mit den C^{α}- und C^{β}-Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_{i-1}^{\alpha}/C_{i-1}^{\beta}$) korreliert, wobei letztere Korrelation wegen der schwächeren Kopplung (vgl. Abb. 1.9) zu schwächeren Signalen führt. Die C^{α}- und C^{β}-Resonanzen unterscheiden sich durch entgegengesetzte Vorzeichen der Signalintensitäten im HNCACB-Spektrum. Zusätzlich wurde das 3D Tripelresonanz-Spektrum HNCA (Kay et al. 1990) verwendet. Beim HNCA-Experiment werden die Amidresonanzen H^N und N mit der C^{α}-Resonanz derselben Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_i^{\alpha}$) und gleichzeitig mit der C^{α}-Resonanz der vorhergehenden Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_{i-1}^{\alpha}$) korreliert, wobei letztere Korrelation wegen der schwächeren Kopplung zu schwächeren Signalen führt.
Zur Identifikation der Aminosäuretypen dienen die Charakteristika der Spinsysteme. Glycine besitzen kein C^{β}-Atom, Alanine zeigen eine extrem hochfeldverschobene C^{β}-Resonanz. Die C^{β}-Resonanzen von Serin- und Threoninresten liegen extrem tieffeldverschoben vor. Mit Hilfe solcher „Eckpfeiler“ kann das Proteinrückgrat dann sequenziell zugeordnet werden. Resonanzen, die selbst im 3D-Spektrum überlagert erscheinen, können durch selektive Experimente aufgelöst werden. Verschiedene Experimente erlauben es, nur die Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure zu detektieren. Dabei handelt es sich z.B. um das CBCA(CO)NH- (Grzesiek & Bax 1992b) und das HN(CO)CA-Experiment (Yamazaki et al. 1994). Das CBCA(CO)NH-Experiment korreliert die Amidresonanzen H^N und N mit den C^{α}- und C^{β}-Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_{i-1}^{\alpha}/C_{i-1}^{\beta}$). Beim HN(CO)CA-Experiment werden die Amidresonanzen H^N und N mit den C^{α}-Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure korreliert ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_{i-1}^{\alpha}$). Die sequenzspezifische Zuordnung der Carbonylkohlenstoffresonanzen erfolgt dann mit Hilfe eines 3D HNCO- (Ikura et al. 1990) und eines HCACO-Experimentes (Grzesiek & Bax 1993b). Beim HCACO-Experiment werden Alphaproton H^{α} und die C^{α}-Resonanz mit den ^{13}C-Carbonylkohlenstoffen derselben Aminosäure korreliert. Die chemischen Verschiebungen der H^{α}-Resonanzen können mittels eines 3D HNHA- (Vuister & Bax 1993) oder eines HBHA(CO)NH-Experimentes (Grzesiek & Bax 1993a) zugeordnet werden. Während des HNHA-Experimentes werden die Amidgruppenresonanzen über die $^3J_{H\alpha H^N}$-Kopplung mit den H^{α}-Resonanzen korreliert, was neben der chemischen Verschiebung auch die Bestimmung der $^3J_{H\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten (siehe Kapitel 3.17.2.5) erlaubt. Beim HBHA(CO)NH-Experiment werden die Amidresonanzen H^N und N mit den H^{α}- und H^{β}-Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure verbunden ($H_i^N/N_i \leftrightarrow H_{i-1}^{\alpha}/H_{i-1}^{\beta}$).
Die aliphatischen Seitenketten-Protonenresonanzen wurden mit Hilfe eines 3D H(C)CH-COSY-Experimentes (Bax et al. 1990a) zugeordnet. Während dieses Experimentes werden aliphatische, ^{13}C-gebundene Protonen miteinander korreliert. Da aus der Zuordnung des Proteinrückgrates (siehe vorheriger Abschnitt) bereits die chemischen Verschiebungen von C^{α} und H^{α} bekannt waren, konnte dieses Resonanzpaar als Ausgangspunkt für die schrittweise Zuordnung der Seitenketten-Protonenresonanzen verwendet werden. Die aliphatischen Seitenketten-Kohlenstoffresonanzen wurden mit Hilfe eines 3D (H)C(CO)NH-TOCSY- (Grzesiek et al. 1993) oder einem 3D (H)CCH-TOCSY-Experiment (Bax et al. 1990b) zugeordnet. Auf diese Weise erhält man schrittweise alle chemischen Verschiebungen der CH-Gruppen-Resonanzen der aliphatischen Seitenkette

jeder Aminosäure, die dann im (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum zugeordnet werden können.
Die sequentielle Zuordnung der aromatischen Seitenketten-Protonenresonanzen erfolgte mittels eines aromatischen (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrums und den 2D (HB)CB(CGCD)HD- sowie (HB)CB(CGCDCE)HE-Experimenten (Yamazaki et al. 1993). Während der letzten beiden Experimente werden die C^{β}-Resonanzen der Residue mit ihren H^{δ}- bzw. H^{ϵ}-Resonanzen korreliert. Da bei den beiden untersuchten Proteinen das aromatische (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum jeweils sehr übersichtlich ist, lassen sich meist mit Kenntnis der H^{δ}- bzw. H^{ϵ}-chemischen Verschiebungen die C^{δ}- bzw. C^{ϵ}-Resonanzen zuordnen.

3.17.2.2 Analyse mit Hilfe der sekundärstruktur-relevanten chemischen Verschiebungen

Die Sekundärstrukturanalyse der einzelnen Proteine wurde mit Hilfe der sekundärstruktur-relevanten chemischen Verschiebungen durchgeführt. Dadurch ist es möglich, bereits ohne NOE-basierte Strukturberechnung Aussagen über die Sekundärstrukturelemente eines Proteins zu machen.
Die numerische Differenz zwischen den beobachteten chemischen Verschiebungen der Kernspins eines Proteins und den dazugehörigen chemischen Verschiebungen der jeweiligen Kernspins in der gleichen Aminosäure im Kontext eines ungefalteten Peptids (chemische Verschiebungen im 'Random Coil'-Zustand) wird als sekundäre chemische Verschiebung bezeichnet ($\Delta\delta$). Insbesondere sind $^{13}C_{\alpha}$, $^1H_{\alpha}$ und ^{13}CO sekundäre Verschiebungen sensitive Indikatoren für α-Helix- und β-Faltblatt-Bildung (Wishart & Sykes 1994a,b, Chung et al. 2001). Die Ausbildung einer regulären α-Helix verursacht eine Niedrigfeldverschiebung der $^{13}C_{\alpha}$- und ^{13}CO-Signale sowie eine Hochfeldverschiebung der $^1H_{\alpha}$-Resonanzen mit jeweiligen mittleren Verschiebungen von 2,6 ppm, 1,7 ppm und 0,37 ppm, während es bei Ausbildung von β-Faltblättern zu Verschiebungen mit umgekehrten Vorzeichen kommt. Die chemischen Verschiebungen eines flexiblen Peptides, das schnellen Austausch auf der Zeitskala der chemischen Verschiebungen zwischen verschiedensten strukturellen Konformationen erfährt, sind lineare Mittelwerte aller beteiligten Konformationen. Eine Polypeptiddomäne mit Neigung zur Bildung helikaler Struktur weist diese Sekundärstruktur möglicherweise nur in einer Teilpopulation der Konformere auf. Dieser Anteil der Helizität kann durch das Verhältnis der Mittelwerte der beobachteten sekundären Verschiebungen und der Mittelwerte der Verschiebungscharakteristik einer regulären Helix abgeschätzt werden.
Die in dieser Arbeit vorgenommene Analyse der sekundären chemischen Shifts basiert auf den aminosäurespezifischen chemischen Verschiebungen der individuellen Kerne für ungeordnete Strukturen ('Random Coil') von Schwarzinger et al. (2000) und zusätzlichen Korrekturen für Sequenzeffekte (Schwarzinger et al. 2001). Diese Werte wurden mittels Ac-GGXGG-NH2-Peptiden in 8 M Urea bestimmt.

3.17.2.3 Bestimmung des heteronuklearen (^{1}H-^{15}N)-NOE

Zur Bestimmung flexibler Bereiche in einem Protein wurden (^{1}H-^{15}N)-NOE-Spektren aufgenommen. Diese NOE-Daten (bei bekanntem Abstand zwischen Amidproton H^N und Amidstickstoff N, r_{H^NN} = 1,02 Å) können in Verbindung mit Messungen dipolarer Relaxation (heteronukleare T_1- und T_2-Zeiten) dazu verwendet werden, um Aussagen über interne molekulare Bewegung eines Proteins zu machen. Hierbei wird vorausgesetzt, dass der relative Beitrag der dipolaren Relaxation für jedes H^NN-Paar gleich ist und somit Variationen unter den verschiedenen Paaren nur auf ihre unterschiedliche Dynamik zurückzuführen ist (Kay et al. 1989, Chung et al. 2001).
Grundlage des Experimentes ist ein 2D (^{1}H-^{15}N)-Korrelationsexperiment, bei dem die Intensität der Kreuzresonanz vom beobachteten Relaxationsparameter abhängt. Es wird zunächst ein Spektrum aufgenommen, bei dem der (^{1}H-^{15}N)-NOE durch Protonensaturation während der Relaxationswartezeit voll angeregt wird; bei einem zweiten Experiment fehlt die Saturierung.
Daraus berechnet sich der NOE wie folgt:

$$NOE = \frac{I_{sat}}{I_{unsat}} \tag{3.2}$$

NOE: „steady-state"-heteronuklearer Kern-Overhauser-Effekt

I_{sat}: Intensität des Signals mit Protonensaturierung

I_{unsat}: Intensität des Signals ohne Protonensaturierung

Die Stärke des Hetero-NOE ist abhängig von der Magnetfeldstärke. Theoretische Berechnungen zeigen für Feldstärken von 14,1 und 18,8 T, dass für H^NN-Paare Hetero-NOE-Werte von etwa +0,78 bei starker Einschränkung der Bewegung bis zu etwa -3,94 bei freier Beweglichkeit erreicht werden können (Kay et al. 1989).

3.17.2.4 Abschätzung der Proteindynamik aus Resonanzsignalbreiten im (^{1}H-^{15}N)-TROSY

Das TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy)-Experiment ist ein heteronukleares Korrelationsexperiment, das schärfere Resonanzsignale liefern soll (Pervushin et al. 1997). Bei der NMR-Spektroskopie an Proteinen steigt die Linienbreite mit steigender Masse des untersuchten Moleküls bzw. Molekülkomplexes aufgrund länger werdender Korrelationszeiten und damit kürzer werdender T2-Zeiten an. Dieser Kohärenzverlust verursacht die breiter werdenden Liniensignale und die damit verbundene schlechter werdende Auflösung.

Im nichtentkoppelten (^{1}H-^{15}N)-Einbindungs-HSQC-Experiment besteht jedes Multiplett aufgrund der J-Kopplung aus vier Resonanzen verschiedener Signalschärfe (siehe Abbildung 3.1). Die verschiedenen Multiplettkomponenten besitzen verschiedene Linienbreiten,

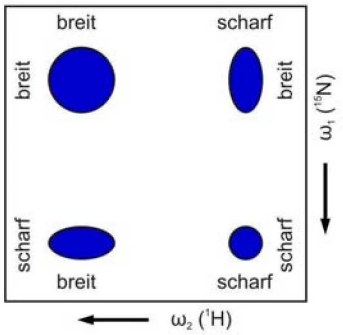


Abbildung 3.1: Theoretisches Multiplettschema im nichtentkoppelten (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Experiment. Man erkennt, dass die vier von der ^{1}H-^{15}N-skalaren Kopplung verursachten Komponenten unterschiedliche Linienbreiten aufweisen. Für sehr große Komplexe werden alle Komponenten mit Ausnahme der „scharf/scharf"-Feinstrukturkomponente über das Detektionslimit hinaus verbreitert (verändert nach Fiaux et al. 2002).

da es zu konstruktiver bzw. destruktiver Interferenz der verschiedenen Relaxationsmechanismen kommt. Typischerweise wird die transverse (T2)-Relaxation bei großen Proteinen bei hohen Magnetfeldstärken durch Dipol-Dipol-Kopplung (DD) und die chemische Verschiebungsanisotropie (CSA) dominiert. Obwohl die Relaxationsmechanismen üblicherweise korreliert sind, so tragen sie doch mit unterschiedlichen Vorzeichen zu den einzelnen Komponenten des Multipletts bei. Demzufolge relaxieren die Multiplettkomponenten mit deutlich unterschiedlichen Gesamtraten. Während des TROSY-Experimentes wird die Komponente ausgewählt, bei der sich die verschiedenen Relaxationsmechanismen nahezu aufheben. Das führt dann zu einer einzelnen, scharfen Resonanz im Spektrum. Es kommt zu einer signifikanten Steigerung der spektralen Auflösung und der Sensitivität (Pervushin et al. 1997).
Der Einfluß der intramolekularen Dynamik auf die Linienbreiten im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Experiment lässt sich wie folgt beschreiben: Regionen großer Flexibilität zeichnen sich durch scharfe Signale aus, wohingegen strukturell klar definierte Bereiche in ihrer freien Bewegung eingeschränkt sind und somit breitere Signale erzeugen. Dadurch können aufgrund variabler Linienbreiten qualitative Aussagen über die Flexibilität in einem Protein gemacht werden (z.B. Fiaux et al. 2002).
Zur Analyse der Linienbreiten wurden (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektren aufgenommen und mit NMRPipe (Delaglio et al. 1995) ohne Fensterfunktion prozessiert. Die Linienbreiten (sowie ihre Fehler; Abschätzung eines Ablesefehlers) wurden daraufhin mit Hilfe des Programmes CARA (Keller 2004) bestimmt. Dazu wurde für jede Resonanz im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum das beobachtete NMR-Signal mit dem gleichen Linienformmodell (Gauss/Lorentz-Linie) mit variabler Linienbreite gefittet.

3.17.2.5 Bestimmung skalarer Kopplungskonstanten

Die Bestimmung der homonuklearen Dreibindungskopplung zwischen dem Hα- und H^N-Proton ($^3J_{H\alpha H^N}$) erfolgte durch ein 3D HNHA-Experiment (Vuister & Bax 1993). Die Kopplungskonstante wird durch den Intensitätsvergleich der Signale des Hα- und des

H^N-Protons wie folgt berechnet:

$$^3J \approx \frac{arctan(\sqrt{\frac{I_{Kreuz}}{I_{Diagonal}}})}{\pi \cdot (\delta + \delta')} \tag{3.3}$$

I_{Kreuz}: Intensität des Kreuzsignals ($H\alpha$)

$I_{Diagonal}$: Intensität des Diagonalsignals (H^N)

$\delta + \delta' = 25{,}058$; feste Werte aus der Pulssequenz

Die Stärke der $^3J_{H\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten (in Hz) kann nach der Karplus-Beziehung mit dem Torsionswinkel Φ der Peptidbindung von Aminosäuren korreliert werden (Karplus 1959, Pardi et al. 1984):

$$^3J = A \cdot cos^2(\Phi - 60) - B \cdot cos(\Phi - 60) + C \tag{3.4}$$

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

Desweiteren ist es möglich, aus der Größe der Kopplungskonstanten einer Aminosäure Auskünfte über Sekundärstrukturelemente abzuleiten. Hohe Werte der $^3J_{H\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten deuten auf Aminosäuren in β-Faltblättern hin (im idealen Fall: antiparalleles β-Faltblatt (Φ = -139°), $^3J_{H\alpha H^N}$ = 8,9 Hz; paralleles β-Faltblatt (Φ = -119°, $^3J_{H\alpha H^N}$ = 9,7 Hz). Kleine $^3J_{H\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten deuten auf Aminosäuren in α-Helizes hin (im idealen Fall: Φ = -57°, $^3J_{H\alpha H^N}$ = 3,9 Hz) (Wüthrich 1986).
Da nach der Karplus-Beziehung verschiedene Torsionswinkel für bestimmte Kopplungskonstanten zugelassen sind, ist die Konformation des Proteinrückgrates dadurch nicht eindeutig bestimmt. In Regionen großer Flexibilität beobachtet man zusätzlich eine Mittelung der Kopplungskonstanten über die Werte mehrerer verschiedener Konformationen. Daher kann die Bestimmung der Torsionswinkel Φ durch die Kopplungskonstante mit Fehlern behaftet sein, falls der Torsionswinkel nicht relativ stark fixiert ist. In diesem Fall repräsentiert die Kopplungskonstante den Durchschnitt aller angenommenen Φ-Winkel (Cavanagh et al. 1996).

3.17.2.6 H_2O/D_2O-Austauschexperimente

Die Amidprotonen eines Proteins können mit den Protonen des Lösungsmittels (H_2O) austauschen. Dieser Austausch kann verlangsamt oder verhindert sein, wenn die betreffenden Protonen in Wasserstoffbrücken fixiert sind oder aus proteinstrukturellen Gründen nicht vom Lösungsmittel erreicht werden können.
Im vorliegenden Fall ist die Transmembrandomäne des CD4 in der Modellmembran eingebaut, die einen hydrophoben Bereich darstellt und damit durch die weitgehende Abwesenheit von H_2O den Protonenaustausch stark einschränkt. Zusätzlich wird die Ausbildung

einer Transmembranhelix erwartet, die sich durch starke Wasserstoffbrücken auszeichnet. In Wasserstoffbrückenbindungen ist der Amidprotonenaustausch mit dem Wasser stark eingeschränkt, daher kann die H^NN-Korrelation im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum deutlich länger beobachtet werden. Über die Zuordnung der Signale können die Residuen identifiziert werden, die eine erhöhte Amidprotonen-Lebensdauer besitzen. Durch eine Zeitreihe von (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Experimenten kann die Abnahme der Signalintensitäten mit der Zeit gemessen werden. Dazu wurden die Resonanzen im jeweiligen Spektrum mit Hilfe der Auswerteroutine CARA (Keller 2004) integriert. Die gewonnenen Intensitäten wurden im Vergleich zum Startwert der Intensität in H_2O-Puffer eingeordnet und dann gegen die Aminosäuresequenz grafisch aufgetragen.
Die H_2O-haltigen Proteinproben des CD4 wurden für den Versuch lyophilisiert und in D_2O wieder resuspendiert.

3.17.2.7 Messung Transferierter Dipolarer Kopplungen (TrDC)

Bei isotroper Bewegung der im Experiment detektierten Spins im Molekül kommt es zur Ausmittelung aller Beiträge dipolarer Kopplungen (DCs), die damit nicht detektiert werden können. Erfährt das Molekül jedoch eine partielle Ausrichtung gegenüber dem externen Magnetfeld und damit eine Vorzugsrichtung, so führt dies zu einer unvollständigen Ausmittelung der DCs und man detektiert residuelle dipolare Kopplungen (RDCs). Internukleare Einbindungs-DCs zeigen dann die Orientierung des zugehörigen Bindungsvektors relativ zu einem Molekül-fixierten Koordinatensystem an (Saupe & Englert 1963, Tolman et al. 1995, Tjandra et al. 1997). Ist die Ausrichtung schwach, dann kann der starke Einbindungseffekt als einfache Änderung in der betreffenden J-Kopplungskonstanten gemessen werden. Eine schwache Ausrichtung wird durch Lösung des Moleküls in einem anisotropen Medium erreicht.
In der vorliegenden Arbeit sollte die Bindung des VpUcyt an membraninsertiertes CD4 untersucht werden. Dazu wurden Vesikel mit insertiertem CD4, wie in den Kapiteln 3.16.1 und 3.16.2 beschrieben, hergestellt. Da eine direkte Messung der RDCs des CD4 aufgrund der Größe des verwendeten Vesikelsystems nicht möglich war, musste die Detektion mittels des VpUcyts erfolgen. Das VpUcyt bewegt sich im ungebundenen Fall jedoch isotrop, was wie beschrieben zu einer Ausmittelung der DCs führt. Bei günstiger k_{on}/k_{off}-Rate erfährt das Protein aber eine Ausrichtung im Magnetfeld, die vom Alignment des Bindepartners CD4 und seinem asymmetrischen Vesikelsystem bestimmt wird. Das VpUcyt „übernimmt" damit die RDC-Informationen des Komplexes; man spricht dabei von Transferierten Dipolaren Kopplungen (TrDCs). Generell gilt, dass die Bewegung eines Bindungsvektors relativ zum molekularen Ausrichtungs-Rahmen die Größe des RDCs (und damit auch des TrDCs) relativ zur statischen Ordnung skaliert (Tolman et al. 1997, Bouvignies et al. 2005).
Mit Hilfe der durchgeführten Experimente konnten Änderungen in der $^1J_{H^NN}$-Kopplungskonstanten bestimmt werden, die zur Beurteilung der CD4/VpUcyt-Wechselwirkung genutzt werden können.

3.17.2.8 Analyse der Differenz der chemischen Verschiebungen bei molekularen Wechselwirkungen

Bei der Bindung eines Partners (z.B. Mizelle) an ein Protein kommt es insbesondere im Bereich der Bindungsregion zu einer Änderung der chemischen Umgebung für die beteiligten Aminosäuren. Dies führt wiederum zu einer Änderung der chemischen Verschiebung der Resonanzen der beteiligten Atome in den NMR-Spektren. Folglich kann durch Analyse dieser Änderungen das Bindungsepitop auf der Oberfläche des Zielproteins ermittelt werden.
Zunächst wurde der Effekt durch die Zugabe des DPC mit dieser Methode studiert, im weiteren Verlauf wurden die Änderungen der chemischen Verschiebungen der H^NN-Paare aufgrund der Phosphorylierung des VpUcyt kartiert und analysiert.
Die Differenzen wurden aus den chemischen Verschiebungen der Amidprotonen- und Amidstickstoffresonanzen im ungebundenen und mizellengebundenen Zustand getrennt ermittelt und anschliessend mit Gleichung 3.5 (nach Schweimer et al., 2002) zusammengefasst.

$$\Delta_{total}\delta = \sqrt{(\Delta\delta(^1H))^2 + (0,1 \cdot \Delta\delta(^{15}N))^2} \tag{3.5}$$

$\Delta_{total}\delta$: Normalisierte chemische Verschiebungen

$\Delta\delta(^1H)$: Differenz der chemischen Verschiebungen für das Amidproton H^N

$\Delta\delta(^{15}N)$: Differenz der chemischen Verschiebungen für den Amidstickstoff N

3.17.3 NOE-Zuordnung und Strukturberechnung

Zur Bestimmung der NOE-Interaktion zwischen ^{1}H-Kernspins müssen NOE-Korrelationen in den NOE-Spektren identifiziert und zugeordnet werden. Daraus können dann Distanzeinschränkungen für die Strukturrechnung abgeleitet werden.

3.17.3.1 Interproton-Distanzeinschränkung

Zur iterativen Identifizierung von NOE-Resonanzen, deren Zuordnung und Kalibrierung wurde das Software-Paket RADAR verwendet. Dieses Programm zur automatischen NOE-Spektrenanalyse verknüpft die Routinen ATNOS (Herrmann et al. 2002a) und CANDID (Herrmann et al. 2002b), die auf Raumstrukturberechnungen mittels Torsionswinkeldynamik durch das Programm DYANA (Güntert et al. 1997) basieren.
RADAR führt einen iterativen Prozess durch, der aus sieben Zyklen besteht. ATNOS analysiert die Basislinien und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der NOE-Spektren und identifiziert die potentiellen NOE-Kreuzsignale basierend auf der Übereinstimmung mit den chemischen Verschiebungen der zugeordneten Protonen. Die Zuordnung der NOE-Kreuzkorrelationen erfolgt dann mittels des Programmes CANDID. Dazu werden ebenfalls die chemischen Verschiebungen in den vorgegebenen Zuordnungstabellen verwendet, zusätzlich dazu die Präsenz von symmetrischen Kreuzkorrelationen, Konsistenz

von Zuordnungs-Netzwerken und Kompatibilität mit der kovalenten Polypeptid-Struktur. Im nächsten Schritt werden die ^{1}H-^{1}H-NOE-Korrelationen mittels einer Peak-Integrationsroutine zu distanzeinschränkenden Strukturparametern kalibriert, die einen maximalen räumlichen Abstand zwischen den NOE-korrelierten Protonen beschreiben (obere Distanzeinschränkung, Güntert et al. 1991). Daraufhin werden Artefakte und unklare NOE-Korrelationen entfernt. Die verbleibenden struktureinschränkenden Parameter dienen zur Strukturberechnung durch den Torsionswinkeldynamik-Algorithmus DYANA, dessen errechnete Strukturscharen ab dem zweiten Zyklus durch die Programme ATNOS und CANDID als zusätzliche Einschränkung zur Identifizierung und Zuordnung weiterer ^{1}H-^{1}H-NOE-Korrelationen verwendet werden.
Mit diesem Vefahren wurden die Distanzeinschränkungen aus den 3D (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-NOESY-HSQC-Spektren (Zhang et al. 1994), den aliphatenselektiven 3D (^{1}H-^{1}H-^{13}C)-HSQC-NOESY-Spektren (Majumdar & Zuiderweg 1993) sowie den aromatischen 2D und 3D (^{1}H-^{1}H-^{13}C)-HSQC-NOESY-Spektren (Majumdar & Zuiderweg 1993) gewonnen.

3.17.3.2 Strukturberechnung

Zur Berechnung der räumlichen Struktur der untersuchten Proteine mittels DYANA wurde eine Schar von 100 Strukturen in Zufalls-Anfangskonformationen in einer molekulardynamischen Rechnung im Torsionswinkelraum mit 2000 Schritten berechnet. Die Aminosäuretypen Arginin und Lysin wurden dabei in einer positiv geladenen, Asparagin- und Glutaminsäure in negativ geladener und Histidin in einer elektroneutralen Topologie berechnet. Zusätzlich wurden für Methyl- und Methylengruppen sowie für rotationssymmetrische Protonenpositionen Pseudoatome definiert und dafür eine entsprechende Korrektur der betreffenden Abstandseinschränkungen durchgeführt (Wüthrich et al. 1983). Die experimentell gewonnenen oberen Abstandseinschränkungen aus dem iterativen Prozess mittels CANDID wurden durch manuell gewonnene Abstandseinschränkungen ergänzt und standen dann für die Strukturberechnung bereit.
Die aus den Strukturberechnungen resultierenden Strukturen wurden mit dem Programm MOLMOL (Koradi et al. 1996) visualisiert und analysiert.

Kapitel 4

Experimente und Ergebnisse

Das folgende Kapitel beschreibt die Experimente und Ergebnisse zur Herstellung, Reinigung, zu strukturellen und dynamischen Studien an der zytoplasmatischen Domäne des HIV-1 VpU (VpUcyt, Kapitel 4.1), dem Wildtyp der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne des CD4 (CD4tmcyt, Kapitel 4.2) und der Variante der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne des CD4 (CD4mut, Kapitel 4.3). Die biologische Relevanz für das Studium an den genannten Proteinen wurde im einleitenden Kapitel bereits deutlich gemacht.
VpUcyt, als Wechselwirkungspartner der zytoplasmatischen Domäne des CD4 bekannt, wird besonders auf eine strukturelle Reorganisation hin untersucht, die es in Anwesenheit des Modellmembransystemes Mizelle erfährt. In diesem Zusammenhang werden die globalen Sekundärstrukturänderungen mit Hilfe von Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht, während die Beteiligung des C-Terminus an einer möglichen tertiären Faltung mittels intrinsischer Fluoreszenz eingeschätzt wird. Das Verhalten von einzelnen Residuen bis hin zu einzelnen Atomen wird mit Hilfe der NMR-Spektroskopie analysiert. Dabei werden Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteins aufgrund der Anwesenheit von Mizellen ebenso studiert wie die Rigidität der verschiedenen strukturellen Merkmale. Eine auf NOE-Distanzeinschränkungen basierende tertiäre Faltung des Proteins wird dargestellt und analysiert. Nach der Phosphorylierung zweier Serine im VpUcyt-Protein werden auftretende Änderungen in den chemischen Verschiebungen analysiert, zugeordnet und auf eine eventuelle Auswirkung auf die Struktur und Rigidität des VpUcyt diskutiert.
Das CD4tmcyt-Protein stellt die wirtseigene Komponente des Proteinkomplexes mit dem HIV-1 VpU dar. Um ausreichende Mengen dieses Proteins produzieren zu können, wird nach der Klonierung der DNA ein Expressionssystem hergestellt, das hohe Mengen an gewünschtem Zielprotein erzeugt. Ein für Membranproteine anwendbares Reinigungsprotokoll wird entwickelt, das Protein in hoher Reinheit liefert. Die Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie gibt einen ersten Eindruck über vorhandene Strukturmerkmale, während ein Zentrifugationsassay die Funktionalität der beiden rekombinant hergestellten CD4-Konstrukte in Bezug auf die VpUcyt-Bindung beweist. Ein Satz von NMR-NOESY-Spektren diente als Grundlage einer auf NOE-Distanzeinschränkungen basierenden Strukturuntersuchung.

Eine Wechselwirkung des CD4 mit dem VpU ist nicht direkt abhängig von der Anwesenheit der Cysteine in der Aminosäuresequenz des CD4. Daher wurde eine cysteinfreie Variante CD4mut entwickelt, deren Klonierung und Reinigung dargestellt wird. Die strukturelle Analyse wird durch CD-spektroskopische Untersuchungen begonnen, während Funktionalitätsstudien mit Hilfe eines Zentrifugationsassays die Bindung an das VpUcyt beweisen. Die NMR-basierten Studien geben einen detaillierten Einblick in die Struktur und Dynamik der Domänen des Proteins. Nachdem die Sekundärstruktur und ihre Rigidität analysiert wurden, wird das Protein in seiner Gesamtstruktur berechnet. Das Verhalten bei Austausch des Lösungsmittels schließt die Unteruchung ab.

4.1 Das HIV-1 VpUcyt

4.1.1 Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins VpUcyt aus *E. coli*

Mit Hilfe von GST-Fusionsvektoren ist es möglich, das gewünschte Zielprotein als Fusion zur Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* überzuexprimieren. Das Fusionsprotein liegt dann vorwiegend in der gelösten Form vor und kann nach der Zelllyse generell mittels Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose gereinigt werden. Nach Reinigung des Fusionsproteins ermöglicht eine Protease-Schnittstelle die Abspaltung des GST-Fusionspartners mittels Thrombin. Der für das Fusionsprotein GST-VpUcyt kodierende Expressionsvektor war zu Beginn der Arbeit bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Er enthält ein Gen für GST, gefolgt von einem Sequenzabschnitt, der für die Protease-Schnittstelle kodiert. In 3'-Richtung folgt nach diesem Sequenzabschnitt das für VpUcyt kodierende DNA-Segment.
Das verwendete VpUcyt-Protein beinhaltet die C-terminalen Aminosäuren 39 bis 81 der VpU-Sequenz (siehe dazu auch Kapitel 1.3.3). Am Aminoterminus des VpUcyt verbleiben nach der Proteolyse des Fusionsproteins zwei Aminosäuren (gs), die nicht zur VpUcyt-Sequenz gehören (siehe Abbildung 4.1).



Abbildung 4.1: Aminosäuresequenz des HIV-1 VpUcyt im Einbuchstaben-Aminosäure-Kode. Kleine Buchstaben kennzeichnen die Aminosäuren, die nach der Proteolyse mittels Thrombin am Aminoterminus des VpUcyt verbleiben und nicht zur Wildtyp-Sequenz des Proteins gehören.

Für die NMR-basierten Untersuchungen wurde isotopenmarkiertes Protein benötigt. Dazu wurde die Expression des Proteins in M9-Minimalmedium (siehe Tabelle 3.6) durchgeführt, welches je nach Bedarf ^{15}N-Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle bzw. ^{13}C-Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt. Für alle Experimente, die kein isotopenmarkiertes Protein benötigten, wurde die Expression in LB-Medium durchgeführt.
Der Expressionsstamm *E. coli* BL21 wurde mit der pGEX-4T2-VpUcyt-Vektor-DNA transformiert (Kapitel 3.8.3) und über Nacht bei 37 °C auf LB-Agarplatten angezogen, die mit 50 mg/ml Ampicillin versetzt waren. Danach wurde das Expressionsmedium mit den herangezogenen Transformanden angeimpft und inkubiert. Die Zellen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 bis 0,8 mit 1 mM IPTG induziert und nach 4 h Expressionszeit abzentrifugiert (Kapitel 3.10). Dabei konnten pro Liter Medium Bakterienpellets mit etwa 3 g Nasszellgewicht gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

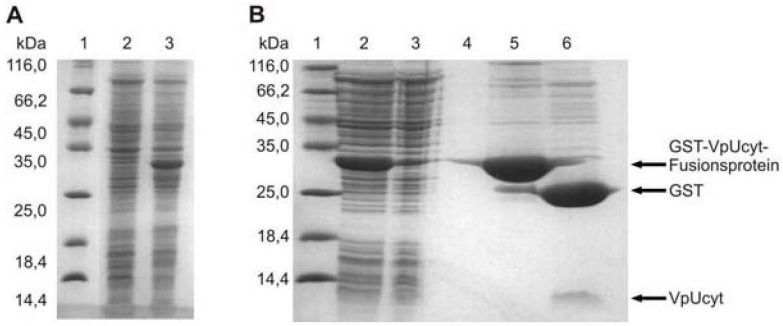


Abbildung 4.2: 15 % SDS-PAGE der Expression **(A)** und Reinigung mit Spaltung des GST-VpUcyt-Fusionsproteins **(B)**. **A** Spur 1: Protein Marker, Spur 2: Zellsuspension vor Induktion, Spur 3: Zellsuspension nach 4h Expression. **B** Spur 1: Protein Marker, Spur 2: Rohextrakt nach Zellaufschluss und Zentrifugation, Spur 3: Durchfluss des Säulenauftrages, Spur 4: Waschschritt mit Bindepuffer, Spur 5: Säule vor Spaltung des Fusionsproteins, Spur 6: Säule nach Spaltung des Fusionsproteins.

Zur Reinigung wurden die Zellen wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben in GST-Lysispuffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der zellfreie Rohextrakt wurde nach der Zentrifugation durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose gereinigt (Kapitel 3.12.1). Nach der Spaltung des Fusionsproteins an der Säule durch Thrombin wurde das nun vom Fusionspartner gelöste VpUcyt-Protein aus der Chromatographie-Säule abgelassen und mit 1 mM PMSF zur Inaktivierung von Serin-Proteasen (wie z.B. Thrombin) versetzt. Die Expression, Affinitätschromatographie und Spaltung wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert (siehe Abbildung 4.2).
Die Trennung des VpUcyt von der Thrombin-Protease sowie die Überführung in ein flüchtiges Puffersystem wurde mit der Reversed Phase Chromatographie (RPC) erreicht (Kapitel 3.12.5). Der Erfolg dieses Reinigungsschrittes wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 4.3).
Nach der RPC wurden die VpUcyt-enthaltenden Fraktionen vereinigt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und vakuumgetrocknet. Danach lag das Protein in reiner, pulverförmiger Form vor. Die Ausbeute betrug etwa 12 mg/l mit einer Reinheit größer als 95 %. Mit Hilfe der ESI-Massenspektroskopie wurde eine Masse von 5009 Da (theoretisch: 5009 Da) für das VpUcyt bestimmt.

4.1.2 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Zur Untersuchung sekundärstruktureller Veränderungen im VpUcyt-Protein aufgrund der Anwesenheit von Modellmembransystemen wurden Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen (siehe Kapitel 3.13). Die Fern-UV-Messungen liefern Aussagen über die vorhandenen Sekundärstrukturelemente (gemittelt über Sequenz und Zeit).

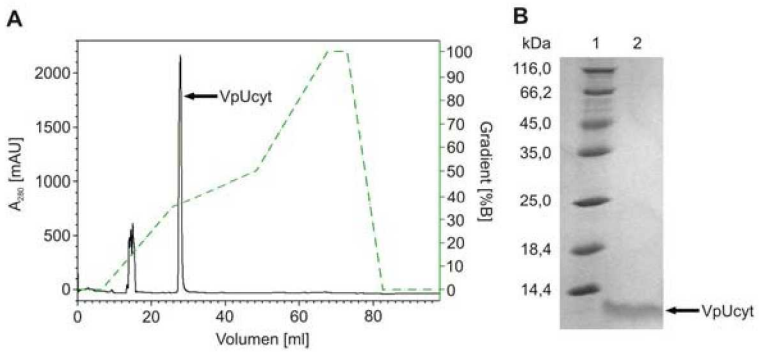


Abbildung 4.3: **A** Chromatogramm der Reversed Phase Chromatographie des eluierten VpUcyt-Spaltproduktes. **B** 15 % SDS-PAGE von der Zielfraktion der RPC. Spur 1: Protein Marker, Spur 2: Elutionsfraktion des in (A) mit „VpUcyt" markierten Signals.

Abbildung 4.4 zeigt die Fern-UV-CD-Spektren von VpUcyt in Anwesenheit (grüne, rote und blaue Kurve) und in Abwesenheit (schwarze Kurve) von DPC-Mizellen. Das in detergenzfreiem Puffer aufgenommene Spektrum zeigt ein deutliches Minimun unterhalb von 200 nm, was auf ein in weiten Teilen unstrukturiertes Protein hinweist. Im Gegensatz dazu ruft die Zugabe von DPC lokale Minima bei etwa 220 und etwa 205 nm und ein Maximum bei etwa 195 nm hervor, die an die Extrema von CD-Spektren ausgedehnter, regulärer α-Helizes bei etwa 222 nm, etwa 208 nm und bei 190 nm erinnern. Offensichtlich induziert die Anwesenheit des Detergenz die Bildung von Sekundärstrukturelementen, wobei Helizes besonders ausgeprägt sind.
Die Charakterisierung der VpUcyt-Struktur mit NMR-Methoden benötigt vergleichsweise hohe Protein- (1 mM) und DPC-Konzentrationen (100 mM). Eine hohe Proteinkonzentration verursacht Artefakte in den CD-Spektren aufgrund von Absorptionseffekten; eine hohe Mizellenkonzentration führt speziell im Bereich niedriger Wellenlängen zu unerwünschten Lichtstreueffekten. Beide Effekte machen eine quantitative Auswertung der gewonnenen Spektren bei solch hohen Konzentrationen praktisch unmöglich.
Alle CD-Spektren wurden mit 53 μM VpUcyt-Protein aufgenommen. Die Detergenzkonzentration wurde zwischen 0 und 100 mM variiert. Das Detergenz bildet über der kritischen Mizellenkonzentration (critical micelle concentration, cmc) Mizellen, die für DPC bei etwa 1,5 mM in H_2O liegt. Die CD-Spektren des VpUcyt in Anwesenheit von 0, 5, 10 und 100 mM DPC wurden von 260 bis 190 nm aufgenommen. Die quantitative Analyse der Sekundärstrukturanteile mit CDPro ist in Tabelle 4.1 dargestellt.
Im detergenzfreien Puffer zeigen alle drei Analysealgorithmen ein vornehmlich unstrukturiertes VpUcyt-Protein, bei dem der Anteil ungeordneter Sekundärstrukturelemente zwischen 80 und 94 % liegt. Die Zugabe von DPC-Mizellen resultiert in einem deutlichen Auftreten von Sekundärstrukturelementen, die etwa 50 % des Proteins betreffen. In 100 mM DPC beträgt der Anteil von α-Helizes 29 bis 32 % (gegenüber 3,6 bis 5,6 % ohne DPC), von

Tabelle 4.1: Anteile der Sekundärstrukturelemente im VpUcyt mit 0, 5, 10 und 100 mM DPC. Die Analysealgorithmen (AA) SELCON3, CDSSTR und CONTINLL unterscheiden zwischen regulären (r) und verzerrten (d) Helizes (H) und β-Strängen (S). Zur Angabe der Sekundärelemente werden die beiden Anteile jeweils addiert. Desweiteren werden die Sekundärstrukturanteile der Windungen (turn) und unstrukturierten Bereiche (RC) angegeben. Zur Einschätzung der Güte der jeweiligen Anpassung werden RMSD und NRMD ermittelt.

C_{DPC}	AA	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	turn	RC	RMSD	NRMD
100 mM	SELCON3	0.141	0.149	0.092	0.058	0.185	0.370	0.549	0.196
	CDSSTR	0.180	0.142	0.074	0.059	0.154	0.394	0.275	0.098
	CONTINLL	0.147	0.147	0.069	0.053	0.158	0.427	0.061	0.022
10 mM	SELCON3	0.117	0.122	0.085	0.051	0.145	0.485	0.608	0.215
	CDSSTR	0.125	0.104	0.059	0.043	0.125	0.539	0.222	0.078
	CONTINLL	0.116	0.123	0.073	0.051	0.145	0.492	0.042	0.015
5 mM	SELCON3	0.091	0.100	0.082	0.049	0.123	0.568	0.589	0.207
	CDSSTR	0.102	0.088	0.061	0.041	0.099	0.602	0.235	0.082
	CONTINLL	0.095	0.104	0.065	0.046	0.119	0.571	0.035	0.012
0 mM	SELCON3	0.022	0.031	0.044	0.031	0.048	0.823	-	-
	CDSSTR	0.010	0.026	0.049	0.034	0.063	0.806	0.130	0.045
	CONTINLL	0.019	0.037	0.050	0.035	0.055	0.803	0.028	0.010

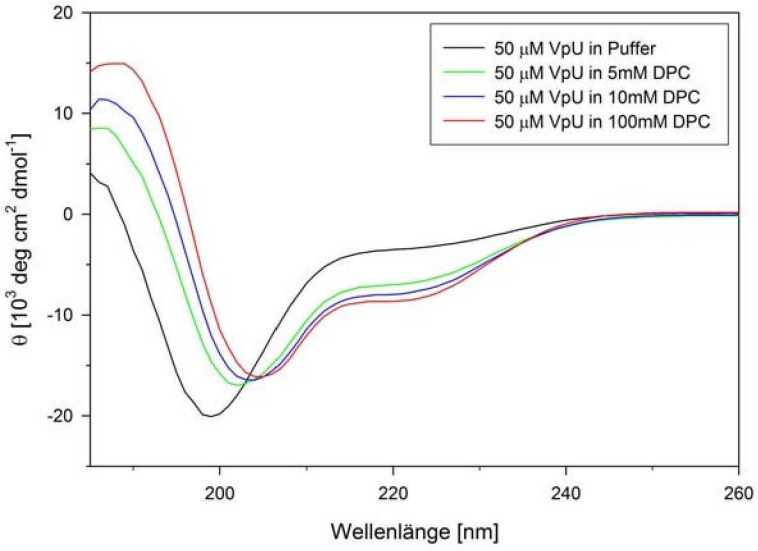


Abbildung 4.4: Fern-UV-Spektren von VpUcyt ohne (schwarz), mit 5 (grün), 10 (blau) und 100 (rot) mM DPC. Die Werte des CD sind auf molare Elliptizität geeicht. Man erkennt deutlich die Verschiebung der Minima hin zu höheren Wellenlängen bei Zugabe von DPC.

β-Faltblättern 12 bis 15 % (7,5 bis 8,5 %), von Windungen 15,5 bis 18,5 % (4,8 bis 6,3 %) und von unstrukturierten Bereichen 37 bis 43 % (80 bis 82 %).

4.1.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzemission von Tryptophan (Trp) ist sehr sensitiv gegenüber der Polarität des umgebenden Lösungsmittels. Dabei wird das Fluoreszenzmaximum durch polare Lösungsmittel zu größeren Wellenlängen hin verschoben. Demgegenüber bewirkt eine Erhöhung der Viskosität der umgebenden Lösung eine Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums. Damit ergibt sich eine Unterscheidungsmöglichkeit für die Fluoreszenz von Tryptophan-Resten in gefalteten Proteinen. Tryptophan-Reste, die sich an der Proteinoberfläche befinden und somit der polaren wässrigen Lösung ausgesetzt sind, zeigen Fluoreszenzmaxima bei etwa 350 bis 353 nm. Ist der Rest in hydrophobe Regionen eingebettet, so erfährt das Fluoreszenzmaximum eine Blauverschiebung. Werden Substanzen zugegeben, welche die Polarität des Lösungsmittels erhöhen, so kommt es zu einer Rotverschiebung der Fluoreszenz exponierter Tryptophane.
Das VpUcyt besitzt in seiner Aminosäuresequenz nur ein Tryptophan an der Position 76. Im vorliegenden Falle wurde die Änderung der W76-Fluoreszenz bei Zugabe von DPC untersucht. Als Kontrolle dienten Messungen an freiem Tryptophan in wässriger Lösung und nach Zugabe von DPC.
Um Konzentrationseffekte auf die Fluoreszenz auszuschließen, wurde zunächst die Abhängigkeit der W76-Fluoreszenz von der VpUcyt-Konzentration in DPC-freiem NMR-Puffer untersucht (siehe Kapitel 3.14). Analog wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenz von freiem Trp von der Konzentration der Aminosäure in Puffer analysiert. Da keine Konzentrationseffekte zu beobachten waren, wurden die jeweiligen Konzentrationen so eingestellt, dass das Emissionsspektrum ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufwies, ohne das Gerät jedoch an der Aussteuergrenze zu betreiben.
Die Ergebnisse der jeweiligen Messungen mit und ohne DPC für VpUcyt und freies Trp sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Man erkennt, dass es durch Addition von DPC in beiden Fällen zu einer Senkung der Polarität in der Umgebung des Trp kommt. Diese Verschiebung des Emissionsmaximums ist bei VpUcyt jedoch doppelt so groß als bei freiem Trp. Während sich das freie Trp in die polare Kopfgruppenregion des DPC einlagert (Yau et al. 1998), so befindet sich das W76 im VpUcyt wahrscheinlich in etwas hydrophoberen Bereichen der Mizelle.

Tabelle 4.2: Fluoreszenzemissionsmaxima des Tryptophans im VpUcyt und der freien Aminosäure Tryptophan (Trp) in An- und Abwesenheit von DPC. Die Verschiebung der Tryptophanemission hin zu kleineren Wellenlängen bei Zugabe von DPC ist beim VpUcyt fast doppelt so groß als bei freiem Trp.

	Emissionsmaximum [nm]	
	+ DPC	− DPC
VpUcyt	353	365
freies Trp	357	364

4.1.4 NMR-Spektroskopie an freiem und mizellengebundenem VpUcyt

4.1.4.1 Sequenzielle Resonanzzuordnung des freien VpUcyt

a. Homo- und heteronukleare 2D NMR-Spektroskopie an freiem VpUcyt

Zu Beginn der NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde das Protein ohne membranähnliche (d.h. mizellenartige) Umgebung strukturell und dynamisch charakterisiert. Dazu wurde zunächst ein (^{1}H-^{15}N)-Einbindungskorrelations-(HSQC)-Spektrum des VpUcyt in DPC-freiem NMR-Puffer aufgenommen (Abbildung 4.5 A), welches eine nur geringe spektrale Dispersion sowohl in der Protonen-, als auch der Heterokerndimension (^{15}N) zeigt. Das lässt darauf schließen, dass das VpUcyt unstrukturiert vorliegt. Ausgehend von der Aminosäuresequenz des VpUcyt (Abbildung 4.1) sind 43 (^{1}H-^{15}N)-Korrelationssignale im (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum zu erwarten (ohne Prolinreste, die kein Amidproton besitzen und ohne die aminoterminale Aminosäure, von der aufgrund des schnellen Austausches mit dem Lösungsmittel kein Signal detektiert wurde). Weiterhin sind zweimal je zwei Resonanzen für die Seitenketten-Amidgruppen des Glutamin- und des Asparaginrestes, viermal je zwei Resonanzen der Seitenketten-Amidgruppen der Argininreste und fünfmal je ein Signal für die Seitenketten-Amidgruppen des Histidins und der Argininreste zu erwarten. Aus einer Anzahl von 55 Korrelationen im (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum von VpUcyt ergibt sich, dass mindestens ein Signal zuviel erscheint. Als mögliche Ursache kommt das Vorhandensein von cis- und trans-Konformeren des C-terminalen Bereiches um das P75 in Betracht. Das aliphatenselektive (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum (Abbildung 4.5 B) des freien VpUcyt zeigt ebenfalls nur geringe Dispersion in beiden Dimensionen. Speziell im Bereich der Methylprotonen (zwischen 0 und 1 ppm) sind starke Überlagerungen von Signalen zu erkennen. Zusätzlich erscheinen keine Methylsignale unterhalb von 0 ppm. Dieser Befund deutet auf ein weitgehend unstrukturiertes Polypeptid hin.

Als weiteres Indiz für das Fehlen stabiler, regulärer Sekundärstrukturelemente kann die weitgehende Abwesenheit starker Kreuzkorrelationen im Diagonalbereich des zweidimensionalen, ^{15}N-editierten (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Experimentes gewertet werden (Abb. 4.5 D). Befinden sich Residuen in einer α-Helix, dann können starke NOEs zwischen Amidprotonen benachbarter Aminosäuren detektiert werden (vgl. Abb. 4.8 D). Das Fehlen dieser Kreuzkorrelationen kann bedeuten, dass sich das Protein in einer β-Strang-Konformation oder in ungeordneter 'random coil'-Struktur befindet (Wüthrich 1986). Betrachtet man die Resonanzsignale zu den aliphatischen Protonen, dann fällt ebenfalls auf, dass speziell zu den sequenziell weiter entfernten Protonen (H^β, H^γ, H^δ) kaum NOEs zu erkennen sind. Das lässt auf eine hohe Dynamik innerhalb des Proteins schließen, die einen Aufbau der NOEs verhindert.

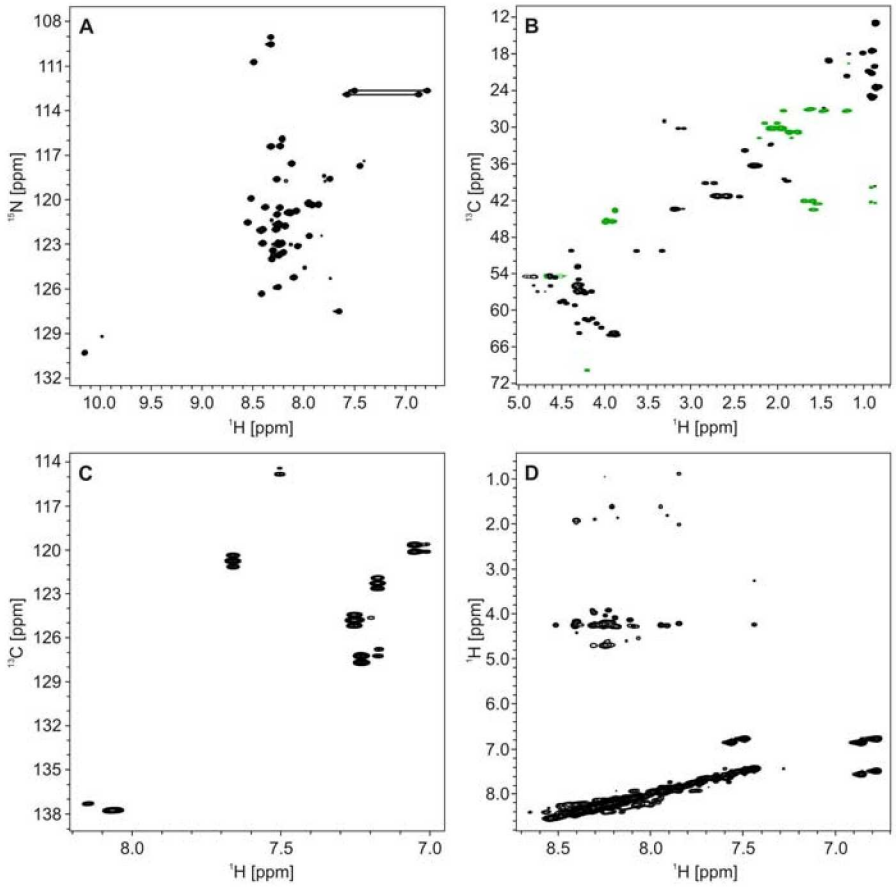


Abbildung 4.5: Hetero- und homonukleare 2D NMR-Spektren von freiem VpUcyt. **A** (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum. Zusammengehörige Resonanzpaare des Asparagin- und Glutamin-Seitenketten-Amidgruppen sind durch Linien verbunden. **B** (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum des aliphatischen, **C** des aromatischen Bereichs. **D** ^{15}N-editiertes (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektrum.

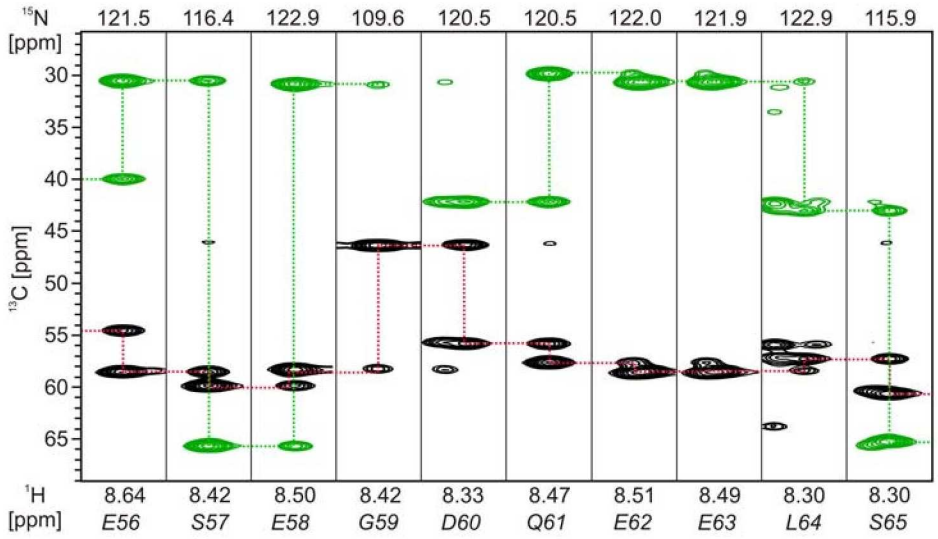


Abbildung 4.6: Sequenzspezifische Resonanzzuordnung des Proteinrückgrates des freien VpUcyt mittels 3D HNCACB-Spektrum für das VpUcyt-Segment E56 bis S65. ^{13}C(F1)-^{1}H(F3)-Streifen sind bei entsprechenden H^N- und N-chemischen Verschiebungen in den Dimensionen F2 und F3 entnommen und sequenziell angeordnet. Die Konnektivitäten durch die C^α- und C^β-chemischen Verschiebungen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet (C^α: rot, C^β: grün). Die Unterbrechung der C^β-Konnektivität bei G59 und die typische Tieffeldverschiebung der C^β-Resonanzen von S57 und S65 sind zu erkennen.

b. Sequenzielle Zuordnung der Rückgrat-Amidgruppen

Um Aussagen über einzelne Aminosäuren des Proteins zu machen, musste jeder Korrelation im (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum das zugehörige H^NN-Paar einer Aminosäure zugeordnet werden.

Mit Hilfe des 3D Tripelresonanz-Spektrums HNCACB (Wittekind & Mueller 1993) erfolgte die Zuordnung der Proteinrückgrat-Amidgruppen sowie der C^α- und Seitenketten C^β-Resonanzen. Im HNCACB-Experiment werden die Amidresonanzen H^N und N mit den C^α- und C^β-Resonanzen derselben Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_i^\alpha/C_i^\beta$) und gleichzeitig mit den C^α- und C^β-Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_{i-1}^\alpha/C_{i-1}^\beta$) korreliert, wobei letztere Korrelation wegen der schwächeren Kopplung (vgl. Abb. 1.9) zu schwächeren Signalen führt. Die C^α- und C^β-Resonanzen unterscheiden sich darüber hinaus durch entgegengesetzte Vorzeichen der Signalintensitäten im HNCACB-Spektrum.

Zur Identifizierung der Aminosäuretypen dienen die Charakteristika der Spinsysteme. Glycinreste besitzen kein C^β-Atom. Alaninreste zeigen eine extreme Hochfeldverschiebung der

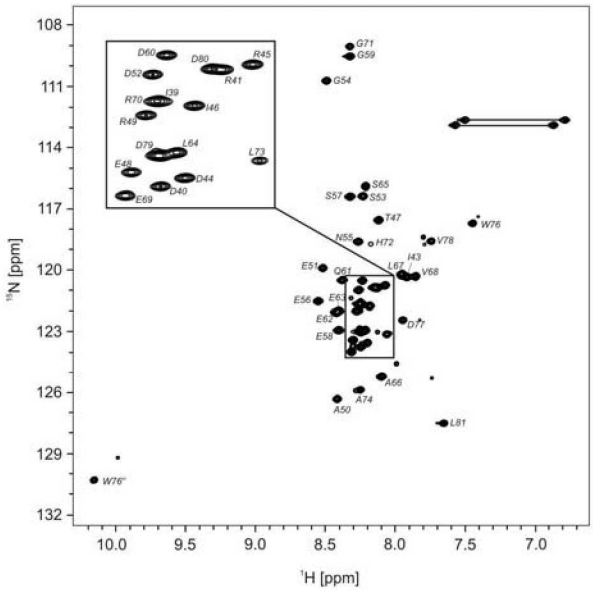


Abbildung 4.7: (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum des freien VpUcyt mit zugeordneten H^{N}N-Paaren. Die Zuordnung der Aminosäuren ist im Einbuchstaben-Aminosäure-Kode in schwarz angegeben. Die Amidseitenketten von Q61 und N55 sind, wenn auch nicht der entsprechenden Aminosäure zugeordnet, mit einer durchgezogenen Linie verbunden.

C^{β}-Resonanzen, da es sich hierbei um Methylgruppen handelt. Die C^{β}-Resonanzen von Serin- und Threoninresten liegen aufgrund der Bindung zu einem Sauerstoffatom extrem tieffeldverschoben vor. Mit Hilfe dieser „Eckpfeiler" konnten bis auf das g(-2) und das P75 alle Resonanzen sequenzspezifisch zugeordnet werden. In Abbildung 4.6 ist exemplarisch ein Ausschnitt aus dem 3D HNCACB-Spektrum gezeigt, der die sequenzielle Verknüpfung der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoff-Resonanzen verdeutlicht.
Die sequenzspezifische Zuordnung der Carbonylkohlenstoffresonanzen erfolgte über ein 3D HNCO-Experiment (Ikura et al. 1990), das die Amidgruppen (H^{N} und N) mit den ^{13}C-Carbonylkohlenstoffen der vorangehenden Aminosäure korreliert. Die chemischen Verschiebungen der H^{α}-Resonanzen konnten mittels eines 3D HNHA-Experimentes (Vuister & Bax 1993) zugeordnet werden.
Abbildung 4.7 zeigt das (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum mit allen zugeordneten H^{N}N-Paaren.

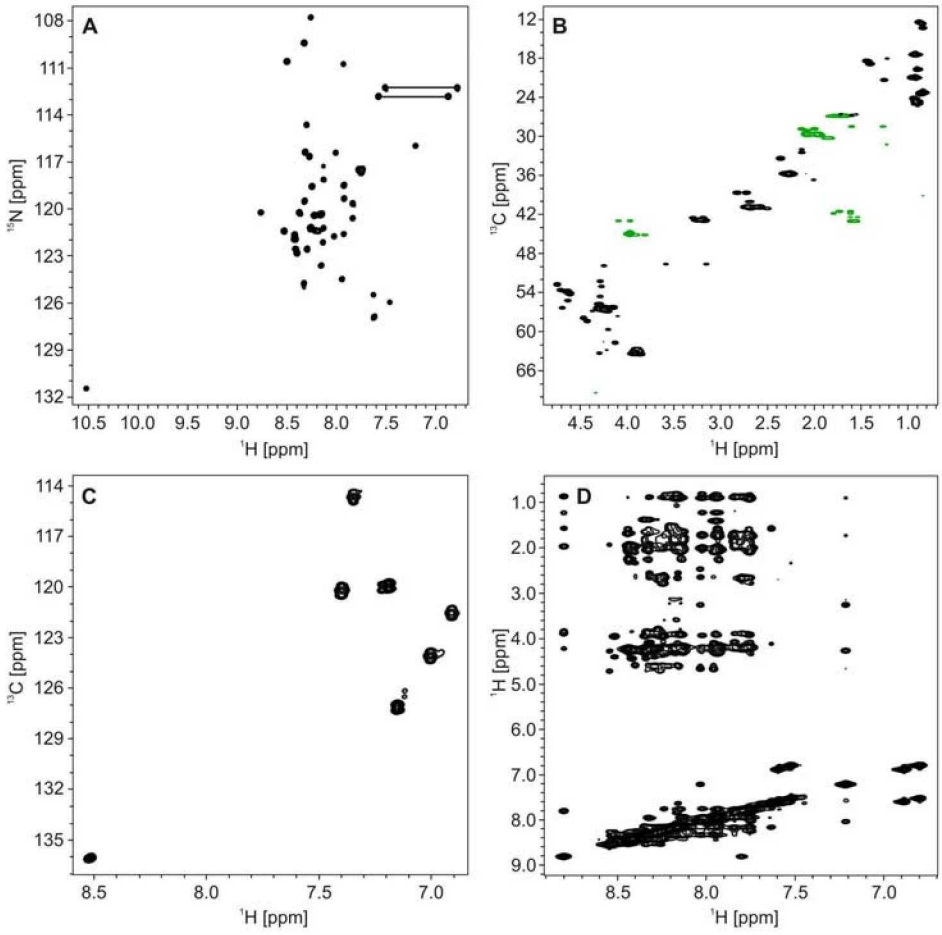


Abbildung 4.8: Hetero- und homonukleare 2D NMR-Spektren von VpUcyt in mizellenhaltiger Lösung. **A** (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum. Zusammengehörige Resonanzpaare der Asparagin- und Glutamin-Seitenketten-Amidgruppen sind durch Linien verbunden. **B** (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum des aliphatischen, **C** des aromatischen Bereichs. **D** ^{15}N-editiertes (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektrum.

4.1.4.2 Sequenzielle Resonanzzuordnung des mizellengebundenen VpUcyt

a. Homo- und heteronukleare 2D NMR-Spektroskopie an mizellengebundenem VpUcyt

Das in DPC-haltigem NMR-Puffer (siehe 3.14) gelöste VpUcyt wurde zunächst durch 2D-Experimente charakterisiert. Dazu wurde ein (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Experiment und ein (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Experiment durchgeführt. Im Vergleich zu den Spektren des freien VpUcyt (siehe Abbildung 4.5) zeigen die Spektren des mizellengebundenen VpUcyt (Abbildung 4.8) eine erhöhte Signaldispersion in beiden Dimensionen, was auf die Ausbildung von regulären Sekundärstrukturelementen hinweist.

Eine weitere strukturelle Charakterisierung wurde mittels eines 2D, ^{15}N-editierten (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Experimentes vorgenommen. Abbildung 4.8 D zeigt das erhaltene Spektrum. Man erkennt deutlich eine Anzahl von Kreuzkorrelationen zwischen Amidprotonen benachbarter Amidgruppen, die auf reguläre Sekundärstrukturelemente, insbesondere α-Helizes, hinweisen. Betrachtet man die Korrelationssignale zu den aliphatischen Protonen, so stellt man auch in diesem Bereich eine gute Signaldispersion und -quantität bis hin zu den sequenziell entfernten Seitenkettenprotonen (H^γ, H^δ) fest. Im Vergleich zum 2D, ^{15}N-editierten (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektrum des freien VpUcyt (vgl. Abb. 4.5 D) fällt eine deutliche spektrale Dispersionszunahme bei Mizellenzugabe auf. Das betrifft vor allem den Bereich der Amidproton-Kreuzsignale, in dem sich die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen andeutet. Es bildet sich eine bevorzugte Struktur aus, die zu NOE-Signalen aufgrund von Dipol-Dipol-Wechselwirkung über den Raum und damit zu Kreuzsignalen zwischen Protonen mit einem Abstand von weniger als 5 Å führt.

b. Sequenzielle Zuordnung der Rückgratamidgruppen

Für das mizellengebundene VpUcyt erfolgte die sequenzspezifische Zuordnung (siehe dazu Kapitel 3.17.2.1) der Proteinrückgratamidgruppen (H^N und N) sowie der C^α- und Seitenketten-C^β-Resonanzen ebenfalls mittels eines 3D HNCACB-Experimentes. Die Zuordnung der Amidgruppen wurde mittels eines 3D HN(CO)CA-Experimentes (Yamazaki et al. 1994) kontrolliert und weiter vervollständigt. Damit konnten alle Amidgruppen (mit Ausnahme des g(-2) und P75) zugeordnet werden.
Die sequenzspezifische Zuordnung der Carbonylkohlenstoffresonanzen erfolgte über ein 3D HNCO-Experiment (Ikura et al. 1990), das die Amidgruppen (H^N und N) mit den ^{13}C-Carbonylkohlenstoffen der vorangehenden Aminosäure korreliert. Die chemischen Verschiebungen der H^α-Resonanzen konnten mittels eines 3D HNHA-Experimentes (Vuister & Bax 1993) zugeordnet werden. Während dieses Experimentes werden die Amidgruppenresonanzen über die $^3J_{H\alpha H^N}$-Kopplung mit den H^α-Resonanzen korreliert, was neben der chemischen Verschiebung auch die Bestimmung der $^3J_{H\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten (siehe Kapitel 3.17.2.5) erlaubt. Mit Hilfe dieses Experimentes konnten alle H^α-Resonanzen bei Kennt-

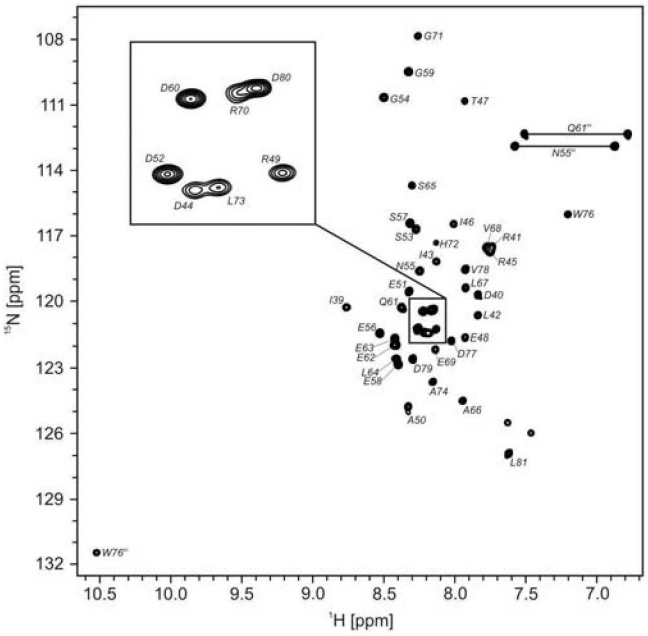


Abbildung 4.9: (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum des mizellengebundenen VpUcyt mit zugeordneten H^{N}N-Paaren. Die Zuordnung der Aminosäuren ist im Einbuchstaben-Aminosäure-Kode in schwarz angegeben.

nis der chemischen Verschiebung des C^{α}-Atoms (aus dem HNCACB) der entsprechenden Aminosäure im 2D (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum identifiziert werden.
Abbildung 4.9 zeigt das (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum von VpUcyt mit den zugeordneten H^{N}N-Paaren in einer DPC-Mizellen-Lösung.

c. Zuordnung der Seitenketten-Resonanzen des mizellengebundenen VpUcyt

Die sequenzspezifische Zuordnung der aliphatischen Seitenkettenresonanzen erfolgte mit Hilfe eines 3D HCCH-COSY-Experimentes (Bax et al. 1990a). Während dieses Experimentes werden aliphatische, ^{13}C-gebundene Protonen miteinander korreliert, wobei die Protonen über zwei oder drei kovalente Bindungen miteinander gekoppelt sind. Die aus dem HNCACB- und dem HNHA-Experiment für jede Aminosäure bereits bekannten chemischen Verschiebungen von C^{α} bzw. H^{α} konnten als Ausgangspunkt für die schrittweise Zuordnung der Seitenkettenresonanzen verwendet werden.
So können die H^{β}-Resonanzen aus dem 3D H(C)CH-COSY-Spektrum, die C^{β}-Resonanzen aus dem 3D (H)C(CO)NH-TOCSY-Experiment (Grzesiek et al. 1993), obschon aus dem 3D HNCACB entnommen, gewonnen und im aliphatischen (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum zugeordnet werden. Auf diese Weise erhält man Schritt für Schritt alle chemischen Verschiebungen der ^{1}H- und ^{13}C-Resonanzen der aliphatischen Seitenkette jeder einzelnen

Aminosäure. Diese Zuordnungsmethode bietet den Vorteil, dass die Detektion nicht über die labilen Amidprotonen erfolgt, sondern ausschließlich über die ^{13}C-gebundenen Protonen. Die gewonnene Zuordnung wurde mittels eines 3D H(C)CH-TOCSY- (Bax et al. 1990a) und eines 3D, ^{15}N-editierten (^{1}H-^{1}H)-TOCSY-Experimentes überprüft.
Die sequenzielle Zuordnung der aromatischen Seitenketten gestaltete sich im Falle des VpUcyt sehr einfach, da nur zwei Aminosäuren aromatisch sind (H72 und W76). Durch Identifikation der H^{β}-Protonen im 3D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY-Experiment konnten nach darauffolgender Identifikation der Kreuzresonanzen im 2D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY-Experiment alle aromatischen Protonenresonazen zugeordnet werden. Mittels dieser Werte konnte im aromatischen (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum der zugehörige Wert für die Kohlenstoffverschiebung ermittelt werden. Läßt man die Entkopplung während der INEPT-Refokussierungsphase weg, kommt es zur Multiplettaufspaltung der Resonanzen; abhängig von den C-Kopplungen spaltet die Resonanz auf. Diese Information kann dann zur weiteren Verifizierung der Zuordnung der aromatischen Seitenketten verwendet werden.

d. Vollständigkeit der Resonanzzuordnung

Es wurden für das mizellengebundene VpUcyt 43 von 43 möglichen $H^{N}N$-Resonanzpaaren zugeordnet (100 %). Auch die Zuordnung der H^{α}- und C^{α}-Resonanzen war vollständig (100 %). Ferner wurden 43 von 45 Proteinrückgrat-Carbonylkohlenstoffkernen zugeordnet (96 %). Eine der fehlenden Resonanzen ist auf das fehlende Proteinrückgrat-Amidproton des sequenziell folgenden Prolinrestes zurückzuführen, die andere fehlende Resonanz ist die des carboxyterminalen Leucin-Restes (L81). Da das 3D HNCO-Experiment die Carbonylkohlenstoff-Resonanzen an Position (*i-1*) mit der Proteinrückgrat-Amidgruppe der folgenden Aminosäure an Position (i) korreliert, können diese Carbonylkohlenstoffkerne nicht detektiert werden.
Für die VpUcyt-Seitenkettenresonanzen konnte eine Vollständigkeit von 94 % bei den Protonen und 91 % für die Heterokerne (^{13}C und ^{15}N) erreicht werden. Mit den verwendeten Experimenten konnten die C^{γ}-Resonanzen der Asparaginsäure-Seitenkette, der aromatischen Seitenkette des Tryptophans, die C^{δ}-Resonanz der Glutaminsäure-Seitenkette, die $C^{\delta 2}$- und $C^{\epsilon 2}$-Resonanzen der Tryptophan-Seitenkette, sowie die C^{ζ}-Resonanzen der Arginin-Seitenketten nicht zugeordnet werden, da sie nicht direkt an ein Proton gebunden sind. Bei dem verwendeten pH-Wert sind die lösungsmittelzugänglichen Seitenketten-Carboxylgruppen der Glutamin- und Asparaginsäurereste deprotoniert und können somit ebenfalls nicht detektiert werden. Es war weiterhin nicht möglich, die Hydroxylprotonen von Serin-Resten (H^{γ}) und dem Threonin-Rest ($H^{\gamma 1}$) zu detektieren und zuzuordnen. Ebenso fehlen die Resonanzzuordnungen der Guanidinogruppen der Argininreste und der Seitenketten-Stickstoffgruppen der Histidine.
Die Resonanzzuordnung für das VpUcyt in DPC-Mizellen bei 30 °C wurde in der 'Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB)' hinterlegt, die Eintragungsnummer lautet '15513'.

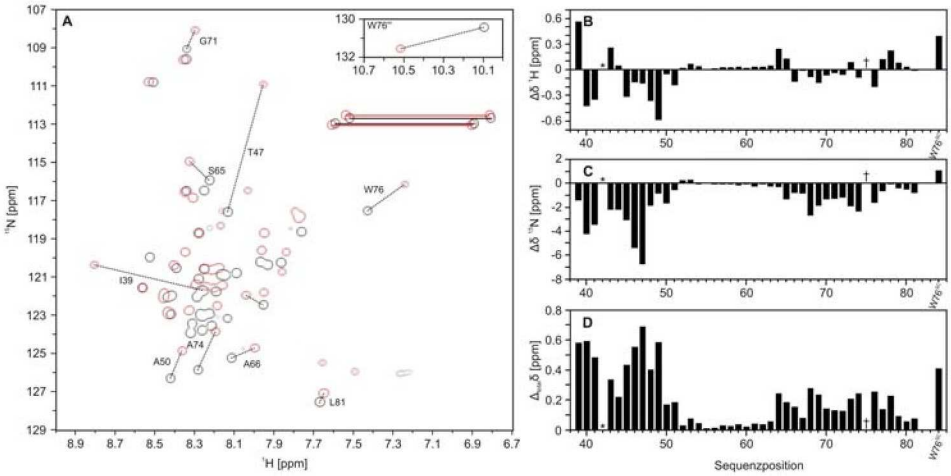


Abbildung 4.10: **A** (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Experiment des VpUcyt mit und ohne DPC. Gezeigt sind das Spektrum des VpUcyt ohne (schwarze Signale) und mit (rote Signale) 100 mM DPC. Der Übersichtlichkeit halber sind nur einige der Aminosäuren bezeichnet (im Einbuchstaben-Aminosäurekode). **B** Änderung der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen-, **C** der Amidstickstoff-Resonanzen. **D** Normalisierte Änderung der chemischen Verschiebungen, berechnet nach Gleichung 3.5. Residuen, deren Änderung in der chemischen Verschiebung nicht bestimmt werden konnte, sind mit einem „*“ markiert, die Position des P75 durch ein „†“.

4.1.4.3 (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Experimente des VpUcyt mit und ohne DPC

Nachdem die Korrelationssignale des VpUcyt im (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum zugeordnet worden waren, konnte durch eine Überlagerung der (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektren von freiem und mizellengebundenem VpUcyt der Einfluß des Detergenz DPC auf die Residuen charakterisiert werden. Dazu wurde dem in DPC-freiem NMR-Puffer gelösten VpUcyt schrittweise das DPC in fester Form zugegeben. Nach Lösung des Detergenz und pH-Kontrolle wurde jeweils ein (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum aufgenommen. Abbildung 4.10 zeigt das (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum zu Beginn der Titration ohne (schwarze Signale) und am Ende der Titration mit 100 mM DPC (rote Signale). Man erkennt deutlich die großen Veränderungen in den chemischen Verschiebungen der VpUcyt-Residuen, was eine strukturelle Änderung innerhalb des Proteins impliziert. Speziell die Amidgruppe und die Seitenkettenamidgruppe des Tryptophan 76 zeigen deutliche Veränderungen in der chemischen Verschiebung ($\Delta_{total}\delta^{H^N N}W76 \approx 0,211$ ppm; $\Delta_{total}\delta^{H^{\epsilon 1} N^{\epsilon 1}}W76 \approx 0,400$ ppm). Der Einfluss des DPC auf die Seitenkettenamidgruppe des W76 wurde bereits in den Kapiteln 4.1.2 und 4.1.3 untersucht. Bei Konzentrationen über 100 mM DPC kommt es zu keinen Änderungen mehr in den chemischen Verschiebungen, daher wurde die zu verwendende Menge an DPC für die folgenden Experimente auf 100 mM DPC festgelegt.

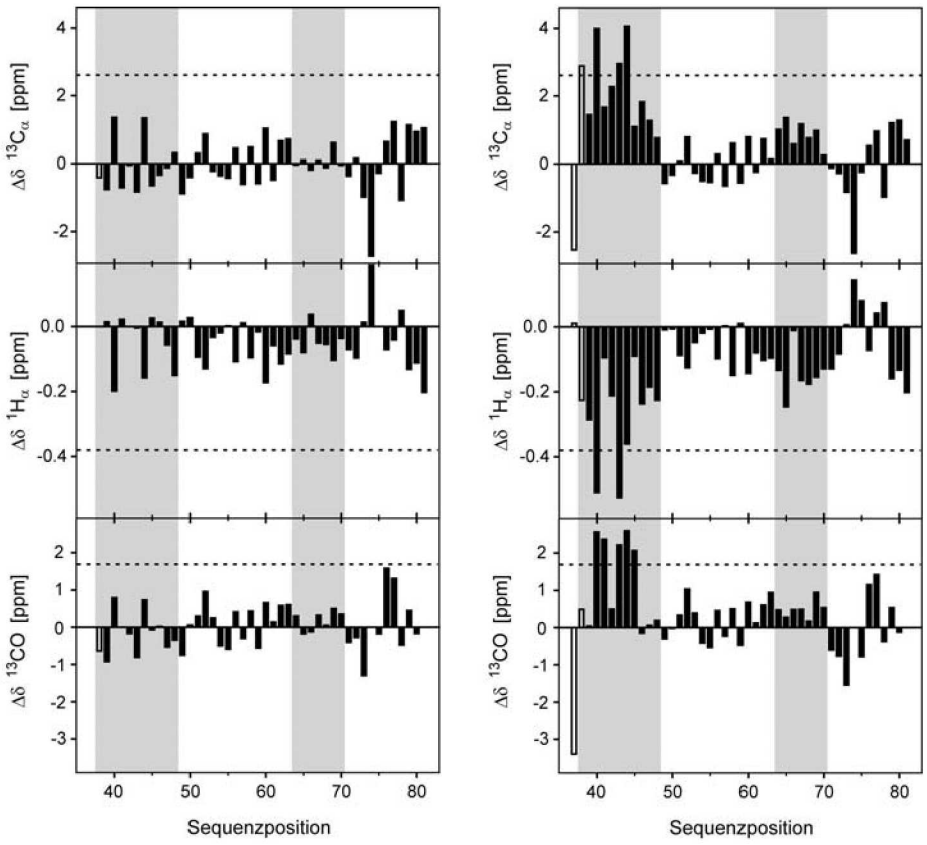


Abbildung 4.11: Sekundärstrukturanalyse mittels sekundärer $^{13}C_\alpha$, $^{1}H_\alpha$ und ^{13}CO chemischer Verschiebungen. Die 'random coil' Referenzverschiebungen basieren auf den Arbeiten von Schwarzinger et al. (2000, 2001) an Ac-GGXGG-NH2-Peptiden in 8 M Urea. Die verschiedenen Panele zeigen die Abweichungen der gemessenen chemischen Verschiebungen von den jeweiligen Referenzverschiebungen in ppm. **Links:** Die ermittelten Werte für freies VpUcyt. **Rechts:** Die ermittelten Werte für mizellengebundenes VpUcyt. Die gestrichelten Linien geben die theoretischen Werte für eine zeitlich zu 100 % existierende α-Helix an. Balken mit weißer Füllung beschreiben die beiden Residuen des proteloytischen Überhangs. Grau unterlegt wurden die beiden Bereiche, welche in DPC-Mizellen-Lösung α-Helizes ausbilden.

4.1.4.4 Sekundärstrukturanalyse mittels chemischer Verschiebungen

Die numerische Differenz zwischen den beobachteten chemischen Verschiebungen der Kernspins eines Proteins und den dazugehörigen chemischen Verschiebungen der jeweiligen Kernspins in der gleichen Aminosäure im Kontext eines ungefalteten Peptids (chemische Verschiebungen im 'Random Coil'-Zustand) wird als sekundäre chemische Verschiebung bezeichnet ($\Delta\delta$, siehe Kapitel 3.17.2.2). Insbesondere sind die $^{13}C_\alpha$, $^{1}H_\alpha$ und ^{13}CO sekundären Verschiebungen sensitive Indikatoren für α-Helix- und β-Faltblatt-Formation (Wishart & Sykes 1994a,b, Chung et al. 2001). Bei Ausbildung einer regulären α-Helix kommt es zu einer Niedrigfeldverschiebung der $^{13}C_\alpha$- und ^{13}CO-, sowie zu einer Hochfeldverschiebung der $^{1}H_\alpha$-Resonanzen mit jeweiligen mittleren Verschiebungen von 2,6 ppm, 1,7 ppm und 0,37 ppm. Die Helizität kann durch das Verhältnis der Mittelwerte der beobachteten sekundären Verschiebungen und der Mittelwerte der Verschiebungscharakteristik einer regulären Helix abgeschätzt werden.
Abbildung 4.11 zeigt die $^{13}C_\alpha$, $^{1}H_\alpha$ und ^{13}CO sekundären chemischen Verschiebungen des VpUcyt in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von 100 mM DPC. Während beim freien VpUcyt keine sekundärtypischen Muster auftreten, so bilden sich diese in Anwesenheit von 100 mM DPC deutlich aus. Zwei sequenzielle Bereiche mit signifikanter Helixpopulation können in jedem der drei Diagramme beobachtet werden. Die genauen Grenzen der Helizes sind nur schwer zu definieren, im Wesentlichen umfassen sie die Residuen 39 bis 48 (Helix 2) und 64 bis 70 (Helix 3). Die mittleren Sekundärshifts in den grau unterlegten Bereichen in Abbildung 4.11 deuten auf das Vorkommen der Helix 2 in 69 % (basierend auf $\Delta\delta$ ^{13}CO) bis 85 % ($\Delta\delta$ $^{13}C_\alpha$) und die Existenz der Helix 3 in 28 % ($\Delta\delta$ $^{13}C_\alpha$) bis 38 % ($\Delta\delta$ $^{1}H_\alpha$) aller Konformere zu einem beliebigen Zeitpunkt hin. Im Gegensatz dazu zeigt das VpUcyt keinerlei β-Faltblattstrukturen, da keinerlei zusammenhängende Muster von hochfeldverschobenen $^{13}C_\alpha$, ^{13}CO und tieffeldverschobenen $^{1}H_\alpha$ Sekundärshifts in den gezeigten Diagrammen auftreten.

4.1.4.5 Der heteronukleare (^{1}H-^{15}N)-NOE

Der heteronukleare (^{1}H-^{15}N)-NOE ist ein sensitiver Indikator für lokale Veränderungen in der Beweglichkeit des Proteinrückgrates auf einer Zeitskala von Pico- und Nanosekunden (siehe Kapitel 3.17.2.3). Residuen mit negativen NOE-Werten führen Bewegungen mit großer Amplitude auf einer sub-Nanosekundenzeitskala aus, während Residuen mit positiven NOE-Werten in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt sind.
In dieser Arbeit wurde der (^{1}H-^{15}N)-NOE verwendet, um die dynamischen Eigenschaften des VpUcyt in freiem und mizellengebundenem Zustand in Abhängigkeit von der Sequenzposition zu analysieren. Abbildung 4.12 zeigt die (^{1}H-^{15}N)-NOE-Spektren des freien (A, B) und mizellengebundenen (C, D) VpUcyt-Proteins ohne (A und C) und mit (B und D) vorangehender 3 Sekunden dauernder Sättigung der Amidprotonen. Es ist deutlich zu erkennen, dass einige Signale in (B) und (D) nicht mehr sichtbar, negativ oder verstärkt sind. Zur Bestimmung des Hetero-NOE-Wertes wurden die Resonanzsignale mittels CARA (Keller 2004) integriert und danach lt. Gleichung 3.2 dividiert. Abbildung 4.13 zeigt die

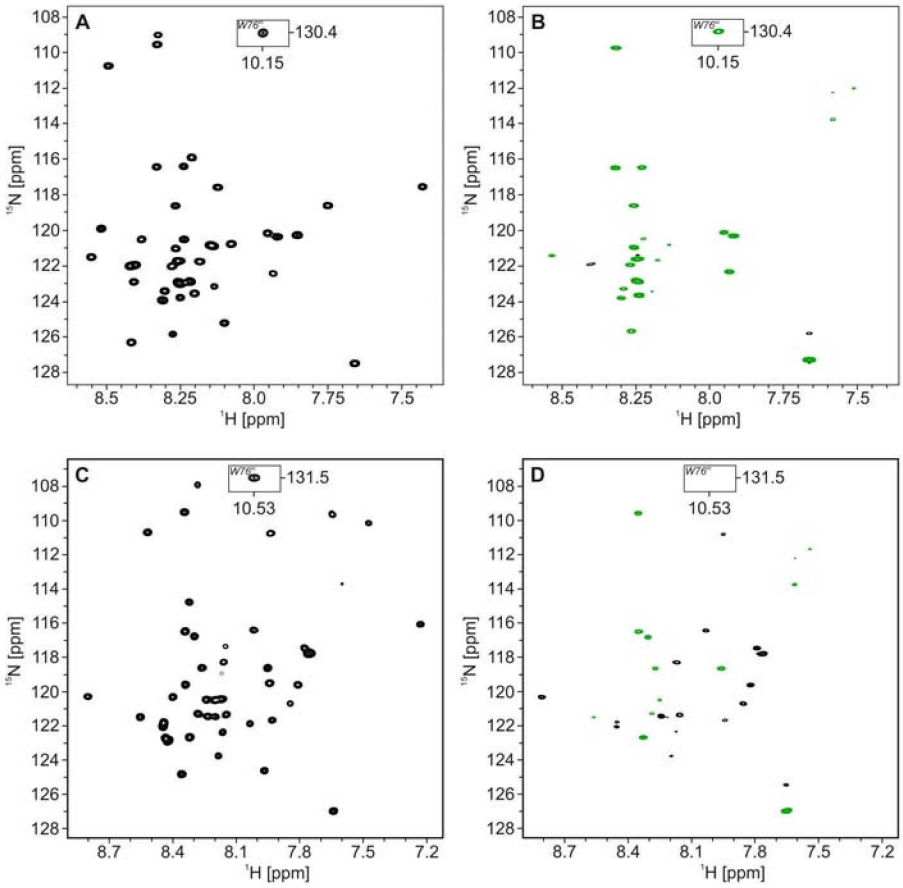


Abbildung 4.12: (^{1}H-^{15}N)-NOE-Spektren des freien (**A**, **B**) und mizellengebundenen VpUcyt (**C**, **D**). Die Spektren wurden jeweils ohne (**A** und **C**) und mit (**B** und **D**) vorheriger 3 s dauernder Sättigung der Amidprotonen aufgenommen. Fehlende oder negative (in grün) Resonanzen deuten auf erhöhte interne Dynamik der betreffenden Residue hin. Schon aus den deutlichen Unterschieden der residuellen Intensitäten in den beiden Spektren **B** und **D** lässt sich auf eine signifikante Änderung der Dynamik innerhalb des Proteins infolge der DPC-Zugabe schließen. Die Spektren wurden bei einer Magnetfeldstärke von 18,8 T aufgenommen.

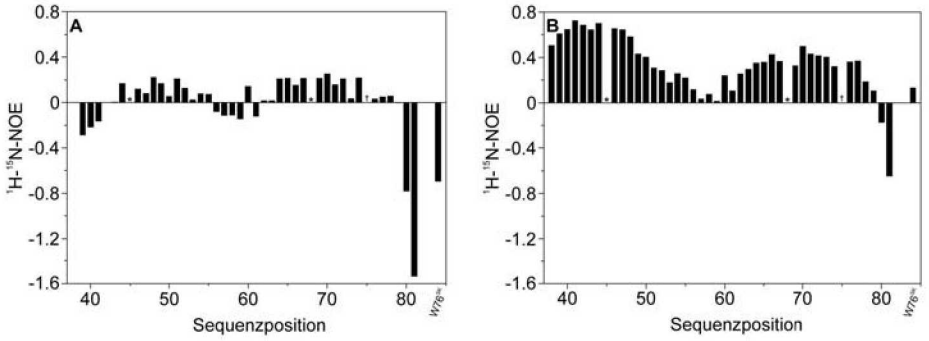


Abbildung 4.13: (^{1}H-^{15}N)-Hetero-NOE-Werte des freien und mizellengebundenen VpUcyt in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz. Der Hetero-NOE-Wert berechnet sich aus dem Quotienten der Resonanzintensitäten mit und ohne Vorsättigung gemäß Gleichung 3.2. Je größer der Wert des NOE, desto rigider die Struktur in diesem Bereich. Der NOE kann einen Wert von etwa 0,8 nicht überschreiten (siehe dazu Kapitel 3.17.2.3). **A** Werte für das freie VpUcyt. Man erkennt eine durchweg freie Beweglichkeit der Aminosäuren, speziell im Bereich der Termini. **B** Werte für das mizellengebundene VpUcyt. Die Beweglichkeit des Proteins ist größtenteils stark eingeschränkt, auch die Beweglichkeit der Termini. Mit $W76^{SK}$ wird die Amidgruppe in der Seitenkette des Tryptophan 76 bezeichnet. Die Position des P75 ist durch ein „†" markiert; Residuen, deren Intensitäten aufgrund großen Signalüberlapps nicht bestimmt werden konnte, sind mit einem „∗" markiert. Die Spektren, aus denen die angegebenen Werte berechnet wurden, wurden bei einer Magnetfeldstärke von 18,8 T aufgenommen.

Hetero-NOE-Werte für freies (A) und mizellengebundenes (B) VpUcyt. Nach Zugabe des DPC kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Rigidität der VpUcyt-Struktur, die das gesamte Protein betrifft. Besonders im Bereich des N-Terminus und im Bereich der Residuen 60 bis 78 wird die Beweglichkeit der Amidgruppen durch die Anwesenheit des DPC reduziert. Es fällt auf, dass die aromatische Seitenkette des Tryptophan 76 (hier repräsentiert durch die Amidgruppe in der Seitenkette) eine der betragsmäßig größten Einschränkungen der Beweglichkeit erfährt.

4.1.4.6 Dynamikabschätzung über Linienbreiten im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum

Die Linienbreite eines Signals im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum ist stark abhängig von den dynamischen Eigenschaften der beobachteten Amidgruppe (Pervushin et al. 1997). Eine räumlich frei bewegliche, d.h. nicht in eine feste Struktur eingebundene Aminosäure verursacht Linienbreiten, die sich deutlich von der natürlichen Linienbreite unterscheiden (vgl. dazu auch Kapitel 3.17.2.4). Aus den gewonnenen Ergebnissen kann nicht direkt auf Sekundär- oder Tertiärstruktureffekte geschlossen werden. Ist ein beobachtetes Amidproton z.B. an einer Wasserstoffbrücke beteiligt und dadurch in seiner Beweglichkeit eingeschränkt, so kann dies von Sekundärstruktur- (z.B. α-Helix) oder Tertiärstrukturkontakten herrühren.

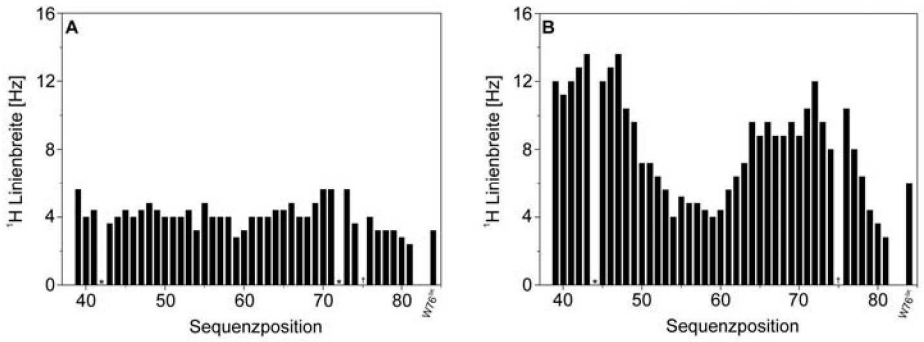


Abbildung 4.14: ^{1}H Linienbreiten ('scharf/scharf'-Komponente, vgl. Kap. 3.17.2.4) aus dem (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum für freies (A) und mizellengebundenes (B) VpUcyt. **A** Das freie VpUcyt zeigt eine durchweg uniforme Linienbreite von etwa 5 Hz. **B** In den lt. Sekundärstrukturanalyse (siehe Kapitel 4.1.4.4) helikalen Bereichen (Residuen 39 bis 48, 64 bis 70) tritt nach DPC-Zugabe eine deutlich erhöhte Linienbreite auf. Im Bereich der stabileren Helix 2 (39 bis 47) beträgt die Linienbreite im Schnitt 12 Hz, im Bereich der weniger stabilen Helix 3 (64 bis 70) im Schnitt 9 Hz. Die interhelikalen Residuen erfahren kaum eine Änderung der Linienbreite, ebenso der C-Terminus. Die Werte wurden mit Hilfe der Auswerteroutine CARA (Keller 2004) direkt aus dem Spektrum gewonnen. Die Position des P75 ist durch ein „†" markiert; Residuen, deren Linienbreite aufgrund großen Signalüberlapps nicht bestimmt werden konnte, sind mit einem „*" markiert. Die Spektren zur Bestimmung der Linienbreiten wurden bei 18,8 T aufgenommen.

Zur Analyse der Linienbreite wurde jeweils für freies und mizellengebundenes VpUcyt ein (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum mit einer Aufnahmezeit von 1 s aufgenommen, um Auswerteeffekte durch ein vorzeitiges Aufnahmeende des FID zu vermeiden. Während des TROSY-Experimentes wurde die Komponente zur Detektion ausgewählt, bei der sich die verschiedenen Relaxationsmechanismen nahezu aufheben und daher das schärfste Signal auftritt. Zusätzlich wurde der Datensatz ohne glättende Fensterfunktion prozessiert. Mit Hilfe des Auswerteprogrammes CARA (Keller 2004) wurde für jede Resonanz im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum das beobachtete NMR-Signal mit dem gleichen Linienformmodell (Gauss/Lorentz-Linie) mit variabler Linienbreite gefittet.

Abbildung 4.14 zeigt die ermittelten ^{1}H Linienbreiten für freies (A) und mizellengebundenes (B) VpUcyt. Während das freie VpUcyt über die gesamte Sequenz eine gleichmäßige Linienbreite von etwa 5 Hz zeigt, so tritt nach der Zugabe von 100 mM DPC eine deutliche Veränderung in der Dynamik des Proteins auf. Die Linienbreiten in den lt. Sekundärstrukturanalyse (siehe Kapitel 4.1.4.4) helikalen Bereichen nehmen deutlich, wenn auch nicht um denselben Betrag, zu. Die Residuen der ermittelten Helix 2, die lt. Sekundärshifts in 69 bis 85 % der Konformere auftritt, zeigen eine ^{1}H Linienbreite von durchschnittlich 12 Hz, die damit etwa um einen Faktor 3 höher liegt als die Linienbreite der Residuen des interhelikalen Bereiches um die phosphorylierbaren Serine 53 und 57. Die Linienbreiten im interhelikalen Bereich sind im Vergleich zum freien VpUcyt nahezu unverändert, die

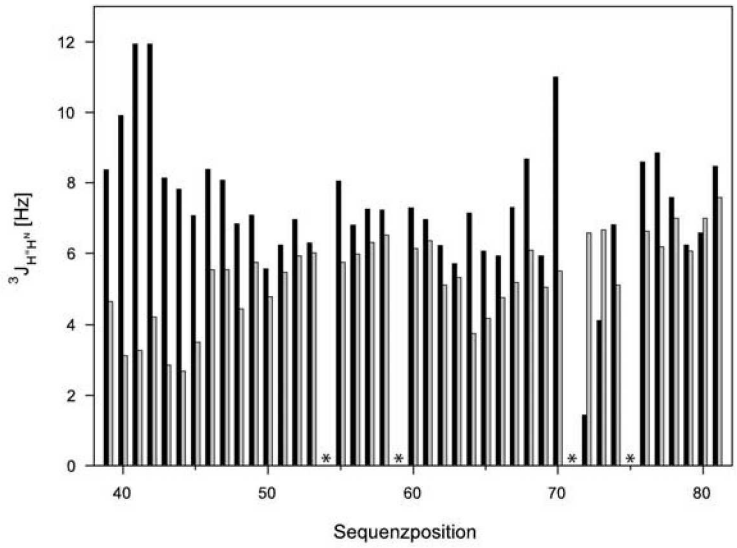


Abbildung 4.15: $^3J_{H^\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten für freies (schwarz) und mizellengebundenes (grau) VpUcyt. Die Intensitäten der einzelnen Resonanzen wurden aus dem 3D HNHA-Spektrum erhalten (Vuister & Bax 1993), die Integration der Intensitäten erfolgte mit Hilfe des Auswerteprogrammes CARA (Keller 2004). $^3J_{H^\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten weisen auf Sekundärstrukturelemente hin: 2 bis 4 Hz: α-Helix, 6 bis 8 Hz: ungeordnete Struktur, 8 bis 11 Hz: β-Faltblatt- und gestreckte Struktur. Glycine und das Prolin sind mit einem „$*$“ markiert.

Dynamik der beteiligten Amidgruppen scheint unbeeinflußt zu sein. Die Sekundärstrukturanalyse zeigte, dass Helix 3 in 28 bis 38 % der betrachteten Konformere vorhanden ist. Die daran beteiligten Residuen zeigen nach Zugabe von 100 mM DPC eine Linienbreitenerhöhung auf durchschnittlich 9 Hz, die damit etwa um einen Faktor 2 höher lieget als die Linienbreite der Residuen des interhelikalen und C-terminalen Bereiches. Der Unterschied in der Erhöhung der Linienbreiten der beiden helikalen Bereiche könnte ursächlich im unterschiedlichen Vorkommen der beiden Helizes in den betrachteten Konformeren liegen. Die Amid-Seitenkette des Tryptophan 76 zeigt eine signifikante Erhöhung der ^{1}H-Linienbreite. Es ist möglich, dass diese Seitenkette durch eine strukturelle Reorganisation in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt wird.

4.1.4.7 Bestimmung der skalaren $^3J_{H^\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten

Die Sekundärstrukturelemente eines Proteins unterscheiden sich unter anderem in den ^3J-Kopplungskonstanten zwischen Amidproton H^N und Alpha-Proton H^α, $^3J_{H^\alpha H^N}$ (siehe dazu auch Kapitel 3.17.2.5). Während α-helikale Strukturen $^3J_{H^\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten im Bereich von 2 bis 4 Hz zeigen, liegen diese Konstanten bei β-Faltblatt- und gestreckten

Strukturen zwischen 8 und 11 Hz (Vuister & Bax 1993). Ungeordnete Strukturen besitzen Kopplungskonstanten zwischen 6 und 8 Hz, die einen Mittelwert zwischen allen vorhandenen Strukturkonformeren darstellen. Eindeutige $^3J_{H^\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten eines globulär gefalteten Proteins können bei einer Verfeinerung der Strukturrechnung aus NOE-berechneten Distanzeinschränkungen dienen. Beim hier studierten VpUcyt handelt es sich jedoch um ein Protein mit nicht-uniformer Struktur und beträchtlicher interner Dynamik in einigen Bereichen (siehe dazu Ergebnisse aus den Kapiteln 4.1.4.5 und 4.1.4.6). Daraus ergibt sich, dass in diesen Bereichen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine gemittelte (über die Zeit und die Konformere) Kopplungskonstante gemessen wird.
Die $^3J_{H^\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten wurden jeweils für freies und mizellengebundenes VpUcyt durch Intensitätsvergleich der H^N- und H^α-Kreuzresonanzen im 3D HNHA-Spektrum ermittelt (siehe Kapitel 3.17.2.5). Die Integration der Resonanzen wurde mit Hilfe der Auswerteroutine CARA (Keller 2004) durchgeführt.
Abbildung 4.15 zeigt die ermittelten $^3J_{H^\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten für freies (schwarze Balken) und mizellengebundenes (graue Balken) VpUcyt. Das freie VpUcyt zeigt keine Anzeichen für das Vorhandensein von α-helikaler Struktur, der N-Terminus scheint im Gegenteil stark gestreckt zu sein. Das Protein zeigt im Wesentlichen Kopplungskonstanten, die auf ungeordnete Konformation schließen lassen. Nach Zugabe von 100 mM DPC kommt es zu einer allgemeinen Verschiebung der $^3J_{H^\alpha H^N}$-Kopplungskonstanten in Richtung α-helicaler Struktur. Laut Sekundärstrukturanalyse (Kapitel 4.1.4.4) befinden sich die Residuen 39 bis 48 in 69 bis 85 % der Konformere in α-helikaler Struktur. Abbildung 4.15 zeigt, dass die genannten Residuen tatsächlich Kopplungskonstanten aufweisen, die für die Existenz dieser Helix sprechen. Im Bereich von Helix 3 (Residuen 64 bis 70) ist eine signifikante Abnahme der Kopplungskonstanten feststellbar, der Mittelwert der betreffenden Konstanten liegt jedoch leicht über 4 Hz. Daraus kann geschlossen werden, dass dieser Sequenzbereich in einem Teil des betrachteten Konformerenensembles keine reguläre α-Helix aufweist und einem Konformationsaustausch unterliegt.

4.1.4.8 Bestimmung und Analyse der struktureinschränkenden Parameter aus NOE-Korrelationen

Zur Analyse der räumlichen Struktur wurde das VpUcyt nur im mizellengebundenen Zustand untersucht, da im ungebundenen Zustand aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse nicht mit einer expliziten Raumstruktur zu rechnen war.

Die Zuordnung der intramolekularen (^{1}H-^{1}H)-NOE-Korrelationen wurde wie bereits in Kapitel 3.17.3 beschrieben automatisiert mit dem Programm RADAR durchgeführt. RADAR verknüpft die Programme ATNOS (Herrmann et al. 2002a) und CANDID (Herrmann et al. 2002b), die auf Raumstrukturberechnungen mittels Torsionswinkeldynamik durch das Programm CYANA (Güntert et al. 1997) beruhen.
Es standen für RADAR zur Strukturanalyse und -berechnung das in H_2O aufgenommene aliphatische 3D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY-Spektrum, das in D_2O aufgenommene aliphatische 3D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY-Spektrum, das 3D (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-NOESY-

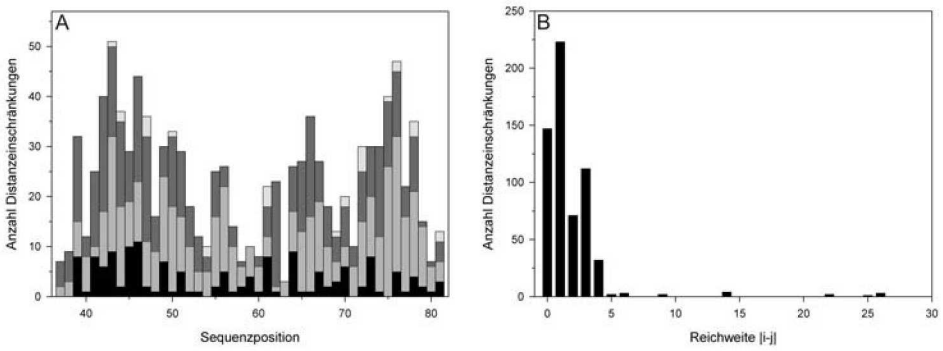


Abbildung 4.16: Anzahl der zur Berechnung der räumlichen Struktur verwendeten Distanzeinschränkungen. **A** Anzahl der verwendeten intramolekularen Distanzeinschränkungen pro Sequenzposition der Residue. Schwarz: intraresiduelle ($|i-j|=0$), hellgrau: sequenzielle ($|i-j|=1$) Distanzeinschränkungen, dunkelgrau: Distanzeinschränkungen mittlerer ($2 \leq |i-j| \leq 5$) und weiß: großer ($|i-j|>5$) sequenzieller Reichweite. **B** Anzahl in Abhängigkeit von ihrer sequenziellen Reichweite.

HSQC-Spektrum und das 2D aromatische (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY-Spektrum zur Verfügung.
Die Indentifizierung von NOE-Signalen, sowie die Berechnung der räumlichen Struktur geschah zunächst in einem iterativen Verfahren. Nach der Berechnung der räumlichen Struktur wurden die ermittelten Distanzeinschränkungen in einem interaktiven Prozess manuell untersucht. Fehlerhafte NOE-Korrelationen wurden gelöscht und manuell gefundene hinzugefügt. Die modifizierten Listen der Distanzeinschränkungen wurden anschließend in eine erneute Berechnung mittels CYANA eingegeben; dieser Prozess wurde daraufhin wiederholt.

In Abbildung 4.16 A ist die Anzahl der zur Berechnung der räumlichen Struktur verwendeten Distanzeinschränkungen pro Aminosäurerest dargestellt. Es fällt auf, dass die Anzahl der Distanzeinschränkungen mit der Sequenzposition variiert und besonders in den ausgewiesenen flexiblen Bereichen abnimmt. Abbildung 4.16 B zeigt diese Anzahl der Distanzeinschränkungen in Abhängigkeit von ihrer sequenziellen Reichweite. Die Berechnung der räumlichen Struktur wird besonders von Distanzeinschränkungen kleiner und mittlerer (d.h. $|i-j| \leq 5$) Reichweite bestimmt, da nur wenige langreichweitige Kontakte zu finden sind. Die tertiäre Faltung der berechneten Modellstruktur wird im Wesentlichen von diesen wenigen langreichweitigen Kontakten definiert, die dadurch ein deutliches Übergewicht in der Rechnung erhalten. Offensichtlich besitzt das Protein eine interne Dynamik, die die zeitlich konstante Ausbildung einer Tertiärstruktur verhindert. Die gefundenen langreichweitigen Kontakte spiegeln daher nur eine zeitlich begrenzt auftretende Konformation wider.

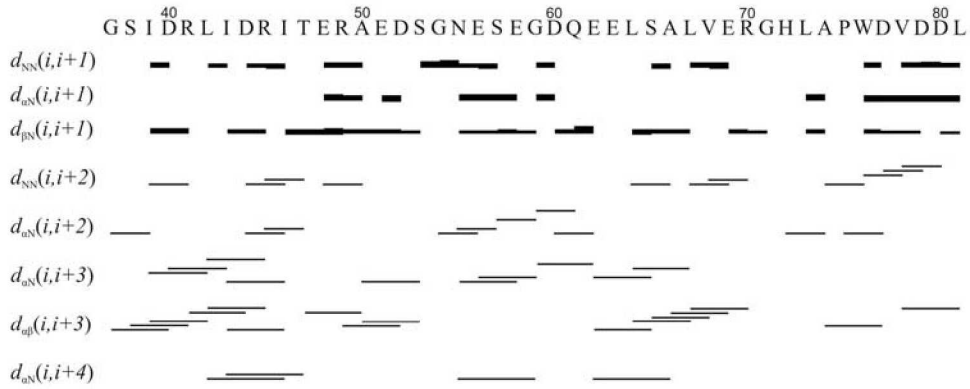


Abbildung 4.17: Sekundärstrukturtypische NOE-Kreuzkorrelationen für mizellengebundenes VpUcyt. α-helikal typische Korrelationen (z.B. $d_{NN}(i,i+1)$, $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$) sind für die in der Sekundärstrukturanalyse (Kapitel 4.1.4.4) gefundenen Bereiche I39 bis E48, sowie L64 bis R70 zu finden. Weitere auftretende $d_{\alpha N}(i,i+3)$-Korrelationen im Bereich N55-G59 lassen das Vorhandensein einer kleinen Helix vermuten. Die für β-Stränge typischen starken $d_{\alpha N}(i,i+1)$-Korrelationen lassen sich allenfalls nur im Bereich um die möglichen Phosphorylierungsstellen (S53 und S57) sowie am C-Terminus des Proteins finden und fehlen komplett im Bereich der gefundenen Helizes.

4.1.4.9 3D-Strukturberechnung und -analyse

Die 604 gewonnenen Distanzeinschränkungen wurden für die Berechnung der räumlichen Struktur des VpUcyt mittels CYANA verwendet. Durch Torsionswinkeldynamik-Simulationen wurde, ausgehend von Zufallskonformationen des Moleküls, eine Schar von 100 Strukturen berechnet, wobei die Erfüllung der NOE-abgeleiteten Einschränkungen dazu unter anderem als Zielfunktion dient. Die Strukturberechnung im Torsionswinkelraum besitzt den Vorteil, dass die Bindungslängen während der Simulation konstant gehalten werden können. Die Berechnung der Torsionswinkel erfolgt ausgehend vom Aminoterminus für die gesamte Polypeptidkette.
Die Strukturberechnung resultierte in einer konvergierenden Schar der 100 Konformere. Die Güte der Berechnung lässt sich aus den einzelnen CYANA-Zielfunktionen schließen, in welche die Erfüllung der experimentellen Einschränkungen sowie der van-der-Waals-Abstände eingeht.
Die Analyse der Strukturberechnungen wurde mit den Programmen PROCHECK-NMR (Laskowski et al. 1996) und MOLMOL (Koradi et al. 1996) durchgeführt.

Die Liste der Distanzeinschränkungen kann nach Korrelationen durchsucht werden, die typisch für das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen sind. Muster dieser Kreuzkorrelationen lassen auf die Größe und Ausdehnung der jeweiligen Sekundärstrukturelemente schließen. α-Helizes werden unter anderem charakterisiert durch starke Korrelationen zwischen benachbarten Amidprotonen ($d_{NN}(i,i+1)$) und längereichweitige Raumkopplungen

($d_{\alpha N}(i, i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$). Zusätzlich dazu treten Korrelationen zwischen jeweils dem Alpha- und Betaproton einer Aminosäure und dem Amidproton der darauffolgenden Aminosäure auf ($d_{\alpha N}(i, i+1)$, $d_{\beta N}(i, i+1)$). β-Strang-Konformationen dagegen weisen starke Kreuzkorrelationen jeweils zwischen Beta- und Alphaproton einer Residue und Amidproton der darauffolgenden Residue ($d_{\alpha N}(i, i+1)$ und $d_{\beta N}(i, i+1)$) auf. Abbildung 4.17 stellt die ermittelten NOE-Kreuzkorrelationen für die jeweiligen sekundärstrukturtypischen Kontakte dar. Aus dem Diagramm lässt sich ablesen, dass für die in Kapitel 4.1.4.4 abgeleiteten Sekundärstrukturelemente tatsächlich auch die typischen Kreuzkorrelationen auftreten und somit das Vorhandensein dieser Elemente bestätigt wird. Helix 2 (I39 bis E48) wird durch die für α-Helizes typischen NOE-Korrelationen ($d_{\alpha N}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$) eindeutig festgelegt, während Helix 3 (L64 bis R70) zwar durch die typischen $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$-Korrelationen bestimmt wird, jedoch z.B. $d_{\alpha N}(i, i+3)$-Korrelationen durchweg fehlen. Das könnte darauf hindeuten, dass diese Helix weniger rigide ist und nur in einem Teil des beobachteten Ensembles auftritt.
Die aus den Distanzeinschränkungen berechnete Konformerenschar kann im Bezug auf die ermittelten Sekundärstrukturelemente analysiert werden. Die gewählten Elemente der Einzelstrukturen werden überlagert ('gefittet'), daraufhin kann die mittlere quadratische Abweichung (root mean square, RMSD) als Maß für die Abweichung vom Sekundärstrukturelement des energieärmsten Konformers berechnet werden. Abbildung 4.18 A und B zeigt die jeweilige Überlagerung der Konformerenschar im Bezug auf das jeweilige gewählte Sekundärstrukturelement. Abb. 4.18 A zeigt die Region g(-2) bis A50, in der die zur Helix 2 gehörenden Residuen I39 bis E48 überlagert wurden. Überlagert man die Rückgratschweratome, dann erhält man einen RMSD-Wert von 0,268 Å, fittet man diese Region mit allen Schweratompositionen, dann erhält man einen RMSD-Wert von 0,810 Å. Die Region E62 bis H72, welche Helix 3 (L64 bis R70) beinhaltet, ist in Abbildung 4.18 B dargestellt. Die Überlagerung der Residuen L64 bis R70 liefert einen RMSD-Wert für die Rückgratschweratome von 0,305 Å und von 0,914 Å für alle Schweratome in diesem Bereich. Man erkennt deutlich, dass auch die Residuen E62 und E63 tendenziell α-helikale Struktur annehmen. Die etwas schlechtere Definiertheit der Helix 3 in Vergleich zu Helix 2, ausgedrückt durch den größeren RMSD, könnte ein weiterer Hinweis für die etwas geringere Helixrigidität von Helix 3 sein. Der C-Terminus ist im Bereich der Residuen H72 bis D79 durch eine hohe Anzahl an Distanzeinschränkungen (Abb. 4.16 A) wohldefiniert. Aus der berechneten Konformerenschar lässt sich nicht eindeutig ableiten, ob sich die genannten Aminosäuren in einer festen 'Loop'-Struktur oder in einem kurzen Helixelement befinden.

Abbildung 4.18 C zeigt die Überlagerung von 20 berechneten Konformeren des gesamten VpUcyt-Proteins, Abbildung 4.18 D die 'Ribbon'-Darstellung des Proteinrückgrates des energieärmsten Konformers. Die Überlagerung der Strukturen zeigt deutlich, dass die berechnete Konformerenschar dieselbe tertiäre Faltung aufweist, es jedoch Bereiche gibt, die weniger gut definiert sind. Neben den beiden Proteintermini betrifft dies vor allem den Sequenzbereich um die Phosphorylierungsstellen (S53 und S57), sowie die Residuen am N-terminalen Ende von Helix 3. Die Studien der dynamischen Eigenschaften des Proteins (siehe Kapitel 4.1.4.5 und 4.1.4.6) und der Helixanteile im Bezug auf das betrachtete

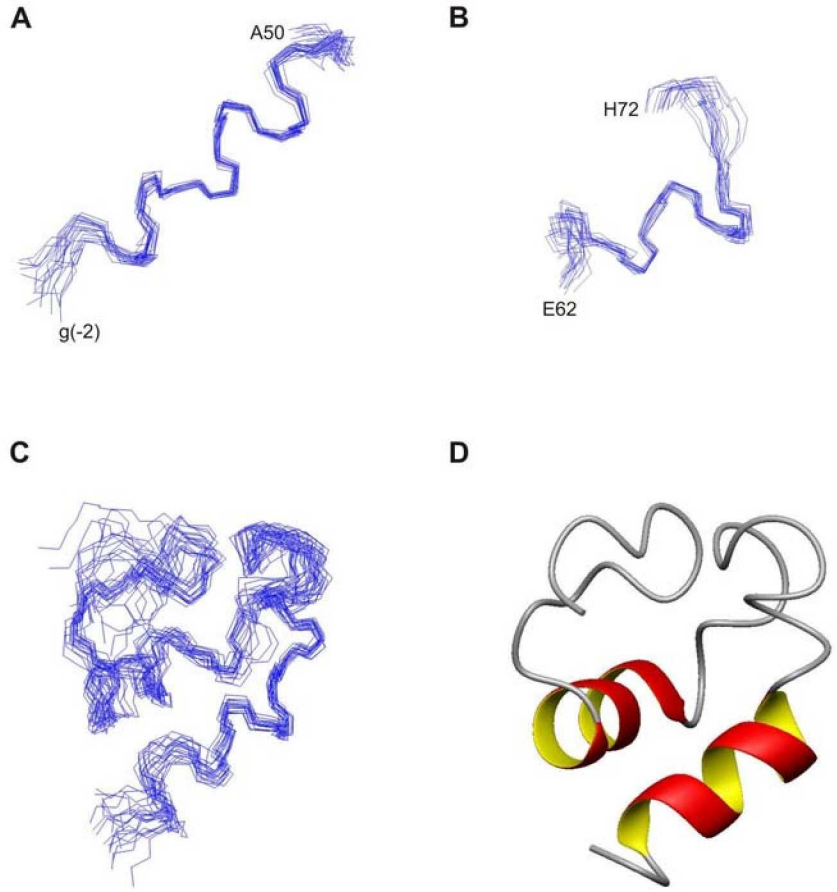


Abbildung 4.18: Strukturenschar von 20 Konformeren aus der Strukturberechnung für das mizellengebundene VpUcyt. **A** Darstellung der Residuen g(-2) bis A50, bei der die Rückgratschweratome der Residuen 39 bis 48 überlagert wurden (Erklärung siehe Text; Rückgrat-RMSD: 0,268 Å; Schweratom-RMSD: 0,810 Å). **B** Darstellung der Residuen E62 bis H72, bei der die Rückgratschweratome der Residuen 64 bis 70 überlagert wurden (Rückgrat-RMSD: 0,305 Å; Schweratom-RMSD: 0,914 Å). Man erkennt, dass auch die Residuen E62 und E63 Anzeichen einer α-helikalen Struktur zeigen. Jedoch nimmt die Strukturungenauigkeit in diesem Bereich zu. **C** Darstellung aller Residuen (37 bis 81) des VpUcyt. Es wurden die Residuen 39 bis 78 überlagert. Die große Flexibilität in den terminalen Bereichen ist zu erkennen, ebenso die unterschiedliche Definiertheit der Strukturelemente. **D** 'Ribbon'-Darstellung des Proteinrückgrates eines Konformers aus der Strukturenschar. Der N-terminalen Helix 2 folgt ein strukturell gut definierter Bereich, der die beiden phosphorylierbaren Serine 53 und 57 beinhaltet. In einigen der berechneten Strukturen beinhaltet diese Region 1 bis 2 Windungen einer Helix, die jeweils ein Serin beinhalten. Der anschließenden Helix 3 folgt der C-terminale Loop, dessen Ende nur schlecht definiert ist.

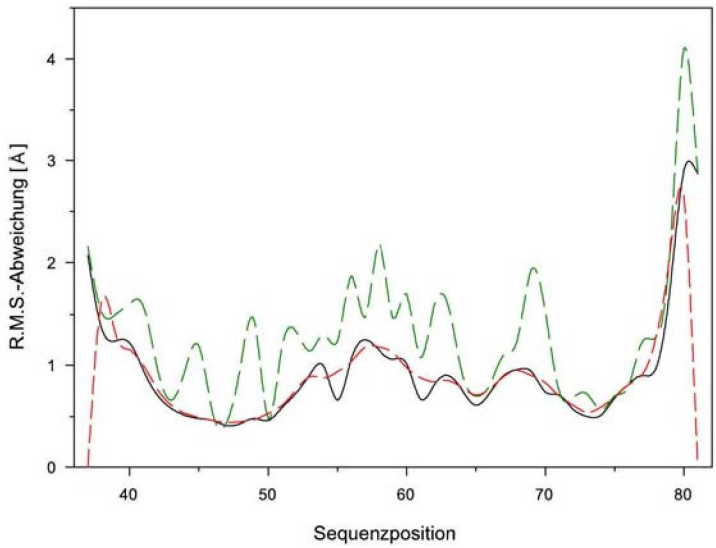


Abbildung 4.19: Koordinatenpräzision der berechneten Grenzstruktur des VpUcyt-Proteins. Dargestellt sind die über die Strukturenschar gemittelten, paarweisen RMSD-Werte der Atomkoordinaten relativ zur mittleren Struktur pro Sequenzposition. Schwarz: Globale Abweichung aller Schweratompositionen des Proteinrückgrates; Grün: Globale Abweichung aller Schweratompositionen; Rot: lokale Abweichung der Rückgratschweratompositionen in Aminosäure-Dreiergruppen. Es wird deutlich, dass die Termini des Proteins weniger gut definiert sind als die restlichen Bereiche. Die Atompositionen sind besonders im Bereich der Helix 2 genau bestimmt. Die Berechnung der ermittelten Werte erfolgt mit Hilfe von MOLMOL (Koradi et al. 1996).

Proteinensemble (siehe 4.1.4.4) zeigen eindeutig, dass das VpUcyt-Protein nicht konstant über die Zeit in eine Tertiärstruktur gefaltet ist. Die in einer Fraktion des betrachteten Ensembles vorhandene tertiäre Faltung des VpUcyt-Proteins wird daher als 'Grenzstruktur' bezeichnet. In dieser kurzen Zeit können jedoch NOE-Korrelationen auftreten und detektiert werden, die langreichweitige Kontakte widergeben. Durch die Natur des NOE kann aber nicht auf die zeitliche Dimension seines Auftretens geschlossen werden, sodass diese nur kurzzeitig auftretenden langreichweitigen NOEs ein Übergewicht in der Strukturberechnung erhalten und damit eine Struktur anzeigen, die vorhanden, aber nicht über den gesamten Zeitraum stabil ist. Daher kann die durch die NOE-Distanzeinschränkungen gefundene 'Grenzstruktur' nur als solche beschrieben werden. Das VpUcyt nimmt diese Struktur an, allerdings nur zu einem gewissen Teil des beobachteten Zeitraumes. Es kann dementgegen jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich verschiedene Tertiärfaltungen existieren, von denen keine langreichweitigen NOE-Kontakte festgestellt werden können.

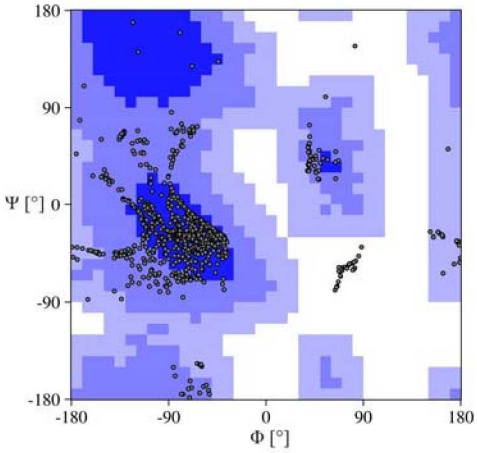


Abbildung 4.20: Ramachandran-Plot der berechneten Strukturen von mizellengebundenem VpUcyt. Dargestellt sind die Φ- und Ψ-Torsionswinkel für alle Aminosäuren der 20 berechneten Konformere des Proteins in Grad. Dunkelblau: Bevorzugte Regionen (Oben links: β-Faltblatt-Konformation; Mitte links: rechtsgängige α-Helix; Mitte rechts: linksgängige α-Helix und 3_{10}-Helix); Blau: Erlaubte Regionen; Hellblau: Weitgehend erlaubte Regionen. Glycine können aufgrund ihrer fehlenden Seitenkette jede beliebige Φ-/Ψ-Torsionswinkelkorrelation im Ramachandran-Plot einnehmen.

Die Grenzstruktur (Abbildung 4.18 D) des VpUcyt zeigt die beiden Helizes 2 und 3 in nahezu antiparalleler Stellung zueinander. Der interhelikale Bereich um die Serine 53 und 57 liegt nahezu senkrecht zu den Helizes, und ist in Kontakt mit dem C-Terminus, der in das Protein hineingefaltet ist. In einigen Konformeren der berechneten Strukturenschar zeigen sich jeweils 3_{10}-Helizes im Bereich der Serine, in einem geringen Teil der Strukturenschar auch im C-Terminus (Residuen V78 bis D80).
Die Konvergenz der Konformerenschar lässt sich durch die RMSD-Werte untersuchen, die auf der Berechnung von Koordinatendifferenzen der Atompositionen zwischen den verschiedenen Konformeren beruhen (Abbildung 4.19). Es ist eine deutlich verminderte Koordinatenpräzision im Bereich der Proteintermini zu erkennen (Aminosäuren G37 bis S38 und D79 bis L81), für die auch nur eine geringe Anzahl an Distanzeinschränkungen vorlag (siehe Abb. 4.16). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die genau definierten Helizes die größte Koordinatenpräzision in Bezug auf die mittlere Struktur besitzen. Abgesehen von den Termini erreicht die Koordinatenabweichung aufgrund einer geringen Anzahl von Distanzeinschränkungen ihr Maximum im Bereich von Serin 57, das ein potentielles Ziel für die Phosphorylierung darstellt. Die Analyse in den letzten Kapiteln hat gezeigt, dass die Flexibilität in diesem Bereich größer ist als in den umliegenden Bereichen.

Die berechneten Strukturen können mit Hilfe des Ramachandran-Plot (Ramachandran et al. 1963) weiter analysiert werden. In diesem Diagramm werden die Φ- und Ψ-Torsionswinkel der einzelnen Aminosäuren gegeneinander aufgetragen. Die sterisch erlaubten Konformationen für Aminosäuren in einem Polypeptid können vollständig durch die Rotationswinkel Φ und Ψ beschrieben werden. Es handelt sich dabei um diejenigen Winkel, welche die N-C_α- und die CO-C_α-Bindungen einschließen (siehe auch Abbildung 1.7). Demzufolge befinden sich die Reste in „bevorzugten“ Regionen der Darstellung, die in definierte Sekundärstrukturelemente eingebunden sind. Glycine besitzen ein Proton anstatt einer Methylgruppe an der β-Position, daher ist die Einschränkung wegen des

geringeren van-der-Waals-Radius geringer. Daher ist der erlaubte Bereich für Glycine im Ramachandran-Plot deutlich größer. Der prozentuale Anteil von Aminosäuren, deren Φ-/Ψ-Torsionswinkel in diesen erlaubten Regionen auftreten, gibt somit ein Maß für die Güte der berechneten Strukturparameter wider.
Abbildung 4.20 zeigt den Ramachandran-Plot für die 20 energieärmsten berechneten Strukturkonformere, von deren Aminosäuren über 97 % innerhalb von erlaubten Bereichen zu finden sind (58 % in bevorzugten Regionen, 31 % in erlaubten Regionen, 6 % in weitgehend erlaubten Regionen). Aminosäurepositionen mit abweichenden Φ-/Ψ-Torsionswinkelkoordinaten befinden sich in den Strukturbereichen geringerer Koordinatenpräzision, vor allem im carboxyterminalen Bereich des Proteins.

Mit Hilfe der molekülvisualisierenden Programme wie MOLMOL (Koradi et al. 1996) ist es möglich, die Oberfläche des Proteins über die van-der-Waals-Radien der Atome zu berechnen. Zusätzlich dazu können die geladenen Residuen (Positiv: Arginin; Negativ: Asparaginsäure und Glutaminsäure) farbig visualisiert werden. Durch die Oberflächendarstellung können potentielle Bindungsstellen und/oder Ladungsmuster erkannt und weiter analysiert werden.
Abbildung 4.21 zeigt die Oberflächendarstellung des energieärmsten Konformers des VpUcyt. Die Aminosäuresequenz des VpUcyt (Abb. 4.1) zeigt 14 negativ und 4 positiv geladene Residuen, was die überwiegend negativ geladene Oberfläche des Proteins erklärt. Die positiven Bereiche sind den Seitenketten der Arginine zuzuschreiben, die prominenteste positive Region befindet sich im Bereich der Helix 2 (Arginine 41, 45 und 49). In seiner *in vivo*-Situation schließt sich dem N-Terminus des hier verwendeten Konstruktes ein Bereich basischer Aminosäuren und die Transmembrandomäne an. Definiert man dadurch den N-Terminus des VpUcyt als membranproximal, dann repräsentiert das VpUcyt seine negative Oberfläche in das Zytosol. Auch die phosphorylierbaren Serine 53 und 57 sind damit frei zugänglich für mögliche Bindepartner.

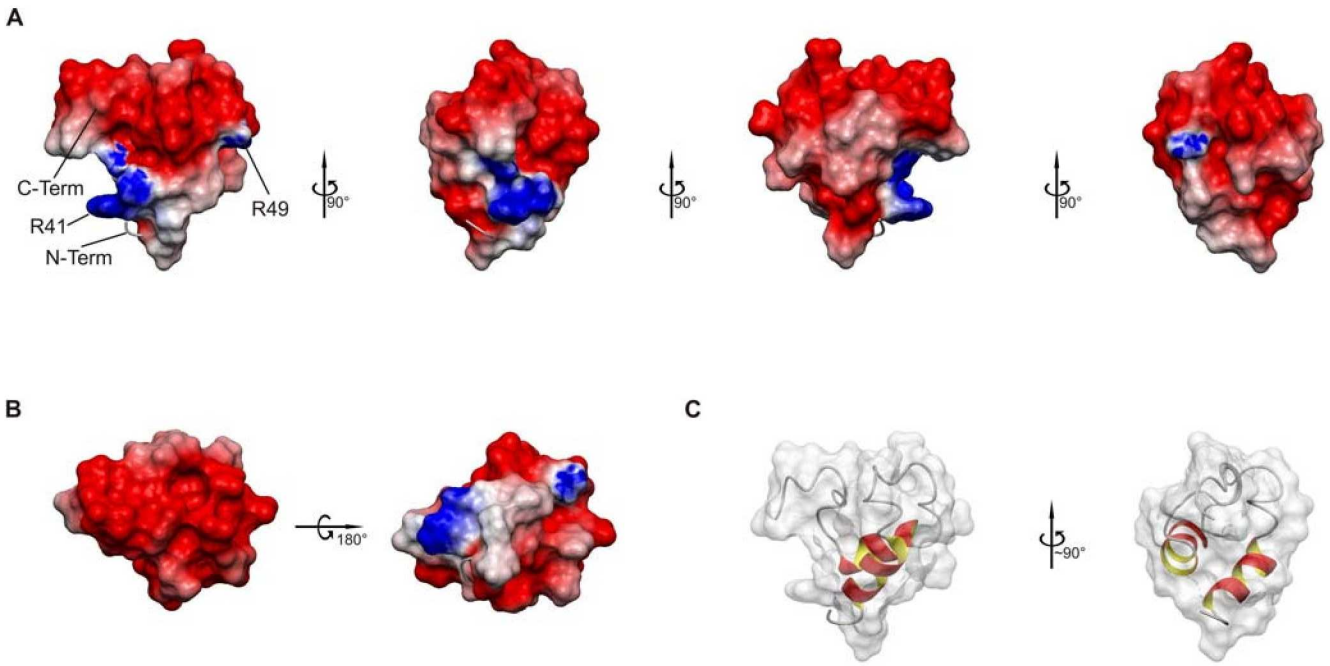


Abbildung 4.21: Oberflächendarstellung des energieärmsten Konformers der VpUcyt-Strukturberechnung. Die negativ geladenen Residuen sind in rot, die positiv geladenen Residuen in blau dargestellt. **A** 'Seitenansicht' des VpUcyt-Proteins. Das Protein ist im Wesentlichen negativ geladen, es besitzt nur im Bereich der Helix 2 durch die Arginine eine positiv geladene Oberfläche. **B** Ansicht von 'oben' (links) und von 'unten' (rechts). **C** Oberflächendarstellung mit darin gezeigter 'Ribbon'-Darstellung des Proteinrückgrates.

4.1.5 NMR-Spektroskopie an mizellengebundenem, phosphoryliertem VpUcyt ($VpUcyt^{2P}$)

4.1.5.1 Einfuss der Mizellenumgebung auf den Phosphorylierungsprozess

Das VpUcyt besitzt zwei Serine (S53 und S57), die von der Casein Kinase II phosphoryliert werden können (Schubert et al. 1994; siehe Kapitel 1.3.3). Im phosphorylierten Zustand kann das Protein durch Faktoren des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes gebunden werden. Ist das VpUcyt dann gleichzeitig an das CD4 gebunden, so wird über den Komplex das CD4 zur Degradation durch das Proteasom markiert. Diese biologische Funktion des VpU-Proteins hängt entscheidend vom Phosphorylierungszustand ab.

a. Einfluss der Mizellenumgebung auf den Phosphorylierungsprozess; Reversibilität der Phosphorylierung

Um einen möglichen Einfluss der Membranumgebung während des Phosphorylierungsvorganges auszuschließen, wurden zwei getrennte Experimente durchgeführt. Zum einen wurde 1 mM VpUcyt in DPC-freiem NMR-Puffer aufgenommen, mit 4000 U CK-II, 4 mM ATP und 10 mM $MgCl_2$ versetzt und 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden 100 mM DPC hinzugegeben und ein (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum aufgenommen. Zum anderen wurde 1 mM VpUcyt in DPC-enthaltenden NMR-Puffer aufgenommen, mit 4000 U CK-II, 4 mM ATP und 100 mM $MgCl_2$ versetzt und ebenfalls 2 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Durchführung eines (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Experimentes wurden die Spektren der beiden unter An- bzw. Abwesenheit von DPC phosphorylierten Proteine verglichen, die sich als identisch herausstellten. Damit kann ein Einfluss der Mizellenumgebung auf den Phosphorylierungsprozess ausgeschlossen werden.

Die Reversibilität des Phosphorylierungsprozesses wurde mit der „Shrimps Alkalinen Phosphatase“ (SAP, MBI Fermentas) überprüft. Dazu wurde die Probe mit dem phosphorylierten VpUcyt nach Beendigung der Experimente mit 30 U SAP versetzt und für 1,5 h bei 30 °C inkubiert. Ein anschließendes (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Experiment zeigte die Identität mit dem Ausgangsspektrum vor Beginn des Phosphorylierungsprozesses.

b. Vorbereitung des $VpUcyt^{2P}$ für NMR-Proben

Spektren mit Aussagen über das dynamische Verhalten können nur dann untereinander verglichen werden, wenn das beobachtete, in verschiedenen Zuständen vorliegende Protein jeweils im gleichen Puffersystem gelöst ist. Das bedeutet im einzelnen, dass das VpUcyt nach der Phosphorylierung von Kinase und Kofaktoren gereinigt werden musste. Dazu wurde das Protein wie oben beschrieben phosphoryliert und anschließend mittels Reversed Phase Chromatographie (siehe Kapitel 3.12.5) gereinigt. Zur Messung wurden NMR-Proben in selber Weise wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben präpariert.

Die Masse des phosphorylierten und nicht-phosphorylierten VpUcyt wurde mittels 'Electron Spray Ionization Mass Spectroscopy (ESI-MS)' bestimmt. Es wurde für das nicht-phosphorylierte VpUcyt eine Masse von 5009 Da (theoretisch: 5009 Da) und für das phosphorylierte Protein von 5169 Da (theoretisch: 5169 Da) ermittelt.

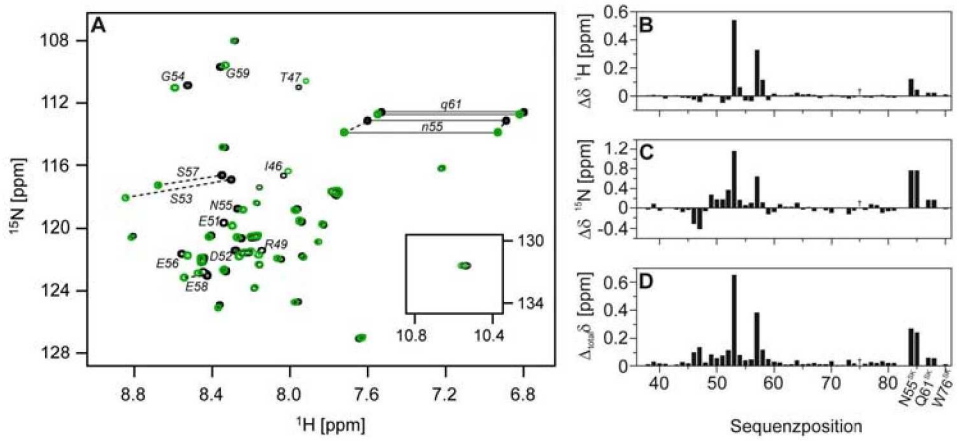


Abbildung 4.22: **A** (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektren von phosphorylierten (grün) und nicht-phosphorylierten (schwarz) S53 und S57 des VpUcyt in 100 mM DPC-d38 bei 30 °C und pH 6,2. Die Phosphorylierung verursacht große Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Amidgruppe der betroffenen Serine. Residuen, die signifikante Resonanzverschiebungen erfahren, sind beschriftet. Proteinrückgrat- und Seitenkettenresonanzen sind durch große bzw. kleine Buchstaben angedeutet. Das Insert zeigt die H^{N}N-Korrelation des Indolrings von W76. **B-D** Histogramme der Änderungen der chemischen Verschiebungen der H^{N} (**B**) und N (**C**) Resonanzen in Folge der Phosphorylierung. Die totale Änderung der chemischen Verschiebungen (**D**) wurde mittels der Gleichung $\Delta_{total}\delta = ((\Delta\delta H)^2 + (0,1 \cdot \Delta\delta N)^2)^{1/2}$ berechnet (Schweimer et al. 2002). Die Position des P75 ist mit einem Kreuz (†) markiert.

4.1.5.2 Kartierung und Zuordnung der chemischen Verschiebungen des VpUcyt^{2P}

Die Resonanzfrequenz eines Kernspins spiegelt die effektive magnetische Flußdichte am Ort des Spins wider und hängt von der Magnetfeldstärke und der elektronischen Umgebung des Kerns ab. Die genaue Position eines NMR-Signals wird von chemischen Modifikationen beeinflußt, wenn diese die lokale Elektronendichte ändern. Die chemischen Verschiebungen der Proteinrückgratatome werden weitgehend durch die Geometrie des Proteins, Wasserstoffbrücken und der Seitenkette der Residue mitbestimmt (Wishart & Case 2001). Charakteristische sekundäre chemische Verschiebungen (vgl. Kapitel 4.1.4.4) sind ein sensitiver Indikator für Sekundärstrukturelemente. Allerdings können chemische Modifikationen einer Aminosäure substanzielle Änderungen der chemischen Verschiebungen verursachen, die nicht unbedingt mit Sekundärstruktureffekten in Verbindung stehen. Beispielsweise kann die Phosphorylierung von Serinen in unstrukturierten Proteinen zu Änderungen in den chemischen Verschiebungen führen, die in derselben Größenordnung liegen wie die Änderungen duch die Formation von Sekundärstrukturelementen (Bienkiewicz & Lumb 1999).
Abbildung 4.22 A zeigt eine Überlagerung der (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektren von phos-

phoryliertem (grün) und nicht-phosphoryliertem (schwarz) VpUcyt in mizellenhaltiger Lösung. Der größte Teil der Seitenketten- und Rückgratamidkorrelationen konnte per Vergleich identifiziert werden. Alle $^{13}C_{\alpha\beta}$-chemischen Verschiebungen und die restlichen Amidkorrelationen konnten mit Hilfe des 3D Tripelresonanz-Spektrums HNCACB (Wittekind & Mueller 1993) zugeordnet werden. Die sequenzspezifische Zuordnung der Carbonylkohlenstoffresonanzen ^{13}CO erfolgte über ein 3D HNCO-Experiment (Ikura et al. 1990); die chemischen Verschiebungen der H^{α}-Resonanzen konnten mittels eines 3D HNHA-Experimentes (Vuister & Bax 1993) zugeordnet werden. In der angegebenen Abbildung wurden nur Resonanzen beschriftet, die eine signifikante Verschiebung aufgrund der Phosphorylierung erfahren. Große chemische Verschiebungen sind für das S53 und das S57 festzustellen, zusätzlich sind kleine, aber signifikante Verschiebungen für alle Residuen im Bereich I46 bis G59 und die Seitenkettenamide von N55 und Q61 messbar.
Die Phosphorylierung von Serinen in unstrukturierten Peptiden verursacht Änderungen der chemischen Verschiebung in der Größenordnung von $\Delta\delta^{HN} \sim 0,3$ ppm und $\Delta\delta^{N} \sim -0,2$ ppm (monoanionische Phosphatgruppe) oder $\Delta\delta^{HN} \sim 1$ ppm und $\Delta\delta^{N} \sim 2,8$ ppm (dianionische Phosphatgruppe) im Vergleich zum unphosphorylierten Peptid (Wishart & Case 2001). Die beobachteten Verschiebungen des S53 ($\Delta\delta^{HN} \sim 0,5$ ppm; $\Delta\delta^{N} \sim 1,2$ ppm) und des S57 ($\Delta\delta^{HN} \sim 0,3$ ppm; $\Delta\delta^{N} \sim 0,6$ ppm) liegen zwischen diesen Werten. Der pKa des Gleichgewichtes zwischen der mono- und dianionischen Form der phosphorylierten Serine liegt um 6 (Bienkiewicz & Lumb 1999). Beim gewählten pH von 6,2 sind beide Formen ungefähr gleich populiert. Aufgrund des schnellen Austausches zwischen beiden Formen kommt es zu einer gemittelten chemischen Verschiebung im gewonnenen Datensatz. Die substanziellen $\Delta\delta^{HN}$ und $\Delta\delta^{N}$ chemischen Verschiebungen der Serine 53 und 57 im $VpUcyt^{2P}$ resultieren daher größtenteils direkt aus der geänderten Elektronendichte. Die geringfügigen Änderungen im Bereich I46 bis G59 können strukturelle oder dynamische Änderungen aufgrund sterischer oder elektrostatischer Effekte duch die kovalente Ankopplung der Phosphatgruppen widerspiegeln (Abbildung 4.22 B bis D).

4.1.5.3 Sekundärstrukturanalyse mittels chemischer Verschiebungen

Abbildung 4.23 zeigt den Einfluss der Serin-Phosphorylierung auf die Sekundärstruktur des VpUcyt, basierend auf $\Delta\delta\ ^{13}C_{\alpha} - \Delta\delta\ ^{13}C_{\beta}$-Werten, welche die Sensitivität der $^{13}C_{\alpha}$ und $^{13}C_{\beta}$ chemischen Verschiebungen für die Sekundärstruktur eines Proteins widerspiegelt. $^{13}C_{\alpha}$-Resonanzen zeigen eine mittlere Tieffeldverschiebung von etwa 2,5 ppm in Helizes und eine mittlere Hochfeldverschiebung von etwa 2,0 ppm in β-Faltblättern relativ zu ihren Verschiebungen in ungeordneter ('random coil') Struktur, während $^{13}C_{\beta}$-Verschiebungen geringe Änderungen der chemischen Verschiebung in Helizes, aber große Tieffeldverschiebungen von etwa 2,5 ppm in β-Faltblättern erfahren (Wishart & Case 2001). Die Änderungen in den chemischen Verschiebungen, $\Delta\delta\ ^{13}C_{\alpha}$ und $\Delta\delta\ ^{13}C_{\beta}$, repräsentieren die Differenz zwischen den gemessenen $^{13}C_{\alpha}$ und $^{13}C_{\beta}$ chemischen Verschiebungen und tabellierten Werte für den 'random coil'-Zustand (Wishart et al. 1995a). In einem Diagramm, in

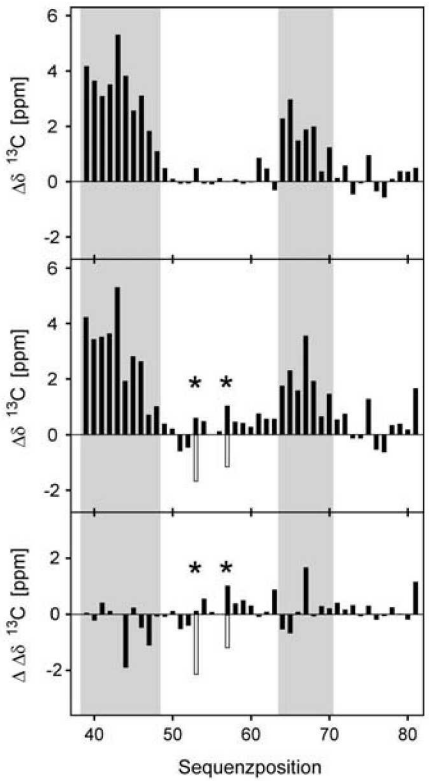


Abbildung 4.23: Effekt der Phosphorylierung von S53 und S57 auf die Sekundärstruktur des VpUcyt in mizellenhaltigem Puffer (100 mM DPC-d38) bei 30 °C. Die beiden oberen Panele zeigen die Änderung $\Delta\delta^{13}C = \Delta\delta C_\alpha - \Delta\delta C_\beta$ für das unphosphorylierte (oben) und das phosphorylierte (Mitte) VpUcyt. $\Delta\delta$ beschreibt dabei den Unterschied zwischen den beobachteten und den tabellierten 'random coil'-Werten (Wishart et al. 1995a). Das untere Panel gibt die Differenz zwischen den $\Delta\delta$-Werten der oberen beiden Panele an (phosphoryliert - unphosphoryliert). Die Position der beiden Serine ist durch Sterne („*“) angedeutet. Die 'random coil' chemischen Verschiebungen der Serine 53 und 57 wurden für die direkten, durch die Phosphorylierung verursachten Verschiebungen korrigiert. Es wurde zum einen eine monoanionische (gefüllte Balken) und zum anderen eine dianionische (offene Balken) Phosphatgruppe angenommen (Bienkiewicz & Lumb 1999). Die beiden in VpUcyt gefundenen Helizes (Residuen 39 bis 48 und 64 bis 70, hier angedeutet durch graue Unterlegung) scheinen kaum von der Phosphorylierung betroffen zu sein.

dem $\Delta\delta^{13}C = \Delta\delta C_\alpha - \Delta\delta C_\beta$ gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen wird (Abbildung 4.23 oben und Mitte), kann man von einem α-helikalen Sekundärstrukturelement sprechen, wenn vier oder mehr positive Histogrammbalken aufeinander folgen, die jeweils eine Schwelle von 0,7 ppm überschreiten und im Mittel etwa 2,5 ppm hoch sind. Eine Gruppe von drei oder mehr negativen Balken, die jeweils kleiner als etwa 1,4 ppm sind und eine mittlere Höhe von etwa 4,5 ppm haben, weist auf eine β-Strang-Konformation hin (Wishart & Sykes 1994a, Wishart & Case 2001).

Abbildung 4.23 zeigt deutlich die Existenz zweier Helizes sowohl im phosphorylierten, als auch in nicht-phosphorylierten VpUcyt in Anwesenheit von DPC-Mizellen. Helix 2 reicht im Wesentlichen von I39 bis E48, während Helix 3 die Residuen L64 bis R70 umfaßt. Die helikalen Bereiche sind durch graue Hinterlegung angedeutet. Die deutlich größere mittlere Stärke der $\Delta\delta$ ^{13}C in Helix 2 im Vergleich zu Helix 3 deutet eine größere Helizität in diesem Bereich an. Höchstwahrscheinlich tritt Helix 2 in nahezu allen Konformeren der betrachteten VpUcyt-Konformere auf, während Helix 3 nur in weniger als 40 % der Fälle auftritt.

Die Region zwischen den beiden Helizes zeigt keine augenscheinliche Neigung zu helikaler oder β-Strang-Konformation im nicht-phosphorylierten VpUcyt. Die Phosphorylierung der

Serine 53 und 57 verursacht große Änderungen in den $^{13}C_\beta$ und kleine Änderungen in den $^{13}C_\alpha$ chemischen Verschiebungen der Serine. Schließt man die obige Betrachtung des Einflusses der Phosphorylierung mit in die Berechnung ein, so reduzieren sich die $\Delta\delta$ ^{13}C von S53 und S57 zu kleinen Werten. Die gefüllten und offenen Balken repräsentieren die $\Delta\delta$ ^{13}C-Werte, die mit 'random coil'-Werten berechnet wurden, die eine mono- bzw. dianionische Phosphatgruppe beschreiben. Der schnelle Austausch zwischen mono- und dianionischem Ladungszustand der Phosphatgruppe wird in einen Zwischenwert der $\Delta\delta$ ^{13}C-Werte zwischen den gefüllten und offenen Balken resultieren, der um Null liegen wird. Alle anderen Residuen im Bereich von Helix 2 und 3 zeigen Werte bei (Q61) oder unter dem Schwellenwert für die Helixbildung von 0,7 ppm. β-Strangformation in dieser Region kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Die ununterbrochene Serie von positiven $\Delta\delta$ ^{13}C-Werten zwischen S57 und L64 könnte eine N-terminale Ausdehnung der Helix 3 in einer Subfraktion der phosphorylierten VpUcyt-Konformere andeuten.
Das untere Panel in Abbildung 4.23 zeigt die Differenz zwischen den $\Delta\delta$ ^{13}C-Werten des phosphorylierten und des nicht-phosphorylierten VpUcyt. Ziel ist es, Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteins aufgrund der Phosphorylierung sichtbar zu machen. Es sind keine deutlichen Änderungen zu erkennen. Nichtsdestotrotz können kleinere Änderungen im konformationellen Ensemble des VpUcyt auftreten. Die Gruppierung dreier negativer Balken in der C-terminalen Hälfte von Helix 2 wäre in Übereinstimmung mit einer leicht reduzierten Helizität in diesem Bereich, d.h. Helix 2 könnte in einigen der betrachteten Konformere verkürzt sein. Die bereits angedeutete N-terminale Extension von Helix 3 wird ebenfalls durch eine Gruppe positiver Balken zwischen S57 und L64 widergespiegelt.

4.1.5.4 Der heteronukleare (^{1}H-^{15}N)-NOE

Wie bereits in den Kapiteln 3.17.2.3 und 4.1.4.5 erläutert ist der (^{1}H-^{15}N)-NOE ein sensitiver Indikator für lokale Variationen der Proteinrückgratdynamik auf der Pico- und Nanosekundenzeitskala. Residuen mit negativen NOE-Werten führen Bewegungen großer Amplitude aus, während Residuen mit positiven NOE-Werten in ihren Bewegungen eingeschränkt sind.
Es wurde - analog zu Kapitel 4.1.4.5 - ein (^{1}H-^{15}N)-NOE-Datensatz für das VpUcyt^{2P} aufgenommen und analysiert. Abbildung 4.24 zeigt, dass sich die Residuen des VpUcyt weder im nicht-phosphorylierten, noch im phosphorylierten VpUcyt in einer rigiden, globulären Faltung befinden. Es ist zu erkennen, dass Regionen größerer und Regionen geringerer Flexibilität existieren. Im Vergleich zu einem völlig entfalteten Protein erfahren aber alle Residuen eine Einschränkung in der Beweglichkeit, die an Sekundärstrukturelementen beteiligt sind. Genauer betrachtet ist nur die Region um die Phosphorylierungsstellen von uniformer, leicht erhöhter Flexibilität, ausnahmslos zeigen die Residuen 53 bis 59 Hetero-NOE-Werte nahe bei oder unter Null. Genau diese Residuen sind nun deutlich durch die Phosphorylierung betroffen (siehe Abb. 4.24 Mitte und unten). Ein leichter Anstieg der betrachteten Werte deutet auf eine Abnahme der Flexibilität in diesem Bereich hin.

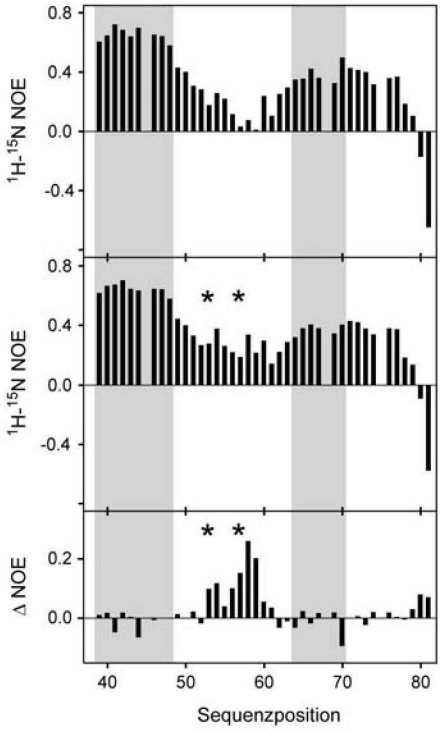


Abbildung 4.24: Effekt der Phosphorylierung der Serine 53 und 57 auf die Proteinrückgratdynamik des VpUcyt in Mizellen (100 mM DPC-d38) bei 30 °C. Der stationäre heteronukleare (^{1}H-^{15}N)-NOE für nichtphosphoryliertes (oben) und phosphoryliertes (Mitte) VpUcyt wurde Kapitel 3.17.2.3 folgend bestimmt. Das untere Panel zeigt die Differenz zwischen den beiden oben gezeigten Datensätzen (phosphoryliert - unphosphoryliert). Die Position der Serine ist mit Sternen („*“) markiert. Die mittels Sekundärstrukturanalyse bestimmten helikalen Bereiche sind durch einen grauen Hintergrund angedeutet. Aufgrund spektralen Überlapps konnte keine Information für die Residuen R45 und V68 gewonnen werden; aufgrund des Fehlens der H^NN-Korrelation ebenso nicht für das Prolin 75.

4.1.5.5 Dynamikabschätzung über Linienbreiten im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum

Die Linienbreite eines Signals ist stark von seinen dynamischen Eigenschaften abhängig (siehe dazu Kapitel 3.17.2.4 und 4.1.4.6). Eine Erhöhung der Linienbreite einer betrachteten Aminosäure deutet auf die Reduktion der freien Beweglichkeit hin.
Zur Analyse der Linienbreite wurde jeweils für nicht-phosphoryliertes und phosphoryliertes VpUcyt ein (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum mit einer Aufnahmezeit von 1 s aufgenommen und wie in Kapitel 3.17.2.4 beschrieben ausgewertet.
Abbildung 4.25 zeigt die gewonnenen ^{1}H Linienbreiten für nichtphosphoryliertes (oben) und phosphoryliertes (Mitte) VpUcyt. Das Differenzdiagramm (Abb. 4.25 unten) zeigt, dass neben der Phosphorylierungsregion die Residuen L64 bis H72 eine deutliche Linienverbreiterung erfahren. Die Linienbreitenzunahme in der Phosphorylierungsregion deutet auf die Verringerung der Bewegungsfreiheit der Residuen hin, ebenso die Zunahme der Linienbreiten im Bereich von Helix 3.

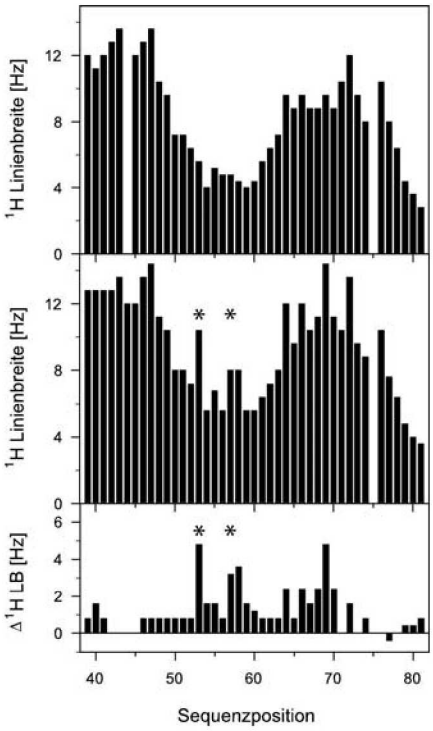


Abbildung 4.25: Effekt der Phosphorylierung der Serine 53 und 57 auf die ^{1}H Linienbreite der Amidprotonen des VpUcyt in Mizellen (100 mM DPC-d38) bei 30 °C. Die ^{1}H Linienbreite für nichtphosphoryliertes (oben) und phosphoryliertes (Mitte) VpUcyt wurde wie in Kapitel 3.17.2.4 beschrieben bestimmt. Das untere Panel zeigt die Änderung in der ^{1}H Linienbreite aufgrund der Phosphorylierung (phosphoryliert - unphosphoryliert). Die Position der Serine ist mit Sternen („*“) markiert.

4.1.5.6 Kartierung der Phosphorylierungsstelle auf der Oberfläche des mizellengebundenen VpUcyt

Die durch die Phosphorylierung hervorgerufene Änderung in der chemischen Umgebung der betroffenen Residuen kann strukturelle Folgen haben. Die vorangegangene Beschreibung der gefundenen Ergebnisse lässt darauf schließen, dass es im Bereich der Residuen I46 bis Q61 zu einer Versteifung der Sekundärstruktur kommt.
Die durch die Änderungen in den chemischen Verschiebungen im (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum (siehe Abbildung 4.22) betroffenen Residuen können in der Oberflächendarstellung des mizellengebundenen, nicht-phosphorylierten VpUcyt (siehe dazu Kapitel 4.1.4.9) dargestellt werden, um den Gesamteffekt der Phosphorylierung der Serine 53 und 57 auf die gefundene Tertiärfaltung abschätzen zu können. Dazu wurden die Residuen I46 bis Q61 in der Oberflächendarstellung des mizellengebundenen, nicht-phosphorylierten VpUcyt farbig dargestellt (Abbildung 4.26). Die beiden Serine 53 und 57 wurden dabei in rot, die restlichen Verschiebungen der Residuen im Bereich I46 bis Q61 in grün dargestellt. Es fällt auf, dass ein weiter, wenn auch kompakter Bereich des Proteins von der Phosphorylierung betroffen ist. Im intakten VpU-Protein schließt sich an das in dieser Arbeit studierte VpUcyt-Protein N-terminal ein basischer Bereich und eine Transmembrandomäne an, die

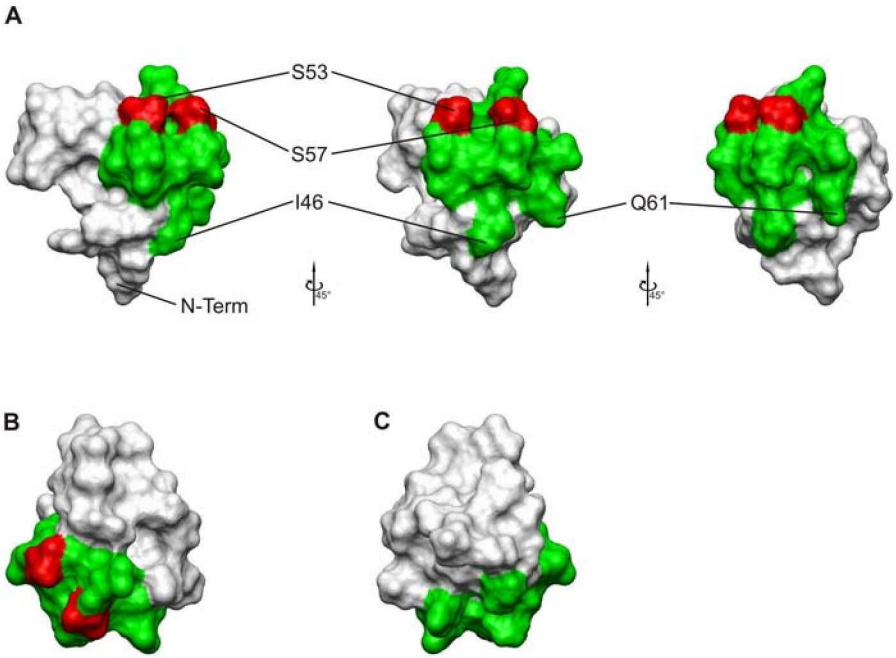


Abbildung 4.26: Oberflächendarstellung des mizellengebundenen, nicht-phosphorylierten VpUcyt in verschiedenen Seitenansichten (**A**), in Draufsicht (**B**) und Sicht von unten (**C**). Die Phosphorylierung der Serine 53 und 57 verursacht Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Residuen I46 bis Q61, die auf strukturelle Änderungen in diesem Bereich hindeuten könnten. Diese Residuen sind farbig markiert, die phosphorylierbaren Serine 53 und 57 rot, die restlichen Residuen des Bereiches I46 bis Q61 grün. Der sequenzielle Anfangs- (I46) und Endpunkt (Q61) der betroffenen Region ist mit Namen der Residue angegeben.

das Protein in der Membran verankert. Nimmt man diese Ausrichtung für die gezeigte Oberflächendarstellung als gegeben an, dann fällt auf, dass durch die Phosphorylierung im Wesentlichen Residuen betroffen sind, die von den Serinen in Richtung der Membran liegen. Desweiteren scheint der Phosphorylierungseffekt vor allem durch Beeinflußung der Helizes (I46 ist eine C-terminale Residue der Helix 2, Q61 befindet sich im Bereich des N-terminalen Endes von Helix 3) zu wirken. Die Kompaktheit der betroffenen Region und die Exponiertheit der beiden phosphorylierten Serine könnte darauf hindeuten, dass sich diese Region zur anschließenden Bindung eines Partners umformt.

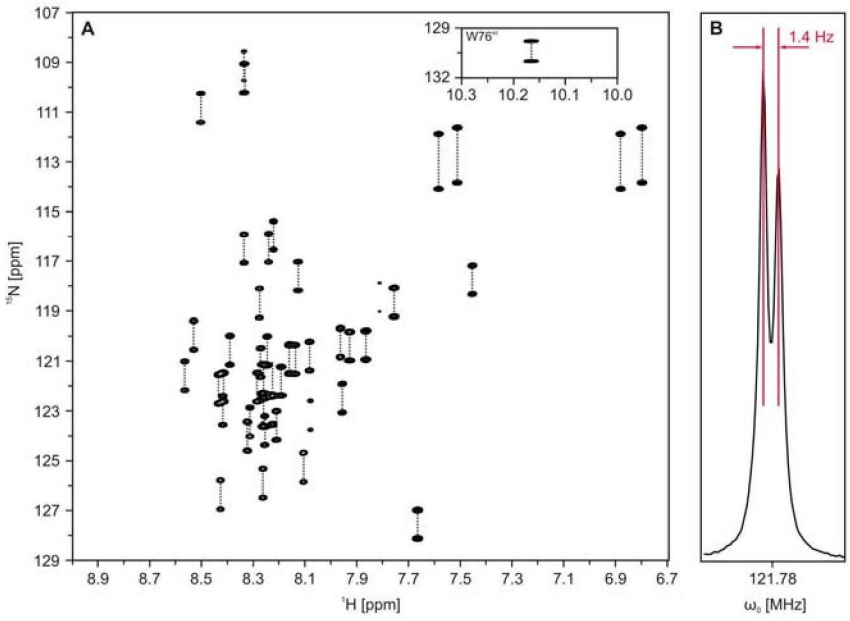


Abbildung 4.27: **A** (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum ohne Protonenrefokussierung des freien VpUcyt in Puffer. Die unterlassene Refokussierung führt zu einer Aufspaltung der Signale in der Stickstoffdimension, die der (^{1}H-^{15}N)-Kopplungskonstanten entspricht. Zusammengehörige Resonanzen sind durch gestrichelte Linien miteinander verbunden. **B** Asymmetrische POPC-Vesikel orientieren sich im Magnetfeld, aufgrund der unspezifischen Wechselwirkung zwischen dem Lösungsmittel ($H_2O/^2H_2O$ 9:1 (v/v)) und der Membran kommt es zur Aufspaltung des ^2H_2O-Signals. Die messbare Aufspaltung des Signals ist abhängig von der Magnetfeldstärke und beträgt, in diesem Fall bei $\omega_0 = 800$ MHz, $\Delta^{D_2O} \approx 1,4$ Hz.

4.1.6 VpUcyt in Wechselwirkung mit POPC-Vesikeln

Eine weitere Möglichkeit der strukturellen Charakterisierung des VpUcyt in membranassoziiertem Zustand bietet das Studium von transferierten dipolaren Kopplungen (siehe Kapitel 3.17.2.7). Ziel ist es, die Wechselwirkung zwischen VpUcyt und dem Liposom zu charakterisieren und gegebenenfalls strukturelle Informationen für das membrangebundene VpUcyt abzuleiten. Bindet das VpUcyt stark an das Liposom, dann ist das Signal des Proteins mit Flüssig-NMR aufgrund der Größe des Liposom/Protein-Komplexes nicht mehr detektierbar (vgl. dazu Kapitel 1.4). Befindet sich das Protein jedoch in schnellem Austausch zwischen frei in Lösung und gebundenem Zustand, dann können dipolare Kopplungen für das Protein gemessen werden. Dazu ist es zwingend notwendig, dass das Liposom magnetisch ausgerichtet ist (Koenig et al. 1999). Aus diesen Messungen können sowohl Informationen über die Konformation des gebundenen Proteins als auch über seine Orientierung relativ zur Membranoberfläche gewonnen werden.

In einem darauffolgenden Experiment kann untersucht werden, wie sich die Anwesenheit von CD4 in den Liposomen auf die Konformation und Orientierung des VpUcyt auswirkt. Dazu ist es ebenfalls wichtig, dass die CD4/VpUcyt-Bindung eine hohe 'on/off'-Rate besitzt.
Im beschriebenen Experiment wird die Aufspaltung der (^{1}H-^{15}N)-Korrelation in der indirekten Dimension des nicht-entkoppelten HSQC-Spektrums gemessen. Man erhält im isotropen Fall die J-Kopplung, da sich alle Anteile der dipolaren Kopplungen D zu Null addieren. Dementgegen trägt die dipolare Kopplung D im anisotropen Fall (d.h. bei magnetischer Ausrichtung der asymmetrischen Liposomen) einen Anteil zur gemessenen Aufspaltung dar, man erhält die (J+D)-(^{1}H-^{15}N)-Kopplung. Die Differenz aus den gemessenen Kopplungen für den anisotropen und isotropen Fall ergibt direkt die dipolare Kopplung D, die einer 'transferierten dipolaren Kopplung (TrDC)' entspricht (siehe dazu Kap. 3.17.2.7).
Ein TrDC besitzt Richtungsinformationen, daher können positive und negative Werte angenommen werden.

Zur Messung der TrDCs wurden zunächst die $^1J_{HN}$-Kopplungskonstanten des VpUcyt in Vesikelpuffer (vgl. Kap. 3.16) bestimmt. Dazu wurde ein (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Experiment ohne Protonenrefokussierung bei 30 °C aufgenommen. Parallel dazu wurden asymmetrische Vesikel wie in den Kapiteln 3.16.1 und 3.16.2 beschrieben hergestellt. Die POPC-Vesikellösung wurde mit 0,5 mM ^{15}N-isotopenmarkiertem VpUcyt versetzt und bei 30 °C temperiert.
Daraufhin wurden ebenfalls die (^{1}H-^{15}N)-Kopplungen aus einem bei 30 °C aufgenommenen (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum bestimmt. Die Kontrolle der Vesikel-Asymmetrie erfolgte über direkte Beobachtung der D_2O-Resonanzlinie. Aufgrund der Orientierung der asymmetrischen Vesikel im Magnetfeld kommt es in Folge der unspezifischen Wechselwirkung zwischen dem Lösungsmittel ($H_2O/^2H_2O$ 9:1 (v/v)) und den Vesikeln zu einer Quadrupolaufspaltung der ^2H_2O-Resonanz. Die Aufspaltung ist abhängig von der Magnetfeldstärke. Abbildung 4.27 A zeigt das Spektrum des ohne Protonenrefokussierung aufgenommenen (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Experimentes, Abbildung 4.27 B die Aufspaltung des D_2O-Signals.

Zum Nachweis der Asymmetrie der Vesikel wurde die Lichstreuung (siehe Kapitel 3.15) angewendet. Dazu wurde Vesikellösung in der angegebenen Verdünnung gemessen. Die Auswertung der Daten zeigte für die als elliptisch anzusehenden Vesikel eine Länge der Achsen von $a = 216$ nm und $b = 23,3$ nm, was einem Längenverhältnis von etwa 10 entspricht. Die Asymmetrie der Vesikel ist damit eindeutig nachgewiesen.

Die Differenz aus den $^1J_{HN}$-Kopplungskonstanten der beiden Experimente liefert die TrDCs (siehe oben). In Abbildung 4.28 sind die ermittelten Werte für die TrDC gegen die Sequenzposition aufgetragen. Man erkennt deutlich einen sequenzspezifischen Effekt in Anwesenheit der POPC-Vesikel. Im Einklang mit den Ergebnissen des an DPC-Mizellen gebundenen VpUcyt wird ein das ganze Protein betreffender Effekt beobachtet. Da das DPC und das POPC mit dem Phosphatidylcholin dieselbe Kopfgruppe besitzen, lässt sich

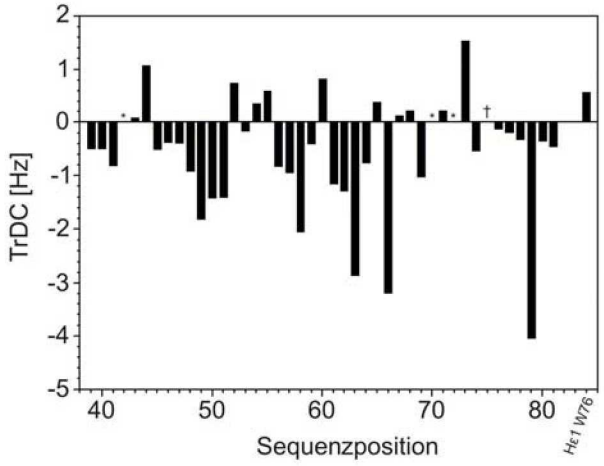


Abbildung 4.28: Werte der TrDC in Abhängigkeit von der Sequenzposition. Residuen, deren Änderung in der chemischen Verschiebung nicht bestimmt werden konnten, sind mit einem „*“ markiert, die Position des P75 ist durch ein „†“.

vermuten, dass es zur Ausbildung derselben Tertiärstruktur kommt. Für die vorliegende Arbeit wurde angenommen, dass die ${}^1J_{H^N N}$-Kopplungskonstante nicht von der Konformation des Proteins abhängt. Die Überprüfung dieser Annahme steht noch aus.

4.2 Der Wildtyp des humanen CD4

4.2.1 Konstruktion des Initialklons pET43b_CD4tmcyt

Mit dem Vektor pET43b (Novagen, Madison, USA) ist es möglich, Proteine als Fusion mit dem NusA-Protein und einem Hexa-Histidintag überzuexprimieren. Das große NusA-Protein (55,4 kDa) soll dabei nach der Expression den ggf. unlöslichen Fusionspartner in Lösung halten. Diese Eigenschaft sollte dazu genutzt werden, um die Reinigung des Membranproteins CD4tmcyt zu erleichtern.
Der käuflich erworbene Vektor pET43b enthält ein Gen für NusA, gefolgt von einem Sequenzabschnitt, der für den Hexa-Histidintag und die Protease-Schnittstelle kodiert. In 3'-Richtung nach diesem Sequenzabschnitt konnte das für CD4tmcyt kodierende DNA-Fragment in den Vektor eingesetzt werden.
Zur Konstruktion des initialen CD4tmcyt-Klones wurde die PCR-Technik (siehe Kapitel 3.5) mit dem in Tabelle 4.3 angegebenen Ansatz angewendet. Nach der PCR erfolgte die Reinigung der PCR-Ansätze mittels DNA-Gelelektrophorese (Kapitel 3.3) und Gelextraktion (Kapitel 3.4). Das CD4tmcyt-PCR-Fragment und die pET43b-Vektor-DNA wurden durch die Restriktionsenzyme *SmaI* und *XhoI* verdaut (Kapitel 3.6.1).

Nach anschließender Dephosphorylierung der Vektor-DNA (Kapitel 3.6.3) wurden die PCR-Fragmente und die Vektor-DNA mittels Gelelektrophorese und -extraktion gereinigt. Nach der Ligation (Kapitel 3.6.4) erfolgte die Transformation (Kapitel 3.8.3) des Bakterienstammes *E. coli* TOP10 mit dieser DNA.
Die Korrektheit der DNA-Sequenz wurde wie in Kapitel 3.7 beschrieben mit der Methode der enzymatischen Dideoxy-Methode von Sanger et al. (1977) überprüft. Nach der Präparation hinreichender Mengen von Plasmid-DNA (Kapitel 3.1) wurden *E. coli* BL21(DE3)star-Zellen mit dem Plasmid transformiert.

Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C auf LB-Agarplatten herangezogen, die mit 100 mg/ml Ampicillin versetzt waren. Danach wurde das LB-Expressionsmedium mit den herangezogenen Transformanden beimpft und inkubiert. Nach dem Erreichen einer

Tabelle 4.3: PCR-Ansatz und -Prozedur zur Konstruktion des Initialklons pET43b_CD4tmcyt.

PCR-Ansatz	PCR-Prozedur
10 pmol 5_pET43b_CD4tmcyt	30×(92 °C 30"
10 pmol 3_pET43b_CD4tmcyt	55 °C 25"
100 μM dNTP	72 °C 25"
0,5 μl 10 mg/ml BSA	72 °C 2')
2 U Vent-Polymerase	
50 μl 1-fach Vent-Puffer	
2 mM $MgSO_4$	

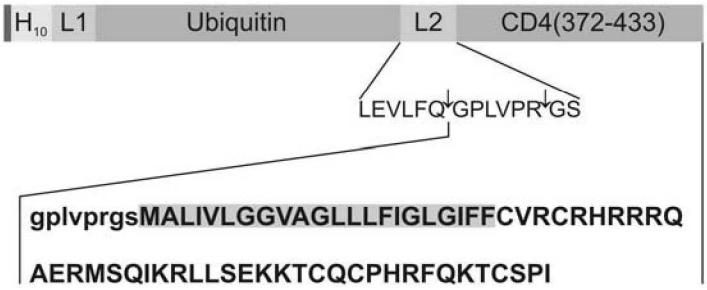


Abbildung 4.29: Schematische Darstellung des Aufbaus des Fusionsproteins. Dem Decahistidintag (H_{10}) folgt ein Linker (L1), dann Ubiquitin und ein weiterer Linker (L2), der Erkennungssequenzen für eine PreScission- und eine Thrombinschnittstelle enthält. Das C-terminale CD4(372-433) wird nach der proteolytischen Spaltung mit PreScission zum gewünschten Zielprotein CD4tmcyt. Aminosäuren, die nicht zur Wildtypsequenz des CD4(372-433) gehören, sind mit kleinen Buchstaben dargestellt; Residuen der Transmembrandomäne sind grau hinterlegt.

optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 bis 0,8 wurden die Zellen mit 1 mM IPTG induziert und nach 4 Stunden Expressionszeit durch Zentrifugation geerntet (Kapitel 3.10). Dabei konnten pro Liter LB-Medium Bakterienpellets mit etwa 4 g Nasszellgewicht gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Zur Reinigung wurde das Zellpellet zunächst in nativem NiNTA-Puffer (50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert und mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurden der zellfreie Rohextrakt und das Zelltrümmerpellet per SDS-PAGE analysiert. Dabei zeigt sich, dass das gesamte exprimierte Fusionsprotein in der unlöslichen Fraktion zu finden war. Auch die Zugabe von denaturierenden Substanzen wie 8 M Urea oder 6 M Guanidinium-HCl, sowie Detergenzien zum Aufschlusspuffer konnte keine nennenswerte Verbesserung herbeiführen.
Aufgrund dieser Problematik und der zu erwartenden geringen Ausbeute an gespaltenem CD4tmcyt-Peptid (Massenverhältnis NusA-Tag/CD4tmcyt $\approx$ 55 kDa/7 kDa) wurde das System nur noch als Ausgangspunkt für eine weiterführende Klonierung verwendet, die im folgenden Kapitel vorgestellt wird.

4.2.2 Klonierung an verschiedene Tags und Schnittstellen

Aufgrund der negativen Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1 musste ein adäquates System gefunden werden, das sowohl eine hohe Ausbeute, als auch die Löslichkeit des Proteins gewährleistet.
Dazu wurden Vektoren ausgewählt, deren spezielle Eigenschaften für die Gewinnung von ausreichenden Mengen CD4tmcyt-Proteins genutzt werden sollten:

i. Vektor pGEV-2
Der Vektor pGEV-2 (Huth et al. 1997) ist ein modifizierter pET21a-Vektor (Novagen, Madison, USA). Nach erfolgter Klonierung der gewünschten DNA-Sequenz in den Vektor ist die Expression des Zielproteins als Fusion mit der B1-Domäne des Protein G möglich. Die Spaltung der Fusion erfolgt dann über eine Protease-Schnittstelle mittels Thrombin. Der Referenz zur Folge ist es mit diesem Vektor möglich, auch unlösliche Proteine in großer Menge in Lösung zu produzieren.

ii. Vektor pET15b_kombi
Durch Nutzung des Vektors pET15b_kombi (Novagen; Modifikationen in der Arbeitsgruppe Willbold) ist es möglich, das gewünschte Zielprotein als Fusion mit einem Hexa-Histidintag zu exprimieren. Eine Protease-Schnittstelle erlaubt die Abspaltung des Tags mittels Thrombin. Der Vorteil dieses Systems ist zum einen, dass der Hexa-Histidintag für NMR-spektroskopische Untersuchungen nicht unbedingt abgespalten werden muss und zum anderen, dass bei Produktion isotopenmarkierten Proteins vergleichsweise geringe Verluste an markiertem Protein durch die proteolytische Spaltung auftreten.
Die in dieser Arbeitsgruppe durchgeführte Modifikation der Restriktionsschnittstellenregion („Multiple Cloning Site“, MCS) des Vektors vergrößert die Auswahl an verwendbaren Restriktionsenzymen.

iii. Vektor pTKK19xb/ub_ubi
Der Vektor pTKK19xb/ub_ubi ist ein modifizierter pET19-Vektor (Kohno et al. 1998), er erlaubt die Produktion des Zielproteins als Fusion zu einem Deca-Histidintag und Ubiquitin. Durch eine Protease-Schnittstelle für die „Yeast Ubiquitin Hydrolase“ (YUH) kann das Zielprotein ohne N-terminalen Überhang abgespalten werden. Außerdem soll es zu einer großen Ausbeute an Zielprotein kommen, da das Ubiquitin von prokaryontischen Expressionssystemen in großen Mengen produziert wird.

Expressionsversuche mit System iii. zeigten im Vergleich zu den bei i. und ii. angegebenen Varianten, dass die zu erwartende Menge an Zielprotein beim System pTKK19xb/ub_ubi deutlich größer ist. Um mögliche Probleme bei der proteolytischen Freisetzung des Zielproteins zu vermeiden, wurden zwischen Ubiquitin-C-Terminus und Zielprotein-N-Terminus verschiedene Schnittstellen für eine proteolytische Spaltung vorgesehen. Hierbei handelt es sich um folgende Sequenzen:

LVPR$^{\downarrow}$GS: Thrombin-Schnittstelle; Thrombin schneidet auch noch bei Urea-Konzentrationen von 2 bis 3 M, allerdings mit reduzierter Aktivität

LEVLFQ$^{\downarrow}$GPLVPRGS: PreScission-Schnittstelle; PreScission schneidet auch hochaktiv in Gegenwart von Detergenzien, die Thrombinschnittstelle dient als Linker

DDDD$^{\downarrow}$K: Enterokinase-Schnittstelle; Enterokinase ist bei 3 M Urea noch voll aktiv, ebenso bei geringen Detergenzkonzentrationen

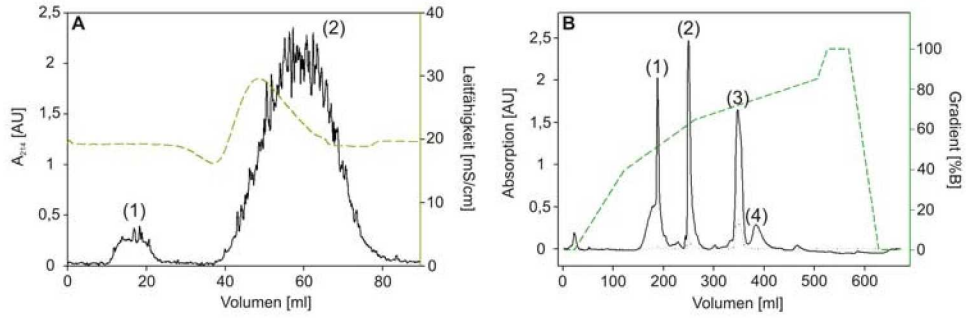


Abbildung 4.30: **A** Chromatogramm der Umpufferung des CD4tmcyt-Fusionsproteins nach der Affinitätschromatographie. Substanzen mit einem Gewicht größer als 5 kDa (1) werden von Bestandteilen kleiner als 5 kDa (2) getrennt. **B** Chromatogramm der RPC des gefällten und dann resuspendierten CD4tmcyt-Spaltansatzes. Die durchgezogene Kurve entspricht der Absorption bei 214 nm; die gepunktete Kurve zeigt die Absorption bei 280 nm. Die Eluate entsprechen (1) dem Ubi-Tag, (2) der PreScission-Protease, (3) dem residuellen Triton-X-100, und (4) dem CD4tmcyt-Protein. Das CD4tmcyt zeigt keine Absorption bei 280 nm und lässt sich damit direkt im Chromatogramm von anderen Substanzen unterscheiden.

IEGR$^{\downarrow}$: Faktor Xa-Schnittstelle; Faktor Xa ist auch bei geringen Acetonitrilkonzentrationen (bis zu 10 %) voll aktiv

Zur Herstellung der Konstrukte wurde die PCR-Technik eigesetzt (siehe Kapitel 3.5.1). Nach der PCR erfolgte die Reinigung der PCR-Ansätze mittels DNA-Gelelektrophorese (Kapitel 3.3) und Gelextraktion (Kapitel 3.4). Am 3'-Ende der Multiple Cloning Site (MCS) des pTKK19xb/ub_ubi-Vektor-DNA wurde ein 'blund end' erzeugt (siehe Kapitel 3.6.2), am 5'-Ende der MCS wurde der Vektor mittels *NotI* verdaut (siehe Kapitel 3.6.1). Die Ligation von Insert und Vektor erfolgte wie bereits erläutert (siehe dazu Kapitel 3.6.4).
Daraufhin wurden die verschiedenen Konstrukte exprimiert und auf ihre Spaltbarkeit getestet. Es stellte sich heraus, dass der Einsatz einer PreScission-Schnittstelle mit Linker (Vektorkonstrukt „pTKK19_CD4tmcyt") die gewünschten Ergebnisse lieferte.
Das Vektorkonstrukt pTKK19_CD4tmcyt kodiert für einen Decahistidintag, Ubiquitin und das CD4tmcyt, die jeweils durch Linker miteinander verbunden sind (siehe dazu Abbildung 4.29). L2 bildet dabei die Schnittstelle für die PreScission-Protease (LEVLFQ$^{\downarrow}$GP), mit der sich der N-terminale Tag vom CD4tmcyt-Protein abspalten lässt. Versuche mit Spaltung durch Thrombin (LVPR$^{\downarrow}$GS) waren nicht erfolgreich, wahrscheinlich weil die Thrombin-Schnittstelle wegen der sich anlagernden Detergenzmoleküle nicht erreichbar war. Sie dient daher nun als zusätzlicher Linker.
Im folgenden Kapitel 4.2.3 wird das Reinigungsprotokoll vorgestellt, mit dem sich das CD4tmcyt in hoher Reinheit präparieren lässt.

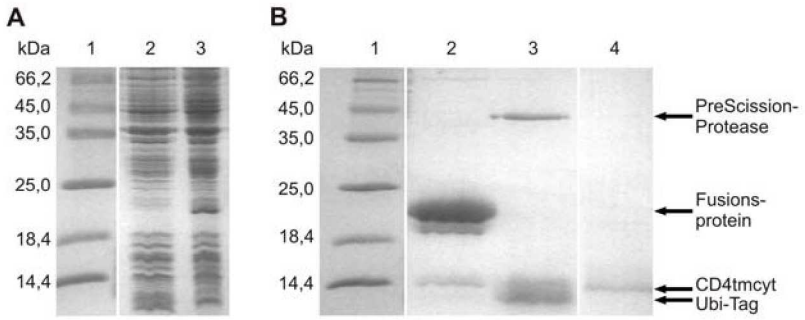


Abbildung 4.31: 15 % SDS-PAGE der Expression **(A)** und Reinigung mit Spaltung und RPC des CD4tmcyt-Proteins **(B)**. **A** Spur 1: Protein Marker, Spur 2: Zellsuspension vor Induktion, Spur 3: Zellsuspension nach 4h Expression. **B** Spur 1: Protein Marker, Spur 2: Mit 300 mM Imidazol eluierte Proteine von der Ni^{2+}-NTA-Agarose, Spur 3: Spaltansatz nach einer Spaltzeit von 12 h, Spur 4: Reines CD4tmcyt nach der RPC.

4.2.3 Expression und Reinigung des CD4tmcyt

E. coli chemokompetente Zellen wurden mit dem Plasmid pTKK19_CD4tmcyt transformiert und auf LB-Agarplatten über Nacht angezogen. Alle Wachstumsmedien wurden mit 100 μg/ml Kanamycin versetzt. Eine Kolonie der bewachsenen Platte wurde in 50 ml LB-Medium überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Morgen wurde ein Aliquot dieser Kultur dazu verwendet, um 1 l LB-Medium auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,1 anzuimpfen. Die Zellen wurden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und nach Erreichen einer optischen Dichte von etwa 0,7 mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 4 Stunden unter Schütteln bei 37 °C wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (Kapitel 3.10).

Zur Reinigung wurden die Zellen wie in Kapitel 3.11.2 beschrieben in Puffer aufgenommen, resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der zellfreie Rohextrakt wurde nach der Zentrifugation durch Affinitätschromatographie an Ni^{2+}-NTA-Agarose gereinigt (Kapitel 3.12.2). Nach Pufferwechsel durch Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3.12.3) wurde das Fusionsprotein mit PreScission gespalten (Kapitel 3.12.4) und mittels TCA gefällt. Die Trennung der Spaltprodukte wurde mit der Reversed Phase Chromatographie erreicht (RPC, Abbildung 4.30, Kapitel 3.12.5). Während der Affinitätschromatographie, dem Pufferwechsel und der Proteolyse befanden sich Detergenzien im Puffer, um die Präzipitation des Proteins zu verhindern.

Nach der RPC wurden die CD4tmcyt-enthaltenden Fraktionen vereinigt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und vakuumgetrocknet. Danach lag das Protein in reinem, pulverförmigem Zustand vor, die Ausbeute betrug etwa 6 mg/l bei einer Reinheit von mehr als 95 %.

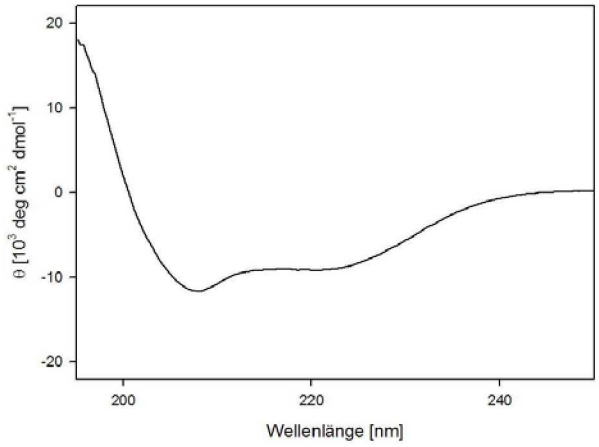


Abbildung 4.32: Fern-UV-CD-Spektrum des CD4tmcyt-Proteins in DPC-Mizellen bei 30 °C.

Der Erfolg einer Reinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 4.31). Die Identität des Zielproteins CD4tmcyt wurde per ESI-Massenspektroskopie eindeutig nachgewiesen.

4.2.4 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Zur Abschätzung der Sekundärstruktur des CD4tmcyt-Proteins wurden Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen (siehe Kapitel 3.13). Dazu wurde 45 μM CD4tmcyt in mizellenhaltigem Phosphatpuffer (20 mM Phosphat, 200 mM DPC-d38, 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) NaN_3, 2 mM DTT, pH 6,2) gelöst. Es wurden Spektren bei 30 °C in einer QS Quarzküvette mit einer optischen Weglänge von 1 mm aufgenommen. Zur Basislinienkorrektur wurden zusätzlich Spektren mit Puffer, aber ohne Protein aufgenommen.
Die quantitative Analyse der Spektren wurde, wie in Kapitel 3.13 angegeben, mit Hilfe des Programmes „CDPro“ und dem Basisreferenzspektrensatz „SDP48“ durchgeführt. Abbildung 4.32 zeigt das CD-Spektrum für CD4tmcyt, das lokale Minima bei etwa 208 und etwa 220 nm aufweist. Das ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein eines signifikanten helikalen Anteils im CD4tmcyt-Protein. Messungen in Puffer mit 150 mM NaCl sind beschränkt auf Wellenlängen über 195 nm, da es unterhalb dieser Wellenlänge zu substanzieller Absorption durch Chloridionen kommt. Ungeachtet dessen kommt es aber auch in salzfreiem Puffer schon zu deutlichen Streueffekten durch die Anwesenheit von Mizellen. Daher wurde die spektrale Analyse auf den Wellenlängenbereich zwischen 195 und 240 nm beschränkt.
Die drei bereits beschriebenen Methoden „CONTIN/LL“, „SELCON3“ und „CDSSTR“ lieferten ähnliche Ergebnisse bei der Bestimmung der Sekundärstrukturanteile. Es wurden

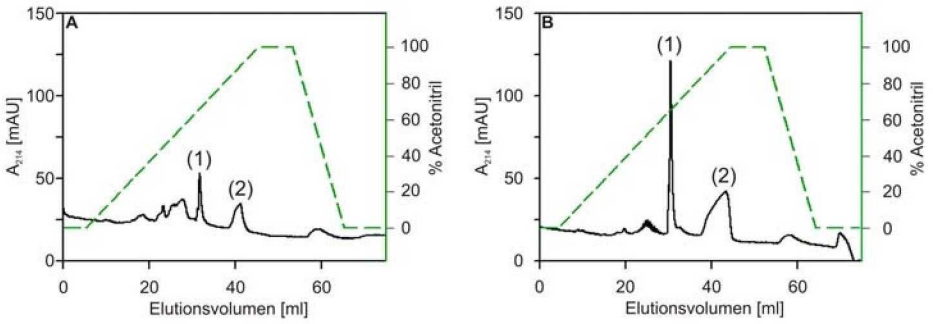


Abbildung 4.33: RPC-Analyse des Inkorporationstests für das CD4tmcyt-Protein. Im gesamten Überstand (**A**) befindet sich im Vergleich zur Pelletfraktion (**B**) deutlich weniger CD4tmcyt (1). In beiden Fraktionen ist auch das Lipid POPC vorhanden (2).

37 bis 42 % Helix, 10 bis 17 % β-Strang, 16 bis 20 % Windungen und 27 bis 32 % unstrukturierte Bereiche erhalten. Eine zusätzliche Analyse mit dem Basisspektrensatz SMP56 lieferte faktisch dieselben Ergebnisse.

4.2.5 Inkorporation des CD4tmcyt-Proteins in POPC-Vesikel

Die Inkorporation des CD4tmcyt-Proteins wurde wie in Kapitel 3.16.1 beschrieben durchgeführt, die Erfolgskontrolle erfolgte nach Kapitel 3.16.3. Der nach der Vakuumtrocknung entstandene weiße, watteähnliche Lipid-/Proteinball wurde in 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,8 aufgenommen und durch Pipettieren homogenisiert. Nach der Herstellung kleiner, unilamellarer Vesikel durch Ultraschall wurden die Vesikel durch Ultrazentrifugation pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 2,5 ml reinem ^2H_2O resuspendiert, beschallt und ultrazentrifugiert. Aufgrund der Massendichte sedimentieren die Vesikel in H_2O, schwimmen jedoch auf ^2H_2O (Koenig & Gawrisch 2005). Der Überstand wurde von dem schwimmenden Pellet sorgfältig getrennt, vakuumgetrocknet und in Puffer (0,09 % TFA in 40 % Acteonitril) gelöst. Das Pellet wurde in 2,5 ml Phosphatpuffer aufgenommen.
Zur RPC-Analyse wurde der gesamte lyophilisierte und danach resuspendierte Überstand verwendet, jedoch nur 0,2 ml des Vesikelpellets. Abbildung 4.33 zeigt das Chromatogramm des Überstandes (A) und des Pellets (B). Betrachtet man die Signalhöhen (CD4tmcyt in Pelletfraktion zu CD4tmcyt in Überstandfraktion 3,5:1) und das Verhältnis der aufgetragenen Mengen (Pellet zu Überstand 1:12,5), dann erhält man das Verhältnis des in der Vesikelfraktion gefundenen CD4tmcyt zum CD4tmcyt in der Überstandfraktion. Dieses Verhältnis ist in etwa 44:1 und besagt, dass über 97 % des CD4tmcyt in der Pelletfraktion zu finden ist. Da in der Überstandfraktion (Abb. 4.33 A) aufgrund der schwierigen Trennung von Pellet und Überstand zusätzlich POPC zu finden ist (Signal (2)) liegt der

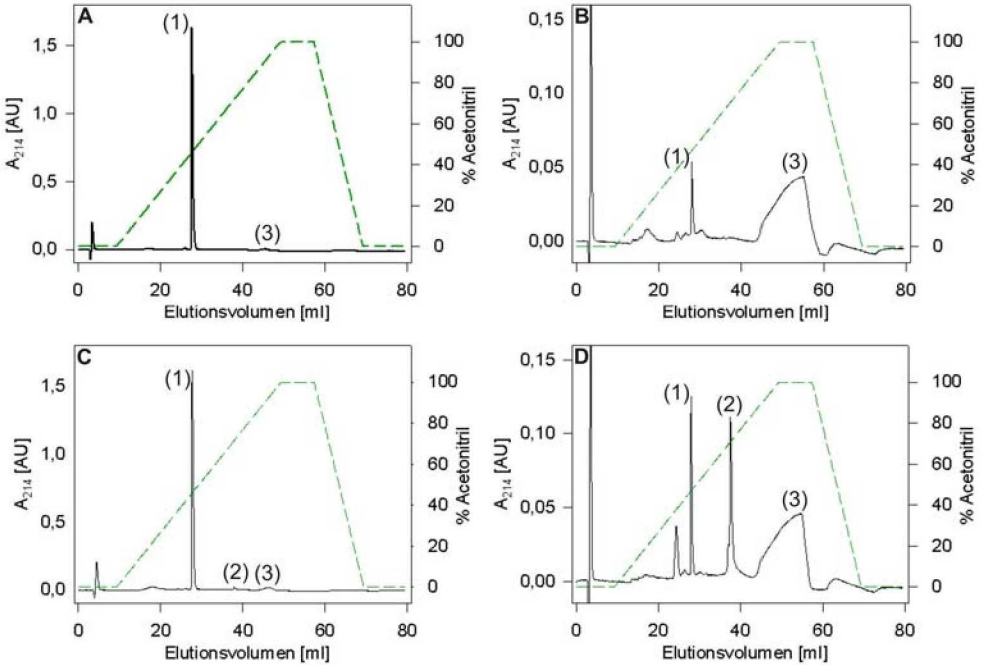


Abbildung 4.34: RPC-Analyse der Wechselwirkung zwischen VpUcyt und membraninsertiertem CD4tmcyt. Ansätze mit und ohne CD4tmcyt wurden jeweils mit VpUcyt inkubiert. Die Vesikelfraktion wurde mittels Ultrazentrifugation von der Pelletfraktion getrennt. HPLC-Chromatogramme der Pufferfraktionen mit (**C**) und ohne membraninsertiertem CD4tmcyt (**A**) sind in der linken Spalte gezeigt. Chromatogramme der Vesikelpellets mit (**D**) und ohne inkorporiertem CD4tmcyt (**B**) sind in der rechten Spalte gezeigt. Identische Gradienten der RPC wurden für alle Läufe benutzt (grüne, gestrichelte Kurven). Die Positionen der VpUcyt- (1), CD4tmcyt- (2), und POPC- (3) Peaks sind im Chromatogramm angegeben.

Schluss nahe, dass ein Teil des in der Überstandfraktion detektierten CD4tmcyt eigentlich zur Vesikelfraktion gehört und der prozentuale Anteil in der Pelletfraktion noch höher ist. Die Inkorporation des CD4tmcyt-Proteins erfolgt daher nahezu vollständig.

4.2.6 Wechselwirkung des membraninsertierten CD4tmcyt-Proteins mit HIV-1 VpUcyt

Die Wechselwirkung des membraninsertierten CD4tmcyt mit dem HIV-1 VpUcyt wurde mit dem Zentrifugationsassay studiert (vgl. Kapitel 3.16.4). CD4tmcyt (0,2 mg) wurde in POPC (20 mg) wie in Kapitel 3.16.1 beschrieben rekonstituiert. Die Lipid-Protein-Mischung wurde nach der Lyophilisation in 1 ml Puffer aufgenommen, der 0,5 mg

VpUcyt enthielt. Nach der pH-Einstellung (6,8) wurde die Lösungen vortex-gemischt und daraufhin ultrazentrifugiert. Der optisch klare Überstand (etwa 1 ml) wurde sorgfältig vom Proteoliposomenpellet getrennt. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer resuspendiert. Aliquots einer Menge von jeweils 100 μl des Überstandes und der Pelletfraktion wurden mittels RPC analysiert. Als Nullkontrolle wurde eine Probe verwendet, die in gleicher Weise parallel zur oben angegebenen Probe präpariert wurde, jedoch kein CD4tmcyt enthielt.
Die obere Zeile in Abbildung 4.34 spiegelt die Zusammensetzung der Überstand- (A) und der Liposomenfraktion (B) des Ansatzes ohne CD4tmcyt wider. Die untere Zeile charakterisiert die Zusammensetzung der Überstand- (C) und der Liposomenfraktion (D) der CD4tmcyt-enthaltenden Probe.
Die Chromatogramme der beiden Pufferfraktionen sind sehr ähnlich. Beide zeigen einen starken VpUcyt-Peak (1) von augenscheinlich gleicher Intensität und einen kleinen POPC-Peak (3). Aufgrund nicht-idealer Trennung von Pellet und Überstand ist in (C) noch ein kleiner CD4tmcyt-Peak zu erkennen (2).
Die Chromatogramme der Vesikelpelletfraktionen (Abb. 4.34 B und D) werden von Peaks des Lipides (3) und des VpUcyt (1) dominiert. Wie erwartet zeigt nur Abb. 4.34 D einen zusätzlichen CD4tmcyt-Peak. Auch die Liposomenfraktion enthält in Abwesenheit des CD4tmcyt einen VpUcyt-Peak, da zwischen den einzelnen Vesikeln des Pellets Puffer mit darin gelöstem VpUcyt zu finden ist. Der Peak des VpUcyt in der CD4tmcyt-enthaltenden Pelletfraktion (Feld D) ist deutlich höher als in der Pelletfraktion ohne CD4tmcyt (Feld B).
Die Bindung des VpUcyt an CD4tmcyt und damit die funktionelle Inkorporation des CD4tmcyt in Lipidmembranen ist damit eindeutig gezeigt worden.

4.2.7 NMR-Spektroskopie

Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung des CD4tmcyt wurde eine 1 mM CD4tmcyt-Probe wie in Kapitel 3.17.1 präpariert. Dazu wurde U(^{15}N)-CD4tmcyt in 0,4 ml RPC-Resuspensionspuffer aufgenommen und mit DPC-d38, gelöst in Phosphatpuffer, gemischt. Nach der Vakuumtrocknung wurde die Probe mit 300 μl entgastem $H_2O/^2H_2O$ (9:1, v/v) und 5 mM DTT-d10 hydratisiert. Die Probe enthielt daraufhin 1 mM CD4tmcyt und 200 mM DPC-d38 in Phosphatpuffer (20 mM Phosphat, 150 mM NaCl, pH 6,2). Anschließend wurde die mizellenhaltige Lösung in ein 3×6 Shigemi S-Röhrchen transferiert. Aus Vorversuchen und dem Vergleich mit den Spektren der Mutante des CD4tmcyt (CD4mut, siehe Kapitel 4.3) war bekannt, dass bei einer Temperatur von 45 °C optimale Bedingungen für die Aufnahme von NMR-Spektren des Proteins herrschen.
Um die Möglichkeit einer vollständigen Resonanzzuordnung abklären zu können, wurden zweidimensionale hetero- und homonukleare Spektren aufgenommen. Zunächst wurde ein (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum des CD4tmcyt in Mizellen aufgenommen (Abbildung 4.35 A), welches eine für die erwarteten α-Helizes typische Dispersion in der Protonendimension zeigt. Die Überlagerung der Resonanzen im Zentralbereich des Spektrums kann von Aminosäuren in unstrukturierten Bereichen herrühren. Ausgehend von der

Aminosäuresequenz des CD4tmcyt (Abbildung 4.29) sind 65 H^NN-Korrelationen im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum zu erwarten. Aufgrund des großen Überlapps ist es jedoch unmöglich, über zweidimensionale Standardspektren alle Resonanzen korrekt zu identifizieren. Hinzu kommt, dass es aufgrund der hohen Temperatur und des gewählten pH-Wertes zu Austauscheffekten kommt, die manche Resonanzen sehr schwach oder gar nicht erscheinen lassen. Desweiteren ist durch das Vorhandensein von 4 Prolinen in den flexiblen Bereichen des Proteins mit einem Anteil an cis/trans-Isomeren zu rechnen, die eine Abschätzung des Vorkommens einer dominierenden Strukturfamilie weiter erschweren. Das aliphatenselektive (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum (Abblidung 4.35 B) zeigt ebenso wie das aromatenselektive (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum (Abblidung 4.35 C) eine hinreichende Dispersion in beiden Dimensionen und legt so den Schluss nahe, dass die Signaldispersion ausreichend für eine erfolgreiche Zuordnung und damit Strukturbestimmung ist.
Ein weiteres Indiz für die Existenz stabiler Sekundärstruktur ist das Vorhandensein von Kreuzkorrelationen im Diagonalbereich des zweidimensionalen, ^{15}N-editierten (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektrums. Befinden sich Residuen in einer α-Helix, dann können starke NOEs zwischen Amidprotonen benachbarter Aminosäuren detektiert werden. Das Fehlen dieser Kreuzkorrelationen kann bedeuten, dass sich das Protein in einer β-Strang-Konformation oder in ungeordneter 'Random Coil'-Struktur befindet (Wüthrich 1986). Abbildung 4.35 D zeigt eine Anzahl von Kreuzkorrelationen zwischen Amidprotonen „(möglicherweise benachbarter) Aminosäuren. Betrachtet man die Resonanzsignale zu den intraresiduellen Protonen, dann stellt man eine gute Signaldispersion und -quantität bis hin zu den sequenziell weit entfernten Seitenkettenprotonen (H^γ, H^δ) fest.

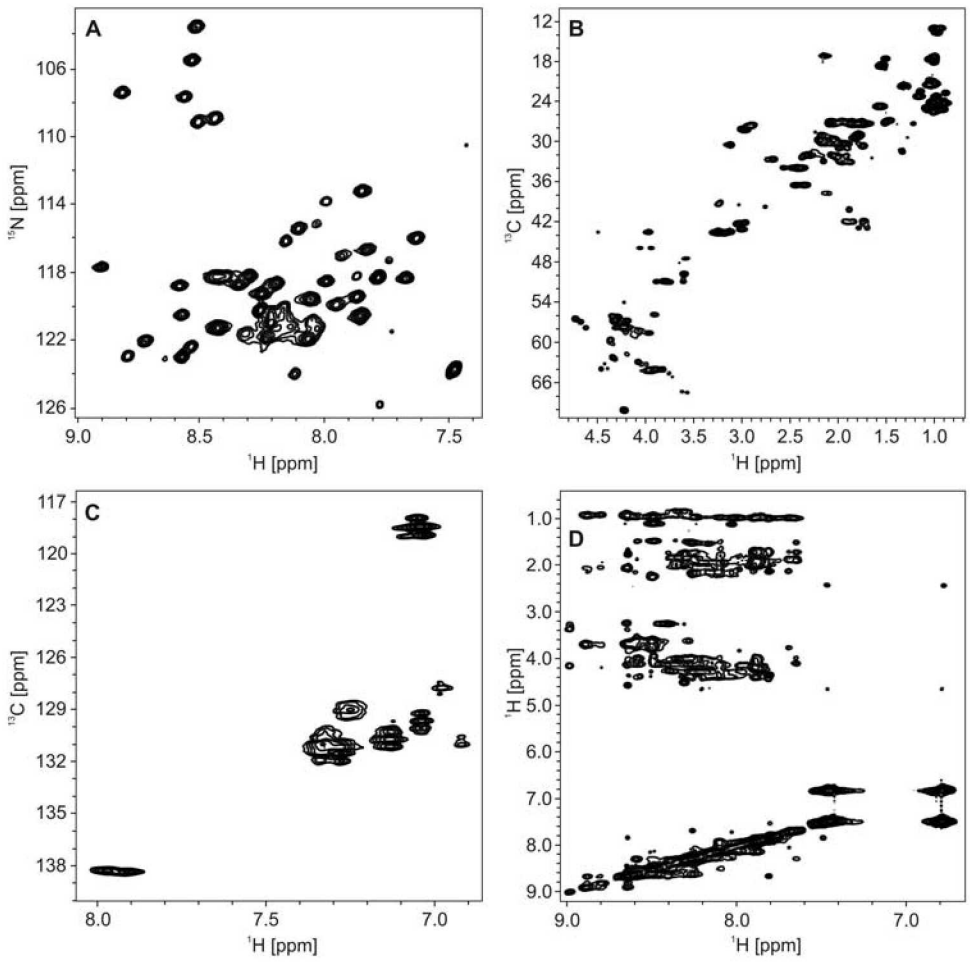


Abbildung 4.35: Hetero- und homonukleare 2D-Spektren von mizelleninsertiertem CD4tmcyt. **A** (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum. Die Resonanzpaare der Glutamin-Seitenketten-Amidgruppen erscheinen aufgrund des TROSY-Effekts nur schwach bzw. gar nicht. **B** (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum des aliphatischen, **C** des aromatischen Bereichs. **D** ^{15}N-editiertes (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektrum.

4.3 Die Variante des humanen CD4

4.3.1 Klonierung, Expression und Reinigung des CD4mut

Die Konstruktion der Cystein-freien Variante des humanen CD4(372-433) wurde ausgehend vom Klon pTKK19_CD4tmcyt (siehe Kapitel 4.2.2) durchgeführt.
Die Mutagenese der fünf Cysteine des CD4(372-433) erfolgte durch eine 2-Schritt-PCR. Hierzu wurde das Template pTKK19_CD4tmcyt in einer ersten PCR (siehe Kapitel 3.5.1) mit den Primern $5'_CD4_mut_C394S/C397S$ und $3'_CD4_mut_C420S/C422S/C430H$ eingesetzt, um einen „Doppelstrang-Primer" zu erzeugen. Nach der Reinigung aus dem Gel (Kapitel 3.4) wurde dieser „Doppelstrang-Primer" zusammen mit dem Primer $5'_pUbiPreScThr_CD4tmcyt$ in einer zweiten PCR eingesetzt. Das Produkt der zweiten PCR ist dann das mutierte CD4tmcyt_C394S/C397S/C420S/C422S/C430H (genannt *cd4mut*), dem die Protease-Schnittstellen für die PreScission- und Thrombin-Protease vorangehen.

Das für das CD4mut-Protein kodierende DNA-Fragment (*cd4mut*) wurde in linearisierten pTKK19xb/ub_ubi-Vektor (siehe dazu Kapitel 3.6) eingesetzt. Die DNA-Sequenz wurde mittels DNA-Sequenzierung (SEQLAB, Göttingen) überprüft.
Chemokompetente *E. coli*-Zellen wurden mit dem Plasmid pTKK19_CD4mut transformiert (Kap. 3.8.3). Die Aminosäuresequenz des CD4mut-Proteins ist bis auf die 5 Punktmutationen identisch zur Sequenz des CD4tmcyt (Abbildung 4.36).

Expression, Reinigung, Spaltung und schlussendliche Isolation des CD4mut-Proteins verlaufen identisch zum Prozess der CD4tmcyt-Reinigung (siehe Kapitel 4.31), mit der Ausnahme, dass kein Zusatz von DTT oder β-Mercaptoethanol in die Puffer von Nöten ist. Zusammengefaßt bedeutet dies, dass das Fusionsprotein in großer Menge exprimiert wurde, und nach Zellaufschluss mit Ultraschall durch Detergenzien in Lösung gebracht wird. Mittels Affinitätschromatographie an Ni^{2+}-NTA-Agarose wurde das Fusionsprotein weitestgehend von zellulären Bestandteilen gereinigt. Nach Elution und Pufferwechsel (Abb. 4.38 A) konnte der Fusionspartner mittels PreScission-Protease abgespalten werden. Der durch TCA gefällte Spaltansatz konnte dann mit der Reversed Phase Chromatographie gereinigt werden (Abb. 4.38 B), das Protein lag nach der Vakuumtrocknung in reinem, pulverförmigem Zustand vor. Die Expression und Reinigung wurde mittels SDS-PAGE verfolgt (Abb. 4.37). Die Identität des CD4mut-Proteins wurde mit ESI-Massenspektroskopie eindeutig nachgewiesen.

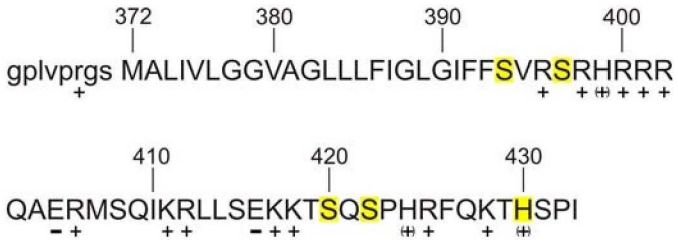


Abbildung 4.36: Aminosäuresequenz des CD4mut-Proteins nach der proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins. Die von der Spaltstelle verbleibenden Residuen sind mit kleinen Buchstaben dargestellt. Die Mutagenese C394S/C397S/C420S/C422S/C430H ist durch gelbe Unterlegung der Residuen angedeutet. Die zytoplasmatische Domäne des Proteins ist stark kationisch bei pH 6,2, der für NMR-spektroskopische Untersuchungen gewählt wurde. Geladene Residuen sind mit ihrer jeweiligen Ladung markiert. Da der Ladungszustand der Histidine im Protein bei pH 6,2 (pKa etwa 6,5) nicht eindeutig ist, wurde das Ladungszeichen in Klammern dargestellt.

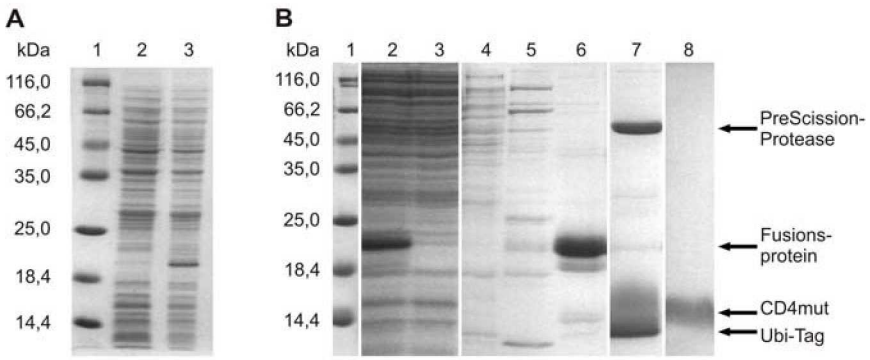


Abbildung 4.37: 15 % SDS-PAGE-Analyse der Expression **(A)** und Reinigung mit Spaltung und RPC des CD4mut-Proteins **(B)**. **A** Spur 1: Protein Marker, Spur 2: Zellsuspension vor Induktion, Spur 3: Zellsuspension nach 4h Expression. **B** Spur 1: Protein Marker, Spur 2: Rohextrakt nach Zellaufschluss und Zentrifugation, Spur 3: Durchfluss des Säulenauftrages, Spuren 4+5: Waschschritte mit Bindepuffer und ansteigender Menge Imidazols, Spur 6: Eluiertes CD4mut-Fusionsprotein nach Umpufferung vor Spaltung, Spur 7: Spaltansatz nach 4 h, Spur 8: CD4mut nach RPC.

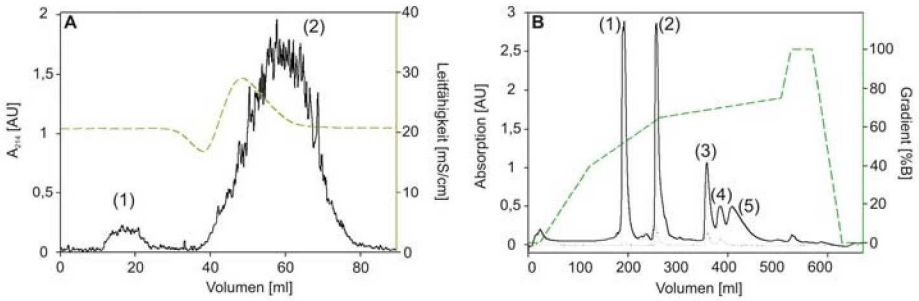


Abbildung 4.38: **A** Chromatogramm der Umpufferung des CD4mut-Fusionsproteins nach der Affinitätschromatographie. Substanzen mit einem Gewicht größer als 5 kDa (1) werden von Bestandteilen kleiner als 5 kDa (2) getrennt. **B** Chromatogramm der RPC des gefällten und dann resuspendierten CD4mut-Spaltansatzes. Die durchgezogene Kurve entspricht der Absorption bei 214 nm; die gepunktete Kurve zeigt die Absorption bei 280 nm. Die Eluate entsprechen (1) dem Ubi-Tag, (2) der PreScission-Protease, (3) ungespaltenem Fusionsprotein, (4) dem residuellen Triton-X-100, und (5) dem CD4mut-Protein. Das CD4mut zeigt keine Absorption bei 280 nm und lässt sich damit direkt im Chromatogramm von anderen Substanzen unterscheiden.

4.3.2 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Zur Abschätzung der sekundärstrukturellen Anteile im CD4mut-Protein wurden Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen (siehe Kapitel 3.13). Dazu wurde 45 μM CD4mut in mizellenhaltigem Phosphatpuffer (20 mM Phosphat, 200 mM DPC-d38, 0,02 % (w/v) NaN_3, pH 6,2) gelöst. Es wurden Spektren mit und ohne 150 mM NaCl bei 30, 40 und 50 °C in einer QS Quarzküvette mit einer optischen Weglänge von 1 mm aufgenommen. Zur Basislinienkorrektur wurden zusätzlich Spektren mit Puffer, aber ohne Protein aufgenommen.
Die quantitative Analyse der Spektren wurde, wie in Kapitel 3.13 angegeben, mit Hilfe des Programmes „CDPro“ und dem Basisreferenzspektrensatz „SDP48“ durchgeführt. Abbildung 4.39 zeigt die geeichten CD-Spektren für CD4mut, die lokale Minima bei 280 und etwa 220 nm aufweisen. Das ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein eines signifikanten helikalen Anteils im CD4mut-Protein. Die Problematik des Salzgehaltes wurde bereits in Kapitel 4.2.4 erläutert, daher wurde auch hier die spektrale Analyse auf den Wellenlängenbereich zwischen 195 und 240 nm beschränkt.
Mit Hilfe der drei verschiedenen Methoden „CONTIN/LL“, „SELCON3“ und „CDSSTR“ konnten ähnliche Ergebnisse für die Anteile der Sekundärstrukturelemente ermittelt werden. Es wurden 39 bis 43 % Helix, 12 bis 15 % β-Strang, 16 bis 19 % Windungen und 23 bis 31 % unstrukturierte Bereiche bestimmt. Die darauffolgende Analyse mit dem Basisreferenzspektrensatz „SMP56“ lieferte praktisch indentische Ergebnisse.
Es ist offensichtlich, dass eine Erhöhung der Temperatur von 30 auf 50 °C nur sehr geringen Einfluß auf die Anteile der Sekundärstruktur hat.

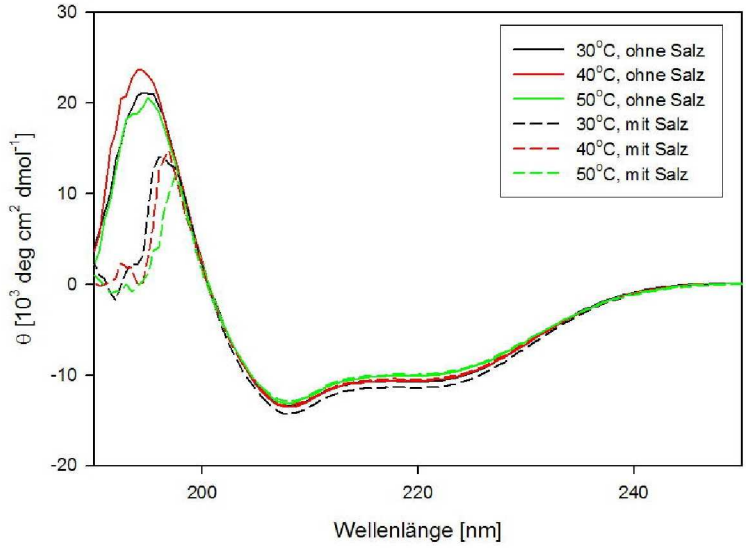


Abbildung 4.39: Fern-UV-CD-Spektren des CD4mut in DPC-Mizellen. Das CD4mut wurde bei drei verschiedenen Temperaturen (30, 40, 50 °C) jeweils mit (gestrichelte Kurven) und ohne Salz (150 mM NaCl, durchgezogene Kurven) untersucht.

4.3.3 Inkorporation des CD4mut-Proteins in POPC-Vesikel

Das CD4mut-Protein wurde wie in Kapitel 3.16.1 in POPC-Vesikel inkorporiert. Zur Abschätzung der Anteile insertierten Proteins kam ein Zentrifugationsassay zum Einsatz (vgl. Kap. 3.16.3). Der nach der Vakuumtrocknung vorhandene weiße, watteähnliche Lipid-/Proteinball wurde in 2,5 ml 20 mM Phosphatpuffer pH 6,8 gelöst, sonifiziert und ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 2,5 ml ^2H_2O gelöst und erneut sonifiziert. Nach Ultrazentrifugation konnte das auf Puffer schwimmende Lipidpellet abgenommen werden. Die wässrige Pufferfraktion und das ggf. vorhandene Bodenpellet wurden abgenommen, lyophilisiert und in Puffer (0,09 % TFA in 40 % Acteonitril) gelöst. Das Pellet wurde in 2,5 ml Vesikelpuffer aufgenommen.
Zur Analyse mittels Reversed Phase Chromatographie (RPC) wurde der gesamte resuspendierte Überstand, jedoch nur 0,2 ml der Pelletfraktion auf die Chromatographie-Säule aufgetragen. Abbildung 4.40 zeigt das Chromatogramm der Überstand- (A) und der Pelletfraktion (B). Betrachtet man die Signalhöhen (CD4mut in Pelletfraktion zu CD4mut in Überstandfraktion 4:1) und das Verhältnis der aufgetragenen Mengen (Pellet zu Überstand 1:12,5), dann beträgt das Verhältnis des in der Vesikelfraktion gefundenen CD4mut zum CD4mut in der Überstandfraktion 50:1. Daraus kann geschlossen werden, dass das CD4mut-Protein zu mindestens 99 % und damit praktisch vollständig in die Vesikel inkorporiert wurde. Die schwierige Trennung von schwimmendem Pellet und Überstandfraktion

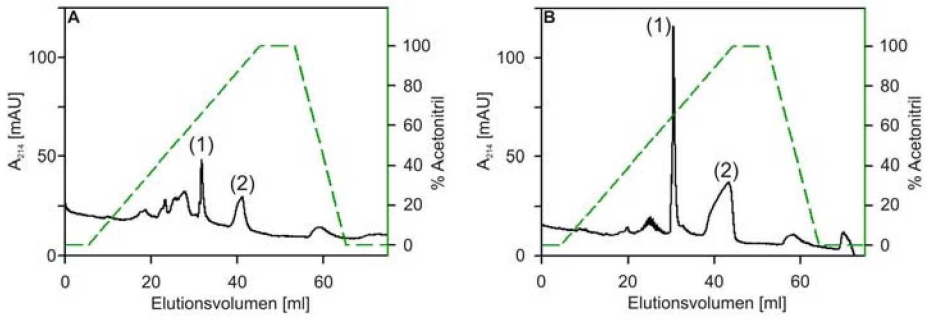


Abbildung 4.40: RPC-Analyse des Inkorporationstests für das CD4mut-Protein. Im gesamten Überstand (**A**) befindet sich im Vergleich zur Pelletfraktion (**B**) deutlich weniger CD4mut (1). In beiden Fraktionen ist auch das Lipid POPC vorhanden (2).

und der damit auftretende Anteil von POPC in der Überstandfraktion (Abb. 4.40 A, Signal (2)) legt den Schluss nahe, dass das detektierte CD4mut (1) eigentlich zur inkorporierten (Pellet-)Fraktion gehört.

4.3.4 Wechselwirkung des membraninsertierten CD4mut-Proteins mit HIV-1 VpUcyt

Das CD4mut-Protein wurde wie in Kapitel 3.16.3 beschrieben in POPC-Vesikel rekonstituiert.
Abbildung 4.41 zeigt die Verteilung des VpUcyt-Proteins zwischen Puffer und Liposompellet-Fraktion in Abwesenheit (Felder A und B) und Anwesenheit (Felder C bis F) membranrekonstituierten CD4mut-Proteins. Die Konzentration des VpUcyt-Proteins betrug in allen Fällen 50 μM. Vor der Zentrifugation entnommene Proben wurden ebenfalls per RPC analysiert und zeigten, dass in jeder Probe praktisch identische Mengen VpUcyt vorlagen. Nach der Separation findet sich ein substanzieller Teil des VpUcyt in der Pelletfraktion wieder. Ein voll hydratisiertes Liposom-Pellet besteht aus multilamellaren Anordnungen, bei denen sich Lipidmembranen, Wasserschichten und puffergefüllte morphologische Defekte abwechseln. Ein typisches Pellet enthält dabei typischerweise etwa 50 % Puffer. Daher erwartet man auch in Abwesenheit einer spezifischen Bindung zwischen VpUcyt und POPC eine entsprechende Menge löslichen VpUcyt-Proteins in der Pelletfraktion. Diese Erwartung deckt sich mit dem beobachteten Peak für VpUcyt in Abbildung 4.41 B.
Die für Abb. 4.41 C und D analysierte Probe enthielt 0,5 mg CD4mut (entspricht einer Konzentration von 62 μM), während die für Abb. 4.41 E und F studierte Probe 2 mg CD4mut (250 μM) enthielt. Der Anteil des VpUcyt in der Pelletfraktion steigt eindeutig mit zunehmender CD4mut-Konzentration (Abb. 4.41 D im Gegensatz zu Abb. 4.41 F). Dies deutet auf spezifische Bindung zwischen den Proteinen hin.

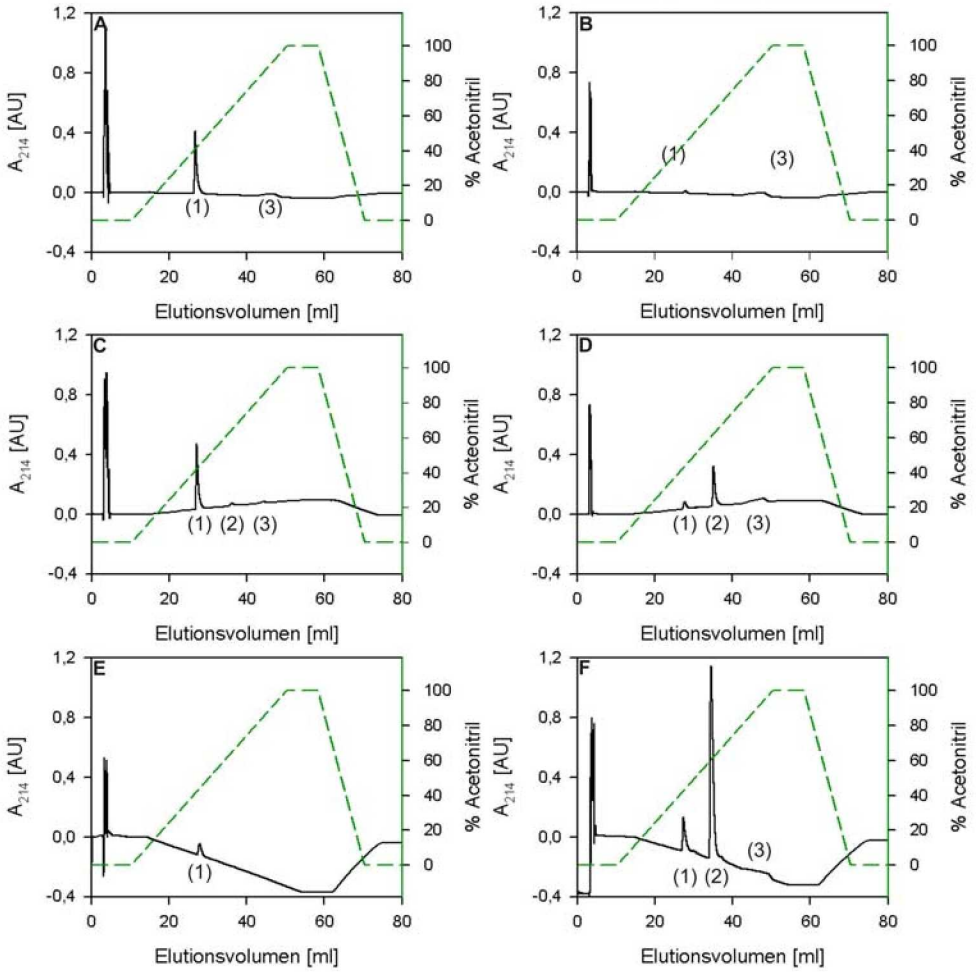


Abbildung 4.41: Analyse der Wechselwirkung von CD4mut und VpUcyt in POPC-Vesikeln mittels Ultrazentrifugation und anschließender Reversed Phase Chromatographie. POPC-Liposomen (10 mg POPC je Probe, 1 ml Volumen) mit verschiedenen Mengen rekonstituierten CD4mut-Proteins (0 mg - oben; 0,5 mg - Mitte; 2 mg - unten) wurden mit 50 μM VpUcyt inkubiert. Die hydratisierten Liposomen wurden mittels Ultrazentrifugation vom Überstand getrennt. Die Zusammensetzung der Überstände (linke Spalte) und der Pelletfraktionen (rechte Spalte) wurde mit analytischer RPC (Gradient der Puffer A und B; grüne, gestrichelte Kurve) analysiert. Die Positionen des VpUcyt (1), des CD4mut (2) und des POPC (3) sind unterhalb der Chromatogramme angegeben.

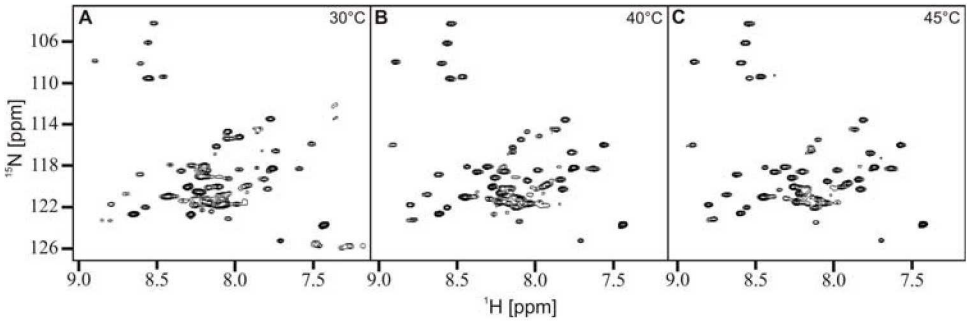


Abbildung 4.42: (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektren zur Optimierung der Messtemperatur. Die Spektren wurden bei 30 (**A**), 40 (**B**) und 45 °C (**C**) aufgenommen. Die Signaldispersion und -schärfe zeigt ein Optimum bei 45 °C, daher wurde diese Temperatur zur Strukturbestimmung gewählt.

Die Separation des membranassoziierten VpUcyt vom freien VpUcyt durch einen einfachen Zentrifugationsschritt in Kombination mit einer RPC-basierten Quantifizierung des VpUcyt und des CD4mut in den beiden Fraktionen kann als Bindungsassay genutzt werden. Die Menge des unspezifisch an die Membran gebundenen oder einfach „gefangenen" (s.o.) VpUcyt-Proteins (Abb. 4.41 B) ist scheinbar deutlich kleiner als die Menge des spezifisch gebundenen VpUcyt-Proteins in Anwesenheit von 250 μM CD4mut (Abb. 4.41 F). Darüber hinaus befindet sich in Anwesenheit von 250 μM CD4mut mehr VpUcyt in der Pelletfraktion (Abb. 4.41 F) als im Überstand (Abb. 4.41 E). Nimmt man eine Eins-zu-Eins-Komplexbildung an, dann sollte daher die Dissoziationskonstante K_d dieses Komplexes in der Größenordnung 250 μM oder kleiner sein. Die zwei möglichen vektoriellen Orientierungen des membranrekonstituierten CD4mut-Proteins tragen zur Unsicherheit dieser Abschätzung bei. Ein signifikanter Anteil des CD4mut könnte für das VpUcyt unzugänglich sein, da die zytoplasmatische Domäne des CD4mut einfach in das Innere des geschlossenen Liposomes zeigt.

4.3.5 NMR-Spektroskopie

4.3.5.1 Temperaturoptimierung mittels 2D-NMR

Um ein Protein strukturell untersuchen zu können, müssen die experimentellen Bedingungen genau optimiert werden. Die Wahl des Puffersystems, des pH und der Temperatur sind entscheidend dafür, dass das Protein seine möglichst native Struktur annimmt. Für das Studium von Membranproteinen kommt erschwerend hinzu, dass diese Proteine aufgrund ihrer stark hydrophoben Transmembrandomäne unlöslich in Puffer sind. Um diese Proteine in Lösung zu bringen, müssen sie entweder in Modellmembransysteme oder in Detergenz-Mizellen rekonstituiert werden (siehe dazu auch Kapitel 1.4.2). Da gängige Modellmembransysteme wie Liposomen zu groß für die direkte Messbarkeit

des inkorporierten Proteins (Resonanzsignale zu breit aufgrund zu langsamer Rotation des Systems) sind, muss die Strukturbestimmung des Membransystems mit Hilfe von möglichst kleinen membran-imitierenden Systemen (wie Mizellen) erfolgen.
In Vorversuchen wurde festgestellt, dass sich das Detergenz Dodecylphosphocholin (DPC) am besten eignete. SDS, DHPC, OG und ähnliche Substanzen lieferten schlechter aufgelöste Spektren. Der Puffer und die Menge des zu verwendenden Detergenz ließ sich zu folgender Probenzusammensetzung optimieren: 0,5 bis 1 mM CD4mut-Protein, 20 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl, 200 mM DPC-d38, 0,02 % (w/v) NaN_3, pH 6,2. Um zwei- und dreidimensionale NMR-spektroskopische Untersuchungen am inkorporierten Protein durchführen zu können, muss die Linienbreite der Resonanzen und die Dispersion im HSQC-Spektrum optimiert werden. Nachdem die Pufferbedingungen bereits optimiert waren, konnte die Messtemperatur als verbleibender Parameter variiert werden. Abbildung 4.42 zeigt ein Reihe von (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektren, die bei 30 °C (A), 40 °C (B) und 45 °C (C) mit ansonsten gleichen Parametern aufgenommen wurden. Mit steigender Temperatur ist auch eine steigende Signaldispersion, speziell im Bereich zwischen 8 und 8,5 ppm, festzustellen. Zudem werden die Signale schärfer und gleichen sich in ihrer Intensität an. Bei weiterer Steigerung der Temperatur kommt es zum einen zu Proteininstabilität, zum anderen können die hier verwendeten, kryogen gekühlten Probenköpfe nicht oberhalb von 50 °C betrieben werden. Aus diesen Gründen wurde eine Temperatur von 45 °C zum Studium der Struktur des CD4mut mittels NMR-Spektroskopie gewählt.

4.3.5.2 Homo- und heteronukleare 2D-NMR-Spektroskopie an CD4mut

Ein Satz von HSQC-Spektren, sowie ein ^{15}N-editiertes (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektrum wurde aufgenommen, um die Möglichkeit einer vollständigen Resonanzzuordnung, verbunden mit einer Strukturbestimmung, zu untersuchen.
Abbildung 4.43 A zeigt das (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum des mizelleninsertierten CD4mut-Proteins. Die beobachtete Dispersion in der Protonendimension ist typisch für Proteine mit vornehmlich α-helikaler Sekundärstruktur bzw. unstrukturierte Proteine. Die mangelnde Dispersion im Bereich von 8 bis 8,4 ppm lässt auf einen substanziellen Anteil an unstrukturierten ('Random Coil')-Bereichen in der Sekundärstruktur des Proteins schließen. Aus den ungleichen Signalhöhen (und damit Linienbreiten) kann man folgern, dass die verschiendenen Bereiche des Proteins unterschiedlicher Dynamik und damit unterschiedlichen Austauschraten des Amidprotons mit dem Wasser unterliegen. Zusätzlich können Signale geringer Intensität durch Residuen verursacht werden, die in direkter sequenzieller Umgebung eines Prolins liegen. Aminosäuren von Untergruppen der untersuchten Konformere können wegen der cis/trans-Isomerie der Proline an diesen Stellen separierte, schwache Signale im (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum erzeugen. Das aliphatenselektive (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum (Abbildung 4.43 B) lässt deutliche Überlagerungen im Bereich der Methylgruppen (0,9 bis 1,2 ppm) und im Bereich einiger Alphaprotonen (4,3 bis 4,5 ppm) erkennen, die ein weiterer Hinweis auf einen unstrukturierten Bereich innerhalb des Proteins sind. Das 2D, ^{15}N-editierte (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektrum (Abbildung

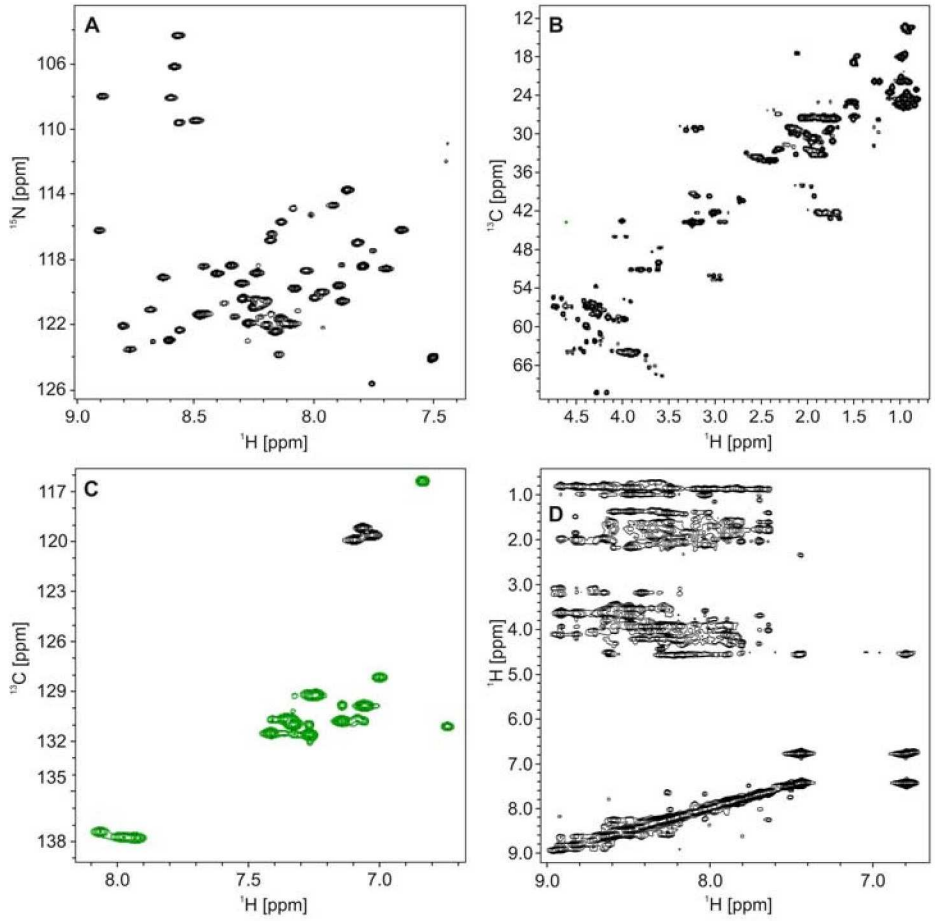


Abbildung 4.43: Hetero- und homonukleare 2D-Spektren von mizelleninsertiertem CD4mut. **A** (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum. Die Resonanzpaare der Glutamin-Seitenketten-Amidgruppen erscheinen aufgrund des TROSY-Effekts nur schwach bzw. gar nicht. **B** (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum des aliphatischen, **C** des aromatischen Bereichs. **D** ^{15}N-editiertes (^{1}H-^{1}H)-NOESY-Spektrum.

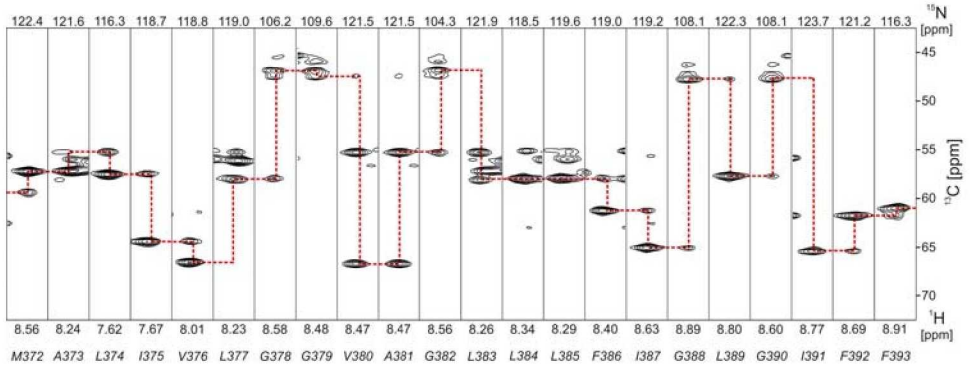


Abbildung 4.44: Streifendarstellung des 3D HNCA-Spektrums der Proteinrückgratkorrelationen der Residuen M372 bis F393, die zur Transmembrandomäne des CD4mut gehören. Jede Amidgruppe ist mit der intraresiduellen C^{α}-chemischen Verschiebung korreliert. Die schwächere Korrelation zum C^{α} der vorangehenden Aminosäure ist ebenfalls zu beobachten. Die gestrichelte Linie spiegelt das Verbindungsmuster wider, die jeweiligen Aminosäuren sind unterhalb der Streifen benannt.

4.43 D) zeigt eine große Anzahl von Kreuzkorrelationen im Bereich der Diagonalen. Daher kann man vermuten, dass es einen gewissen Anteil an α-helikaler Sekundärstruktur im Protein gibt. Betrachtet man die Korrelationen der Amidprotonen zu den aliphatischen Protonen, so stellt man auch in diesem Bereich eine gute Signaldispersion und -quantität bis hin zu den weit entfernten Seitenkettenprotonen (H^{γ}, H^{δ}) fest. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zumindest Teile des Proteins in eine Sekundärstruktur gefaltet sind. Daher erscheint es sinnvoll, eine vollständige Signalzuordnung anzutreten und mit Hilfe von NOE-Distanzeinschränkungen eine Strukturberechnung durchzuführen.

4.3.5.3 Sequenzielle Zuordnung der Rückgratamidgruppen

Für das mizelleninsertierte CD4mut erfolgte die sequenzspezifische Zuordnung (siehe dazu Kapitel 3.17.2.1) der Proteinrückgratamidgruppen (H^{N} und N) sowie der C^{α}- und Seitenketten C^{β}-Resonanzen mit Hilfe verschiedener 3D-Spektren. Aufgrund von dynamischen Eigenschaften der verschiedenen Proteinbereiche wurde eine Kombination von 3D HNCA- (Kay et al. 1990), 3D CBCA(CO)NH- (Grzesiek & Bax 1992b) und 3D CBCANH-Spektren (Grzesiek & Bax 1992a) verwendet. Abbildung 4.44 zeigt eine Sequenz der Proteinrückgratzuordnung mit Hilfe des HNCA-Spektrums. Es sind die Konnektivitäten der einzelnen zur Transmembrandomäne gehörenden Residuen gezeigt. Alle Rückgrat-Amid- und C^{α}-chemischen Verschiebungen dieser Domäne konnten zweifelsfrei identifiziert und zugeordnet werden.

Die sequenzspezifische Zuordnung der Carbonylkohlenstoffresonanzen erfolgte über ein 3D

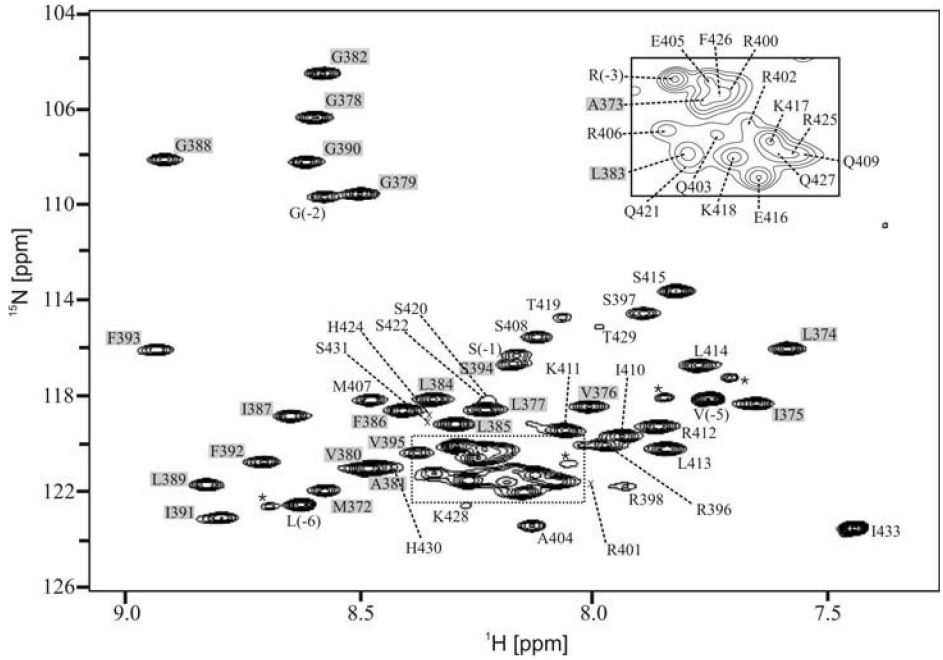


Abbildung 4.45: (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum des CD4mut mit zugeordneten H^{N}N-Paaren. Es konnten alle Residuen mit Ausnahme des H399 dem entsprechenden H^{N}N-Paar zugeordnet werden. Die Aminosäuren, die zur Transmembrandomäne des CD4mut gehören, sind in ihrer Beschriftung grau hinterlegt, der Zentralbereich ist rechts oben vergrößert dargestellt; Signale, die mit einem Stern („$*$“) markiert sind, stellen Resonanzen von Residuen dar, die aufgrund von cis/trans-Isomerie sequenziell benachbarter Proline auftreten.

HNCO- (Ikura et al. 1990) und ein HCACO-Spektrum (Grzesiek & Bax 1993b). Die chemischen Verschiebungen der H^{α}-Resonanzen konnten mit Hilfe eines HBHA(CO)NH-Experimentes ermittelt werden. Mit Hilfe dieses Experimentes konnten alle H^{α}-Resonanzen bei Kenntnis der chemischen Verschiebung des C^{α}-Atoms (aus den oben genannten Spektren) der entsprechenden Aminosäure im 2D (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum identifiziert werden.

Abbildung 4.45 zeigt das (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum des mizelleninsertierten CD4mut-Proteins mit nun zugeordneten H^{N}N-Paaren. Es konnten alle Residuen mit Ausnahme des Histidin 399 zugeordnet werden. Das Fehlen dieser H^{N}N-Korrelation ist auf den starken Signalüberlapp im zugehörigen Bereich zurückzuführen. Zur Transmembrandomäne gehörende Aminosäuren sind grau hinterlegt, der Zentralbereich ist der Übersichtlichkeit halber rechts oben vergrößert dargestellt. Man kann erkennen, dass die Signalintensität der Resonanzen unterschiedlich ist. Residuen der Transmembrandomäne zeigen neben einigen Residuen der zytoplasmatischen Domäne starke, uniform große Signalintensitäten. Es

fehlen die zugeordneten Resonanzen der Seitenketten-Amidgruppen der Glutamin-Reste, die im TROSY-Spektrum nicht oder nur sehr schwach erscheinen. Mit Hilfe der später aufgenommenen NOESY-Spektren war aber eine eindeutige Zuordnung dieser Resonanzen möglich.

4.3.5.4 Zuordnung der Seitenketten-Resonanzen des CD4mut

Die sequenzspezifische Resonanzzuordnung der aliphatischen Seitenkettenresonanzen erfolgte mit Hilfe verschiedener 3D-Experimente. Die chemischen Verschiebungen der aliphatischen Kohlenstoffresonanzen wurden über ein 3D (H)CCH-TOCSY-Experiment (Bax et al. 1990b) ermittelt. Die Zuordnung der Protonenresonanzen erfolgte über ein 3D H(C)CH-COSY- und ein H(C)CH-TOCSY-Experiment (Bax et al. 1990a). Da aus der Zuordnung des Proteinrückgrates (siehe Kapitel 4.3.5.3) bereits die chemische Verschiebung von C^{α} bzw. H^{α} bekannt waren, konnte dieses Resonanzpaar als Ausgangspunkt für die schrittweise Zuordnung der Seitenkettenresonanzen verwendet werden.
Die Vorgehensweise bei der Zuordnung der Seitenkettenresonanzen wurde wie bereits in Kapitel 4.1.4.2 c beschrieben durchgeführt. Die bereits in den 2D-Spektren festgestellten Überlagerungen (siehe Abb. 4.43) konnten mit Hilfe der verschiedenen 3D-Spektren und dem Einsatz der NOESY-Spektren zweifelsfrei aufgelöst werden.
Die sequenzielle Zuordnung der aromatischen Seitenketten erfolgte mittels eines aromatischen (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrums (Abb. 4.43 C) und den 2D (HB)CB(CGCD)HD- sowie (HB)CB(CGCDCE)HE-Experimenten (Yamazaki et al. 1993). Während der letzteren beiden Experimente werden die C^{β}-Resonanzen der Aminosäurereste mit ihren H^{δ}- bzw. H^{ϵ}-Resonanzen korreliert. Da die C^{β}-chemischen Verschiebungen bereits bekannt sind und das aromatische (^{1}H-^{13}C)-HSQC-Spektrum sehr übersichtlich ist, lassen sich in den meisten Fällen mit Kenntnis der H^{δ}- bzw. H^{ϵ}-chemischen Verschiebungen die C^{δ}- bzw. C^{ϵ}-Resonanzen zuordnen.
Zur Kontrolle und Vervollständigung dieser Zuordnung wurden die intraresiduellen (H^{β}-H^{δ})-, (H^{δ}-H^{ϵ})- sowie (H^{ϵ}-H^{ζ})-NOE-Korrelationen im aromatischen und aliphatischen 3D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY-Spektrum verwendet.

4.3.5.5 Vollständigkeit der Resonanzzuordnung

Es wurden für das mizelleninsertierte CD4mut-Protein 64 von 65 möglichen H^{N}N-Resonanzpaaren zugeordnet (98,5 %). Die Zuordnung der H^{α}- und C^{α}-Resonanzen konnte vollständig erreicht werden (100 %), ebenso die Zuordnung der Carbonylkohlenstoffresonanzen (^{13}CO) des Proteinrückgrates.
Für die Seitenkettenresonanzen konnte eine Vollständigkeit von 90 % bei den Protonen (375 von 419) und 100 % bei den ^{13}C-Kernen (189 von 189) erreicht werden, die ^{15}N-Kerne konnten nur zu 10 % zugeordnet werden. Aufgrund der hohen Temperatur und des gewählten pH-Wertes kommt es zum schnellen Austausch mit dem Lösungsmittel und

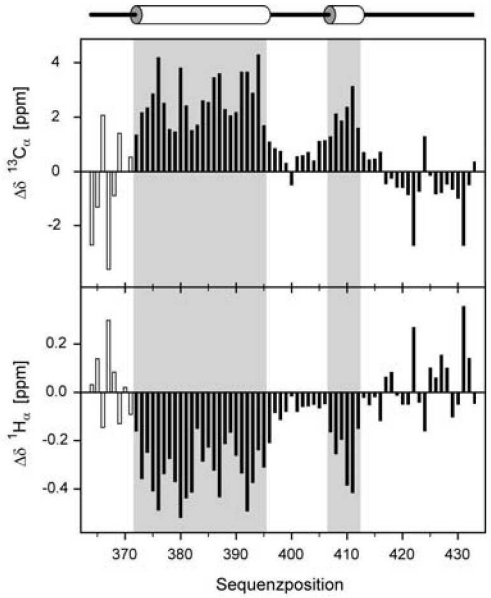


Abbildung 4.46: $^{13}C_\alpha$- und $^{1}H_\alpha$-sekundäre chemische Verschiebungen ($\Delta\delta$) für CD4mut in DPC-Mizellen. Der Konsensus für die Ausdehnung der beiden Helizes ist grau unterlegt. Eine schematische Repräsentation der beiden Helizes ist oberhalb des Diagrammes angegeben. Schwarze Balken repräsentieren Aminosäuren, die zur Transmembran- oder zytoplasmatischen Domäne des CD4mut gehören, helle Balken stellen Aminosäuren des proteolytischen Überhanges dar. Die Referenzwerte für die Ermittlung der sekundären chemischen Verschiebungen wurden aus der Literatur entnommen (Schwarzinger et al. 2000, 2001).

damit zu einer Linienverbreiterung, die eine Detektion praktisch unmöglich macht (vgl. Kapitel 4.1.4.2 d).
Die Resonanzzuordnung für das CD4mut in DPC-Mizellen bei 45 °C wurde in der 'Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB)' hinterlegt, die Eintragungsnummer lautet '15479'.

4.3.5.6 Sekundärstrukturbestimmung mittels chemischer Verschiebungen

Die Analyse der sekundären chemischen Verschiebungen wurde zur Bestimmung der Sekundärstruktur des CD4mut verwendet (siehe dazu Kapitel 3.17.2.2). Für das CD4mut wird ein substanzieller Anteil α-helikaler Struktur erwartet (vgl. Kap. 4.3.2). Typische, mittlere sekundäre chemische Verschiebungen sind 2,6 ppm für $^{13}C_\alpha$- (Niedrigfeldverschiebung) und -0,38 ppm für $^{1}H_\alpha$-Resonanzen (Hochfeldverschiebung) für den Fall einer regulären α-Helix (Wishart & Sykes 1994a).
In Abbildung 4.46 sind die $^{13}C_\alpha$- und $^{1}H_\alpha$-sekundären chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$) für CD4mut in DPC-Mizellen dargestellt. Man kann deutlich zwei durchgehende Bereiche von niedrigfeldverschobenen $^{13}C_\alpha$- und hochfeldverschobenen $^{1}H_\alpha$-sekundären chemischen Verschiebungen erkennen, die das Vorhandensein von α-helikaler Struktur zeigen. Die Ausdehnung der beiden Helizes wurde über Grenzwerte für $\Delta\delta$ $^{13}C_\alpha$ (1,1 ppm) und $\Delta\delta$ $^{1}H_\alpha$ (-0,1 ppm) festgelegt. Damit erhält man die helikalen Segmente 372 bis 395 und 405 bis 412 (basierend auf $\Delta\delta$ $^{13}C_\alpha$) beziehungsweise 372 bis 396 und 407 bis 412 (basierend

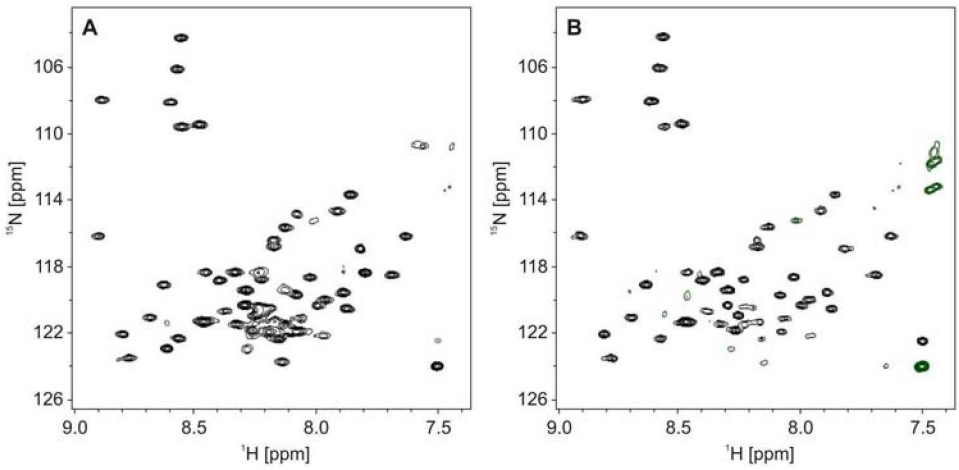


Abbildung 4.47: (^{1}H-^{15}N)-NOE-Spektren des CD4mut. Die Spektren wurden ohne (**A**) und mit (**B**) vorheriger 3 s dauernder Sättigung der Amidprotonen aufgenommen. Fehlende oder negative (in grün) Resonanzen deuten auf erhöhte interne Dynamik der betreffenden Residue hin. Schon aus den geringen Unterschieden der Intensitäten verschiedener Residuen lässt sich schließen, dass es Bereiche stark reduzierter Beweglichkeit gibt. Die Spektren wurden bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T aufgenommen.

auf $\Delta\delta$ $^{13}C_\alpha$), deren Enden jeweils ungenau definiert sind. Im gesamten kann aus dieser Analyse eine hydrophobe Transmembrandomäne von M372 bis V395 und eine kurze zytoplasmatische Helix von M407 bis R412 abgeleitet werden. Die fraktionale Helizität der Transmembrandomäne betrug etwa 100 % basierend auf den $\Delta\delta$ $^{13}C_\alpha$-Werten und etwa 86 % basierend auf den $\Delta\delta$ $^{1}H_\alpha$-Werten. Die zytoplasmatische Helix zeigt eine geringere Helizität, man findet etwa 80 % (aus $\Delta\delta$ $^{13}C_\alpha$) bzw. etwa 69 % (aus $\Delta\delta$ $^{1}H_\alpha$). Nimmt man an, dass die Residuen außerhalb dieser beiden helikalen Bereiche eine Helizität von 0 % besitzen (sie befinden sich also nicht in einer Helix), dann kann die globale Helizität des CD4mut-Proteins bestimmt werden. Aus den $\Delta\delta$ $^{13}C_\alpha$-Werten ergibt sich eine Helizität von etwa 43 %, aus den $\Delta\delta$ $^{1}H_\alpha$-Werten von etwa 35 % für das Gesamtpolypeptid CD4mut.

4.3.5.7 Der heteronukleare (^{1}H-^{15}N)-NOE

Die Beweglichkeit des Proteinrückgrates wurde mit Hilfe des heteronuklearen (^{1}H-^{15}N)-NOE abgeschätzt (siehe Kapitel 3.17.2.3). Ein Hetero-NOE-Wert von etwa +0,8 bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 oder 18,8 T gibt an, dass die Flexibilität des Proteinrückgrates in diesem Bereich stark eingeschränkt ist.
Aus der Analyse der sekundären chemischen Verschiebungen (Kapitel 4.3.5.6) und der Topologie des CD4mut-Proteins wird vermutet, dass das Studium der Hetero-NOEs eine rigide Transmembrandomäne und einen etwas weniger rigiden α-helikalen Bereich inner-

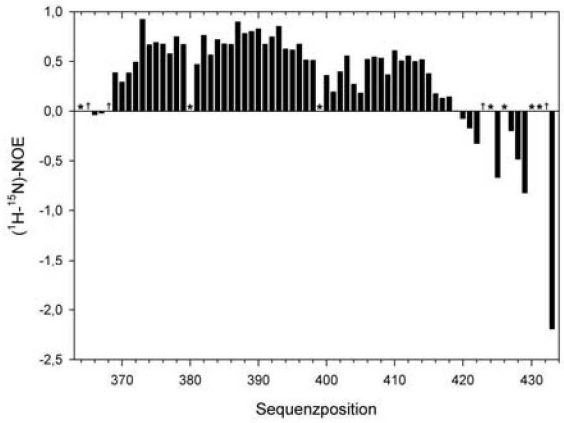


Abbildung 4.48: (^{1}H-^{15}N)-Hetero-NOE-Werte des CD4mut in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz. Der Hetero-NOE-Wert berechnet sich aus dem Quotienten der Resonanzintensitäten mit bzw. ohne Vorsättigung der Protonen (Gleichung 3.2). Je größer der Wert des NOE, desto rigider die Struktur in diesem Bereich. Der NOE kann einen Wert von 0,8 nicht überschreiten (siehe dazu Kapitel 3.17.2.3). Das Protein befindet sich zu großen Teilen in einer rigiden Struktur, jedoch sind die Termini stark flexibel. Die Position der Proline ist durch „†" markiert; Residuen, deren Intensitäten nicht bestimmt werden konnte, sind mit einem „*" markiert. Die Spektren zur Berechnung des Hetero-NOE wurden bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T aufgenommen.

halb der zytoplasmatischen Domäne zeigt. Einen ersten Eindruck liefert das Betrachten der aufgenommenen Spektren (Abb. 4.47) ohne (A) und mit (B) vorangehender, 3 s dauernder Sättigung der Protonen. Es ist zu erkennen, dass einige Residuen in (B) etwa dieselbe Intensität wie in (A) besitzen. Daraus kann man schließen, dass es Bereiche stark reduzierter Beweglichkeit gibt. Die starke, jedoch mit umgekehrten Vorzeichen auftretende Resonanz des C-terminalen I433 (zur Zuordnung vgl. Abb. 4.45) deutet stark darauf hin, dass der C-Terminus sehr beweglich ist.
Abbildung 4.48 zeigt die gewonnenen Hetero-NOE-Werte für mizelleninsertiertes CD4mut in Abhängigkeit von der Sequenzposition. Im Bereich der ermittelten Helizes (siehe Kapitel 4.3.5.6) ist die Beweglichkeit des Proteinrückgrates stark eingeschränkt. Es lassen sich dennoch Unterschiede in der Rigidität zwischen beiden Helizes feststellen. Während die ermittelte Helix in der Transmembrandomäne aufgrund der Hetero-NOE-Werte von durchweg 0,8 zu 100 % rigide erscheint, ist die zytoplasmatische Helix mit durchschnittlichen Hetero-NOE-Werten von 0,6 scheinbar flexibler, es finden zusätzliche Bewegungen der Rückgrat-Amidgruppen bzw. ein schneller Austausch zwischen verschiedenen Konformationen statt. Man erkennt weiterhin, dass der C-Terminus des Proteins stark flexibel ist. Das offensichtliche Fehlen stabilisierender Sekundärstruktur und die hohe Temperatur sind Ursache für die erhöhte Beweglichkeit der betroffenen Residuen.

4.3.5.8 Bestimmung und Analyse der struktureinschränkenden Parameter aus NOE-Korrelationen

Zur Analyse der räumlichen Struktur wurde das CD4mut in mizelleninsertiertem Zustand untersucht. Die zu wählende Mischzeit in den NOESY-Spektren muss auf die apparente

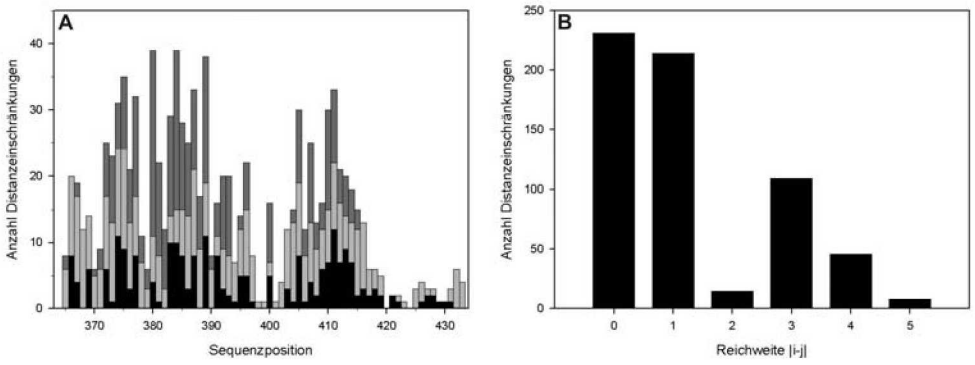


Abbildung 4.49: Anzahl der zur Strukturberechnung verwendeten Distanzeinschränkungen. **A** Anzahl der verwendeten intramolekularen Distanzeinschränkungen pro Sequenzposition der Residue. Schwarz: intraresiduelle ($|i-j|=0$), hellgrau: sequenzielle ($|i-j|=1$) Distanzeinschränkungen, dunkelgrau: Distanzeinschränkungen mittlerer ($2 \leq |i-j| \leq 5$) Reichweite. **B** Anzahl in Abhängigkeit von ihrer sequenziellen Reichweite. Es sind keine Distanzeinschränkungen für langreichweitige Kontakte ('long-range NOEs') zu finden.

Masse des beobachteten Systems bezogen werden, da es sonst zu verfälschenden Spindiffusionseffekten kommen kann. Je größer der beobachtete Komplex, desto kleiner muss die Mischzeit gewählt werden. Aus der Assoziationszahl von 50 bis 60 Molekülen pro Mizelle des DPC (LeMaire et al. 2000) kann errechnet werden, dass eine Mizelle ein Gewicht zwischen 20 und 30 kDa besitzt. Dem hinzu muss noch das Molekulargewicht des CD4mut (7850 Da) gerechnet werden, sodass der beobachtete Komplex ein Gewicht von etwa 30 bis 35 kDa besitzt. Die Mischzeit sollte also nicht länger als 150 ms betragen, um Spindiffusionseffekte möglichst auszuschließen.

Die Zuordnung der intramolekularen (^{1}H-^{1}H)-NOE-Korrelationen wurde, wie bereits in Kapitel 3.17.3 beschrieben, automatisiert mit dem Programm RADAR durchgeführt. RADAR verknüpft die Programme ATNOS (Herrmann et al. 2002a) und CANDID (Herrmann et al. 2002b), die auf Raumstrukturberechnungen mittels Torsionswinkeldynamik durch das Programm CYANA (Güntert et al. 1997) beruhen.
Zur Strukturanalyse und -berechnung mittels RADAR standen das in H_2O aufgenommene aliphatische 3D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY-Spektrum, das in D_2O aufgenommene aliphatische 3D (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY-Spektrum, das 3D (^{1}H-^{15}N-^{1}H)-NOESY-HSQC-Spektrum und das 3D aromatische (^{1}H-^{13}C-^{1}H)-HSQC-NOESY-Spektrum zur Verfügung.
Die Identifizierung von NOE-Signalen, sowie die Strukturberechnung geschah zunächst in einem iterativen Verfahren. Nach der Berechnung der räumlichen Struktur wurden die ermittelten Distanzeinschränkungen in einem interaktiven Prozess manuell untersucht. Fehlerhafte NOE-Korrelationen wurden gelöscht und manuell gefundene hinzugefügt. Die

modifizierten Listen der Distanzeinschränkungen wurden anschließend in eine erneute Strukturberechnung mittels CYANA eingegeben; dieser Prozess wurde daraufhin wiederholt.

Abbildung 4.49 A zeigt die Anzahl der zur Strukturberechnung verwendeten Distanzeinschränkungen pro Aminosäurerest. In der Transmembrandomäne fallen vor allem die Glycine (Sequenzpositionen 378, 379 und 382) wegen des Fehlens einer Seitenkette durch eine geringe Anzahl von Distanzinformationen auf. Der interhelikale Bereich um die Residue R400 ist ebenfalls nur schlecht definiert. Aufgrund der hohen internen Dynamik (vgl. Kapitel 4.3.5.7) können erwartungsgemäß keine Distanzeinschränkungen gefunden werden, die weiter als zur benachbarten Aminosäure (R=1) reichen. Daraus kann direkt abgelesen werden, dass die strukturelle Fixierung dieses Sequenzbereiches durch die Strukturberechnung nicht möglich ist. Im gesamten kann aber festgestellt werden, dass die beiden helikalen Bereiche durch eine ausreichende Anzahl von NOE-Korrelationen definiert werden. Abbildung 4.49 B zeigt diese Distanzeinschränkungen in Abhängigkeit von ihrer sequenziellen Reichweite. Da es keine langreichweitigen Distanzeinschränkungen gibt (d.h. $|i-j| \geq 6$), kann die Bestimmung einer möglichen Tertiärstruktur des CD4mut in dieser Studie nicht erfolgen. Das Ergebnis der Strukturberechung kann also nur Sekundärstrukturelemente umfassen. In der *in vivo*-Situation des CD4 kommt es nicht zu Tertiärstrukturkontakten, da die Transmembrandomäne aufgrund ihrer Eigenschaft in der Membran insertiert ist und topologisch nicht mit der zytoplasmatischen Domäne wechselwirken kann. Daher konnte im Vorfeld dieser Untersuchung das Erscheinen einer Tertiärstruktur ausgeschlossen werden.

4.3.5.9 Strukturberechnung und -analyse des mizelleninsertierten CD4mut-Proteins

Die 623 gewonnenen Distanzeinschränkungen wurden für die Berechnung der räumlichen Struktur des CD4mut mittels CYANA (Güntert et al. 1997) verwendet. Ausgehend von Zufallskonformationen des Moleküls wurde eine Schar von 100 Strukturen mittels Torsionswinkeldynamik-Simulationen berechnet. Wie bereits in Kapitel 4.1.4.9 erläutert, besitzt die Strukturberechnung im Torsionswinkelraum den Vorteil, dass Topologie und Bindungslängen während der Simulation konstant gehalten werden können. Die Strukturberechnung resultierte in eine Schar der 100 Konformere, deren Güte dann aus der CYANA-Zielfunktion abgeschätzt werden kann.
Die Analyse der Strukturberechnungen wurde mit den Programmen PROCHECK-NMR (Laskowski et al. 1996) und MOLMOL (Koradi et al. 1996) durchgeführt.

Aus dem Muster von sekundärstrukturtypischen NOE-Korrelationen kann man neben dem Vorhandensein auch auf die Ausdehnung der Sekundärstruktur des Proteins schließen (vgl. Kapitel 4.1.4.9). Abbildung 4.50 stellt die ermittelten NOE-Kreuzkorrelationen für die jeweiligen sekundärstrukturtypischen Kontakte dar. Es kann daraus abgeleitet werden, dass



Abbildung 4.50: Sekundärstrukturtypische NOE-Kreuzkorrelationen für CD4mut. α-helikal typische Korrelationen (z.B. $d_{NN}(i,i+1)$, $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$) sind für die in der Sekundärstrukturanalyse (Kapitel 4.3.5.6) gefundenen Bereiche M372 bis V395, sowie M407 bis R412 und darüber hinaus zu finden. Die für β-Stränge typischen Muster starker $d_{\alpha N}(i,i+1)$-Korrelationen bei gleichzeitigem Fehlen von $d_{NN}(i,i+1)$-Korrelationen treten nahezu nicht auf. Das Fehlen von verschiedenen Korrelationen ist zum einen auf das Auftreten von Signalüberlagerungen und zum anderen auf das Fehlen der C_β-Kerne bei Glycinen (für $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$- und $d_{\beta N}(i,i+1)$-Korrelationen) zurückzuführen. Die beiden Termini, insbesondere der C-Terminus, stellen sich durch das Fehlen de facto jeglicher sekundärstrukturtypischer NOE-Korrelationen dar.

für die in Kapitel 4.3.5.6 ermittelten Sekundärstrukturelemente tatsächlich auch die typischen Kreuzkorrelationen auftreten. Die Transmembranhelix (M372 bis V395) wird durch die für α-Helizes typischen NOE-Korrelationen ($d_{NN}(i,i+1)$, $d_{\alpha N}(i,i+1)$, $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$) festgelegt, ebenso die zytoplasmatische Helix (M407 bis R412). Bei genauerer Betrachtung jedoch scheint die zytoplasmatische Helix sogar die Residuen L413 und L414 zu umfassen. Das konstant gleichmäßige Auftreten der beobachteten Korrelationen deutet auf eine hohe Regularität beider Helizes hin. Es ist also davon auszugehen, dass die NOE-basierte Strukturberechnung zwei gut definierte Helizes liefern wird. Einige Bereiche zeigen wenige bis gar keine sekundärtypischen NOE-Korrelationen. Das Auftreten starker $d_{\alpha N}(i,i+1)$-Korrelationen bei gleichzeitigem Fehlen der $d_{NN}(i,i+1)$-Korrelationen im N-Terminus des Proteins deuten darauf hin, dass dieser nicht zur CD4(372-433)-Proteinsequenz gehörende Teil gestreckt ist, ähnlich wie die Aminosäuren in einer β-Strangkonformation. Der interhelikale Bereich (Residuen R398 bis Q403) zeichnet sich auch durch das Fehlen der beschriebenen NOE-Korrelationen aus, hieraus kann auf eine eher ungeordnete Struktur geschlossen werden. Da die Analyse der Hetero-NOEs (Kapitel 4.3.5.7) eine eher eingeschränkte Beweglichkeit des Proteinrückgrates in diesem Bereich zeigt, scheint eine fixierte Windung ('Turn') in diesem Bereich als Sekundärstruktur möglich. Der C-Terminus des CD4mut-Proteins zeigt mit Ausnahme von 2 Korrelationen keinerlei sekundärstrukturtypischen Kontakte sequenziell C-terminal von K418. In diesem Bereich konnte schon durch die Analyse der sekundären chemischen Verschiebungen (Kapitel 4.3.5.6) und der Hetero-NOE-Analyse (Kapitel 4.3.5.7) keine reguläre Sekundärstruktur bestimmt werden.

Die aus den Distanzeinschränkungen berechnete Konformerenschar kann im Bezug auf die ermittelten Sekundärstrukturelemente analysiert werden. Abbildung 4.51 A zeigt die

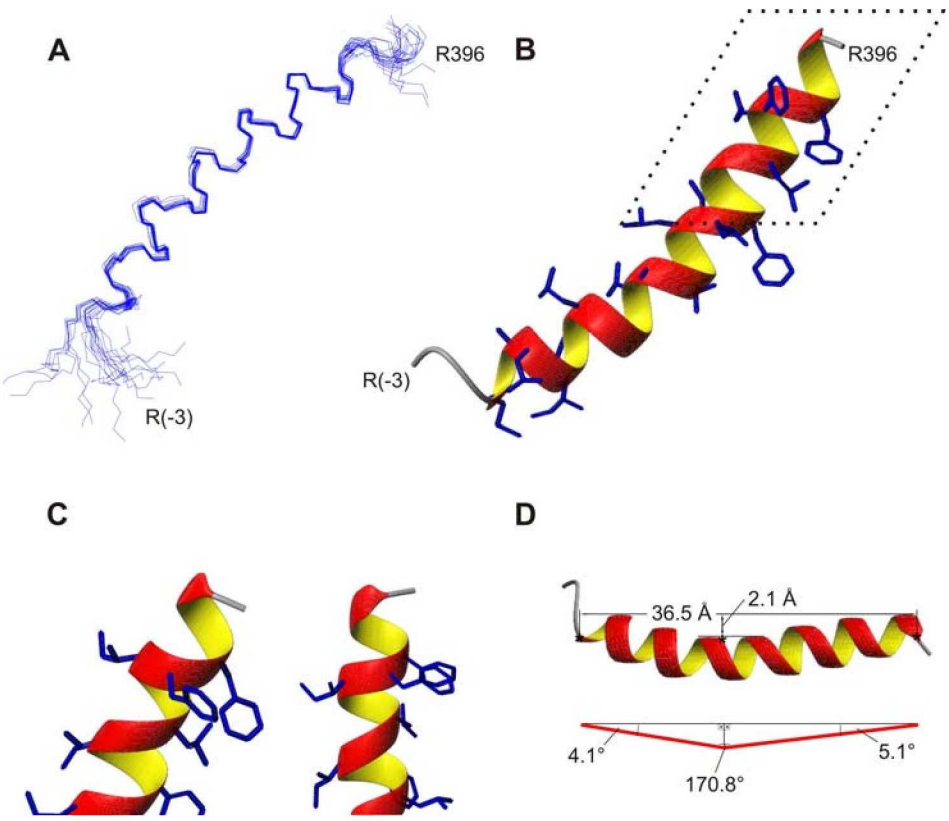


Abbildung 4.51: Strukturelle Darstellung der Transmembranhelix des CD4mut. **A** Strukturenschar von 20 Konformeren aus der Torsionswinkeldynamik. Darstellung der Residuen R(-3) bis R396, bei der die Rückgratschweratome der Residuen 372 bis 393 überlagert wurden (Rückgrat-RMSD: 0,269 Å, Schweratom-RMSD: 0,549 Å). **B** Visualisierung eines Konformers. Das Proteinrückgrat ist in der 'Ribbon'-Darstellung gezeigt, die Schweratomkonnektivitäten der Seitenkettenatome von M372 bis F393 sind in Liniendarstellung angegeben. Der durch eine Raute bezeichnete Bereich wird in (C) vergrößert dargestellt. **C** Der in (B) markierte Bereich wurde hervorgehoben und in zwei verschiedenen Winkeln visualisiert. Es fällt auf, dass die beiden aromatischen Seitenketten der Phenylalanine 392 und 393 dieselbe Ausrichtung in derselben Ebene einnehmen. **D** Abschätzung der Krümmung der Helix. Ursächlich hierfür kann ein unzureichender Durchmesser der Mizelle sein.

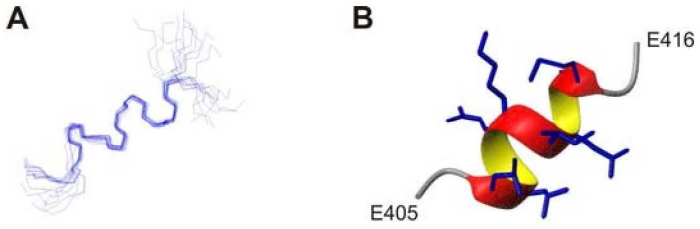


Abbildung 4.52: Strukturelle Darstellung der zytoplasmatischen Helix des CD4mut. **A** Strukturenschar von 20 Konformeren aus der Torsionswinkeldynamik. Darstellung der Residuen E405 bis E416, bei der die Rückgratschweratome der Residuen 407 bis 414 überlagert wurden (Rückgrat-RMSD: 0,298 Å, Schweratom-RMSD: 0,869 Å). **B** Visualisierung eines Konformers. Das Proteinrückgrat ist in der 'Ribbon'-Darstellung gezeigt, die Schweratomkonnektivitäten der Seitenkettenatome von M372 bis F393 sind in Liniendarstellung angegeben.

Überlagerung einer Konformerenschar von 20 Konformern für die Transmembranhelix. Die Strukturberechnung zeigt, dass das Ende der Helix nicht genau definiert ist. Eine Subpopulation der Konformere zeigt das Helixende bei F393, während sich in einer anderen Subpopulation die Helix bis V395 ausdehnt. Die gewählten Elemente der Einzelstrukturen werden überlagert ('gefittet'), daraufhin kann die mittlere quadratische Abweichung (root mean square, RMSD) als Maß für die Abweichung vom Sekundärstrukturelement des energieärmsten Konformers berechnet werden. Fittet man die Rückgratschweratome, dann erhält man einen RMSD-Wert von 0,269 Å, fittet man alle Schweratome in dieser Region, dann erhält man einen RMSD-Wert von 0,549 Å. Die starke Divergenz der nicht-überlagerten Bereiche zeigt, dass die Strukturberechnung keine globale Konvergenz der Konformere liefert, die Sekundärstrukturelemente jedoch gut definiert sind. Das Fehlen einer größeren Anzahl von Distanzeinschränkungen für die Glycine 378, 379 und 382 (siehe Abbildung 4.49) hat zur Folge, dass die Struktur der Transmembranhelix in diesem Bereich etwas weniger genau definiert ist. Ein repräsentativer Konformer ist in Abbildung 4.51 B dargestellt. Das Proteinrückgrat der Residuen R(-3) bis R396 ist in 'Ribbon'-Darstellung gezeigt, die kovalenten Bindungen zwischen Schweratomen der Seitenketten der Transmembranresiduen M372 bis F393 sind in Liniendarstellung repräsentiert. Der durch die gestrichelte Raute bezeichnete Bereich ist in Abbildung 4.51 C hervorgehoben dargestellt. Betrachtet man die aromatischen Seitenketten der Phenylalanine 392 und 393, dann wird dieselbe Ausrichtung in derselben Ebene offensichtlich. Möglicherweise dient diese „Verdickung" der Helix, die wohldefiniert in allen berechneten Konformeren auftritt, als transmembranterminierendes Element (vgl. dazu auch im Folgenden Abbildung 4.54), die eine korrekte Ausrichtung und/oder eine korrekte Konstitution der Helix steuert. Die festgestellte Krümmung der Helix wurde in Abbildung 4.51 D quantifiziert. Hieraus kann jedoch keine biologische Relevanz abgeleitet werden, denn die Krümmung der Helix kann ihre Ursache in einem zu geringen Durchmesser der Mizelle haben. Desweiteren ist die korrekte Bestimmung der Helixachse eines nur durch sekundärstrukturelle Elemente

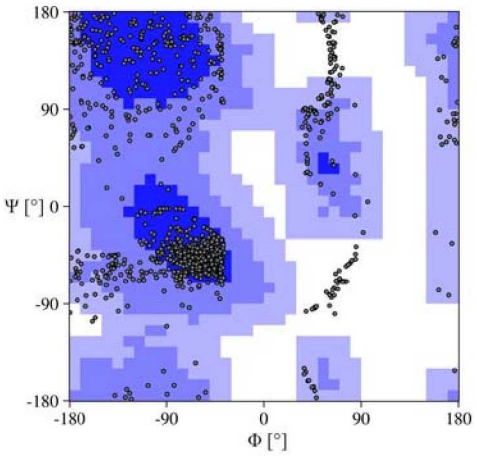


Abbildung 4.53: Ramachandran-Plot der berechneten Strukturen von CD4mut. Dargestellt sind die Φ- und Ψ-Torsionswinkel für alle Aminosäuren der 20 berechneten, energieärmsten Konformere des Proteins in Grad. Dunkelblau: Bevorzugte Regionen (Oben links: β-Faltblatt-Konformation; Mitte links: rechtsgängige α-Helix; Mitte rechts: linksgängige α-Helix und 3_{10}-Helix); Blau: Erlaubte Regionen; Hellblau: Weitgehend erlaubte Regionen. Glycine können aufgrund ihrer fehlenden Seitenkette jede beliebige Φ-/Ψ-Torsionswinkelkorrelation im Ramachandran-Plot einnehmen.

bestimmten Proteins durch NOE-basierende Distanzeinschränkungen nicht ohne weiteres möglich. Der Einsatz von residuellen dipolaren Kopplungen (RDCs) könnte zu einer Klärung beitragen.
Die berechneten Konformere wurden auch im Bezug auf die zytoplasmatische Helix überlagert (Abbildung 4.52). Es wurden die Residuen E405 bis E416 dargestellt, während die Residuen M407 bis L414 überlagert wurden. Man erhält für die Überlagerung der Proteinrückgratschweratome einen RMSD-Wert von 0,298 Å, für die Überlagerung aller Schweratompositionen in diesem Bereich 0,869 Å. Auch hier zeigt die starke Divergenz der nicht-gefitteten Bereiche, dass die Strukturberechnung keine globale Konvergenz der Konformere liefert. Ein repräsentativer Konformer der zytoplasmatischen Helix ist in Abbildung 4.52 B dargestellt. Das Proteinrückgrat der Residuen E405 bis E416 ist in 'Ribbon'-Darstellung gezeigt, während die Seitenketten der Residuen M407 bis L414 in Liniendarstellung repräsentiert sind.

Die Strukturberechnung resultierte nicht in einer konvergierenden Schar Konformere. Ursächlich hierfür ist das Fehlen langreichweitiger Kontakte (siehe Abbildung 4.49), welche die Ausrichtung der gefundenen Sekundärstrukturmerkmale zueinander definieren würden. Daher macht es auch wenig Sinn, die gefundenen Konformere zueinander zu fitten und statistische Untersuchungen zur Gesamtstruktur anzustellen. Der Ramachandran-Plot (Ramachandran et al. 1963) stellt eine sinnvolle Möglichkeit dar, die berechneten Strukturen auf ihre Güte zu untersuchen (vgl zu Kapitel 4.1.4.9). Abbildung 4.53 zeigt den Ramachandran-Plot für die Aminosäuren der 20 energieärmsten Konformere, von denen mehr als 95 % (58 % in bevorzugten Regionen, 27 % in erlaubten Regionen, 9 % in weitgehend erlaubten Regionen) in den erlaubten Bereichen zu finden sind. Aminosäuren mit abweichenden Φ-/Ψ-Torsionswinkelkoordinaten befinden sich in den Strukturbereichen geringerer Koordinatenpräzision, vor allem im carboxyterminalen Bereich des Proteins.

Abbildung 4.54 A zeigt die Oberflächendarstellung eines repräsentativen Konformers des CD4mut. Die Aminosäuresequenz des CD4mut (Abb. 4.36) enthält 16 positiv (inklusive der Histidine) und 2 negativ geladene Residuen, was die stark positiv geladene Oberfläche der zytoplasmatischen Domäne erklärt. Im interhelikalen Bereich (Residuen 396 bis 404) befinden sich 5 Arginin-Reste, die für die starke Konzentration positiver Ladungen verantwortlich sind. Aufgrund der Sequenzposition der beteiligten Residuen befindet sich dieser „positive Patch“ in direkter Nähe (oder sogar Kontakt) zur Mizelle. Das repulsive Potential, dass durch die hohe Dichte an gleichnamiger Ladung erzeugt wird, könnte ursächlich sein für die relative Starre dieses Sequenzbereiches, die durch die Hetero-NOEs ermittelt wurde (siehe Kapitel 4.3.5.7). Die aus vornehmlich hydrophoben Aminosäuren zusammengesetzte Transmembrandomäne zeigt eine ungeladene Oberfläche. In der Kompositdarstellung dieses Konformers (Abbildung 4.54 B) ist die van-der-Waals-Oberfläche des Proteins mit dem Rückgrat in 'Ribbon'-Darstellung gezeigt. Man erkennt, dass das Raumvolumen des positiven Patches größtenteils von den Seitenketten der Arginine erzeugt wird. Im Übergangsbereich zwischen Transmembran- und zytoplasmatischer Domäne, die durch das gestrichelte Rechteck hervorgehoben und in Abb. 4.54 C vergrößert dargestellt wird, kommt es durch das Zusammenwirken der Seitenketten der transmembranen Residuen F392 und F393, sowie der Seitenkette der zytoplasmatischen Aminosäure R396 zur Ausbildung einer „Verdickung“. Diese strukturelle Besonderheit, die mit dem Anfang des positiven Patches übereinstimmt, könne funktionell für die Ausrichtung und/oder Terminierung der Transmembrandomäne des Proteins sorgen. Das N-terminale Ende der Transmembranhelix zeigt auch eine solche Besonderheit, die in diesem Falle durch die Seitenkette des M372 bestimmt wird.

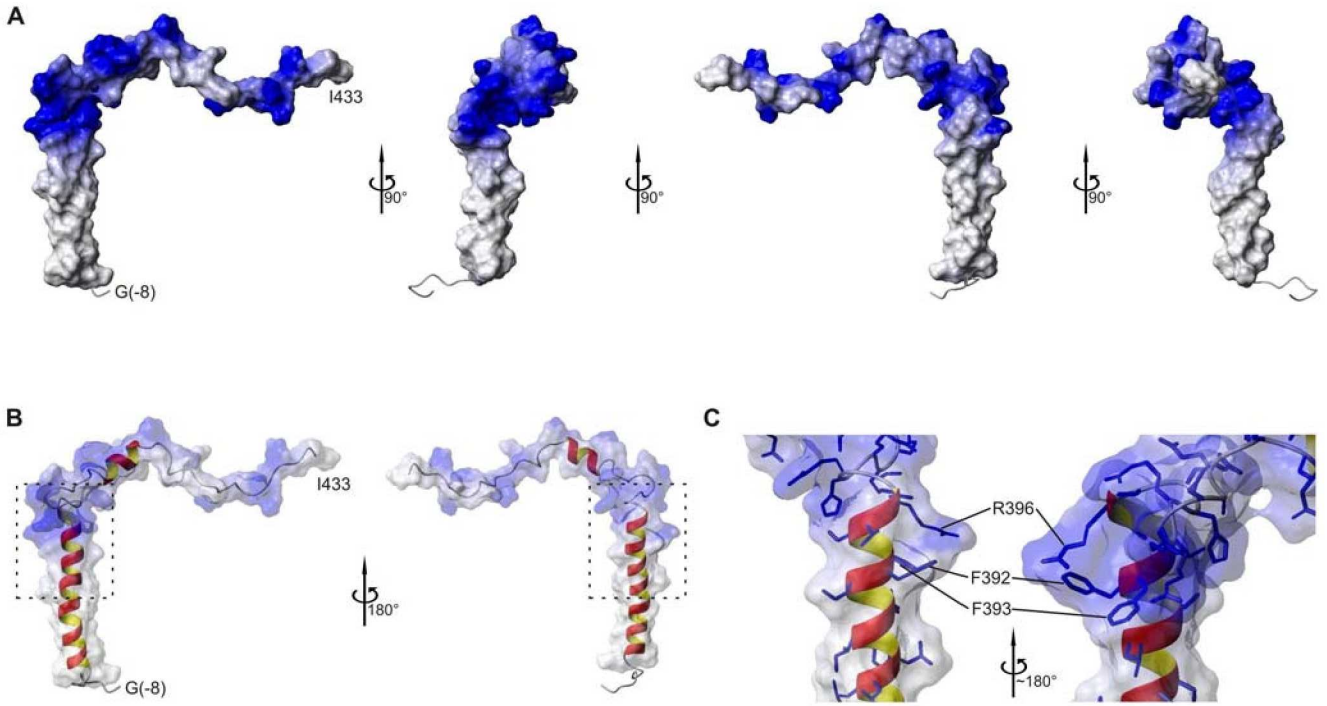


Abbildung 4.54: Oberflächendarstellung eines repräsentativen Konformers der CD4mut-Strukturberechnung. Die negativ geladenen Residuen sind in rot, die positiv geladenen Residuen in blau dargestellt. Aminosäuren, die nicht zur Sequenz des CD4(372-433) gehören, sind in der 'Ribbon'-Darstellung gezeigt (G(-8) bis S(-1)). **A** 'Seitenansicht' des CD4mut-Proteins. Die Transmembrandomäne ist erwartungsgemäß nicht geladen, während die zytoplasmatische Helix stark positiv geladen ist. Die größte Ladungsdichte tritt im Zwischenbereich der beiden Helizes in unmittelbarer Membrannähe auf. **B** Kompositdarstellung des CD4mut. Man erkennt das Proteinrückgrat in 'Ribbon'-Darstellung innerhalb der berechneten Oberfläche des Proteins. Die Ladungsverteilung ist in gleicher Weise wie in (A) zu interpretieren. Der gestrichelte Bereich ist in (C) deutlich vergrößert dargestellt. **C** Stark vergrößerte Darstellung des Überganges von Transmembran- zu zytoplasmatischer Domäne. Die Seitenketten von F392, F393 und R396 bilden eine „Verdickung“ im Übergangsinterface.

4.3.5.10 Austauscheffekte mit dem Lösungsmittel

Zur Identifizierung von Wasserstoffbrückenbindungen in Proteinen mittels NMR-Spektroskopie existieren verschiedene Möglichkeiten: Durch die direkte Messung von skalaren Kopplungen, die durch die Wasserstoffbrückenbindung vermittelt werden, durch Nachweis einer stark reduzierten Austauschrate der in die Bindungen involvierten Amidprotonen, oder das Studium der NOE-Korrelation zwischen dem Amidproton und dem umgebenden Wasser im 3D (^{1}H-^{15}N-^{1}H)-NOESY-HSQC-Spektrum. Die direkte Messung der skalaren Kopplungen war nicht möglich, da die (H^N-CO)-Korrelationssignale aufgrund der schnellen Relaxation kaum detektierbar sind. Um die gewünschten Informationen zu erhalten, wurden daher H_2O-/D_2O-Austauschraten (siehe auch Kapitel 3.17.2.6) der CD4mut-Amidprotonen, sowie der NOE zwischen H_2O und den Amidprotonen bestimmt.

Die NOE-Signale im (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-NOESY-HSQC-Spektrum, die eindeutig dem Wassersignal zugeordnet werden konnten, wurden mit Hilfe der Auswerteroutine CARA (Keller 2004) integriert. Die gewonnene Intensität wurde zur Intensität des Amid-Kreuzsignales in Relation gesetzt und dann klassifiziert. Kaum oder nicht-vorhandenen Korrelationen wurde ein Wert von 0,01, mittleren ein Wert von 0,4, und starken Korrelationen ein Wert von 1 zugeordnet. Regionen geringer Wasserpräsenz (das Innere von Mizellen) oder Strukturen mit stabilen Wasserstoffbrückenbindungen können damit direkt dargestellt werden (Abbildung 4.55 A). Im Bereich der Transmembrandomäne sind nahezu keine Korrelationen zum Wasser zu erkennen, die beobachteten Amidprotonen sind offensichtlich an Wasserstoffbrücken beteiligt und/oder aufgrund der angenommenen Position in der Mizelle nur eingeschränkt für H_2O zugänglich. Die zentralen Residuen I410 bis L414 der zytoplasmatischen Helix zeigen auch einen verringerten NOE zum Wasser, daraus kann man schließen, dass die Amidprotonen in diesem Bereich an Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Die nicht in stabilen Sekundärstrukturen involvierten Residuen zeigen einen starken NOE zum Wasser, was ihre vollständige Lösungsmittelzugänglichkeit nahelegt.

Die NMR-Probe des CD4mut-Proteins wurde zur Messung der HD-Austauschraten lyophilisiert und dann in reinem D_2O aufgenommen (siehe Kapitel 3.17.2.6). Abbildung 4.55 B zeigt das Ergebnis der Analyse. Die Mindestlebensdauer der Amidprotonen der Transmembranhelix ist 4 Stunden. Viele der Amidprotonen verbleiben aber auch deutlich länger, teilweise 50 Stunden und mehr (Daten nicht gezeigt). Am N-terminalen Ende der Helix zeigen die eindeutig zu dieser Helix gehörenden Residuen M372 und A373 eine deutlich kürzere Amidproton-Lebensdauer als im restlichen Teil der Helix. Es ist möglich, dass es aufgrund der hohen Temperatur und der dadurch höheren Dynamik des N-Terminus nicht zu einer konstanten Ausbildung von Wasserstoffbrücken kommen kann. Die zentralen Residuen I410 bis L414 der zytoplasmatischen Helix besitzen eine Amidproton-Lebensdauer von 1 Stunde. Dementsprechend ist die Helix auch bei 45 °C durchweg stabil, wenn auch die Wasserstoffbrückenbindungen nach gewisser Zeit aufgebrochen werden. Die nicht in Sekundärstruktur befindlichen Residuen tauschen ihre Amidprotonen auf einer Zeitskala, die unterhalb der Auflösung des Experimentes liegt (20 min), mit dem Lösungsmittel aus.

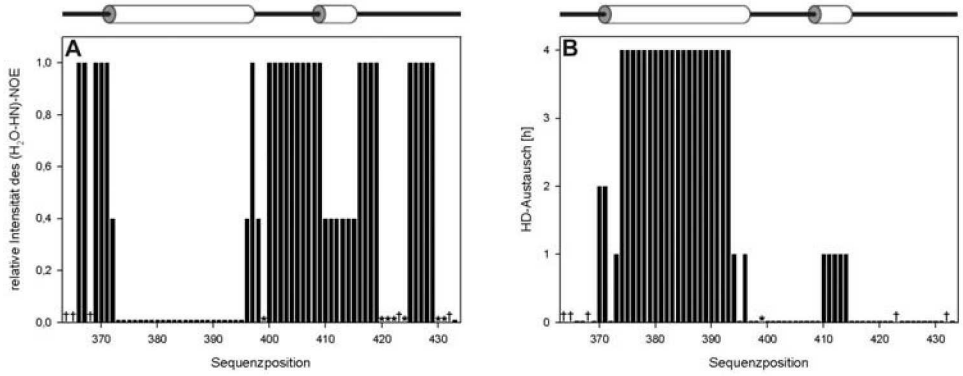


Abbildung 4.55: **A** Relative Stärke des NOE zwischen den Amidprotonen des CD4mut und dem Wasser. Der aus dem (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-NOESY-HSQC-Spektrum gewonnene NOE wurde in drei Klassen eingeteilt: schwach/nicht vorhanden: 0,01; gering/mittel: 0,4; stark: 1. Zur Orientierung sind die gefundenen Helizes über dem Diagramm angegeben. **B** HD-Austauschraten der Amidprotonen, definiert als die Halbwertszeit des Signals bis zu seinem Verschwinden durch vollständigen Austausch zwischen H und D. Proline und das N-terminale Glycin sind mit einem „†“ markiert; Residuen, für die keine Informationen gewonnen werden konnten, sind mit einem „*“ markiert.

Kapitel 5

Diskussion

Der humane T-Zell-Korezeptor CD4 spielt eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Durch seine Funktion bei der extrazellulären Wechselwirkung zwischen TCR und MHC-Klasse II-Molekülen, sowie der intrazellulären Bindung an die Lymphozytenspezifische Kinase p56LcK kommt es zum Start einer Signalkaskade ins Zellinnere, die wesentlich für die Aktivität der T-Zelle ist. Eine Störung der CD4-Funktion an dieser Stelle hätte eine Verminderung der T-Zell-Aktivität und eine subsequente Immundefizienz des Organismus zur Folge. Das humane Immundefizienz-Virus Typ I (HIV-1) setzt bei der Infektion genau an diesem Punkt an. Zum Eintritt in die Wirtszelle kommt es zu einer Komplexierung des HIV-1 Virusoberflächenproteins gp120 mit der extrazellulären Domäne des CD4, die dann über konformationelle Reorganisationen den Eintritt in die Zelle ermöglicht. Zur Verhinderung einer Superinfektion und zur Maskierung der Zellinfektion erfolgt die virusinduzierte Herunterregulierung bereits zellmembranständiger CD4-Moleküle, sowie eine vermittelte Degradation neu synthetisierter CD4-Moleküle, die sich im Endoplasmatischen Retikulum befinden. Letztere erfolgt über eine Komplexierung der zytoplasmatischen Domänen von CD4 und HIV-1 VpU (Virus Protein U), sowie der subsequenten Bindung der zum E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex gehörenden Proteine β-TrC und Skp1. Das Skp1-Protein ubiquitinyliert Lysin-Reste in der zytoplasmatischen Domäne des CD4, welches somit zur Degradation durch das Proteasom markiert ist.
Die strukturelle und dynamische Analyse der Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen von CD4, sowie der zytoplasmatischen Domäne des VpU-Proteins liefert die Grundlage für ein detailliertes Verständnis der beschriebenen Interaktion, deren Manipulation Ziel für therapeutische Ansätze sein könnte.

5.1 Das HIV-1 VpUcyt

5.1.1 Proteinreinigung liefert große Mengen an hochreinem rekombinantem VpUcyt

Zur Herstellung von Proben wurde unmarkiertes oder [$U-^{13}$C, $U-^{15}$N]-VpUcyt als rekombinantes GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Nach der Zelllyse konnte das Fusionsprotein GST-VpUcyt mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt werden.
Die enzymatische Trennung des VpUcyt-Proteins vom Fusionspartner GST wurde durch die Spaltung mittels Thrombin erreicht. Dabei war das Fusionsprotein an der Säule gebunden. Das VpUcyt-Protein wurde durch Reversed Phase Chromatographie von Protease und restlichen Bestandteilen getrennt und lag nach der Vakuumtrocknung in reiner Form vor, der Reinheitsgrad betrug mehr als 99 %.
Die Ausbeute an reinem Protein betrug etwa 12 mg pro Liter Expressionsmedium.

5.1.2 NMR-spektroskopische Experimente ermöglichten nahezu vollständige Resonanzzuordnung

Mit Hilfe dreidimensionaler NMR-Experimente konnte eine nahezu vollständige Resonanzzuordnung für das VpUcyt-Protein erreicht werden.
Es wurden 100 % der möglichen H^NN-Resonanzpaare im (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektrum identifiziert. Die Zuordnung der H^α- und C^α-Resonanzen war zu 100 %, die der Carbonylkohlenstoffe zu 96 % vollständig. Die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen erfolgte für 94 % aller Protonen, und für 91 % der Heterokerne (^{13}C bzw. ^{15}N).

5.1.3 Lösungsstruktur des VpUcyt in Anwesenheit von Mizellen

Strukturelle Eigenschaften verschiedener VpUcyt-Peptidfragmente wurden in der Vergangenheit in Puffer und in TFE-haltiger Lösung charakterisiert. Wray et al. (1995) untersuchten mehrere synthetische Peptide, die überlappende Teile der zytoplasmatischen Domäne des VpUcyt repräsentieren. In TFE-haltiger Lösung (50 % v/v) wurden Helizes in den Regionen 42 bis 50 und 57 bis 69, sowie eine Windung im Bereich 74 bis 77 gefunden. Es ist bekannt, dass TFE Sekundärstrukturelemente stabilisiert, mit einer Tendenz zur Förderung von α-Helixbildung (Sönnichsen et al. 1992). Zusätzlich schwächt TFE Tertiärstrukturkontakte, die durch hydrophobe Wechselwirkung stabilisiert werden (Klaus et al. 1991, Alexandrescu et al. 1994, Sticht et al. 1994, Marx et al. 1995). Willbold et al. (1997) verfolgten daher einen Ansatz in TFE-freier, wässriger Lösung. Hochsalzbedingungen (500 mM Na_2SO_4) wurden gewählt, um elektrostatische Effekte zu verhindern und den hydrophoben Kern des VpU(39-81)-Polypeptides zum Kollaps zu bringen. Unter den genannten Bedingungen wurden Helizes in den Regionen 40 bis 51, 53 bis 56, 62 bis 68 und 75

bis 79 beobachtet, die in etwa 67 % der beobachteten Konformere auftraten. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das VpUcyt eine hochvariable Sekundärstruktur besitzt, die sensitiv für das umgebende Lösungsmittel ist. Zusätzlich fanden Willbold et al. (1997) eine durch wenige langreichweitige Kontakte definierte Tertiärfaltung des VpUcyt-Proteins. Die Charakterisierung einer Tertiärfaltung mit Hilfe nur weniger Distanzeinschränkungen ist möglich (Willbold et al. 1994, Aszodi et al. 1995, Bayer et al. 1995).
Bislang wurde noch keine Flüssig-NMR-Untersuchung der zytoplasmatischen Domäne des VpUcyt in membransimulierender Umgebung publiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der entscheidende Einfluss der Membranumgebung auf die Struktur des VpUcyt gezeigt.

5.1.3.1 VpUcyt ist in Abwesenheit von Mizellen unstrukturiert

Auf dem Weg zu einer strukturellen Charakterisierung des VpUcyt in Anwesenheit von Mizellen wurde VpUcyt zunächst in mizellenfreier Lösung untersucht. Das hatte den Vorteil, dass der Einfluss der Mizellenumgebung auf die Struktur und Dynamik des VpUcyt nach späterer DPC-Zugabe direkt bestimmt werden konnte.
Es wurde gezeigt, dass das Protein in mizellenfreier Lösung bei physiologischen Salzkonzentrationen im Wesentlichen ohne reguläre stabile Sekundärstrukturelemente vorliegt. Im Gegensatz dazu konnten Willbold et al. (1997) bei Hochsalzbedingungen die oben genannten Strukturelemente ermitteln.
Die Circular-Dichroismus-Spektren (Abb. 4.4 und Tab. 4.1) zeigen, dass das Protein im Sequenzmittel zu 80 bis 94 % als ungeordnet angesehen werden kann, somit also ungefaltet vorliegt. Die gemessenen chemischen Verschiebungen weichen nicht signifikant von 'Random Coil'-Werten ab (Abb. 4.11 links). Sowohl aus $\Delta\delta\ ^{13}C_\alpha$, $\Delta\delta\ ^{1}H_\alpha$ und $\Delta\delta\ ^{13}CO$ ist abzuleiten, dass sich die zytoplasmatische Domäne im zeitlichen Mittel unstrukturiert zeigt. Die daher zu erwartende hochgradige Beweglichkeit der Proteinrückgratamidgruppen wird bestätigt durch geringe, uniforme ^{1}H Linienbreiten (Abb. 4.14) und reduzierte Hetero-NOE-Werte (Abb. 4.13).

5.1.3.2 VpUcyt besitzt in Anwesenheit von Mizellen eine wohldefinierte Sekundärstruktur

Die Zugabe von DPC-Mizellen resultiert in einer deutlichen Zunahme α-helikaler Sekundärstruktur. Ein Beleg dafür ist die drastische Veränderung des CD-Spektrums (Abb. 4.4). Das Spektrum ändert sich durch Zugabe von DPC in seiner Erscheinungsform von dem eines ungefalteten Proteins zu dem eines partiell α-helikalen Proteins. Es konnte ein durchschnittlicher Gehalt von 29 bis 32 % α-Helizes ermittelt werden, damit würden sich etwa 14 der 45 Residuen des VpUcyt-Proteins in helikaler Struktur befinden. Helizes mit ausgefransten Enden sind im Bereich der Termini nur noch in einer Subpopulation helikal, da der Übergang fließend ist. Korrekterweise liefert die CD in diesem Fall keine Helizität von 100 %.
Mit Hilfe NMR-spektroskopischer Methoden ist es möglich, den durch CD-Spektroskopie ermittelten Sekundärstrukturgehalt des Proteins exakt zu lokalisieren. Dazu wurden

in der vorliegenden Arbeit Methoden wie die Bestimmung der sekundären chemischen Verschiebungen, der Hetero-NOE-Werte, der ^{1}H Linienbreiten und die Berechnung der Struktur mittels NOE-abgeleiteter Distanzeinschränkungen angewandt. Zusätzlich geben die Methoden wie Hetero-NOE und Linienbreiten Einblicke in die Dynamik.
Mit Hilfe der NOE-abgeleiteten Distanzeinschränkungen war es möglich, eine definierte Sekundärstruktur zu berechnen. Die Anzahl der Distanzeinschränkungen pro Residue war in den Bereichen besonders groß, die sich als reguläre α-Helix erwiesen (Abb. 4.16). Für den Bereich der membranproximalen Helix 2 (I39 bis E48) standen im Mittel 26 Distanzeinschränkungen mittlerer Reichweite ($1 \leq R_{ij} \leq 5$) pro Aminosäure zur Verfügung, während für Helix 3 (L64 bis R70) im Mittel eine Anzahl von 20 Distanzeinschränkungen verwendet werden konnte. Der Bereich der C-terminalen 'Loop'-Struktur konnte mit 27 Distanzeinschränkungen mittlerer Reichweite ($1 \leq R_{ij} \leq 5$) pro Aminosäure strukturell charakterisiert werden.
Die Helizes 2 und 3 waren in jedem berechneten Konformer vorhanden, jedoch mit leicht unterschiedlicher Länge. Während der Beginn der Helix 2 mit I39 unverändert blieb, konnte das Ende mit Hilfe der NOE-abgeleiteten Distanzeinschränkungen nicht eindeutig auf T47 oder E48 festgelegt werden. Die Gesamtheit der vorgenommenen Untersuchungen deutet jedoch darauf hin, dass E48 wahrscheinlich Endpunkt der amphipatischen Helix 2 in den meisten Konformeren ist. Hierbei war vor allen Dingen das Studium der sekundären chemischen Verschiebungen (4.11 rechts), der ^{1}H Linienbreiten (Abb. 4.14 B) und des Hetero-NOE (Abb. 4.13 B) von Bedeutung. Die sekundären chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ $^{13}C_\alpha$ und $\Delta\delta$ $^1H_\alpha$ bestätigen, dass sich die Residuen I39 bis E48 im Mittel in einer wohldefinierten Helix befinden, die allerdings nicht in allen betrachteten Konformeren auftritt. Zusätzlich deuten die $\Delta\delta$ ^{13}CO-sekundären chemischen Verschiebungen auf das Auftreten von Wasserstoffbrückenbindungen ($^{13}CO_i \leftrightarrow H^N_{i+4}$) hin, an denen die Residuen D40 bis R45 beteiligt sind. Das Proteinrückgrat im Bereich von Helix 2 ist stark in seiner Beweglichkeit eingeschränkt, die Hetero-NOEs zeigen jedoch eine Zunahme in der Beweglichkeit zu den Endpunkten der Helix hin. Ferner kann aus den sekundären chemischen Verschiebungen und den Hetero-NOE-Werten abgeleitet werden, dass der Zentralbereich von Helix 2 in allen Konformeren permanent vorhanden ist. Offensichtlich ist die Zeitspanne, die sich die Helix von der Mizelle löst, klein genug, um Hauptmerkmale der Sekundärstruktur in diesem Bereich zu wahren. Die beobachtete stabile Sekundärstruktur von Helix 2 wird durch das Auftreten der α-Helix-typischen NOE-Korrelationen (Abb. 4.17) bestätigt. Selbst schwache Korrelationen ($d_{\alpha N}(i, i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$, $d_{\alpha N}(i, i+4)$) wurden detektiert, deren Muster sich besonders im Zentralbereich der Helix zeigte, was die vorangegangene Stabilitätsdiskussion untermauert. Dementgegen zeigt Helix 3 eine deutlich geringere Stabilität. Im Ensemble der betrachteten Konformere konnte jedoch festgestellt werden, dass die Residuen L64 bis R70 den konstanten Kern der Helix 3 darstellen. Mittelt man die sekundären chemischen Verschiebungen dieser Residuen, dann ergibt sich eine fraktionale Helizität von etwa 40 %. Die Bewegung des Proteinrückgrates ist im Bereich von und um Helix 3 deutlich reduziert (Abb. 4.13). Es ist möglich, dass sich die Helix entfaltet, während sich das VpUcyt von der Mizelle löst, die gesamte Region jedoch ihre Tendenz zur Bildung einer α-Helix behält. Diese Helix wird im gebundenen

Zustand realisiert, während sie im ungebundenen Zustand offenbar entfaltet ist.
Neben den beiden beschriebenen, dominierenden Sekundärstrukturelementen liefert die NOE-basierte Strukturberechnung Hinweise auf weitere, wenn auch nicht klar definierte α-helikale Bereiche. Hierbei handelt es sich um mögliche α- oder 3_{10}-Helizes in den Bereichen A50 bis S53, N55 bis E58 und V78 bis D80, wo ebenfalls einige helixtypische NOE-Korrelationen (Abb. 4.17) beobachtet wurden. Die Helizität in diesem Bereich kann aus den vorliegenden Daten nicht genau bestimmt werden, da aus den sekundären chemischen Verschiebungen keine deutliche Tendenz für α-helikale Konformation abgeleitet werden kann (Abb. 4.11 rechts). Gegen eine Helix im Bereich zwischen Helix 2 und 3 spricht die höhere Flexibilität des Proteinrückgrates (Abb. 4.13). Die mögliche Helix im Bereich des C-Terminus jedoch beinhaltet Residuen, deren Flexibilität deutlich eingeschränkt ist. Auch die sekundären chemischen Verschiebungen sind mit der Existenz einer Helix vereinbar.
Vergleicht man die ermittelten Ergebnisse mit den Arbeiten von Wray et al. (1995) und Willbold et al. (1997), dann lassen sich einige Unterschiede feststellen. Während in allen drei Arbeiten im großen und ganzen Helix 2 und der helikale Bereich von 50 bis 53 übereinstimmen, kommt es bei der Bestimmung von Helix 3 zu Diskrepanzen. Wray et al. (1995) fanden in TFE-Lösung eine Helix von G59 bis E69, während Willbold et al. (1997) eine C-terminal wesentlich verkürzte Helix von D60 bis E63 beobachteten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Helix 3 im mizellengebundenen VpUcyt die Residuen L64 bis R70 umfaßt. Die Unterscheidung eines klar definierten Turns von einer kurzen Helix ist mit NMR-spektroskopischen Mitteln schwierig, eindeutig ist jedoch, dass eine klar definierte Sekundärstruktur existiert. Alles in allem kann festgestellt werden, dass die Sekundärstrukturen in mizellengebundener Form (diese Arbeit), TFE-Lösung (Wray et al. 1995) und Hochsalzpuffer (Willbold et al. 1997) sehr ähnlich, aber nicht identisch sind.

5.1.3.3 Mizellengebundenes VpUcyt ist zeitweise tertiär gefaltet

Trotz der verhältnismäßig flexiblen Struktur lässt sich mit Hilfe NOE-abgeleiteter Distanzeinschränkungen eine Tertiärfaltung für das VpUcyt bestimmen. Bei zeitweise unstrukturierten oder nicht permanent globulär gefalteten Proteinen kann es zu Fehlinterpretationen der langreichweitigen NOEs im Zuge der Beurteilung der tertiären Faltung kommen. Die räumliche Nähe, die sich in NOE-Kontakten mit einer Proportionalität zu $(1/r^6)$ widerspiegelt, tritt möglicherweise nur kurzzeitig während der Messung (in der Mischzeit während der Aufnahme der NOESY-Spektren) in einem Teil der beobachteten Konformere auf. Die Zeitabhängigkeit dieses Prozesses kann jedoch nicht von den NOEs konserviert und dargestellt werden, folgerichtig wird in der Analyse der Tertiärkontakt als stabil und gegeben gewertet. In solch einem Fall kann jedoch eindeutig abgeleitet werden, dass sich die betroffenen Protonen im zeitlichen Mittel für einen nicht genau bestimmbaren Anteil annähern. Die berechnete Tertiärfaltung kann dann als 'Grenzstruktur' angesehen werden. Insgesamt konnten für die Berechnung der Grenzstruktur des VpUcyt 30 langreichweitige ($R_{ij} \geq 5$) Distanzeinschränkungen bestimmt werden (Abb. 4.16 B). Aus einer Schar von

100 berechneten Konformeren konnten die 20 energieärmsten Strukturen entnommen werden. Eine Überlagerung der Atompositionen des Proteinrückgrates dieser ausgewählten Strukturenschar (Abb. 4.18 C) zeigt erwartungsgemäß eine deutliche Abweichung untereinander, insbesondere im Bereich der Proteintermini und dem N-terminalen Bereich vor Helix 3. Diese Bereiche sind durch das Fehlen von langreichweitigen Distanzeinschränkungen definiert. Trotz der Abweichungen ist es eindeutig, dass die berechnete Grenzstruktur aus den wenigen langreichweitigen NOE-Kontakten hervorgeht und durch diese in ihrer globalen Struktur definiert wird. Helix 2 und 3 befinden sich in nahezu antiparalleler Stellung zueinander, während die durch den interhelikalen Bereich definierte Ebene nahezu senkrecht auf der durch die Helizes vordefinierten Ebene steht. Der C-Terminus befindet sich ebenfalls oberhalb der Ebene und weist NOE-Kontakte zur interhelikalen Region um die beiden phosphorylierbaren Serine 53 und 57 auf (Abb. 4.18 D).
Aus dem Vergleich mit der Arbeit von Willbold et al. (1997) ergeben sich deutliche Unterschiede in der Ausrichtung der Sekundärstrukturelemente zueinander. Abbildung 5.1 A zeigt die ermittelte Grenzstruktur der vorliegenden Arbeit, Abbildung 5.1 B die Vergleichsstruktur von Willbold et al. (1997, PDB-Eintrag '1vpu'). Helix 2 und 3 sind in beiden Strukturen antiparallel zueinander. Willbold et al. (1997) berechneten, dass Helix 2, der interhelikale Bereich und Helix 3 eine Ebene definieren, auf die der C-Terminus binden kann. Dazu bildet die Region L64 bis V68 einen 'Turn' aus, der den Terminus auf die Ebene legt. Diese Region befindet sich nach der vorliegenden Arbeit noch in Helix 3. Desweiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Ebene der interhelikalen Region senkrecht zur Helixebene steht, jedoch auf der anderen Seite der Helix 2-Helix 3-Ebene als bei Willbold et al. (1997). Die Fixierung des C-Terminus erfolgt nach der vorliegenden Arbeit durch einen 'Loop', der mit dem Ende von Helix 3 bei R70 beginnt und bei H72 endet. Dadurch kann sich die darauffolgende 'Turn'-(Helix)-Region in Richtung der interhelikalen Region falten (Abbildung 5.1 A).
Durch die unterschiedliche Fixierung des C-Terminus auf die Ebene von Helix 2 und 3 kommt es automatisch dazu, dass in beiden Arbeiten jeweils verschiedene Residuen von Helix 2 in Kontakt mit dem umgebenden Lösungsmittel stehen. Helix 2 ist eine ideale amphipatische Helix, bei der entlang der Helixachse ein Drittel der Aminosäuren hydrophob, ein Drittel eine positive Arginin-Seitenkette, und ein Drittel eine saure Seitenkette besitzt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hydrophoben Residuen nach außen zeigen, während genau diese bei Willbold et al. (1997) in den hydrophoben Kern der Struktur orientiert sind. Ein Blick auf die jeweiligen Untersuchungsbedingungen offenbart die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse in dieser Hinsicht. Durch den Einsatz von Hochsalzbedingungen erreichten Willbold et al. (1997) den Kollaps des hydrophoben Kerns des Proteins und zwangen dadurch die Faltung der hydrophoben Residuen in das Proteininnere, während in der vorliegenden Arbeit durch die Anwesenheit von Modellmembransystemen eine Faltung des Proteins möglich war, in der die amphipatische Helix 2 ihrer Natur entsprechend auf einer polaren Grenzfläche (der Mizellenoberfläche) binden konnte. Ein mögliches Bindemuster für das VpUcyt-Protein wird in Kapitel 5.1.5 diskutiert.

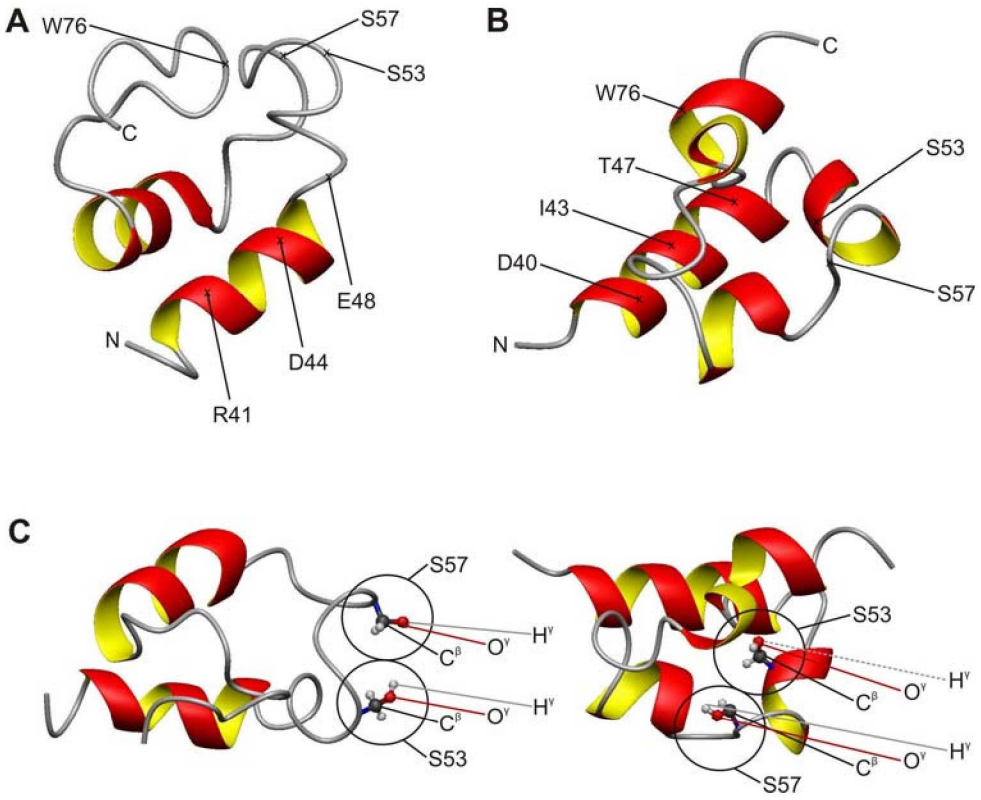


Abbildung 5.1: **A** 'Ribbon'-Darstellung der Tertiärfaltungen für VpUcyt aus der vorliegenden Arbeit und **B** von Willbold et al. (1997, PDB-Eintrag '1vpu'). **C** Orientierung der Seitenketten der phosphorylierbaren Serine 53 und 57, dargestellt auf der Ribbon-Darstellung des Proteinrückgrates der Grenzstrukturen aus dieser Arbeit (links) und der Arbeit von Willbold et al. (1997, rechts). Der Seitenkettenkohlenstoff (C^{β}) und die kovalent gebundene Hydroxylgruppe (O^{γ}, H^{γ}) sind in der 'Ball-and-stick'-Repräsentation gezeigt. Markante Residuen sind im Einbuchstaben-Aminosäurekode benannt, zusätzlich sind N- und C-Terminus angegeben.

Die Diskussion um die Teilnahme des C-Terminus an einer Tertiärfaltung wurde schon mannigfaltig geführt. Während verschiedene Arbeiten keine Hinweise auf Tertiärfaltungen finden konnten (z.B. Wray et al. 1995, Ma et al. 2002), deuten Willbold et al. (1997) und die vorliegende Arbeit eindeutig auf eine Rolle des C-Terminus an der Tertiärfaltung hin. Durch das Beobachten des Aromaten W76 während der Zugabe von DPC konnte bewiesen werden, dass der Terminus tatsächlich an einer Tertiärfaltung des Proteins beteiligt ist (Kapitel 4.1.3). Wegen der offensichtlichen Faltung des W76 in das Proteininnere (vgl. Abb. 5.1) kommt es zu einer verringerten Polarität des umgebenden Lösungsmittels und damit zur Blauverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums. Dementgegen befindet sich das W76 in der Struktur von Willbold et al. (1997) völlig dem Lösungsmittel ausgesetzt.
Die Erreichbarkeit der Serine für die Casein Kinase II ist für die biologische Funktion des VpUcyt von entscheidender Bedeutung. Abbildung 5.1 C stellt die Ausrichtung der für den Phosphorylierungsprozess wichtigen Hydroxyl-Seitenketten der Serine 53 und 57 im Bezug auf die gesamte Grenzstruktur dar. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Erreichbarkeit der genannten Seitenketten durch ihre Exposition zum Lösungsmittel gegeben ist, während sie in der Arbeit von Willbold et al. (1997) in das Proteininnere zeigen und damit ohne strukturelle Reorganisation des Proteins nicht erreichbar sind.

5.1.3.4 Vergleichsstruktursuche in Datenbanken liefert kein humanes Analog

Über die Identifizierung ähnlich gefalteter Proteine und deren bekannter Interaktionspartner kann auf das Ziel des viralen Proteins in der Wirtszelle/dem Organismus geschlossen werden. Ein Protein wird entscheidend von seiner Sekundär- und Tertiärarchitektur bestimmt, die Erkennungsmuster für andere Proteine bildet. Es liegt daher nahe, mit Hilfe einer Datenbanksuche mögliche strukturähnliche Proteine für VpUcyt zu identifizieren.
Die Suche nach strukturell ähnlichen Proteinen mit Hilfe der DALI-Datenbank (Holm & Sander 1996) lieferte nur ein als signifikant eingestuftes Ergebnis, das daraufhin weiter analysiert wurde. Hierbei handelt es sich um eine Transferase aus dem Organismus *Escherichia coli*, die als 'soluble lytic transglycolase 70 (slt70)' bezeichnet wird. Bei slt70 handelt es sich um ein Murein-abbauendes Enzym, das die Spaltung der Glycosidbindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin-Residuen in Peptidoglycan katalysiert. Dabei könnte slt70 eine Rolle beim Recycling von Muropeptiden während der Zellelongation und/oder Zellteilung spielen.
Die strukturellen Übereinstimmungen zwischen VpUcyt und slt70 werden wie folgt dargestellt: Gly37^{VpUcyt} bis Glu69^{VpUcyt} ist ähnlich zu Leu3^{slt70} bis Tyr35^{slt70}, Arg70^{VpUcyt} bis Ala74^{VpUcyt} ist ähnlich zu Tyr38^{slt70} bis Glu42^{slt70}, Val78^{VpUcyt} bis Leu81^{VpUcyt} ist ähnlich zu Arg44^{slt70} bis Thr47^{slt70}. Von den beschriebenen Sequenzabschnitten im slt70 ist keine eigenständige Funktion im Sinne einer Domäne bekannt.

5.1.4 Phosphorylierung von S53 und S57 hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins

Der Vergleich zwischen den (^{1}H-^{15}N)-HSQC-Spektren von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem VpUcyt (Abb. 4.22 A) zeigt, dass die Phosphorylierung von S53 und S57 auch Effekte auf Residuen außerhalb dieses Bereiches hat. Es können geringe Änderungen in den chemischen Verschiebungen selbst bei Residuen des C-Terminus festgestellt werden, signifikante Verschiebungen lassen sich jedoch auf den Sequenzbereich I46 bis G59 reduzieren. Im Hinblick auf die ermittelte Grenzstruktur des VpUcyt-Proteins liegt es nahe, dass die chemischen Verschiebungen der Spins des C-Terminus aufgrund seiner räumlichen Nähe zur Phosphorylierungsregion durch die Phosphorylierung beeinflußt werden.
Die Phosphorylierung verursacht eine leichte N-terminale Stabilisierung und Elongation von Helix 3, die mit einer reduzierten Mobilität der Residuen im interhelikalen Bereich zwischen Helix 2 und 3 einhergeht. Desweiteren wurden Anzeichen für eine leichte Destabilisierung des C-terminalen Endes von Helix 2 gefunden.

5.1.4.1 Helizes 2 und 3 verändern ihre Proportionen infolge der Phosphorylierung

Mit Hilfe der sekundären chemischen Verschiebungen wurde der Einfluss der Phosphorylierung auf die Sekundärstrukturelemente studiert (Abb. 4.23). Es lässt sich keine starke Änderung in der Gesamtsekundärstruktur für das VpUcyt feststellen, allenfalls lassen sich geringe Änderungen in den Längen der Helizes erkennen. Im Vergleich zwischen den sekundären chemischen Verschiebungen der beiden Zustände des VpUcyt (Abb. 4.23 unten) wird durch eine Gruppe negativer Balken eine Destabilisierung der C-terminalen Windung von Helix 2 angedeutet, während eine Gruppe von positiven Balken auf eine eventuelle N-terminale Elongation von Helix 3 hindeutet.
In einer regulären α-Helix sind die Dipolmomente der Residuen nahezu parallel zur Helixachse angeordnet, was in einem substanziellen Gesamtdipolmoment resultiert, das als Helixdipol bezeichnet wird (Hol 1985). Das positive Ende des Helixdipoles zeigt in Richtung des N-Terminus, das negative Ende des Helixdipoles in Richtung des C-Terminus einer α-Helix. Die Einführung einer negativen Ladung in der direkten Umgebung des N-Terminus einer α-Helix kann zu einer Stabilisierung der Helix führen, während die Positionierung einer negativen Ladung am C-Terminus einer Helix eine Destabilisierung hervorrufen kann (Huyghues-Despointes et al. 1993). Die Phosphorylierung der Serine 53 und 57 führt negative Ladungen in die flexible interhelikale 'Loop'-Region ein. Daher könnte es sein, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Phosphatladungen mit dem positiven Dipolende von Helix 3 zu einer N-terminalen Stabilisierung von Helix 3 führen, während die unvorteilhafte Wechselwirkung mit dem negativen Ende von Helix 2 zu einer Destabilisierung des C-Terminus von Helix 2 führt. Andererseits ist es auch möglich, dass die Extension von Helix 3 durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einem der vier nichtgebundenen Protonen-Donoren am N-Terminus der verlängerten Helix 3 und einer negativ geladenen oder polaren Seitenkette oder Gruppe im Bereich der N-terminalen

Kappe von Helix 3 herrührt, ohne dass dabei der Helixdipol eine Rolle spielt (Smart & McCammon 1999). S57 könnte tatsächlich die Position der N-Kappe in den Konformeren mit einer elongierten Helix 3 im phosphorylierten VpUcyt einnehmen, angedeutet durch die Gruppierung positiver $\Delta\delta$ ^{13}C-Werte zwischen S57 und L64 (Abb. 4.23 unten). Generell sollte aber der Einfluss von elektrostatischen Ladungen bei der vorhandenen Salzkonzentration moderat sein.

5.1.4.2 Sekundärstruktur in der Phosphorylierungsregion wird stabilisiert

Die Phosphorylierung von S53 und S57 verursacht eine lokale Verringerung in der Mobilität der umliegenden Residuen (Abb. 4.24). Offensichtlich verursacht die Einführung von zwei voluminösen und geladenen Phosphatgruppen eine Restriktion im Ensemble der Konformationen durch elektrostatische Wechselwirkungen oder sterische Behinderungen. Die lokale Änderung in der Beweglichkeit für die Residuen S53 bis G59 wird eindeutig durch die Differenz der Hetero-NOE-Werte von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem VpUcyt bewiesen (Abb. 4.24 unten). Der mögliche Einfluss durch die N-terminale Stabilisierung von Helix 3 auf diese Region wurde bereits zuvor diskutiert.
Zusammengenommen kann geschlossen werden, dass die Phosphorylierung der Serine 53 und 57 keinen erheblichen Einfluss auf die Sekundärarchitektur der zytoplasmatischen Domäne des VpUcyt in Anwesenheit von membransimulierenden DPC-Mizellen hat. Diese Beobachtung ist in Widerspruch zu einer vorangegangenen Flüssig-NMR-Studie von Coadou et al. (2002), die den Einfluss der Serin-Phosphorylierung auf ein VpU-Peptid (Residuen 41 bis 61) in wässriger und TFE-Lösung untersuchten. Das untersuchte Peptid enthielt die flexible interhelikale 'Loop'-Region und Teile der flankierenden Helizes 2 und 3. Nur das nicht-phosphorylierte VpU(41-61), nicht jedoch das phosphorylierte Peptid, zeigte helikale Eigenschaften am C-Terminus, die einem Teil von Helix 3 zugeschrieben werden können. Dagegen wurde am C-terminalen Ende des phosphorylierten Peptides ein β-Strang beobachtet. Folglich schlugen die Autoren einen 'Schaltermechanismus' vor, bei dem die funktionale Aktivität des VpU durch die duale Serinphosphorylierung gesteuert wird.
Im Falle der in der vorliegenden Arbeit erfolgten Untersuchung der vollständigen zytoplasmatischen Domäne des VpUcyt in Anwesenheit von membransimulierenden Mizellen kann eindeutig eine signifikante strukturelle Reorganisation und insbesondere eine β-Strangbildung ausgeschlossen werden. Möglicherweise sind die geringe Größe des VpU(41-61)-Peptides und die in der Arbeit von Coadou et al. (2002) verwendeten Lösungsmittel (H_2O bzw. TFE/Wasser) verantwortlich für die Unterschiede zur vorliegenden Arbeit.
Interessanterweise deuten aktuelle Moleküldynamikstudien für das vollständige VpU(1-81) in einer Lipiddoppelschicht an, dass die Phosphorylierung die Helizität von Aminosäuren in beiden benachbarten Termini der Helizes 2 und 3 verringern sollte (Lemaitre et al. 2006). Obwohl in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass es zu einer Verringerung der Helizität von C-terminalen Residuen von Helix 2 kommt, konnte eine N-terminale Verkürzung von Helix 3 experimentell nicht bestätigt werden.

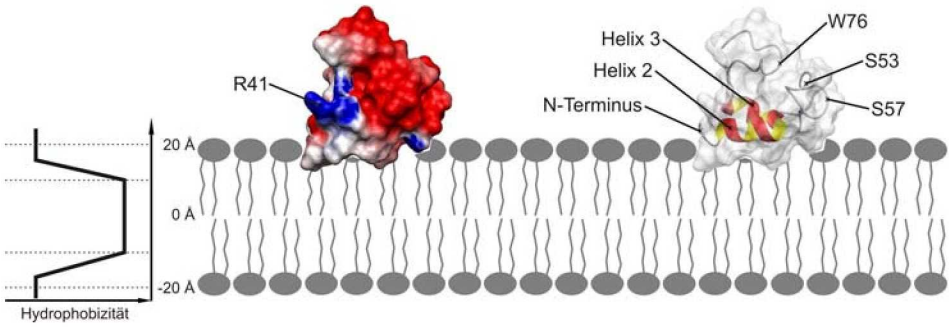


Abbildung 5.2: Modell für die Membranbindung des VpUcyt-Proteins. Zur Veranschaulichung ist das Protein zum einen in der Oberflächendarstellung mit Ladungen (positiv - blau; negativ - rot) gezeigt (links), zum anderen mit Ribbondarstellung des Proteinrückgrates innerhalb der berechneten Oberfläche des Proteins (rechts). Die Ausrichtung erfolgte anhand der hydrophoben Residuen in Helix 2, ebenso aufgrund des N-Terminus, an den sich beim Gesamt-VpU eine basische Sequenz und eine Transmembrandomäne anschliesst (Park et al. 2003). Die beiden phosphorylierbaren Residuen S53 und S57 sind bezeichnet, ebenso das W76 und die prominent herausstehende Seitenkette von R41. Die modellmäßig dargestellten Lipide bilden die Doppelschicht, wobei voluminöse Kopfgruppen den Kontakt zum wässrigen Puffer bilden und hydrophobe Ketten das Innere der Membran. Links neben der Darstellung befindet sich die Darstellung des hydrophoben Profils einer Transmembranhelix nach Sakai & Tsukihara (1998).

5.1.5 Modell des membrangebundenen VpUcyt-Proteins

Mit den gewonnenen Informationen über die Struktur des VpUcyt kann ein Modell für die Membranbindung vorgeschlagen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten DPC-Mizellen besitzen dieselben Kopfgruppen wie Phosphatidylcholin-Lipide, die auch in den Zellmembranen eukaryontischer Zellen vorkommen.
Abbildung 5.2 zeigt das Modell für die Bindung des VpUcyt an eine Lipiddoppelschicht. Dabei wurde die Ausrichtung des Proteins zum einen anhand der Position des N-Terminus gewählt. In seiner vollständigen Form befindet sich N-terminal zu dem in dieser Arbeit untersuchten Protein eine basische Aminosäuresequenz und die Transmembrandomäne (Park et al. 2003). Zum anderen wurde die amphipatische Helix 2 derart auf der Oberfläche justiert, dass die hydrophoben Residuen in die Membran zeigen. Damit ist die hydrophobe Umgebung für diese Ketten gewährleistet. Zusätzlich kann aus diesem Modell im Vergleich mit Abb. 4.21 gezeigt werden, dass die Kontaktfläche zwischen Protein und Membranoberfläche praktisch ungeladen ist. Dagegen befinden sich die Ladungen des Proteins an dem Teil der Oberfläche, die in Richtung des Zytosols zeigt.
Entscheidend für die Aussagekraft eines Modells ist, dass die biologische Funktionalität richtig widergegeben wird. Die zytoplasmatische Domäne des VpUcyt ist im betrachteten Kontext von besonderer Wichtigkeit für die simultane Bindung von CD4 und dem βTrC-

Protein. Für die Bindung an CD4 ist die amphipatische Helix 2 von besonderer Bedeutung (Margottin et al. 1996), während die Bindung an β-TrCP durch die phosphorylierten Serine 53 und 57 vermittelt wird. Zuvor wird das VpUcyt durch die Casein Kinase II an den genannten Positionen phosphoryliert. Die dazu wichtige Zugänglichkeit der Hydroxyl-Seitenketten der Serine ist bereits in Kapitel 5.1.3.3 diskutiert worden. Es wird ersichtlich, dass beim Zutreffen der vorgeschlagenen Bindemuster alle genannten Funktionen des VpU in der vom Modell aufgezeigten Anordnung des VpU realisiert werden können.

5.2 Das CD4tmcyt

5.2.1 Klonierungsstrategie lieferte vielseitiges Vektorkonstrukt für Membranproteine

Zu Beginn dieser Arbeit stand kein DNA-Konstrukt für die Expression des CD4tmcyt zur Verfügung. Daher musste die kodonoptimierte DNA erzeugt werden, die für die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne des CD4, CD4(372-433), kodiert. Bei der Wahl des Expressionsvektors musste besonders beachtet werden, dass das gewünschte Zielprotein höchstwahrscheinlich unlöslich sein wird. Daher wurde bei der Konstruktion des Initialklons der Vektor pET43b gewählt, der für das *E. coli*-eigene NusA-Protein kodiert, das die Löslichkeit von Membranproteinen bei der Expression des Fusionsproteins erhöhen kann (Davis et al. 1999). Da dies jedoch bei gleichzeitig geringen Expressionsausbeuten nicht der Fall war, wurden verschiedene andere Expressionsvektoren getestet.
Es stellte sich heraus, dass der Expressionsvektor pTKK19xb/ub_ubi (Kohno et al. 1998) in Verbindung mit *E. coli* c43(DE3)-Zellen (Miroux & Walker 1996) optimale Ausbeuten erlaubte. Testreinigungen zeigten jedoch, dass die Wahl der proteolytischen Spaltstelle von großer Bedeutung war. Das Fusionsprotein aus Ubiquitin-Tag und CD4tmcyt konnte nicht an Schnittstellen gespalten werden, die sich direkt N-terminal an der Transmembrandomäne des CD4tmcyt befinden. Es ist möglich, dass die dem Lysis- und Spaltpuffer zugesetzten Detergenzien diese Spaltstelle für die Protease unzugänglich machen, da sie sich um die stark hydrophobe Transmembrandomäne als Mizelle anlagern. Zielführend war hier die Einfügung eines Linkers, der als Abstandhalter zwischen CD4tmcyt und der Spaltstelle fungiert. Damit war die proteolytische Spaltung des Ubiquitin-CD4tmcyt-Fusionsproteins mittels PreScission-Protease in detergenzoptimiertem Puffer möglich.

5.2.2 Effizientes Reinigungsprotokoll erlaubt Gewinnung großer Mengen hochreinen CD4tmcyt-Proteins

Der Vektor pTKK19xb/ub_ubi (Kohno et al. 1998) ist bekannt für die Gewinnung von löslichen Proteinen als Ubiquitin-Fusionsprotein (Kusunoki et al. 1998, Bauer et al. 2004). In dieser Arbeit wurde zum ersten mal gezeigt, dass sich dieser Vektor auch zur Expression

von Membranproteinen eignet.
Erste Reinigungsversuche unter nativen Bedingungen in Abwesenheit von Detergenzien waren erfolglos, auch nach Zugabe denaturierender Substanzen wie 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinium-Hydrochlorid. Indessen führte die Zugabe der Detergenzien Triton-X-100 und Cholinsäure zu einer drastischen Verbesserung der Löslichkeit des Fusionsproteins. Die Detergenzien SDS, CHAPS, und *n*-octyl-β-*D*-glucanopyranoside (OG) zur Lösung des Proteins wurden ebenfalls getestet, konnten jedoch nicht den Grad der Effizienz wie die zuvor beschriebenen Detergenzien erreichen.
Die Präsenz der Detergenzien in den Puffern während der Affinitätschromatographie und der proteolytischen Spaltung war entscheidend, um eine Präzipitation des Fusionsproteins bzw. des CD4tmcyt-Proteins zu verhindern. Zusätzlich wurde die Oxidation der Cysteine und die Ausbildung von Disulfid-Brücken durch die Zugabe von DTT verhindert. Der Decahistidintag, der sich N-terminal zum Ubiquitin befindet, erlaubt eine effiziente Einschrittreinigung des Fusionsproteins mittels Ni^{2+}-NTA-Affinitätschromatographie. Dabei bindet das Fusionsprotein praktisch vollständig an die Ni^{2+}-NTA-Agarose und lässt sich durch eine Reihe von Waschschritten mit steigenden Imidazolkonzentrationen reinigen. Nach der Elution mit etwa 300 mM Imidazol erhält man ungefähr 20 mg Fusionsprotein pro Liter Expressionskultur. Die Anwesenheit der Detergenzien hat weder einen nennenswerten Einfluss auf die Affinitätschromatographie, noch auf die spezifische Spaltung mittels PreScission-Protease.
Die proteolytische Spaltung war jeweils nach etwa 12 Stunden vollständig, danach konnte der Ansatz mittels TCA gefällt werden. Mitgefälltes Detergenz wurde durch Waschschritte mit Aceton nahezu völlig entfernt. Die Gelanalyse der Spaltung zeigt, dass nahezu kein intaktes Fusionsprotein nach der Übernachtspaltung verbleibt. Das hohe apparente Molekulargewicht des CD4tmcyt bei der Gelelektrophorese kann von der Assoziation von Detergenzmolekülen (nicht-ionisches Trition X-100 und/oder SDS) mit CD4tmcyt herrühren, das sowohl eine hoch basische (globaler pI = 11,2), als auch eine hydrophobe Domäne enthält. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, dass die Retardation des CD4tmcyt eine unvollständige Denaturierung des Proteins selbst bei hohen SDS-Konzentrationen widerspiegelt. Die helikale Sekundärstruktur stark hydrophober Sequenzen bleibt häufig in Detergenzlösungen erhalten und kann damit das elektrophoretische Verhalten des CD4tmcyt erklären. Reversed Phase Chromatographie diente als letzter Reinigungsschritt, mit dem die Spaltprodukte effizient voneinander getrennt werden konnten. Nach der Vakuumtrocknung lag hochreines CD4tmcyt mit einer Ausbeute von ungefähr 6 mg pro Liter Expressionskultur vor.
Eine NMR-basierte Charakterisierung des Proteins war nur durch die Verwendung von [$U-^{13}$C, $U-^{15}$N]-markiertem Protein möglich. Dazu wurde das beschriebene Reinigungsprotokoll nach der Expression des Proteins in M9-Minimalmedium mit ^{13}C- bzw. ^{15}N-markierten Nährstoffen in identischer Weise angewandt. Interessanterweise betrug die Ausbeute an markiertem Protein ebenfalls ungefähr 6 mg pro Liter Expressionskultur.

5.2.3 CD4tmcyt kann nahezu verlustfrei in Liposomen inkorporiert werden

Es wurde ein Zentrifugationsassay entwickelt, der die Assoziation des CD4tmcyt mit der Membran beweist. Die Ultrazentrifugation einer Mischung aus POPC und CD4tmcyt in ^2H_2O resultierte in einem Liposomenpellet, das auf dem optisch klaren Puffer schwamm. Daraufhin wurden zwei identische Reversed Phase Chromatographie-Läufe durchgeführt, um die Verteilung des CD4tmcyt zwischen Puffer und Liposomenpellet abschätzen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge des CD4tmcyt in der Liposomenfraktion mindestens 12-fach höher ist als in der Pufferfraktion. Die Menge an POPC war in der Pelletfraktion etwa 10-fach größer als in der Pufferfraktion. Aufgrund der schwierigen Trennbarkeit von Pellet- und Pufferfraktion nach der Ultrazentrifugation liegt der Schluss nahe, dass die in der Pufferfraktion gefundenen POPC- und CD4tmcyt-Anteile auf Kontaminationen des Puffers mit kleinen Mengen des Pellets zurückzuführen ist.

5.2.4 CD4tmcyt ist funktionell und bindet VpUcyt

Es kam ein einfacher Zentrifugationsassay zur Anwendung, der die Bindung zwischen den beiden rekombinant produzierten Proteinen CD4tmcyt und VpUcyt zeigte. Aus diesem Versuch ließ sich ableiten, dass das CD4tmcyt funktionell in die Modellmembran eingebaut werden konnte.
Dazu wurden zwei Proben mit POPC-Liposomen hergestellt, von denen eine membraninkorporiertes CD4tmcyt-Protein enthielt. Beide Dispersionen wurden mit identischer Menge an gelöstem VpUcyt versetzt und nach Ultrazentrifugation mittels Reversed Phase Chromatographie analysiert. Dabei zeigte sich, dass in Anwesenheit von CD4tmcyt signifikant mehr VpUcyt in der Liposomenpellet-Fraktion zu finden ist; es lässt sich ein nahezu doppelt so großes VpUcyt-Signal erkennen. Allerdings ist auch in Abwesenheit von CD4tmcyt VpUcyt in der Liposomenpellet-Fraktion detektierbar. Ursache dafür ist VpUcyt, welches in der Pufferphase gelöst ist, die sich zwischen benachbarten Liposomen befindet. Bei voller Hydratisierung enthält die POPC-Membran mindestens 50 % (per Gewicht) Puffer (Klose et al. 1992) und das zwischen den Liposomen befindliche Wasser, dieses entspricht etwa 2 % des in der Probe vorhandenen Puffervolumens. Nach dieser Abschätzung sollte mindestens 1/50 des löslichen VpUcyt-Proteins auch ohne spezifische Interaktion zwischen VpUcyt und POPC in der Pelletfraktion zu finden sein. Die Signalhöhen in den Chromatogrammen bestätigen diese Annahme.

5.2.5 Die strukturelle Charakterisierung des CD4tmcyt in Mizellen ist möglich

Die Transmembrandomäne des CD4tmcyt ist Teil des erzeugten Konstruktes. Aufgrund des hydrophoben Charakters dieser Domäne ist die Verwendung eines Modellmembran-

systemes unumgänglich. Für die Zwecke der NMR-basierten Strukturanalyse ist die Wahl des richtigen Modellmembransystems von großer Bedeutung. Insbesondere muss die Gesamtmasse des betrachteten Komplexes klein gehalten werden und eine Thermostabilität muss gegeben sein, die das Messen bei höherer Temperatur erlaubt und so zu schärferen Linien führt. Hierfür eignen sich insbesondere Detergenzien, welche kleine amphipathische Partikel (Mizellen) bilden und so hydrophobe Proteinsequenzen dem Kontakt mit polarem Lösungsmittel entziehen können. Dazu wurden die Detergenzien DPC, SDS und OG getestet; das DPC eignete sich für das CD4tmcyt am besten.
Das bei 45 °C aufgenommene (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum zeigt, dass über 50 % der erwarteten 65 Resonanzen gut aufgelöst sind. Weiterhin legt die α-Helix-typische Dispersion des Spektrums von etwa 1,5 ppm die Existenz eines substanziellen Anteils α-helikaler Sekundärstruktur nahe. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Circular-Dichroismus-Analyse des mizelleninkorporierten Proteins, die das Vorhandensein von 37 bis 42 % α-Helix zeigt. Bedauerlicherweise überlappen sich Resonanzen im Bereich von 7,9 bis 8,1 ppm in der Protonendimension, die typischerweise Residuen in α-helikalen, aber auch in nicht-strukturierten Bereichen enthält. Dennoch ist es möglich, mit Hilfe dreidimensionaler Spektren und der Editierung über die Heterokerne ^{13}C bzw. ^{15}N die überlagerten Signale aufzulösen. Letztere Möglichkeit wird durch die hohe Signaldispersion im aliphaten- bzw. aromatenselektiven (^{1}H-^{13}C)-Spektrum offenkundig.
Frühere Studien an kurzen Peptiden aus der zytoplasmatischen Domäne des CD4 offenbarten eine amphipatische Helix für die Residuen 403 bis 412 in wässriger Lösung (Willbold & Rösch 1996), während Studien in TFE eine etwas längere Helix von 402 bis 417 zeigten (Wray et al. 1998). Das in der vorliegenden Arbeit dargestellte 2D ^{15}N-editierte (^{1}H-^{1}H)-Spektrum indiziert eindeutig das Vorhandensein von Sekundärstruktur auch im CD4tmcyt, deren Zuordnung zur Transmembran- oder zytoplasmatischen Domäne jedoch nicht weiter verfolgt wurde.

5.2.6 CD4tmcyt-Konstrukt erlaubt Komplexstudien mit Wechselwirkungspartnern in Membrananwesenheit

Durch die Membranverankerung der CDtmcyt-Komplexe ergab sich die Möglichkeit des Studiums des CD4tmcyt-Proteins in einer Lipidmembran oder anderen Modellmembransystemen.
Die zytoplasmatische Domäne des integralen Membranproteins CD4 interagiert mit verschiedenen membranassoziierten oder membraninsertierten Proteinen. Hierbei handelt es sich beispielsweise um die Proteintyrosinkinase p56LcK, oder die HI-viralen Proteine Nef und VpU. Diese Proteine sind integrale Membranproteine (VpU) oder werden in der Membran verankert (p56Lck und Nef) und sind daher während ihrer biologischen Funktion in Membrannähe zu finden.
Durch den Einbau der interagierenden Moleküle in dieselbe Membran wird die Bindekinetik beeinflusst, da die Dimensionalität der Diffusionsbewegung eingeschränkt wird.

Zusätzlich wird es höchstwahrscheinlich zu einer Stabilisierung des Komplexes kommen. Die Transmembrandomäne, die den N-terminalen Teil des CD4tmcyt-Proteins bildet, erlaubt die Membranverankerung der möglichen Komplexe aus CD4 mit seinen Bindepartnern. Eine Membran kann schon durch ihre Anwesenheit Einfluss auf die Dynamik und die Struktur von Proteinen haben. Durch die Hydrophobizität des Membraninneren kann es zur Inkorporation hydrophober Proteinsequenzen kommen. Die nicht-isotrope Verteilung des Lösungsmittels in Membrannähe kann beispielsweise Ursache für die Ausbildung von hydrophoben 'Patches' sein, die dann auch Sekundär- oder Tertiärstrukturbildung beeinflussen oder sogar induzieren.

5.3 Das CD4mut

5.3.1 Die Mutagenese von CD4tmcyt zu CD4mut und dessen Reinigung verliefen erfolgreich

Zur einfacheren Handhabung während der Experimente wurde eine Cystein-freie Variante des CD4tmcyt hergestellt. Das Motif für die Wechselwirkung zwischen den zytoplasmatischen Domänen von CD4 und VpU, sowie zwischen CD4 und Nef umfasst nicht die fünf Cysteine der zytoplasmatischen Domäne des CD4 (Vincent et al. 1993). Für die Handhabung des CD4-Fragmentes und des Gesamtkomplexes ist es daher legitim, durch Punktmutationen eine Cystein-freie Mutante herzustellen. Ausgehend vom Konstrukt für CD4tmcyt wurde die Variante CD4tmcyt_C394S/C397S/C420S/C422S/C430H hergestellt, die im Folgenden mit 'CD4mut' bezeichnet wird. Die Mutation der Cysteine in Serine erfolgte aufgrund der chemischen und sterischen Ähnlichkeit der benannten Aminosäuren, die Mutation C430H erfolgte aufgrund der Sequenzähnlichkeit zur Maus.
Die spezifischen Mutationen wurden mit Hilfe einer speziellen PCR-Technik durchgeführt (Ho et al. 1989). Das gewonnene Insert wurde in den Vektor pTKK19xb/ub_ubi eingesetzt (Kohno et al. 1998), der sich bereits bei der Konstruktion und späteren Reinigung für das CD4tmcyt-Protein als besonders geeignet zeigte. Die Richtigkeit der DNA-Sequenz für das CD4mut-Konstrukt konnte mittels DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

Für das CD4tmcyt-Protein wurde ein effizientes Reinigungsprotokoll entwickelt. Es zeigte sich, dass die identische Vorgehensweise von der Transformation der Zellen über Expression und Reinigung bis zur Vakuumtrocknung des Zielproteins maximalen Erfolg brachten. Änderungen oder Anpassungen am Reinigungsprotokoll waren nicht von nöten. Es konnten in LB- bzw. Minimalmedium Ausbeuten von ungefähr 8 mg pro Liter Expressionskultur erreicht werden.

5.3.2 CD4mut und CD4tmcyt sind strukturell und funktionell ähnlich

5.3.2.1 Konformation des CD4mut ist nahezu unbeeinflusst von den Mutationen

Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen CD4tmcyt und CD4mut wurde mittels Circular-Dichroismus- und 2D NMR-Spektroskopie untersucht. Ein Vergleich der CD-Spektren der beiden Proteine liefert die im Mittel gleichen Werte für den Sekundärstrukturgehalt, dadurch wird eine global unveränderte Sekundärstruktur nahegelegt.
Da die durchgeführten Punktmutationen nur die zytoplasmatische Domäne betreffen, wird auch keine Sekundärstrukturänderung im Transmembranbereich erwartet. Der Vergleich des zugeordneten (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrums des CD4mut (Abb. 4.45) mit dem nicht zugeordneten TROSY-Spektrum des CD4tmcyt (Abb. 4.35 A) zeigt, dass die Residuen der Transmembrandomäne praktisch keine Veränderungen in den chemischen Verschiebungen durch die Mutationen erfahren, die Struktur in beiden Fällen daher vergleichbar sein sollte. Demgegenüber kommt es bei den Residuen der zytoplasmatischen Domäne zu Änderungen in den chemischen Verschiebungen, die sich jedoch auf die direkte Umgebung der Punktmutationen beschränken. Aus dem mittels CD-Spektroskopie ermittelten, unveränderten Anteil der Sekundärstrukturelemente lässt sich ableiten, dass es offensichtlich auch in der zytoplasmatischen Domäne nicht zu signifikanten sekundärstrukturellen Reorganisationen kommt.
Demzufolge bleibt auch die Region, welche die Wechselwirkung mit HIV-1 VpUcyt vermitteln soll, strukturell unbeeinflusst. Es ist daher gerechtfertigt und biologisch relevant, die Variante CD4mut in weiteren, NMR-basierten Studien zu verwenden, die schlussendlich zu einem Modell der Wechselwirkung zwischen CD4 und VpU führen soll.

5.3.2.2 CD4mut bindet VpUcyt mit einer Dissoziationskonstanten im höheren mikromolaren Bereich

Die Inkorporation des CD4mut-Proteins in Lipidvesikel ist, ebenso wie die des CD4tmcyt-Proteins, von entscheidender Bedeutung für die Durchführung funktioneller Bindungsstudien und/oder struktureller Analysen. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkorporation des CD4mut in Lipidvesikel nahezu vollständig erfolgte. Daraufhin wurde die Wechselwirkung zwischen CD4mut und VpUcyt quantifiziert. Der dafür angewandte Zentrifugationsassay stellt eine einfache Methode dar, um die Bindung zwischen einem membranrekonstituierten (CD4mut) und einem löslichen Protein (VpUcyt) abzuschätzen. Mit Hilfe dieser Methode konnte nicht nur nachgewiesen werden, dass das CD4mut funktionell ist und VpUcyt binden kann. Es konnte auch abgeschätzt werden, dass die Dissoziationskonstante K_d des Komplexes aus CD4mut und VpUcyt 250 μM oder kleiner ist. Das CD4mut-Protein konnte nicht mit einer Vorzugsrichtung in die Liposomen eingebaut werden, daher sollte statistisch die Hälfte des inkorporierten Proteins so angeordnet sein, dass die zytoplasmatische Domäne in das Vesikel hinein zeigt und somit für die Bindung mit VpUcyt unerreichbar

ist. Nimmt man diesen Faktor 2 in die Abschätzung des K_d mit hinein, so ergibt sich ein K_d-Wert von 125 μM oder kleiner. Bislang wurde keine Dissoziationskonstante publiziert, daher kann kein Vergleich zu Literaturwerten angestellt werden. In dieser Arbeitsgruppe wurden bereits Bindestudien zwischen den beiden löslichen Peptiden CD4cyt (Preusser et al. 2003) und VpUcyt durchgeführt, die ermittelten Dissoziationskonstanten decken sich grob mit dem hier gefundenen Wert (Daten nicht gezeigt).
Ähnliche Ansätze wurden bereits früher angewandt, beispielsweise um die Partitionierung kleiner Moleküle zwischen der Lipiddoppelschicht und der Wasserphase zu quantifizieren (Wimley & White 1993a, Wimley & White 1993b), oder um die Bindung zwischen Peptiden und Proteinen an die Lipidvesikel zu studieren (White et al. 1998, Buser & McLaughlin 2000).

5.3.3 Resonanzzuordnung des CD4mut ist nahezu vollständig

Mittels mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-Experimente konnte eine nahezu vollständige Zuordnung des CD4mut-Proteins in Mizellen erreicht werden.
Im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum konnten 98,5 % der H^NN-Resonanzpaare zugeordnet werden, das Resonanzpaar für H399 konnte nicht detektiert werden.
Die Zuordnung der H^α- und C^α-Resonanzen war zu 100 % vollständig, ebenso die Zuordnung der Carbonylkohlenstoffe. Die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen erfolgte zu 90 % für die Protonen, zu 100 % für die ^{13}C- und zu 10 % für die ^{15}N-Heterokerne. Der vergleichsweise niedrige Wert für die Seitenketten-Amidgruppen ist auf die hohe Temperatur zurückzuführen, die hohe Austauschraten der an die ^{15}N-Kerne gebundenen Protonen mit dem Lösungsmittel hervorruft. Die damit verbundene Linienverbreiterung verhindert eine Signaldetektion.

5.3.4 Lösungsstruktur des CD4mut-Proteins in Mizellen

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, mit Hilfe mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-Spektroskopie die Struktur der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne einer Cystein-freien Variante des humanen CD4 zu bestimmen. Peptide der zytoplasmatischen Domäne des CD4 waren schon mehrfach Ziel von strukturellen Studien in wässriger Lösung (z.B. Willbold & Rösch 1996) oder TFE/Wasser-Mischung (Wray et al. 1998). Es fehlte jedoch bisher das Studium der gesamten membran- oder mizellenverankerten Domäne. Ebenso existieren bisher keine hochaufgelösten Strukturen der Transmembrandomäne, welche die zytoplasmatische Domäne mit der großen extrazellulären Domäne verbindet und das Protein in der Membran verankert.
Es konnte im Rahmen der hier vorgestellten Analyse gezeigt werden, dass die Transmembrandomäne des CD4mut eine typische Helix darstellt. Einer 'Loop'-Region in der zytoplasmatischen Domäne folgt eine stabile α-Helix, an die sich wiederum der sehr flexible C-Terminus des Proteins anschliesst.

Durch das Fehlen langreichweitiger Abstandsinformationen war es nicht möglich, die Ausrichtung der Helizes zueinander festzustellen. Zur Klärung dieser Frage könnten RDCs einen Beitrag liefern.
Während der Zuordnung wurde bereits deutlich, dass die beiden Domänen des CD4mut deutlich unterschiedliche interne Dynamik aufweisen. Im (^{1}H-^{15}N)-TROSY-Spektrum sind Signale der Aminosäuren aus der Region zwischen den beiden Helizes sowie aus dem C-Terminus im Zentralbereich des TROSY konzentriert. Die spektralen Überlagerungen betrafen auch die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen, konnten jedoch durch Vergleich verschiedener Spektren aufgelöst werden. Der Vergleich legt nahe, dass diese Bereiche durchweg keine reguläre Sekundärstruktur aufweisen.

5.3.4.1 Die Transmembrandomäne ist eine reguläre α-Helix

Die Struktur der Transmembrandomäne ist durch die Berechnung mit NOE-abgeleiteten Distanzeinschränkungen sehr gut definiert. Für die Berechnung der Struktur der Residuen M372 bis F393 standen durchschnittlich etwa 20 Distanzeinschränkungen mit mittlerer sequenzieller Reichweite ($1 \leq R_{ij} \leq 5$) pro Aminosäure zur Verfügung. Deutlich unter diesem Schnitt lagen die Glycine (Abb. 4.49 A), die aufgrund des Fehlens einer Seitenkette weniger Protonen zur Bildung von NOEs besitzen und somit weniger Distanzeinschränkungen liefern können.
Von den beschriebenen Distanzeinschränkungen spiegelte eine große Anzahl NOEs wider, die typisch für das Auftreten von α-helikaler Sekundärstruktur sind. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um die Korrelationen $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (Wüthrich 1986), deren sequenzielles Erscheinungsmuster die rigide, wohldefinierte Existenz der Transmembranhelix beweist (Abb. 4.50). Aus der Existenz von NOEs über große Reichweiten im Kreuzresonanzschema (z.B. $d_{\alpha N}(i, i+4)$) kann vermutet werden, dass die Transmembranhelix stabil über die Zeit existiert, da diese NOEs aufgrund ihrer intrinsischen Schwäche sonst nicht detektierbar wären.
Die Helizität der Transmembranhelix kann zusätzlich aus der Analyse der sekundären chemischen Verschiebungen abgeleitet werden. Es konnte gezeigt werden, dass in einem Ensemble der betrachteten Konformere nahezu alle Moleküle diese Helix annehmen. An den Randbereichen der Helix ist die sekundäre chemische Verschiebung der $^{13}C_{\alpha}$ und der $^{1}H_{\alpha}$ substanziell niedriger als in den Zentralbereichen der Helix (Abb. 4.46). Es wird damit im zeitlichen Mittel eine leichte Öffnung oder ein „Ausfransen“ der Helix an den Termini angedeutet. Diese kann jedoch für das N-terminale Ende der Helix aufgrund der NOE-basierenden Berechnungen ausgeschlossen werden. Das C-terminale Ende der Helix ist deutlich weniger genau durch die NOE-basierende Strukturberechnung bestimmt, die Ausdehnung der Helix schwankt um 1 bis 2 Aminosäuren zwischen den betrachteten Molekülen. Alle berechneten Konformere beschrieben die Residuen M372 bis F393 als zur Transmembranhelix gehörig, die aus der Strukturberechnung gewonnene Helizität für die Residuen S394 und V395 weicht jedoch davon ab. Bei der sequenzspezifischen Einteilung des CD4-Proteins gehören die beiden zuletzt genannten Residuen schon zur

zytoplasmatischen Domäne (Referenz: SWISS-Prot-Eintrag P01730).
Der heteronukleare (^{1}H-^{15}N)-NOE ist ein geeigneter Indikator der lokalen Proteinrückgratdynamik. Er eignet sich besonders zur Charakterisierung α-helikaler Membranproteine (reviewed in Opella & Marassi 2004). Auch hier bestätigt sich, dass die äußersten Enden der Transmembranhelix weniger großen Einschränkungen in der Dynamik unterliegen als die Zentralbereiche (Abb. 4.48). Der mittlere Hetero-NOE-Wert für die Residuen der Transmembranhelix beträgt 0,71, was einer stark reduzierten Beweglichkeit entspricht (Kay et al. 1989).
Zusätzlich wurde die Rigidität der Helix mit Hilfe von H_2O-/D_2O-Austauschraten charakterisiert (Abb. 4.55 B). Die Langlebigkeit des Amidprotonensignals im Bereich der Transmembrandomäne spiegelt die starken intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Transmembranhelizes in der schwach dielektrischen Umgebung der Membran, oder wie in der aktuellen Untersuchung, in der Mizelle wider. Interessanterweise waren die Wasserstoffbrückenbindungen im Zentralbereich deutlich länger stabil als an den Endbereichen, teilweise auch deutlich über 50 Stunden (Daten nicht gezeigt). Aus der Stärke des NOE zwischen H_2O und dem Amidproton im (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-NOESY-Spektrum konnte ebenso auf die Langlebigkeit der Wasserstoffbrückenbindung geschlossen werden (Abb. 4.55 A). Zusätzlich erhält man Hinweise bezüglich der Anwesenheit von Wasser im untersuchten Bereich. Die Amidprotonen der Transmembranresiduen zeigen einen kaum detektierbaren NOE zum Wasser, ein Beweis für die lange Lebensdauer der Wasserstoffbrückenbindungen und ein Hinweis auf die Abwesenheit des Wassers im Inneren der Mizelle.

5.3.4.2 Seitenkettenarchitektur und große Seitenketten positionieren die Transmembranhelix in der Membran

Die Seitenketten der Residuen in einer regulären α-Helix zeigen zum einen im Bezug auf die Helixachse nach außen und zum anderen in Richtung des N-Terminus der Helix. Strukturelle Gegebenheiten, welche die vorgeschriebene Helixarchitektur nicht zulassen oder dieser sogar entgegenwirken, können zum Abbruch der Helix an diesem Punkt führen. Möglicherweise ist dieser „Packungsfehler“, verbunden mit dem Auftreten von Aminosäuren mit voluminösen Seitenketten, ein Prozess zur Terminierung der Transmembranhelix. Die Oberflächendarstellung der Transmembranhelix offenbart an den Helixenden eine „Verdickung“ der Helix.
Am C-Terminus der Helix handelt es sich dabei um eine Struktur, die von den Seitenketten von F392, F393 und R396 gebildet wird. Der Abbruch der Helix wird dadurch verstärkt, dass der Seitenkettenring des F392 nicht in Richtung des Helix-N-Terminus zeigt, sondern deutlich in Richtung des C-Terminus. Dem beschriebenen Bereich schliesst sich ein stark positiver, durch eine große Anzahl an Argininen ausgezeichneter Sequenzabschnitt an. Es ist bekannt, dass die Verteilung der positiven Ladung eine wichtige Determinante in der Membrantopologie darstellt, die die Ausrichtung des Transmembranproteins in der Membran steuert. Die sogenannte 'positive inside rule' besagt, dass sich der dem hydrophoben Bereich angeschlossene, stark positive Sequenzabschnitt im Zytoplasma der Zelle befinden

muss, daher wird das Transmembranprotein mit der korrekten Orientierung in die Zellmembran eingebaut (von Heijne & Gavel 1988, Hartmann et al. 1989, Jones et al. 1994). Für die hier durchgeführte Untersuchung in Mizellen ist die Frage der Orientierung ohne Bedeutung, sie erklärt jedoch die C-terminale Terminierung der Helix, verbunden mit der Funktion des räumlich nahen positiven Sequenzabschnittes.
Die Seitenkette des M372 am N-Terminus der Transmembrandomäne zeigt ebenso nicht in Richtung des N-terminalen Endes der Helix, sondern in Richtung des C-Terminus. Aufgrund des Fehlens der Wildtyp-sequenziellen Fortsetzung der Aminosäuresequenz in N-terminaler Richtung ist es nicht möglich, weitere Packungseffekte zu erkennen oder zu charakterisieren. Im humanen CD4 geht der Transmembrandomäne das Sequenzmotif N-„L(362)PTWSTPVQP(371)„-C voran, das heisst die Aminosäure M372 folgt direkt auf Prolin-371. Aufgrund des Fehlens eines Amidprotons zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke in einer Helix, sowie der voluminösen Seitenkette sind Proline häufig für den Abbruch von Helizes verantwortlich. Aufgrund des zusätzlich auftretenden P368 kommt es höchstwahrscheinlich an dieser Stelle zu einer Terminierung der Helix.
Es konnte gezeigt werden, dass die Transmembranhelix auch im Modellmembransystem Mizelle offensichtlich eine Struktur annimmt, der Faktoren zur Terminierung dieser ausgezeichneten Sekundärstruktur der Aminosäuresequenz innewohnen. Mit etwa 37 Å nimmt die Transmembranhelix die typische Länge an, die zum Durchspannen einer Zellmembran mit einer Dicke von etwa 40 Å erforderlich ist.

5.3.4.3 Die zytoplasmatische Domäne beinhaltet eine stabile, amphipatische α-Helix

Für die Berechnung der Sekundärstruktur der zytoplasmatischen Domäne standen etwa 15 NOE-abgeleitete Distanzeinschränkungen mit kurzer bzw. mittlerer Reichweite ($1 \leq R_{ij} \leq 5$) pro Aminosäure zur Verfügung (Abb. 4.49 A). Aus dieser Berechnung ging eine Schar wohldefinierter Konformere hervor (Abb. 4.52).
Die Struktur der zytoplasmatischen Domäne ist schon früher Ziel von NMR- und CD-spektroskopischen Untersuchungen gewesen, bei denen die synthetischen Peptide CD4(403-419) (Willbold & Rösch 1996) und CD4(396-433) (Wray et al. 1998) in wässriger Lösung untersucht wurden. Willbold & Rösch (1996) identifizierten eine α-Helix von Q403 bis R412, deren mittlere Helizität jedoch nur ungefähr 25 % betrug. Wray et al. (1998) studierten die gesamte zytoplasmatische Domäne in wässriger und TFE-haltiger Lösung, dabei konnte ein Helixanteil nur in Anwesenheit des organischen Lösungsmittels festgestellt werden. Bei einer Konzentration von 50 % (v/v) TFE konnte eine α-Helix von R402 bis K417 identifiziert werden, die eine mittlere Helizität von 62 % im zentralen Bereich von Q403 bis S415 zeigte. Die in dieser Arbeit identifizierte α-Helix ist kürzer (M407 bis L414), besitzt aber eine höhere Helizität. Aus dem Muster der sekundärstrukturtypischen NOE-Korrelationen (Abb. 4.50) kann abgelesen werden, dass die zytoplasmatische Helix durch die $d_{NN}(i, i+1)$-, $d_{\alpha N}(i, i+3)$-, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$-Korrelationen gut definiert wird. Da auch die langreichweitigen und daher signalschwachen NOEs zu detektieren sind ist anzunehmen, dass die Helix in einem großen Teil der beobachteten Konformere zeitlich stabil vorhanden

ist. Die Extension und Rigidität der Helix wurde mit Hilfe der sekundären chemischen Verschiebungen und dem Hetero-NOE untersucht. Aus den mittleren sekundären chemischen Verschiebungen kann geschlossen werden, dass der zentrale Bereich der zytoplasmatischen Helix (M407 bis R412) in 80 % (basierend auf $^{13}C_\alpha$) bzw. 69 % (basierend auf $^{1}H_\alpha$) der betrachteten Konformere auftritt, damit also deutlich stabiler ist als in den zuvor genannten Untersuchungen. Offensichtlich stabilisiert die Verankerung des CD4mut in einer membransimulierenden Mizelle die Konformation der Helix im beobachteten Bereich. Der mittlere Hetero-NOE-Wert für die Residuen der zytoplasmatischen Helix beträgt 0,52, diese ist damit weniger rigide als die beschriebene Transmembranhelix (0,71), aber dennoch stabil (Kay et al. 1989).
Obwohl die sekundären chemischen Verschiebungen helikale Tendenzen für Residuen N-terminal zur zytoplasmatischen Helix zeigen, ist die Helizität in diesem Bereich gering. Interessanterweise wird durch computerbasierte Sequenzanalyse eine α-helikale Struktur für die Residuen R402 bis T419 vorhergesagt (Shin et al. 1991), was eine intrinsische Neigung zur Formation einer Helix in diesem Bereich nahelegt. TFE besitzt die Eigenschaft, α-helikale Sekundärstruktur zu stabilisieren (Sönnichsen et al. 1992). Daher ist es nicht überraschend, dass Wray et al. (1998) eine zytoplasmatische Helix finden, die N-terminal länger ist als diese des in der vorliegenden Arbeit untersuchten, membranverankerten Konstruktes.

5.3.4.4 Das Bindemotif für HIV-1 VpU und andere Wechselwirkungspartner ist teilweise unstrukturiert

In TFE-freier Lösung zeigt der Bereich Q403 bis T419 eine α-helikale Struktur von Q403 bis R412 (Willbold & Rösch 1996). Diese Helix endet vor den beiden Leucinen 413 und 414. Beide Leucine gehören zu einem Dileucinmotif, das entscheidend für die Internalisierung von Transmembranproteinen wie CD4, IgG Fc-Rezeptor und CD3 γ- und δ-Ketten ist. Bemerkenswerterweise ist die beschriebene Helix im Komplex mit p56LcK(7-35) bis inklusive S415 verlängert, dabei sind beide Leucine durch die p56LcK abgedeckt (Kim et al. 2003). Der Vergleich der CD4-Struktur in An- und Abwesenheit von p56LcK(7-35) deutet darauf hin, dass die Anwesenheit der p56LcK die Verlängerung der membranproximalen Helix des CD4 um eine Windung induziert. Das veranlasst die Seitenketten von L413 und L414 in Richtung der p56LcK zu zeigen, wodurch das Protein vor der Dileucin-bindenden Maschinerie der Zelle und gegebenenfalls vor HIV-1 Nef geschützt wird.
Das Bindemotif für das HIV-1 VpU kann in einen essentiellen und einen wichtigen Bereich unterteilt werden. Als essentiell wird der Sequenzbereich L414 bis T419 bezeichnet (Chen & Maldarelli 1993, Vincent et al. 1993), wohingegen der Bereich von Q403 bis L413 eine etwas geringere Bedeutung besitzt. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Helix ist nicht Teil des essentiellen Sequenzmotifs, jedoch führen Punktmutationen im Bereich dieser Helix zu einer Störung der α-helikalen Struktur im Bereich CD4(407-411), die dann die VpU-induzierte Herunterregulierung des CD4 verhindert (Yao et al. 1995). Interessanterweise entspricht diese Sequenzregion der in der vorliegenden Arbeit ermittelten zytoplasmatischen Helix (M407 bis L414).

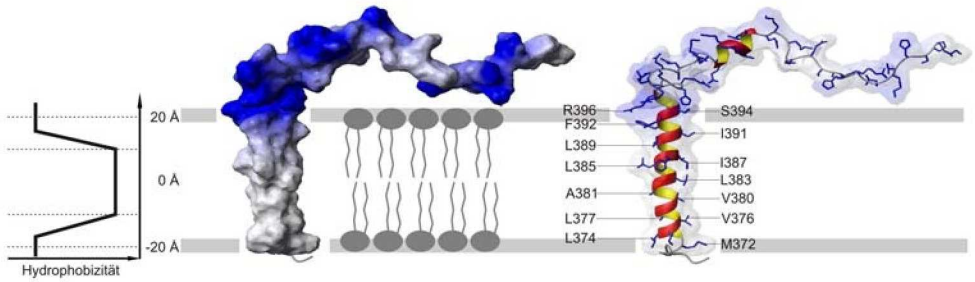


Abbildung 5.3: Modell für die Anordnung des CD4mut-Proteins in einer Lipiddoppelschicht. Die Transmembrandomäne durchspannt die Lipiddoppelschicht, die eine Dicke von etwa 40 Å besitzt. Zur Veranschaulichung ist das Protein zum einen in der Oberflächendarstellung mit Ladungen (positiv - blau; negativ - rot) gezeigt (links), zum anderen zusätzlich mit Ribbondarstellung des Proteinrückgrates und Liniendarstellung der Seitenkettenschweratome (rechts). Die hier sichtbaren Seitenketten sind den betreffenden Residuen zugeordnet worden. Die Anordnung der Lipide in der Doppelschicht ist modellmäßig im Zentralbereich der Abbildung dargestellt, voluminöse Kopfgruppen bilden die Kontaktstelle zur flüssigen Phase, während hydrophobe Ketten in den Innenbereich zeigen. Links neben der Darstellung befindet sich die Darstellung des hydrophoben Profils einer Transmembranhelix nach Sakai & Tsukihara (1998).

5.3.4.5 Der C-Terminus ist unstrukturiert und sehr flexibel

Die zytoplasmatische Domäne des CD4 enthält ein 14 Aminosäuren langes Sequenzstück, das den C-Terminus des Proteins bildet. Von dieser Sequenz ist bekannt, dass sie an der Bindung von p56LcK beteiligt ist (Shaw et al. 1989, Shaw et al. 1990), jedoch keine reguläre Sekundärstruktur ausbildet. Computerbasierte Sequenzanalysen sagen unstrukturierte Bereiche voraus (Shin et al. 1991), die durch Untersuchungen in Anwesenheit von wässriger und TFE-haltiger Lösung bestätigt wird (Wray et al. 1998).
Die sekundären chemischen Verschiebungen zeigen für diesen Bereich keinerlei α-helikale Tendenzen, die Residuen befinden sich in einer 'random coil'-Konformation (Abb. 4.46). Das Fehlen sekundärstrukturtypischer NOE-Korrelationen (Abb. 4.50) deutet darauf hin, dass in diesem Bereich keine definierte Sekundärstruktur existiert. Die Ausbildung einer Sekundärstruktur würde durch die hohe Messtemperatur nicht bevorteilt. Es zeigte sich, dass die Bewegung des Terminus praktisch nicht eingeschränkt ist (Abb. 4.48). Dadurch erklärt sich die geringe Anzahl beobachteter Distanzeinschränkungen in diesem Bereich (Abb. 4.49).

5.3.5 Modell des membraninsertierten CD4mut-Proteins

Aus den gewonnenen Daten und den daraus gezogenen Schlussfolgerungen kann ein Modell für die Membranständigkeit des CD4mut - und damit auch des CD4tmcyt - entwickelt werden. Die Ähnlichkeit der beiden Proteine wurde in den vorangegangenen Sektionen

eingehend diskutiert. Da sich die beiden betrachteten Fragmente des vollständigen CD4-Rezeptors nur durch fünf Cysteine in der zytoplasmatischen Domäne unterscheiden (vgl. Abb. 4.29 und 4.36), ist für die Membranständigkeit kein Unterschied zu erwarten.
In der vorliegenden Arbeit wurden Mizellen als Modellmembransystem verwendet, um Löslichkeit und die funktionelle Faltung des Proteins zu gewährleisten, die der physiologischen Realität nahe kommt. Dabei musste besonders darauf geachtet werden, dass die experimentellen Rahmenbedingungen für die NMR-Spektroskopie gewahrt blieben. Der Vergleich von Proteinstrukturen in Mizellen mit Strukturen membranrekonstituierter Proteine aus der Festkörper-NMR-Spektroskopie zeigt nicht nur die Übereinstimmung in struktureller Hinsicht, sondern auch die Bewahrung der Funktionalität des Proteins in beiden Modellsystemen (Sanders & Oxenoid 2000, Krueger-Koplin et al. 2004, Sanders & Sönnichsen 2006). Die Anzahl der in Mizellen rekonstituierten Membranproteine hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen: Es wurden Strukturen integraler Membranproteine mit einer (Ma et al. 2002), zwei (Howell et al. 2005) oder mehr Transmembranhelizes (Oxenoid et al. 2004), sowie mit β-Faß-Struktur (Fernandez et al. 2001) publiziert. Mizellen haben sich als Modellmembransystem für die Flüssig-NMR-Spektroskopie etabliert und erlauben häufig Schlussfolgerungen bezüglich der Struktur des untersuchten Membranproteins in einer Lipiddoppelschicht.
Die Beobachtungen an einem Membranprotein können in verschiedene Kategorien eingeteilt werden, welche die einzelnen Eigenschaften des Proteins beschreiben (Sanders & Sönnichsen 2006). Anhand von Abbildung 5.3 können die verschiedenen Erkenntnisse analysiert und diskutiert werden. Die Transmembrandomäne des CD4 besteht hauptsächlich aus hydrophoben Residuen, die gleichzeitig einen unpolaren Charakter besitzen. Sie bilden eine typische, durch starke Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierte α-Helix mit etwa 3,5 Aminosäuren pro Windung (aus der Ausrichtung der Seitenketten in der Abbildung abzuschätzen). Das hydrophobe Profil von Transmembrandomänen (Sakai & Tsukihara 1998) gibt an, dass die Helix im Bereich der Membranoberfläche hydrophil ist, während die Hydrophobizität dann rapide steigt. Die zentralen 20 Å der Membran sind durch die Anwesenheit der Lipidketten stark hydrophob und beherbergen daher den Bereich maximaler Hydrophobizität der Transmembranhelix. Jedoch ist die Membranoberfläche keine scharfe Abgrenzung zwischen wässrigen und unpolaren Domänen, sie kann als gradueller Übergang vom Lösungsbereich zur effektiv wasserfreien Hydrocarbonphase angesehen werden (Wiener & White 1992, Sanders & Schwonek 1993, White & Wimley 1999). Für das CD4 kann in diesem Zusammenhang beobachtet werden, dass ein stark positiv geladener Patch in der Grenzregion existiert, der hauptsächlich von Argininen mit positiv geladenen Seitenketten gebildet wird. Die Rolle einer positiv geladenen, zytoplasmatischen Sequenz bei der Ausrichtung während der Membraninsertion des Proteins wurde bereits in den vorangegangenen Abschnitten diskutiert. Aufgrund des Fehlens langreichweitiger Strukturinformationen ist eine Aussage bezüglich der Orientierung der zytoplasmatischen Helix im Bezug auf die Membrannormale abschließend nicht möglich. Der amphipatische Charakter der zytoplasmatischen Helix lässt jedoch vermuten, dass es zumindest über große Zeitspannen zu einem Kontakt zwischen dem helikalen Bereich der zytoplasmatischen Domäne und der Membranoberfläche kommt. Im Rahmen der

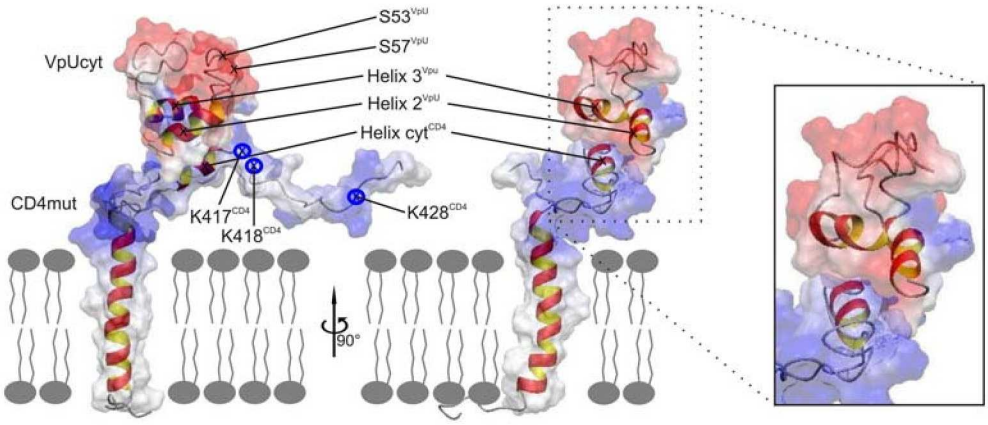


Abbildung 5.4: Modell für die Wechselwirkung zwischen VpUcyt und CD4mut anhand der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Strukturen. Beide Proteine sind in Oberflächendarstellung gezeigt, die Position des Proteinrückgrates ist in 'Ribbon'-Darstellung abgebildet. Besonders wichtige und im Text erläuterte Sekundärstrukturelemente und Sequenzpositionen sind mit ihrer Proteinzugehörigkeit benannt. Die durch das Skp1-Protein ubiquitinylierbaren Lysin-Residuen im CD4mut sind mit einem umrandeten Kreuz in blau dargestellt. Rechts wurde der Kontaktbereich zwischen CD4 und VpU vergrößert dargestellt. Die beiden Darstellungen des Komplexes sind um 90° zueinander gedreht.

vorgenommenen Studie konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus (S420 bis I433) unstrukturiert und frei beweglich ist, er erfährt daher höchstwahrscheinlich nur kurzen oder gar keinen Kontakt zur Membranoberfläche.

5.4 Modell: Die Wechselwirkung zwischen CD4 und HIV-1 VpU

In dieser Arbeit wurden die Grundlagen für die NMR-strukturelle Untersuchung der VpU/CD4-Wechselwirkung gelegt. Die Einzelstrukturen der zytoplasmatischen Domäne des HIV-1 VpU und der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne des humanen Korezeptors CD4 wurden in Anwesenheit von Modellmembranen untersucht, um möglichst die *in vivo*-Situation zu simulieren.
Aus den gewonnenen Ergebnissen kann ein mögliches Interaktionsmuster für CD4 und VpU abgeleitet werden. Abbildung 5.4 zeigt ein denkbares Modell der Bindung zwischen den beiden Proteinen. Grundlage für das Modell ist, dass die jeweils identifizierten Bindestellen miteinander in Kontakt stehen. Dabei handelt es sich um Aminosäuren aus dem Bereich 402 bis 420 im CD4 (Vincent et al. 1993) und aus der amphipathischen Helix 2 im VpU (Margottin et al. 1996). Interessanterweise ist die Aminosäuresequenz E48 bis S57,

welche die Phosphorylierungsstellen enthält, unter allen VpU-Proteinen der bekannten HIV-Isolate hochkonserviert. Eine Deletion von Residuen innerhalb dieses Bereiches führt zu einem Verlust der CD4-Abbauaktivität (Chen & Maldarelli 1993). Im vorgeschlagenen Modell ist diese Region frei zugänglich erreichbar durch die Casein Kinase II, welche die Phosphorylierung der Serine 53 und 57 katalysiert. Anschließend kommt es zur Bindung des β-TrC-Proteins, das phosphoryliertes VpU erkennt und dann die Degradation des CD4 im Proteasom vermittelt (Margottin et al. 1998). Dazu rekrutiert das β-TrCP das Skp1-Protein an die Membran, das Teil des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist und Lysin-Residuen im CD4 ubiquitinylieren kann. Aus diesem Modell ist die Erreichbarkeit der jeweiligen Bindungsstellen für den Mehrfachkomplex offensichtlich.

5.5 Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Modellmembransystemen von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung von Sekundär- oder Tertiärstrukturelementen ist. Die Studie am membranständigen CD4mut-Protein und dem membranassoziierten VpUcyt-Protein lieferte Ergebnisse, die zum Teil deutlich von früheren Untersuchungen abweichen. Offensichtlich können die Eigenschaften der Membran oder Mizelle nicht ohne weiteres durch organische Lösungsmittel wie TFE und/oder Hochsalzbedingungen simuliert werden.
In der vorliegenden Arbeit wurde die Grundlage für das strukturelle Verständnis der CD4/VpU-Wechselwirkung gelegt. Die Einzelstrukturen beider Proteinfragmente wurden mit atomarer Auflösung bestimmt. Die im Rahmen der Arbeit rekombinant erzeugten Polypeptide (CD4tmcyt, CD4mut, VpUcyt) können in einer weiteren Studie zur Aufklärung der Komplexstruktur aus CD4 und VpU verwendet werden. Durch die Membranverankerung des CD4mut wird sichergestellt, dass sich die interagierenden Proteine tatsächlich an einer Modellmembran befinden. Damit kann die *in vivo*-Situation optimal nachgestellt werden.
Die Bindung des CD4 an das VpU stellt nur eine biologische Aktivität des CD4 dar. Mit dem CD4tmcyt-Konstrukt ist es möglich, die Wechselwirkung mit jedem zytoplasmatischen Bindepartner in Anwesenheit eines Membransystems zu studieren. Dabei handelt es sich zum einen um die Proteintyrosinkinase p56LcK (Shaw et al. 1990) und zum anderen um das HIV-1 Protein Nef (Aiken et al. 1994).
Neben dem Studium der spezifischen Wechselwirkung zwischen CD4 und seinen Bindepartnern ist es durch die Entwicklung eines vielseitig einsetzbaren Expressions- und Reinigungsprotokolls möglich, Membranproteine in großer Menge und Reinheit zu produzieren und diese anschließend mittels molekularbiologischer und NMR-spektroskopischer Methoden zu untersuchen.

Weitere strukturelle und dynamische Untersuchungen werden in Zukunft das Wissen um das Verständnis der HIV-Aktivität in einer infizierten Zelle erweitern müssen. Von

besonderem Interesse ist dabei der Prozess der CD4-Herunterregulierung durch die E3-Ubiquitin-Ligase-Maschinerie. Die in der vorliegenden Arbeit erzeugten Polypeptide können auf der Basis der gewonnenen Ergebnisse Grundlage für NMR-spektroskopische Untersuchungen der beschriebenen Vorgänge sein. Das strukturelle Verständnis der biologischen Prozesse auf atomarer Ebene kann Startpunkt für deren Manipulation werden, die zu einer Therapie gegen eine HIV-Infektion führt.

Anhang A

Anhang

A.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1D, 2D, 3D	Ein-, Zwei-, Dreidimensional
Å	Angström (0,1 nm)
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome (Erworbenes Immunschwäche-Syndrom)
ATNOS	automated NOESY peak picking (Programm zur automatischen Selektion von NOE-Resonanzen in NMR-Spektren)
BMRB	Biological Magnetic Resonance Bank
°C	Grad Celsius
CANDID	Combined automated NOE assignment and structure determination module (Programm zur automatischen Zuordnung von NOE-Resonanzen in NMR-Spektren)
CARA	Computer Aided Resonance Assignment (Programm zur Visualisierung und Auswertung von NMR-Spektren)
CD4	human cluster determinant 4
CD4mut	ΔCys-Variante der Transmembran- und zytplasmatischen Domäne des CD4
CD4tmcyt	Transmembran- und zytoplasmatische Domänen des CD4
CK2	Casein Kinase II
cm	Zentimeter
ct	constant time (konstante Zeit)
δ	chemische Verschiebung
D_2O	Deuteriumoxid (^2D_2O)
Da	Dalton (Molekulargewichtsangabe für Biopolymere)
DIPSI-3	decoupling in the presence of scalar interactions (TOCSY-Mischsequenz)
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPC	Dodecylphosphocholine

DPC-d38	perdeuteriertes DPC
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
DYANA	dynamics algorithm for NMR applications (Programm zur Berechnung von Protein- und Nukleinsäurestrukturen aus NMR-Daten)
E. coli	*Escherichia coli*
et al.	et allis (und andere)
F1, F2, F3	Dimensionen von NMR-Spektren nach Fourier-Transformation
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (bei Zentrifugengeschwindigkeitsangaben)
GARP	globally optimized, alternating-phase rectangular pulses (Entkopplungsschema)
GSH-Sepharose	Glutathion Sepharose
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HIV-1	human immunodeficiency virus type 1 (Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1)
HSQC	heteronuclear single quantum coherence (Heteronukleare Einquanten-Kohärenz)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k_{on}	Assoziationsrate
k_{off}	Dissoziationsrate
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	Molar (Mol/Liter)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
M9-Medium	künstliches Minimalmedium zur Isotopenmarkierung
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MHC-II	major histocompatibility complex class II (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II)
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOLMOL	molecule analysis and molecule display (Programm zur Visualisierung und Analyse von 3D Molekülkoordinaten)
ν	Frequenz
Nef	negative factor (HI-virales Protein)

nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernmagnetische Resonanz)
NMRPipe	Programm zur Prozessierung von NMR-Spektren
NOE	nuclear overhauser effect / enhancement (Kern-Overhauser-Effekt)
NOESY	NOE spectroscopy (NOE-Spektroskopie)
OD_{600}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	Protein Data Bank
PFG	pulsed field gradient (Möglichkeit des NMR-Spektrometers, für das Probenvolumen einen kurzzeitigen magnetischen Feldgradienten in einer oder in mehreren Raumachsen zu erzeugen)
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
ppm	parts per million (Masseinheit für chemische Verschiebungen)
PROCHECK-NMR	Programm zur Analyse von NMR-Daten
r.m.s.d.	root mean square deviation (Quadratwurzel aus den mittleren Abweichungsquadraten)
RADAR	automated NOESY peak picking and NOE assignment (Programmpaket aus ATNOS und CANDID)
RDC	Residual Dipolar Coupling
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
$(\Theta)_{MRW}$	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest
TFE	Trifluorethanol
TOCSY	total correlated spectroscopy (Totale Korrelationsspektroskopie)
TrDC	Transferred Dipolar Coupling
TROSY	transverse relaxation optimized spectroscopy (Optimierte transverse Relaxationsspektroskopie)
U	unit (Einheit)
$[U-^{13}C]$, $[U-^{15}N]$	Uniforme Isotopenanreicherungen mit dem Nuklid ^{13}C bzw. ^{15}N (Grad des Einbaus ungekannt; Nomenklatur nach Markley et al., 1998)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VNMRJ	Varian NMR-Software
VpU	HIV-1 Virus Protein U
VpUcyt	zytoplasmatische Domäne des VpU
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WALTZ-16	wonderful alternating phase technique for zero residual splittings (Entkopplungsschema)
WATERGATE	water supression by gradient-tailored exitation (Technik zur Unterdrückung des H_2O-NMR-Signals)

A.2 Ein- und Dreibuchstaben-Aminosäure-Kode

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

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

Alexandrescu, A. T., Ng, Y.-L. & Dobson, C. M., 1994: Characterization of trifluoroethanol-induced partially folded state of α-lactalbumin; J. Mol. Biol. 235, 587–599

Aszodi, A., Gradwell, M. J. & Taylor, W. R., 1995: Global fold determination from a small number of distance constraints; J. Mol. Biol. 251, 308–326

Aue, W., Bartholdi, E. & Ernst, R., 1976: Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance.; J. Chem. Phys. 64, 2229–2246

Bauer, F., Hofinger, E., Hoffmann, S., Rosch, P., Schweimer, K. & Sticht, H., 2004: Characterization of LcK-binding elements in the herpesviral regulatory Tip protein; Biochemistry 43, 14932–14939

Bax, A., 1994: Multi-dimensional nuclear magnetic resonance methods for protein studies.; Curr. Opin. Struct. Biol. 4, 738744

Bax, A., Clore, G. M., Driscoll, P. C., Gronenborn, A. M., Ikura, M. & Kay, L. E., 1990a: Practical aspects of proton-carbon-carbon-proton three-dimensional correlation spectroscopy of ^{13}C-labeled proteins.; J. Magn. Reson. 87, 620–627

Bax, A., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M., 1990b: ^{1}H-^{1}H correlation via isotropic mixing of ^{13}C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning ^{1}H and ^{13}C spectra of ^{13}C-enriched proteins; J. Magn. Reson. 88, 425–431

Bax, A. & Pochapsky, S. S., 1992: Optimized Recording of Heteronuclear Multidimensional NMR Spectra Using Pulsed Field Gradients; J. Magn. Reson. 99, 638–643

Bayer, P., Kraft, M., Ejchart, A., Westendorp, M., Frank, R. W. & Rösch, P., 1995: Structural features of HIV-1 Tat protein; J. Mol. Biol. 247, 529–539

Bienkiewicz, E. A. & Lumb, K. J., 1999: Random-coil chemical shifts of phosphorylated amino acids; J. Biomol. NMR 15, 203–206

Bloch, F., Hansen, W. & Packard, M., 1946: The nuclear induction; Phys. Rev. 69, 127

Bour, S., Geleziunas, R. & Wainberg, M. A., 1995a: The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection; Microbiol. Rev. 59, 63–93

Bour, S., Schubert, U. & Strebel, K., 1995b: The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: Implications for the mechanism of degradation; J. Virol. 69, 1510–1520

Bouvignies, G., Bernardo, P. & Blackledge, M., 2005: Protein backbone dynamics from N-H^N dipolar couplings in partially aligned systems: a comparison of motional models in the presence of structural noise.; J. Magn. Reson. 173, 328–338

Brüschweiler, R., 2003: New approaches to the dynamic interpretation and prediction of NMR relaxation data from proteins.; Curr. Opin. Struct. Biol. 13, 175–183

Buser, C. A. & McLaughlin, S., 2000: Ultracentrifugation Technique for Measuring the Binding of Peptides and Proteins to Sucrose-Loaded Phospholipid Vesicles; in *Methods in Molecular Biology, Vol. 84: Transmembrane Signaling Protocols* (D. Bar-Sagi, Herausgeber); S. 267–281; Humana Press Inc., Totowa, NJ

Case, D., 1998: The use of chemical shifts and their anisotropies in biomolecular structure determination.; Curr. Opin. Struct. Biol. 8, 624630

Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G. & Skelton, N. J., 1996: Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice; Academic Press, San Diego

Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P., 1997: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein; Cell 89, 263–273

Chen, K. Y. & Maldarelli, F., 1993: Human immunodeficiency virus type 1 VpU protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to VpU sensitivity.; J Virol 67, 3877–3874

Chung, J., Eliezer, D., Wright, P. E. & Dyson, H. J., 2001: NMR structural and dynamic characterization of the acid-unfolded state of apomyoglobin provides insights into the early events in protein folding; Biochemistry 40, 3561–3571

Coadou, G., Gharbi-Benarous, J., Megy, S., Bertho, G., Evrard-Todeschi, N., Segeral, E., Benarous, R. & Girault, J. P., 2002: NMR studies of the phosphorylation motif of the HIV-1 protein Vpu bound to the F-box protein beta-TrCP; Biochemistry 42, 14741–14751

Crise, B. & Rose, J. K., 1992: Identification of Palmitoylation Sites on CD4, of the Human Immunodeficiency Virus Receptor; J. Biol. Chem. 267, 13593–13597

Dalgleish, A. G., Beverley, P. C., 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

Davis, G. D., Elisee, C., Newham, D. M. & Harrison, R. G., 1999: New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli; Biotechnol. Bioeng. 65, 382388

Dechwer, W., Pühler, D. A. & Schmid, R. D., 1999: ; in *Römpp Lexikon Biotechnologie und Gentechnik*; Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage

Dehner, A. & Kessler, H., 2005: Diffusion NMR spectroscopy: folding and aggregation of domains in p53.; Chembiochem. 6, 15501565

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G., Zhu, G., Peifer, J. & Bax, A., 1995: NMRPipe: a multidimensional spectral processing program based on UNIX pipes; J. Biomol. NMR 6, 227–293

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littmann, D. R. & Landau, N. R., 1996: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1; Nature 381, 661–666

Dyson, H. & Wright, P., 1998: Equilibrium NMR studies of unfolded and partially folded proteins; Nat. Struct. Biol. 5, 499–503

Ewart, G. D., Sutherland, T., Cage, P. W. & Cox, G. B., 1996: The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels; J. Virol. 70, 7108–7115

Fernandez, C., Adeishvili, K. & Wüthrich, K., 2001: Transverse relaxation-optimized NMR spectroscopy with the outer membrane protein OmpX in dihexanoyl phosphatidylcholine micelles; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 2358–2363

Fesik, S. W. & Zuiderweg, E. R. P., 1988: Heteronuclear Three-Dimensional NMR Spectroscopy. A Strategy for the Simplification of Homonuclear Two-Dimensional NMR Spectra; J. Magn. Reson. 78, 588–593

Fiaux, J., Bertelsen, E., Horwich, A. & Wüthrich, K., 2002: NMR analysis of a 900K GroEL-GroES complex.; Nature 418, 207–211

Gardner, K. & Kay, L., 1998: The use of ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins; Anna. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 27, 357–406

Grzesiek, S., Anglister, J. & Bax, A., 1993: Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in $^{13}C/^{15}N$-enriched proteins by isotropic mixing of ^{13}C magentisation; J. Magn. Reson. 101, 114–119

Grzesiek, S. & Bax, A., 1992a: An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins; J. Magn. Reson. 99, 201–207

Grzesiek, S. & Bax, A., 1992b: Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR; J. Am. Chem. Soc. 114, 6291–6293

Grzesiek, S. & Bax, A., 1993a: Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly 13C/15N-enriched proteins; J. Biomol. NMR 3, 185–204

Grzesiek, S. & Bax, A., 1993b: The origin and removal of artifacts in 3D HCACO spectra of proteins uniformly enriched with ^{13}C; J. Magn. Reson. B 102, 103–106

Güntert, P., Braun, W. & Wüthrich, K., 1991: Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA.; J. Mol. Biol. 217, 517–530

Güntert, P., Mumenthaler, C. & Wüthrich, K., 1997: Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA.; J. Mol. Biol. 273, 283–298

Hajduk, P., Augeri, D., Mack, J., Mendoza, R., Yang, J., Betz, S. & Fesik, S., 2000: NMR-based screening of proteins containing ^{13}C-labeled methyl groups.; J. Am. Chem. Soc. 122, 7898–7904

Hajduk, P. J., Gerfin, T., Boehlen, J. M., Haberli, M., Marek, D. & Fesik, S. W., 1999: High-Throughput Nuclear Magnetic Resonance-Based Screening; J. Med. Chem. 42, 2315–2317

Hartmann, E., Rapoport, T. A. & Lodish, H. F., 1989: Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins; Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 5786–5790

Herrmann, T., Güntert, P. & Wüthrich, K., 2002a: Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using new software ATNOS.; J. Biomol. NMR 24, 171–189

Herrmann, T., Güntert, P. & Wüthrich, K., 2002b: Protein NMR structure determination with automated NOE-assignment using the new software CANDID and the Torsion Dynamics Algorithm DYANA; J. Mol. Biol. 319, 209–227

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R., 1989: Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction; Gene 77, 51–59

Hol, W. G., 1985: The role of the alpha-helix dipole in protein function and structure; Prog. Biophys. Mol. Biol. 45, 149–195

Holm, L. & Sander, C., 1996: Mapping the protein universe; Science 273, 595–602

Howell, S. C., Mesleh, M. F. & Opella, S. J., 2005: NMR structure determination of a membrane protein with two transmembrane helices in micelles: MerF of the bacterial mercury detoxification system; Biochemistry 44, 5196–52006

Huth, J. R., Bewley, C. A., Jackson, B. M., Hinnebusch, A. G., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M., 1997: Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR; Prot. Sci. 6, 2359–2364

Huyghues-Despointes, B. M., Scholz, J. M. & Baldwin, R. L., 1993: Effect of a single aspartate on helix stability at different positions in a neutral alanine-based peptide; Protein Sci. 2, 1604–1611

Ikura, M., Kay, L. E. & Bax, A., 1990: A novel approach for sequential assignment of ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to Calmodulin.; Biochemistry 29, 4659–4667

Ish-Horowicz, D. & Burke, J. F., 1981: Rapid and efficient cosmid cloning; Nucl. Acids Res. 9, 2989–2998

Ishima, R. & Torchia, D., 2003: Protein dynamics from NMR.; Nature Struct. Biol. 7, 740743

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M., 2002: in *Immunologie*; Spektrum Akademischer Verlag

Jeener, J., 1971: in *unpublished lecture* (J. Basko Polje, Herausgeber); Ampere Summer School

Jin, A. J., Huster, D., Gawrisch, K. & Nossal, R., 1999: Light scattering characterization of extruded lipid vesicles; Eur. Biophys. J. 28, 187–199

Johnson, W. C., 1999: Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures; Proteins: Struct., Funct., Genet. 35, 307–312

Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M., 1994: A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology; Biochemistry 33, 3038–3049

Karplus, M., 1959: Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments; J. Chem. Phys. 30, 11–15

Kay, L., 1998: Protein dynamics from NMR; Nature Struct. Biol. 5, 512–517

Kay, L., Ikura, M., Tschudin, R. & Bax, A., 1990: Three-dimensional triple resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins.; J. Magn. Res. 89, 496–514

Kay, L. E., Torchia, D. A. & Bax, A., 1989: Backbone Dynamics of Proteins As Studied by ^{15}N Inverse Detected Heteronuclear NMR Spectroscopy: Application to Staphylococcal Nuclease; Biochemistry 28, 8972–8979

Keller, R., 2004: in *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*; CANTINA Verlag

Kim, P. W., Sun, Z. Y., Blacklow, S. C., Wagner, G. & Eck, M. J., 2003: A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8; Science 301, 1725–1728

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.-C. & Montagnier, L., 1984: T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV; Natue 312, 767–768

Klaus, W., Dieckmann, T., Wray, V., Schomburg, D., Wingender, E. & Mayer, H., 1991: Investigation of the solution structure of the human parathyroid hormone fragment (1-34) by 1H NMR spectroscopy, distance geometry, and molecular dynamics calculations; Biochemistry 30, 6936–6942

Klose, G., König, B. & Paltauf, F., 1992: Sorption isotherms and swelling of POPC in H_2O and ^2H_2O; Chem. Phys. Lipids 61, 265–270

Koenig, B. W. & Gawrisch, K., 2005: Specific volumes of unsaturated phosphatidylcholines in the liquid crystalline lamellar phase; Biochim. Biophys. Acta 1715, 65–70

Koenig, B. W., Mitchell, D. C., König, S., Grzesiek, S., Litman, B. J. & Bax, A., 1999: Measurement of dipolar couplings in a transducin peptide fragment weakly bound to oriented photo-activated rhodopsin; J. Biomol. NMR 16, 121–125

Kohno, T., Kusunoki, H., Sato, K. & Wakamatsu, K., 1998: A new general method for the biosynthesis of stable isotope-enriched peptides using a decahistidine-tagged ubiquitin fusion system: an application to the production of mastoparan-X uniformly enriched with 15N and 15N/13C; J. Biomol. NMR 12, 109–121

Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K., 1996: MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures; J. Mol. Graphics 14, 51–55

Krueger-Koplin, R. D., Sorgen, P. L., Krueger-Koplin, S. T., Rivera-Torres, I. O., Cahill, S. M., Hicks, D. B., Grinius, L., Krulwich, T. A. & Girvin, M. E., 2004: An evaluation of detergents for NMR structural studies of membrane proteins; J. Biomol. NMR 28, 12366–12371

Kupce, E. & Freeman, R., 1995: Adiabatic pulses for wideband inversion and broadband decoupling; J. Magn. Reson. A 115, 273–276

Kusunoki, H., Wakamatsu, K., Sato, K., Miyazawa, T. & Kohno, T., 1998: G protein-bound conformation of mastoparan-X; heteronuclear multi-dimensional transferred nuclear overhauser effect analysis of peptide uniformly enriched with 13C and 15N; Biochemistry 37, 4782–4790

Kwong, P. D., Ryu, S.-E., Hendrickson, W. A., Axel, R., Sweet, R. M., Folena-Wasserman, G., Hensley, P. & Sweet, R. W., 1990: Molecular characteristics of recombinant human CD4 as deduced from polymorphic crystals; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6423–6427

Laemmli, U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; Nature 227, 680–685

Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., 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, 477–496

LeMaire, M., Champeil, P. & Møller, J. V., 2000: Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents; Biochim. Biophys. Acta 1508, 86–111

Lemaitre, V., Willbold, D., Watts, A. & Fischer, W. B., 2006: Full length Vpu from HIV-1: combining molecular simulations with NMR spectroscopy; J. Biomol. Struct. Dynam. 23, 485–496

Lemaster, D., 26: Isotope labeling in solution protein assignment and structural analysis.; Prog. NMR Spectr. 1994, 371–419

Lottspeich, F. & Zorbas, H., 1998: in *Bioanalytik*; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

Ma, C., Marassi, F. M., Jones, D. H., Strauss, S. K., Bour, S., Strebel, K., Schubert, U., Oblatt-Montal, M., Montal, M. & Opella, S. J., 2002: Expression, purification, and activities od full-length and truncated versions of the integral membrane protein Vpu from HIV-1; Protein Sci. 11, 546–557

Macintosh, L. & Dahlquist, F., 1990: Biosynthetic incorporation of ^{15}N and ^{13}C for assignment and interpretation of nuclear magnetic resonance spectra of proteins.; Q. Rev. Biophys. 23, 1–38

Maddon, P. J., Molineaux, S. M., Maddon, D. E., Zimmerman, K. A., Godfrey, M., Alt, F. W., Chess, L. & Axel, R., 1986: Structure and Expression of the Human and Mouse T4 Genes; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9155–9159

Majumdar, A. & Zuiderweg, E. R. P., 1993: Improved ^{13}C-Resolved HSQC-NOESY Spectra in H_2O, Using Pulsed Field Gradients; J. Magn. Reson. B 102, 242–244

Margottin, F., Benichou, S., Durand, H., Richard, V., Liu, L. X., Gomas, E. & Benarous, R., 1996: Interaction of the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: role of Vpu residues involved in CD4 interaction and *invitro* degradation; Virology 223, 381–386

Margottin, F., Bour, S. P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. & Benarous, R., 1998: A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif; Mol. Cell 1, 565–574

Marion, D., Kay, L., Sparks, S., Torchia, D. & Bax, A., 1989: Three-dimensional heteronuclear NMR of ^{15}N labeled proteins; J. Am. Chem. Soc. 111, 1515–1517

Markley, J., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C., Kaptein, R., Sykes, B., Wright, P. & Wüthrich, K., 1998: Recommendations for the resentation of NMR structures of proteins and nucleic acids; J. Biomol. NMR 12, 1–23

Marx, U. C., Austermann, S., Bayer, P., Adermann, K., Ejchart, A., Sticht, H., Walter, S., Schmid, F.-X., Jaenicke, R., Forssmann, W.-G. & Rösch, P., 1995: Structure of the parathyroid hormone 1-37 in solution; J. Biol. Chem. 270, 15194–15202

Meyer, B. & Peters, T., 2003: NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors.; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 42, 864890

Miroux, B. & Walker, J. E., 1996: Over-production of Proteins in Escherichia coli: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels; J. Mol. Biol. 260, 289–298

Mullis, K. B. & Faloona, F. A., 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction; Methods Enzymol 155, 335–350

Opella, S. J. & Marassi, F. M., 2004: Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy; Chem. Rev. 104, 3587–3606

Oschkinat, H., Griesinger, C., Kraulis, P. J., Sørensen, O. W., Ernst, R. R., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M., 1988: Three-dimensional NMR spectroscopy of a protein in solution; Nature 332, 374–376

Oxenoid, K., Kim, H. J., Jacob, J., Sonnichsen, F. D. & Sanders, C. R., 2004: NMR assignments for a helical 40 kDa membrane protein; J. Am. Chem. Soc. 126, 5048–5049

PalmerIII, A., 1997: Probing molecular motion by NMR; Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 732–737

Pardi, A., Billeter, M. & Wüthrich, 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

Park, S. H., Mrse, A. A., Nevorov, A. A., Mesleh, M. F., Oblatt-Montal, M., Montal, M. & Opella, S. J., 2003: Three-dimensional Structure of the Channel-forming Transmembrane Domain of Virus Protein "u" (Vpu) from HIV-1; J. Mol. Biol. 333, 409–424

Pencer, J., White, G. F. & Hallett, F. R., 2001: Osmotically Induced Shape Changes of Large Unilamellar Vesicles Measured by Dynamic Light Scattering; Biophys. J. 81, 2716–2728

Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. & Wüthrich, K., 1997: Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1236612371

Pervushin, K., Wider, G. & Wüthrich, K., 1998: Single transition-to-single transition polarisation transfer (ST2-PT) in [^{15}N,^{1}H]-TROSY.; J. Biomol. NMR 12, 345–348

Petty, H. R., 1993: in *Molecular Biology of Membranes: Structure and Function*; S. 404; Plenum Press, New York

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, J. & Belfrage, G., 1975: Metal Chelate Affinity chromatography, a new approach to protein fractionation; Nature 258, 598–599

Preusser, A., Jonas, G. & Willbold, D., 2003: Purification of recombinantly expressed human cluster determinant 4 cytoplasmic domain; J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. 786, 39–44

Provencher, S. W. & Glockner, J., 1981: Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism ; Biochemistry 20, 33–37

Purcell, E., Torrey, H. & Pound, R., 1946: Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid; Phys. Rev. 69, 37–38

Ramachandran, G., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V., 1963: Stereochemistry of polypeptide chain configurations; J. Mol. Biol. 7, 95–99

Reif, B., Hennig, M. & Griesinger, C., 1997: Direct measurement of angles between bond vectors in high-resolution NMR; Science 276, 1230–1233

Ryu, S.-E., Kwong, P. D., Truneh, A., Porter, T. G., Arthos, J., Rosenberg, M., Dai, X., Xuong, N.-H., Axel, R., Sweet, R. W. & Hendrickson, W. A., 1990: Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4; Nature 348, 419–426

Sakai, H. & Tsukihara, T., 1998: Structures of Membrane Proteins Determined at Atomic Resolution; J. Biochem. 124, 1051–1059

Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H. & Wüthrich, K., 2000: NMR assignment and secondary structure determination of an octameric 110 kDa protein using TROSY in triple resonance experiments.; J. Am. Chem. Soc. 122, 75437548

Sambrook, J. E., Fritsch, F. & Maniatis, T., 1989: Molecular Cloning; in *A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Sanders, C. R. & Oxenoid, K., 2000: Customizing model membranes and samples for NMR spectroscopic studies of complex membrane proteins; Biochim. Biophys. Acta 1508, 129–145

Sanders, C. R. & Schwonek, J. P., 1993: An approximate model and empirical energy function for solute interactions with a water-phosphatidylcholine interface; Biophys. J. 65, 1207–1218

Sanders, C. R. & Sönnichsen, F., 2006: Solution NMR of membrane proteins: practice and challenges; Magn. Reson. Chem. 44, 524–540

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R., 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467

Sattentau, Q. J. & Weiss, R. A., 1988: The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor.; Cell 52, 631–633

Saupe, A. & Englert, G., 1963: High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Orientated Molecules; Phys. Rev. Lett. 11, 462–464

Schubert, U., Henklein, P., Boldyreff, B., Wingender, E., Strebel, K. & Porstmann, T., 1994: The human immunodeficiency virus type 1 encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase-2 (CK-2) at positions Ser52 and Ser56 within a predicted α-helix-turn α-helix-motif; J. Mol. Biol. 236, 16–25

Schubert, U. & Strebel, K., 1994: Differential activities of the human immunodeficiency viurs type 1-encoded VpU protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartiments; J. Virol. 68, 2260–2271

Schwarzinger, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Chung, J., Wright, P. E. & Dyson, H. J., 2001: Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts; J. Am. Chem. Soc. 123, 2970–2978

Schwarzinger, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Wright, P. E. & Dyson, H. J., 2000: Random coil chemical shifts in acidic 8 M urea: implementation of random coil shift data in NMRView; J. Biomol. NMR 18, 43–48

Schweimer, K., Hoffmann, S., Bauer, F., Friedrich, U., Kardinal, C., Feller, S., Biesinger, B. & Sticht, H., 2002: Structural investigation of the binding of a herpesviral protein to the SH3 domain of tyrosine kinase Lck.; Biochemistry 41, 5120–5130

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. & Pines, A., 1988: Interative schemes for bilinear operators; application to spin decoupling; J. Magn. Reson. 77, 274–293

Shaw, A. S., Amrein, K. E., Hammond, C., Stern, D. F., Sefton, B. M. & Rose, J. K., 1989: The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain; Cell 59, 627–636

Shaw, A. S., Chalupny, J., Whitney, J. A., Hammond, C., Amrein, K. E., Kavathas, P., Sefton, B. M. & Rose, J. K., 1990: Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosin protein kinase; Mol. Cell. Biol. 10, 1853–1862

Shin, J., Dunbrack Jr., R. L., Lee, S. & Strominger, J. L., 1991: Phosphorylation-dependent down-modulation of CD4 requires a specific structure within the cytoplasmic domain of CD4; J. Biol. Chem. 266, 10658–10665

Shuker, S., Hajduk, P., Meadows, R. & Fesik, S., 1996: Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR; Science 274, 1531–1534

Smart, J. L. & McCammon, J. A., 1999: Phosphorylation stabilizes the N-termini of alpha-helices; Biopolymers 49, 225–233

Sönnichsen, F. D., Van Eyk, J. E., Hodges, R. S. & Sykes, B. D., 1992: Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide; Biochemistry 31, 8790–8798

Sreerama, N. & Woody, R. W., 1993: A self-consistent method for the anaylsis of protein secondary structure from circular dichroism; Anal. Biochem. 209, 32–44

Sreerama, N. & Woody, R. W., 2000: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set; Anal. Biochem. 287, 252–260

Sreerama, N. & Woody, R. W., 2004: Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra; Meth. Enzymol. 383, 318–351

Stangler, T., Hartmann, R., Willbold, D. & Koenig, B. W., 2006: Modern High Resolution NMR for the Study of Structure, Dynamics and Interactions of Biological Macromolecules; Z. Phys. Chem. 220, 567–613

Sticht, H., Willbold, D., Ejchart, A., Rosin-Arbesfeld, R. & Rösch, P., 1994: Trifluoroethanol stabilizes a helix-turn-helix motif in equine-infectious-anemia-virus trans-activator protein; Eur. J. Biochem. 225, 855–861

Styles, P., Soffe, N. F., Scott, C. A., Cragg, D. A., Row, F., White, D. J. & White, P. C. J., 1984: A High-Resolution NMR Probe in Which the Coil and Preamplifier Are Cooled with Liquid Helium; J. Magn. Reson. 60, 397–404

Sun, F., 2003: Molecular dynamics simulation of human immunodeficiency virus protein U (VpU) in lipid/water Langmuir monolayer; J. Mol. Mod. 9, 114–123

Tjandra, N. & Bax, A., 1997: Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium.; Science 278, 1111–1114

Tjandra, N., Omichinski, J. G., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. & Bax, A., 1997: Use of dipolar 1H-15N and 1H-13C couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution.; Nat. Struct. Biol. 4, 732–738

Tolman, J. R., Flanagan, J. M., Kennedy, M. A. & Prestegard, J. H., 1995: Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins: information for structure determination in solution.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9279–9283

Tolman, J. R., Flanagan, J. M., Kennedy, M. A. & Prestegard, J. H., 1997: NMR evidence for slow collective motions in cyanometmyoglobin.; Nat. Struct. Biol. 4, 292–297

Vincent, M. J. & Jabbar, M. A., 1995: The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: A potential regulator of proteolysis and protein transport in the mammalian secretory pathway; Virology 214, 639–649

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 endoplasmatic reticulum; J. Virol. 67, 5538–5549

von Heijne, G. & Gavel, Y., 1988: Topogenic signals in integral membrane proteins; Eur. J. Biochem. 174, 671–678

Vuister, G. W. & Bax, A., 1993: Quantitative J correlation: A new approach for measuring homonuclear three-bond $J(H^N H^\alpha)$ coupling constants in ^{15}N-enriched proteins; J. Am. Chem. Soc. 115, 7772–7777

Wagner, G., 1997: An account of NMR in structural biology; Nat. Struct. Biol. 4, 841–844

Wagner, G. & Wüthrich, K., 1982: Sequential resonance assignments in protein ^{1}H nuclear magnetic resonance spectra. Basic pancreatic trypsin inhibitor.; J. Mol. Biol. 155, 347–366

Wang, J., Yan, Y., Garrett, T. P. J., Liu, J., Rodgers, D. W., Garlick, R. L., Tarr, G. E., Husain, Y., Reinherz, E. L. & Harrison, S. C., 1990: Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains; Nature 248, 411–418

White, G., Pencer, J., Nickel, B. G., Wood, J. M. & Hallett, F. R., 1996: Optical Changes in Unilamellar Vesicles Experiencing Osmotic Stress; Biophys. J. 71, 2701–2715

White, S. H. & Wimley, W. C., 1999: Membrane Protein Folding and Stability: Physical Principles; Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28, 319–366

White, S. H., Wimley, W. C., Ladokhin, A. S. & Hristova, K., 1998: Protein Folding in Membranes: Determining Energetics of Peptide-Bilayer Interactions; in *Energetics of Biological Macromolecules, Part B, 295* (G. Ackers, M. Johnson, J. Abelson & M. Simon, Herausgeber); S. 62–88; Academic Press

Wiener, M. C. & White, S. H., 1992: Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. II. Distribution and packing of terminal methyl groups; Biophys. J. 61, 428–433

Willbold, D., Hoffmann, S. & Rösch, P., 1997: Secondary structure and tertiary fold of the human immunodeficiency virus protein U (VpU) cytoplasmic domain in solution; Eur. J. Biochem. 245, 581–588

Willbold, D. & Rösch, P., 1996: Solution Structure of the Human CD4 (403-419) Receptor Peptide.; J. Biomed. Sci. 3, 435–441

Willbold, D., Rosin-Arbesfeld, R., Sticht, H., Frank, R. & Rösch, P., 1994: Structure of the equine infectious anemia virus Tat protein; Science 264, 1584–1587

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

Williamson, M., Havel, T. & Wüthrich, K., 1995: Solution conformation of Proteaseinhibitor IIA from bull seminal plasma by ^{1}H nuclear magnetic resonance and distance geometry; J. Mol. Biol. 182, 295–315

Wimley, W. C. & White, S. H., 1993a: Membrane partitioning: distinguishing bilayer effects from the hydrophobic effect; Biochemistry 32, 6307–6312

Wimley, W. C. & White, S. H., 1993b: Quantitation of electrostatic and hydrophobic membrane interactions by equilibrium dialysis and reverse-phase HPLC; Anal. Biochem. 213, 213–217

Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S. & Sykes, B. D., 1995a: 1H, 13C and 15N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects; J. Biomol. NMR 5, 67–81

Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L. & Sykes, B. D., 1995b: ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR; J. Biomol. NMR 6, 135–140

Wishart, D. S. & Case, D. A., 2001: Use of chemical shifts in macromolecular structure determination; Methods Enzymol. 338, 3–34

Wishart, D. S. & Sykes, B. D., 1994a: Chemical shifts as a tool for structure determination; Methods Enzymol. 239, 363–392

Wishart, D. S. & Sykes, B. D., 1994b: The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data; J. Biomol. NMR 4, 171–180

Wittekind, M. & Mueller, L., 1993: HNCACB, a high-sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonance with the α- and β-carbon resonance in proteins.; J. Magn. Reson. 101, 201–205

Wray, V., Federau, T., Henklein, P., Klabunde, S., Kunert, O., Schomburg, D. & Schubert, U., 1995: Solution structure of the hydrophilic region of HIV-1 encoded virus protein U (Vpu) by CD and 1H NMR spectroscopy; Int. J. Peptide Protein Res. 45, 35–43

Wray, V., Mertins, D., Kiess, M., Henklein, P., Trowitzsch-Kienast, W. & Schubert, U., 1998: Solution structure of the cytoplasmic domain of the human CD4 glycoprotein by CD and ^{1}H NMR spectroscopy: implications for biological functions; Biochemistry 37, 8527–8538

Wu, H., Kwong, P. D. & Hendrickson, W. A., 1997: Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4; Nature 387, 527–530

Wüthrich, K., 1986: in *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; John Wiley & Sons, New York, USA

Wüthrich, K., 1998: The second decade - into the third millenium.; Nature Struct. Biol. 5, 492–495

Wüthrich, K., Billeter, M. & Braun, W., 1983: Pseudo-structures for the 20 common amino acids for use in studies of protein conformations by measurements of intramolecular proton-proton distance constraints with nuclear magnetic resonance; J. Mol. Biol. 169, 949–961

Yamazaki, T., Forman-Kay, J. D. & Kay, L. E., 1993: Two-dimensional NMR experiments for correlating $^{13}C^{\beta}$ and $^{1}H^{\delta/\epsilon}$ chemical shifts of aromatic residues in ^{13}C-labeled proteins via scalar couplings; J. Am. Chem. Soc. 115, 11054–11055

Yamazaki, T., Lee, W., Arrowsmith, C., Muhandiram, D. & Kay, L. E., 1994: A suite of triple resonance NMR experiments for the backbone assignment of 15N, 13C, 2H labeled proteins with high sensitivity.; J. Am. Chem. Soc. 116, 11655–11666

Yao, X. J., Friborg, J., Checroune, F., Gratton, S., Boisvert, F., Sekaly, R. P. & Cohen, E. A., 1995: Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic region of CD4 contributes to Vpu sensitivity; Virology 209, 615–623

Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K. & White, S. H., 1998: The preference of tryptophan for membrane interfaces; Biochemistry 37, 14713–14718

Zeeb, M. & Balbach, J., 2004: Protein folding studied by real-time NMR spectroscopy.; Methods 34, 6574

Zhang, O., Kay, L. E., Olivier, J. P. & Forman-Kay, J. D., 1994: Backbone 1H and 15N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques; J. Biomol. NMR 4, 845–858

Danksagung

„Danke“ möchte ich den Leuten sagen, die mir privat oder dienstlich zur Seite standen und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Dieter Willbold gilt mein Dank, der mir dieses überaus interessante Thema überlassen hat. Für die Betreuung, die Schaffung eines sehr guten Arbeitsklimas und die immer motivierende Art, die so manches Tief überwinden half, bin ich sehr dankbar. Danke auch für die erfrischend unkomplizierte Art bei jedem dienstlichen oder privaten Gespräch.

Prof. Dr. Georg Büldt sei für die Aufnahme und Betreuung während meiner ersten Zeit in Jülich gedankt. Sein Interesse an meiner Arbeit, aber auch am fußballerischen Geschick des INB-2 hat mich sehr erfreut.

Ganz besonders großer Dank gilt Dr. Bernd König, der es speziell in der ersten Zeit dieser Arbeit wohl nicht immer leicht mit mir hatte. Die großartige Unterstützung bei der Bewertung von Experimenten, der Planung von Strategien und dem Schreiben der Veröffentlichungen werde ich nie vergessen. Speziell in den letzten Jahren hat mir die Zusammenarbeit sehr viel Spaß gemacht.

Jeannine Mohrlüder sei für die vielen schönen Gespräche während der Mittagessen und der Kaffeepausen gedankt, es tat gut, mit Freunden auch mal über andere Themen zu sprechen - und das zumeist auf witzige Art und Weise.

Vielen Dank an Esther Jonas, die mich in meiner ersten Zeit als „in das Labor gefallener Astronom“ mit den molekularbiologischen Arbeitsweisen vertraut gemacht hat. Danke auch für die lustigen Neckereien!

Unserem „Bonner“ Dr. Rudolf Hartmann und Dr. Matthias Stoldt gilt großer Dank für die Einführung in die NMR-Messtechnik und die Teilhabe an ihrem großen NMR-Wissensschatz.

Danke meinen Bürokollegen Dirk Bartnik, Andreas Eckhoff, Julian Glück, Holger Schmidt und Sven Schünke für die geniale Atmosphäre. Es war bisher eine wirklich tolle Zeit in diesem Büro mit vielen Späßen, fachlichen, politischen und moralethischen Diskussionen. Ich könnte mir keine bessere „Bürobesatzung“ vorstellen! Die manchmal nötige Ablenkung während der Arbeitspausen wurde durch das Team 'FZJ-Kickerhupen' und die Tetrinet-Fraktion immer wieder schön geliefert. Vielen Dank für die schönen Spiele!

Danke an alle anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für die nette Atmosphäre, die vielen Ratschläge und Hilfen. Es ist mir eine große Freude, Teil dieser AG zu sein!

Einer ganz wichtigen Gruppe gilt auch mein besonderer Dank: Den Fußballern der BSG Forschungszentrum Jülich. Sie haben mit ihrer unkomplizierten, immer lustigen Art für den dringend notwendigen körperlichen und seelischen Ausgleich gesorgt. Ganz besonders Harry Beck, der „der Mann von nebenan" im Institut ist, war immer für ein nettes Schwätzchen zwischendurch zu haben und hat mir immer wieder ein Lachen ins Gemüt gezaubert, wenn die Zeichen mal auf Sturm standen. Ganz besonders auch Franz-Josef Pratscher, der in meiner Zeit als Leiter der internen Fußballmeisterschaft und auch sonst immer ein offenes Ohr für mich hatte, sich meine Ärgernisse angehört hat und das Fußballspielen grundsätzlich zu einem tollen Event gemacht hat. Allen Mannschaften, Spielern und Leitern des internen FZJ-Fußballs für die einfach unvergessliche Zeit!

Meinen lieben Eltern Roselie und Winfried Wittlich, denen auch unter anderem diese Arbeit gewidmet ist. Während meines gesamten Lebens konnte ich mich immer uneingeschränkt auf ihren Rückhalt und ihre Unterstützung verlassen. Die Fürsorge und Geborgenheit zu Hause haben meinen oftmals leeren Akku wieder aufgefüllt. Ich bin besonders stolz, Euer Sohn zu sein! Danke! Der Westerwald und Kurtscheid werden immer meine Heimat sein, egal wo ich bin!

Es fällt mir schwer, das auszudrücken, was ich für meine Freundin Katrien Huysmans empfinde. Sie hat mich in den letzten Jahren begleitet und immer wieder aufgebaut, wenn Motivationslücken auftraten. Es war sehr beruhigend, sie in meiner Nähe zu wissen und zu fühlen, dass man geborgen ist. Ich weiß, dass es nicht immer leicht war, mit meinem Streß und meiner Angestrengtheit zu leben und dabei noch Unterstützung auszustrahlen. Dank U! Bedanken möchte ich mich dabei auch bei ihrer gesamten Familie (in Deutschland und Belgien), die mich immer offen empfangen hat und mir gezeigt hat, dass ich willkommen bin.

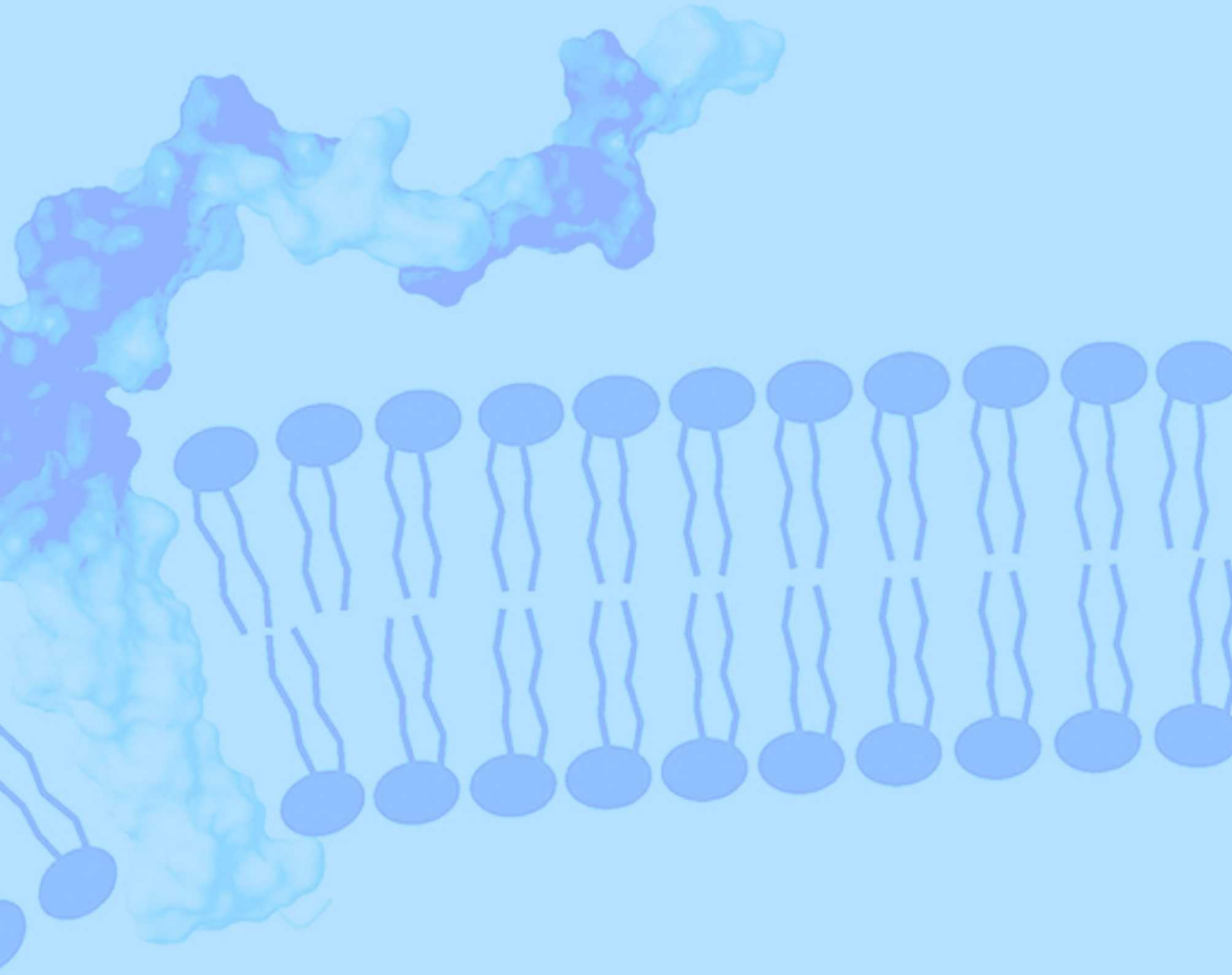
Vielen Dank an Dr. Holger Schmidt, mit dem ich die letzten 11 Jahre eine tolle Freundschaft erleben durfte. Die gemeinsame Zeit in Bonn und auch hier in Jülich war toll! Ich hoffe, daß diese Freundschaft immer erhalten bleibt!

Allen Verwandten und Freunden für die Erzeugung eines schönen und gemütlichen Umfeldes.

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

1. **Methoden zur integrierten Analyse metabolischer Netzwerke unter stationären und instationären Bedingungen**
   von S. A. Wahl (2008), 245 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-506-7

2. **Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)**
   von M. Wittlich (2008), XVIII, 185 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-510-4



Band | Volume 2
ISBN 978-3-89336-510-4

JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM