

Strukturelle Charakterisierung des
Vpr-Proteins
aus dem humanen Immundefizienz Virus
vom Typ-2

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Luis Möckel
aus Neubrandenburg

Jülich, März 2014

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Dieter Willbold
Korreferent: PD Dr. Bernd W. König

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2014

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	IX
Summary	XI

1. Einleitung	1
1.1. Das humane Immundefizienz Virus	1
1.1.1. Aufbau und Genetik von HIV-2	1
1.1.2. Das virale Protein R aus HIV-2	3
1.1.3. Das Protein 6 aus HIV-2	5
1.1.4. Die Interaktion der HIV Proteine Vpr und p6	6
1.2. Modellmembranen	7
1.2.1. Detergenzmizellen	7
1.2.2. Nanodisks	8
1.3. Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie	10
1.3.1. NMR-Spektroskopie mit Proteinen in Modellmembranen	11
1.3.2. Die chemische Verschiebung	12
1.3.3. Die paramagnetische Relaxationsverstärkung	13
1.4. Ziel dieser Arbeit	15
2. Material	17
2.1. Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine	17
2.2. Verwendete Biochemikalien, Chemikalien und Kits	18
2.3. Verwendete Bakterienstämme	19
2.4. Verwendete Plasmide	20
2.5. Verwendete Enzyme	20
2.6. Verwendete Größenstandards	21
2.7. Chromatographien	21
2.8. Datenbanken und Programme	22
2.9. Sonstige Materialien und Geräte	23

3. Methoden	24
3.1. Arbeiten mit DNA	24
3.1.1. Isolierung von DNA aus <i>E. coli</i>	24
3.1.2. Bestimmung von DNA-Konzentrationen	24
3.1.3. DNA-Gelelektrophorese	24
3.1.4. Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme	25
3.1.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
3.1.6. Dephosphorylierung von DNA	25
3.1.7. Ligation von DNA	26
3.1.8. DNA-Sequenzierung	26
3.1.9. Klonierung des Plasmids pET28a_HIV-2_His-p6	26
3.2. SDS-PAGE nach Laemmli	27
3.3. Bakterienkulturen	29
3.3.1. Transformation von <i>E. coli</i> mit DNA	29
3.3.2. Herstellung einer Glycerinkultur von <i>E. coli</i> Zellen	29
3.3.3. Rekombinante Expression der verwendeten Proteine in <i>E. coli</i>	29
3.3.3.1. Expression von HIV-2 Vpr	29
3.3.3.2. Expression von HIV-2 His-p6	30
3.3.3.3. Expression der Varianten des MSP	31
3.3.3.4. Expression der His-TEV-Protease	31
3.4. Reinigung von rekombinant exprimierten Proteinen	33
3.4.1. Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	33
3.4.2. Ionentauscherchromatographie	33
3.4.3. Größenausschlusschromatographie	33
3.4.4. Die autokatalytische Inteinspaltung	34
3.4.5. Reinigung von HIV-2 Vpr	36
3.4.6. Reinigung von HIV-2 p6	38
3.4.7. Reinigung der Varianten des MSP	40
3.4.8. Reinigung der His-TEV-Protease	41
3.4.9. Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels UV-Absorptionsspektroskopie	42
3.5. Markieren von Vpr mit MTSL	43
3.6. Assemblierung von Nanodisks	44
3.6.1. Assemblierung von Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks	44

3.6.2.	Assemblierung von MSP1D1-/MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks	45
3.7.	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	46
3.8.	Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie	47
3.8.1.	Chemische Verschiebung (δ)	49
3.8.2.	Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie	50
3.8.2.1.	2D HSQC- und TROSY-Spektren	51
3.8.2.2.	3D NMR-Spektren für die Resonanzzuordnung	52
3.8.3.	Paramagnetische Relaxationsverstärkung	54
3.8.4.	Chemical Shift Perturbation (CSP)	55
3.8.5.	Berechnung von Proteinstrukturen aus NMR-Daten	56
3.8.6.	Dynamiken des Proteinrückgrats	57
3.8.7.	NMR-Spektroskopie mit HIV-2 Vpr	58
3.8.7.1.	NMR-Spektrometer	58
3.8.7.2.	Probenvorbereitung	58
3.8.7.3.	NMR-Experimente	61
3.8.7.4.	Proteinrückgratresonanzzuordnung von Vpr	61
3.8.7.5.	Bestimmung der globalen Proteinrückgratstruktur des Vpr	61
3.8.7.5.1.	Bestimmung der Torsionswinkeleinschränkungen	63
3.8.7.5.2.	Berechnung von PRE-basierten Abständen	63
3.8.7.5.3.	Strukturrechnung	65
3.8.7.6.	Ermittlung der Dynamiken des Proteinrückgrats von Vpr	65
3.8.7.6.1.	Tensor2	66
3.8.7.6.2.	Spektrale Dichtefunktion	67
3.8.7.7.	Lokalisation von Vpr in DPC-Mizellen	69
3.8.7.8.	Vpr in Nanodisks	69
3.8.7.9.	Titration von HIV-2 p6 zu HIV-2 Vpr	70
4.	Ergebnisse	72
4.1.	Expression und Reinigung von HIV-2 Vpr	72
4.2.	Expression und Reinigung von HIV-2 p6	73
4.3.	Nanodisks	74
4.3.1.	Assemblierung von Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks	74
4.3.2.	Assemblierung von MSP1D1-DMPC-Nanodisks	75
4.3.3.	Assemblierung von MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks	76
4.4.	CD-Spektroskopie mit HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen	77

4.5.	NMR-Spektroskopie	77
4.5.1.	Optimierung der Messbedingungen	77
4.5.2.	Zuordnung der Proteinrückgratresonanzsignale des Vpr in DPC-Mizellen	79
4.5.3.	Sekundärstrukturbestimmung von Vpr mittels TALOS-N	80
4.5.4.	Paramagnetische Experimente zur Bestimmung von Abständen	81
4.5.5.	Berechnung und Analyse der globalen Proteinrückgratstruktur von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen	84
4.5.6.	Lokalisation von Vpr in DPC-Mizellen	87
4.5.6.1.	Titration von DPC zu Vpr	87
4.5.6.2.	Titration von Mn^{2+} zu Vpr in DPC-Mizellen	90
4.5.7.	Dynamiken des Proteinrückgrats von Vpr in DPC-Mizellen	91
4.5.7.1.	Analyse der Relaxationsdaten mittels Tensor2	93
4.5.7.2.	Analyse der Relaxationsdaten mittels reduzierter spektraler Dichtefunktion	94
4.5.8.	Vpr in Nanodisk	96
4.5.8.1.	NMR mit Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks	96
4.5.8.2.	NMR mit Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks	96
4.5.8.3.	NMR mit Vpr-MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks	98
4.5.9.	Titration von HIV-2 p6 zu Vpr in DPC-Mizellen	102
4.5.9.1.	Bestimmung der Bindestelle von p6 in Vpr	102
4.5.9.2.	Bestimmung der Dissoziationskonstante zwischen Vpr und p6	104
5.	Diskussion	106
5.1.	Rekombinante Expression und Reinigung von Vpr und p6	106
5.1.1.	Das Vpr-Fusionsprotein ermöglicht die Expression und Reinigung von HIV-2 Vpr	106
5.1.2.	Die Expression und Reinigung von p6 liefert ausreichende Mengen Protein	107
5.2.	Assemblierung von Nanodisks mittels Dialyse ist effizienter als mittels BioBeads	108
5.3.	Resonanzzuordnung, globale Struktur und Dynamiken von Vpr	108
5.3.1.	Proteinrückgratresonanzzuordnung	108
5.3.2.	Die globale Proteinrückgratstruktur von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen	109
5.3.3.	Vergleich der HIV-2 Vpr Struktur mit den Strukturen von HIV-1 Vpr	110
5.3.4.	HIV-2 Vpr ist hochflexibel und monomer in DPC-Mizellen	111

5.4.	Die Interaktion von Vpr mit Modellmembranen	113
5.4.1.	Die Interaktion von Vpr mit DPC-Mizellen	113
5.4.2.	Die Krümmung der Helix α_1 könnte durch die Größe der DPC-Mizelle induziert sein	115
5.4.3.	Vpr interagiert mit Lipiddoppelschichten in Nanodisks	116
5.4.4.	Der biologische Hintergrund der Interaktion von Vpr mit Membranen	118
5.5.	Die Interaktion der HIV-2 Proteine Vpr und p6	121
5.5.1.	Die mittelstarke Bindung von Vpr an p6 findet vorwiegend über den N-Terminus des Vpr statt	121
5.5.2.	Biologischer Hintergrund der Interaktion zwischen Vpr und p6	124
5.6.	Ausblick	125
Chemische Verschiebungen von HIV-2 Vpr		XII
Literaturverzeichnis		XXXI
Abkürzungsverzeichnis		XLV
Publikationen und Posterpräsentation		XLVIII
Danksagung		XLIX
Eidesstattliche Erklärung		L

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des Virions von HIV-2	2
1.2	Schematische Darstellung des Genoms von HIV-2	3
1.3	Computerbasiertes Modell der Struktur von HIV-2 Vpr	5
1.4	Schematische Darstellung des Gag-Polyproteins von HIV-2	6
1.5	Schematische Darstellung des Querschnitts einer Detergenzmizelle und einer Nanodisk	10
2.1	Verwendete Größenstandards	21
3.1	Schematische Darstellung des exprimierten Vpr-Fusionsproteins	30
3.2	Schematische Darstellung des exprimierten His-p6	31
3.3	Aufbau eines Inteins	36
3.4	Schematische Darstellung der Reinigung von HIV-2 Vpr und HIV-2 p6	38
3.5	Reaktion des MTSL mit dem Cystein des Vpr	43
4.1	SDS-Gel der Expression und Reinigung des HIV-2 Vpr	73
4.2	Expression und Reinigung von HIV-2 p6	74
4.3	Größenausschlusschromatogramm von Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks	75
4.4	Größenausschlusschromatogramme von MSP1D1-DMPC-Nanodisks	76
4.5	Größenausschlusschromatogramm von MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks	76
4.6	UV-CD-Spektrum von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen	77
4.7	2D [¹ H, ¹⁵ N]-HSQC-Spektren von HIV-2 Vpr	78
4.8	Zuordnung der Proteinrückgrat-Resonanzsignale des Vpr in DPC-Mizellen	80
4.9	Sekundärstrukturbestimmung von HIV-2 Vpr mittels TALOS-N	81
4.10	2D [¹ H, ¹⁵ N]-TROSY-Spektren von Vpr_C81S_F39C-SL und Vpr_C81-SL in DPC-Mizellen	82
4.11	Intensitätsverhältnisse der PRE-Experimente mit Vpr_C81S_F39C-SL und Vpr_C81-SL	83
4.12	Die 10 energetisch günstigsten Konformationen von Vpr in 50 mM DPC	85
4.13	Energetisch günstigste globale Proteinrückgratstruktur von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen	86
4.14	2D [¹ H, ¹⁵ N]-TROSY-Spektren von Vpr in Anwesenheit verschiedener DPC-Konzentrationen	88
4.15	CSPs und spektrale Dispersion von Vpr bei Titration von DPC	89
4.16	Titration von Mn ²⁺ zu HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen	91
4.17	Dynamiken des Proteinrückgrats von Vpr in 50 mM DPC	92

4.18	Analyse der Relaxationsdaten von Vpr mittels Tensor2	94
4.19	Reduziertes spektrale Dichtefunktionsmapping von Vpr bei 14,1 T und 18,8 T	95
4.20	NMR-Spektren von Vpr in Nanodisks	97
4.21	Vergleich von Vpr in DPC-Mizellen und MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks	100
4.22	Größenausschlusschromatogramm von Vpr-MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks nach abgeschlossener NMR-Messung	101
4.23	Überlagerung der 2D [¹ H, ¹⁵ N]-TROSY-Spektren von Vpr in 50 mM DPC bei Titration mit p6	103
4.24	CSPs der Vpr-Resonanzsignale bei Titration von p6	104
4.25	Dissoziationskonstanten der Vpr-p6-Interaktion	105
5.1	Vergleich der globalen Struktur von HIV-2 Vpr mit den Strukturen von HIV-1 Vpr	111
5.2	Schematisches Modell des Vpr-DPC-Mizellen-Komplex	114
5.3	Helikale Räder und Hydropathie Plot von Vpr	115
5.4	Vergleich der Aminosäuresequenzen von HIV-1 und HIV-2 Vpr	120
5.5	Abbildung der p6-interagierenden Aminosäuren in der Struktur des Vpr	123

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Biochemikalien, Chemikalien und Kits	18
2.2	Verwendete Bakterienstämme	19
2.3	Verwendete Plasmide	20
2.4	Verwendete Enzyme	20
2.5	Materialien für Gravitationsfluss betriebene Chromatographiesäulen	21
2.6	Mittels ÄKTAPurifier Chromatographiesystem betriebene Säulen	21
2.7	Verwendete Datenbanken und Programme	22
2.8	Verwendete Geräte	23
3.1	Puffer der DNA-Gelelektrophorese	25
3.2	Puffer, Gele und Lösungen zur SDS-Gelelektrophorese	28
3.3	Coomassie-Färbelösung zum Anfärben von Proteinen auf SDS-Gelen	28
3.4	Medien und Zusätze für die Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	32
3.5	Zusammensetzung des 1-fach PBS-Puffer	32
3.6	Puffer zur Reinigung des HIV-2 Vpr	37
3.7	Puffer zur Reinigung von HIV-2 p6	39
3.8	Puffer zur Reinigung der Varianten des MSP	41
3.9	Puffer zur Reinigung der His-TEV-Protease	42
3.10	PRE-Wasch-Puffer und NMR-SL-Puffer	44
3.11	Puffer zur Assemblierung von Nanodisk	46
3.12	Teilweise für die NMR-Messungen verwendete Puffer	59
3.13	Hergestellte NMR-Proben von Vpr	60
3.14	Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente	62
A.1	Chemische Verschiebungen der Kerne von HIV-2 Vpr	XII

Zusammenfassung

Das virionassoziierte virale Protein R (Vpr) aus dem humanen Immundefizienz Virus vom Typ 2 (HIV-2) ist ein multifunktionelles Protein. Es ist sowohl zum HIV-1/SIV Vpr, als auch zum HIV-2/SIV Vpx homolog. Es wird vermutet, dass die Funktionen des HIV-1 Vpr in HIV-2 auf Vpr und Vpx aufgeteilt sind. Trotz seiner geringen Größe von etwa 105 Aminosäuren erfüllt HIV-2 Vpr Funktionen, die zu einer erhöhten Infektiosität des Virus führen. Zu Beginn eines Infektionszyklus assoziiert Vpr mit dem Reverse Transkriptase-Komplex, welcher aus dem viralen RNA-Genom DNA für den Einbau ins Wirtszellen-Genom transkribiert. Am Ende des viralen Lebenszyklus ist Vpr an der Freisetzung neuer Virionen beteiligt. Neben diesen Funktionen wird vermutet, dass Vpr eine Ionenkanalaktivität sowie die Fähigkeit in Membranen einzudringen besitzt. Die Assoziation von Vpr mit dem Virion wird durch die Interaktion mit dem C-terminalen Bereich des HIV Gag-Polyproteins (p6) vermittelt. Durch Unterdrückung dieser Interaktion wird der Einbau von Vpr in das Virion inhibiert.

Ungeachtet seiner Multifunktionalität ist das HIV-2 Vpr strukturell kaum untersucht. So existieren lediglich zwei Strukturen von HIV-1 Vpr voller Länge. Auch die Interaktion von Vpr-Proteinen mit Membranen wurde noch nicht auf atomarer Ebene, beispielsweise mittels NMR-Spektroskopie, charakterisiert. Besonders durch ihre Fähigkeiten, die Abwehrmechanismen der Wirtszelle herabzusetzen und die Infektiosität des Virus zu erhöhen, stellen akzessorische Proteine wie das HIV-2 Vpr potentielle Ziele für die therapeutische Behandlung von HIV dar. Für die Entwicklung wirksamer Therapien bedarf es allerdings einer ausführlichen Charakterisierung des Proteins.

In dieser Arbeit wurde HIV-2 Vpr strukturell mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert und die globale Faltung des Proteinrückgrats von Vpr in DPC-Mizellen aufgeklärt. Diese zeigt, dass Vpr aus drei α -Helices (α_1 , α_2 , α_3) besteht, von denen α_1 stark amphipatisch ist und α_2 die größte Hydrophobizität aufweist. NMR-Relaxations-Experimente zeigen, dass Vpr hochflexible Termini besitzt, wohingegen die α -Helices, auch wegen ihrer Interaktion mit der DPC-Mizelle, rigide vorliegen. Die Versuche konnten auch zeigen, dass höchstwahrscheinlich ein Vpr-Molekül mit einer Mizelle interagiert und HIV-2 Vpr bei den gewählten Bedingungen als Monomer vorliegt. Durch verschiedene Titrationsexperimente konnte gezeigt werden, dass α_1 ausschließlich mit der Oberfläche der Mizelle interagiert, α_2 und α_3 dagegen partiell in die Mizelle eingebettet sind. Interessanterweise liegt in DPC-Mizellen auch der C-Terminus von HIV-2 Vpr vom Puffer abgeschirmt vor. Für HIV-1 Vpr ist bekannt, dass der C-terminale Bereich mit Membranen interagiert und in diese eindringen kann. Die Verwendung von Nanodisks erlaubte die Charakterisierung des HIV-2 Vpr in Lipiddoppelschichten mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie. Diese Experimente zeigten, dass es nur geringe strukturelle Unterschiede zwischen HIV-2 Vpr in Lipiddoppelschichten und DPC-Mizellen gibt.

Durch Titration von unmarkiertem p6 zu ^{15}N -markiertem Vpr in DPC-Mizellen konnte mittels NMR-Spektroskopie die p6-Bindestelle im Bereich des N-Terminus und der Helix α_1 von Vpr lokalisiert werden. Die Experimente haben auch gezeigt, dass zwei weitere Bindestelle für p6 in Vpr existieren könnten. Durch Fitten der NMR-Daten konnte, basierend auf einem 1:1 Bindemodell, zusätzlich die Dissoziationskonstante der Interaktion zwischen Vpr und p6 mit $31,3 \pm 15,1 \mu\text{M}$ bestimmt werden.

Summary

The accessory viral protein R (Vpr) of the human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) is a virion associated multifunctional protein. HIV-2 Vpr is homolog to the proteins HIV-1/SIV Vpr as well as to HIV-2/SIV Vpx. In HIV-2 the proteins Vpr and Vpx might share the functions of Vpr in HIV-1. In spite of its small size of approximately 105 amino acids HIV-2 Vpr enhances the viral infectivity by performing miscellaneous functions during the viral life cycle. After the infection of a host cell Vpr associates with the Reverse Transcriptase complex. This complex is responsible for the transcription of the viral RNA genom into DNA for incorporation into the host cell genome. At the end of the viral life cycle Vpr takes part in the budding process of virions from host cells. In addition, Vpr might possess an ion channel activity and the ability to penetrate cell membranes. The incorporation of Vpr into the virion is achieved by its interaction with the C-terminal domain of the gag-polyprotein (p6). The virion incorporation of Vpr is prevented by removal of the Vpr binding site in p6.

Although HIV-2 Vpr is highly important for the virus, there is almost no structural information on the protein. Only two NMR structures of full length HIV-1 Vpr have been published, yet. Furthermore, the interaction of Vpr proteins with membranes has not been characterized at the atomic level by NMR spectroscopy or comparable techniques. The accessory proteins of HIV, such as HIV-2 Vpr, enhance the viral infectivity and therefore, they are in the focus of antiviral drug development. But prior to the development of efficient therapies a detailed characterization of the protein is necessary.

In this work HIV-2 Vpr was structurally characterized using NMR spectroscopy and the global fold of the backbone of Vpr in DPC micelles was determined. This structure contains three α -helices (α_1 , α_2 , α_3). The first helix α_1 is a highly amphipathic helix and α_2 is the most hydrophobic region of HIV-2 Vpr. Relaxation experiments reveal that the termini of Vpr are highly flexible, while the helices possess a strong rigidity. Besides, these experiments showed that one Vpr molecule interacts with one DPC micelle and HIV-2 Vpr is predominantly monomeric at the used conditions. By performing titration experiments the association of α_1 with the micelle surface was shown. Both α_2 and α_3 are partially embedded into the DPC micelle. Interestingly the C-terminus of Vpr is solvent protected in DPC micelles as well. For Vpr of HIV-1 the C-terminal region is known to interact with membranes and to penetrate lipid bilayers. NMR experiments with HIV-2 Vpr in nanodiscs indicate only minor structural differences of Vpr in lipid bilayers compared to DPC micelles. The titration of unlabeled HIV-2 p6 to ^{15}N -labeled Vpr localized the p6 binding site in the N-terminal region and in helix α_1 of Vpr. Besides, these experiments indicate that there might be two more binding sites of p6 in Vpr. Assuming a 1:1 binding model, fitting of the NMR data provided a K_D of $31.3 \pm 15.1 \mu\text{M}$ for the Vpr-p6-interaction.

1. Einleitung

1.1. Das humane Immundefizienz Virus

Das humane Immundefizienz Virus (HIV) lässt sich in die Stämme HIV-1 und HIV-2 einteilen, die sich unabhängig voneinander aus dem Simian Immundefizienz Virus (SIV) entwickelt haben. Wobei das HIV-2 noch immer eine sehr starke Ähnlichkeit mit SIV-Stamm SIV_{sm} aufweist (de Silva et al. 2008). Neben Unterschieden in den Aminosäuresequenzen der jeweiligen Proteine von HIV-1 und HIV-2, unterscheiden sich diese zusätzlich in zwei Genen. Das HIV-1 besitzt ein *vpu* Gen (Cohen et al. 1988), wohingegen das HIV-2 ein *vpx* Gen besitzt (Guyader et al. 1989).

Bei der Infektion befallen beide Stämme humane CD4 exprimierende T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen (Sattentau & Weiss, 1988). Das humane T-Zell-Glykoprotein CD4 ist dabei der Hauptrezeptor für beide Stämme des HI-Virus (Sattentau & Weiss, 1988). Nach erfolgter Infektion führen beide Stämme zu einem ähnlichen Krankheitsverlauf, der sich in vier Phasen einteilen lässt. Diese sind: I) eine ein- bis vierwöchige akute Phase, II) eine mehrjährige, weitgehend symptomfreie Latenzphase, III) eine Phase mit ersten Erkrankungen, die bereits auf ein geschwächtes Immunsystem hinweisen und IV) die finale Phase in der das vollständige Krankheitsbild des erworbenen Immunschwächesyndroms (AIDS, engl. Abk. für acquired immunodeficiency syndrom) vorliegt. Die vierte Phase zeichnet sich durch eine stark verringerte Anzahl von CD4 exprimierenden Zellen sowie durch schwerwiegende opportunistische Infektionen mit Viren, Pilzen und Bakterien aus (RKI – www.rki.de – 2014).

Obwohl sich die beiden Stämme HIV-1 und HIV-2 genetisch sehr ähnlich sind, besitzt das HIV-1 eine wesentlich größere geographische Verbreitung. Das HI-Virus vom Typ 1 tritt weltweit auf, wohingegen sich die Verbreitung von HIV-2 hauptsächlich auf Westafrika beschränkt (Campbell-Yesufu & Gandhi, 2011). Auch in der Infektionshäufigkeit unterscheiden sich die beiden Stämme stark. So leben weltweit etwa 35 Mio. Menschen mit einer HIV-Infektion, wovon nur etwa 2 Mio. mit HIV-2 infiziert sind und überwiegend aus Westafrika stammen (Campbell-Yesufu & Gandhi, 2011).

1.1.1. Aufbau und Genetik von HIV-2

HIV-2 ist ein etwa 120 nm großes Viruspartikel, welches von einer äusseren Lipidschicht umgeben ist (Abb. 1.1). Diese Lipidschicht erlangt das Virus beim Abschnüren von der humanen Zelle. Das HIV-2 Glykoprotein gp120 befindet sich auf der Oberfläche dieser Lipidschicht und spielt eine entscheidende Rolle bei der Infektion von CD4⁺-Zellen (Lusso, 2006). Das transmembrane gp41 interagiert mit gp120 und verankert dieses so in der Lipidschicht (Gabudza et al. 1991). Die beiden

Glykoproteine gp120 und gp41 werden aus dem gp160 prozessiert, welches wiederum durch das *env*-Gen codiert ist (Abb. 1.2). Durch Interaktion des CD4-Rezeptors auf der Oberfläche humaner Zellen mit dem viralen gp120-Glykoprotein auf der Oberfläche des HI-Virus, erreicht das Virus den Eintritt in die humane Zelle. Neben dem CD4-Rezeptor benötigt HIV-2 einen Korezeptor für den Zelleintritt in die humane Zelle. Als Korezeptor fungiert entweder CCR5 oder CXCR4, bei denen es sich um humane Chemokinrezeptoren handelt (Lusso, 2006).

Die aus dem p17 Protein bestehende Matrix (MA) ist von einer Lipidschicht umgeben. Die Matrix enthält das virale Kapsid und die Protease des HI-Virus. Das p17 Protein wird als N-terminaler Teil des Gag-Polyproteins exprimiert und durch das *gag*-Gen codiert (Coffin et al. 1997). Das Virus benötigt die Protease zum Öffnen des Kapsids, welches das virale Genom sowie weitere Proteine wie das p6-Protein (siehe Abb. 1.1) enthält. Die Protease des HIV-2 wird durch Transkription und Translation des *pol*-Gens im Verlauf der Infektion durch die humane Zelle synthetisiert. Das Kapsid (CA) von HIV-2 besteht aus dem p24-Protein, welches als Teil des Gag-Polyproteins synthetisiert wird (Coffin et al. 1997).

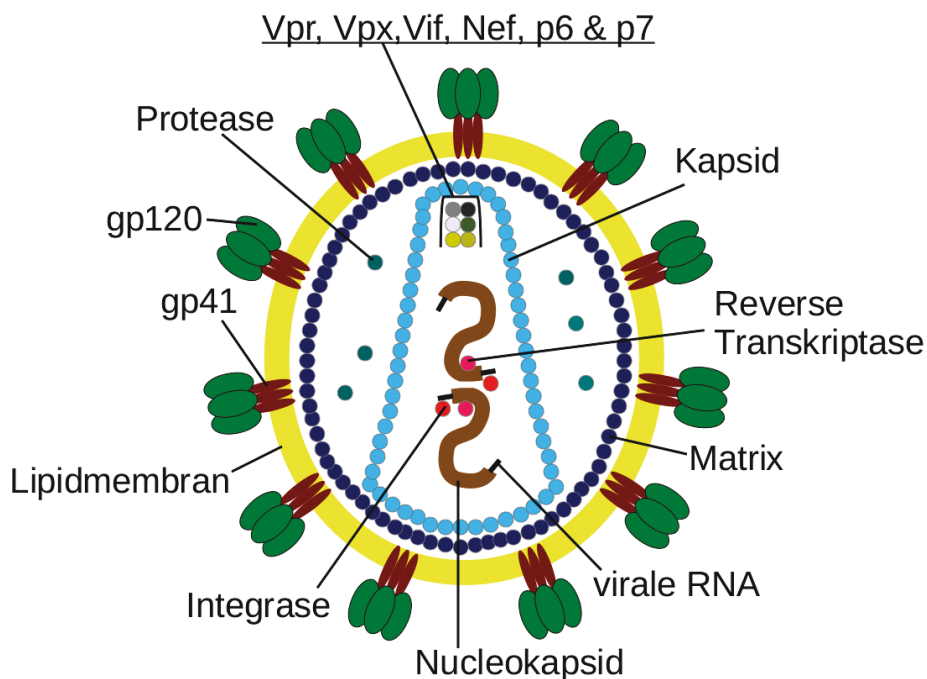


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Virions von HIV-2. Eingezeichnet sind alle wichtigen Proteine und Strukturen des Virions (Verändert nach http://simple.wikipedia.org/wiki/File:HIV_Virion-en.png).

Das Genom von HIV-2 (Abb. 1.2) besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen, die von zwei Long Terminal Repeats (LTRs) flankiert werden. Die LTRs ermöglichen den Einbau des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle durch die Integrase. Diese Integration erfolgt nach reverser

Transkription der viralen RNA in DNA durch die Reverse Transkriptase. Sowohl die Reverse Transkriptase als auch die Integrase werden durch das *pol*-Gen kodiert (Coffin et al. 1997). Neben den retroviralen Hauptgenen *env*, *pol* und *gag* besitzt das HIV-2 die akzessorischen Gene *vpr*, *vpx*, *vif*, *nef*, *rev* und *tat*, die einen großen Einfluss auf die Virulenz des Virus haben (Trono, 1995). Das Protein Vif (viraler Infektiositätsfaktor, engl. Abk. für viral infectivity factor) bindet unter anderem an das anti-virale humane Protein APOBEC3G, was zu einem proteasomalen Abbau von APOBEC3G führt (Conticello et al. 2003). Durch das Protein Nef (Negativer Faktor, engl. Abk. für negative factor) von HIV kommt es dagegen zu einer Herunterregulierung der CD4-Moleküle an der Zelloberfläche von HIV-infizierten Zellen (Laguet et al. 2010). Das Tat-Protein (Trans-Aktivator der Transkription) verstärkt die virale Transkription in der infizierten Zelle (Debaisieux et al. 2012) und Rev (Regulator der Expression viraler Proteine) wird beim Export von nicht gespleißten Transkripten aus dem Zellkern der Wirtszelle bei der Biosynthese von viralen Genprodukten benötigt (Strebel, 2003). Das virale Protein X (Vpx) aus HIV-2 ist dagegen am Import von viraler DNA in den Zellkern infizierter Makrophagen beteiligt (Fletcher III. et al. 1996). Das virale Protein R (Vpr) von HIV-2 induziert unter anderem den G2-Zellzyklusarrest in infizierten Zellen (Fletcher III. et al. 1996).

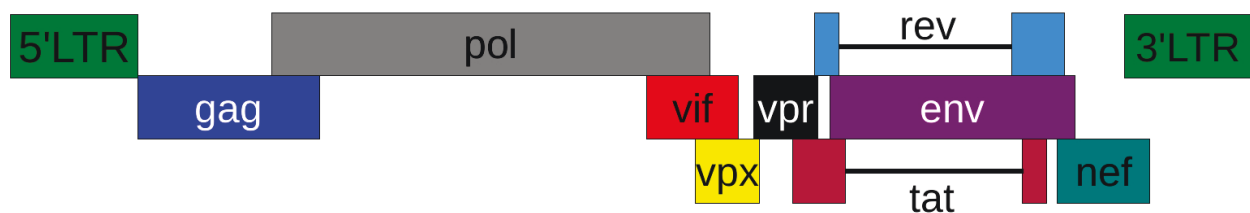


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Genoms von HIV-2.

(Modifiziert nach <http://www.mclid.co.uk/hiv/?q=HIV+genome>)

1.1.2. Das virale Protein R aus HIV-2

Das akzessorische virale Protein R (Vpr) aus HIV-2 besteht aus etwa 105 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 12 kDa (Swiss-Prot-Nr. P06938). Es ist ein virionassoziiertes Protein, das durch Interaktion mit dem viralen Protein p6 in das Virion eingebaut wird (siehe Kap. 1.1.4.). Wie das homologe HIV-1 Vpr ist auch HIV-2 Vpr ein multifunktionelles Protein, das an verschiedenen Zeitpunkten des viralen Lebenszyklus Funktionen erfüllt. Neben Vpr besitzt HIV-2 das zu diesem ebenfalls homologe Vpx, dessen Gen wahrscheinlich durch Genduplikation des *vpr*-Gens in HIV-2 entstanden ist (Tristem et al. 1990). So besteht zwischen HIV-1 und HIV-2 Vpr eine Aminosäuresequenzhomologie von etwa 44 % und zwischen den HIV-2 Proteinen Vpr und Vpx eine Homologie von etwa 22 % (Khamsri et al. 2006). Es wird ausserdem vermutet, dass die

Funktionen des HIV-1 Vpr in HIV-2 auf die beiden Proteine Vpr und Vpx aufgeteilt sind.

Funktionen des Vpr sind unter anderem die Induktion des G2-Zellzyklusarrest in infizierten Zellen, was durch Zellkulturstudien mit SIV_{sm} Vpr gezeigt wurde (Fletcher III. et al. 1996). Dieser Zellzyklusarrest dient einer effizienteren Replikation der viralen Gene. Weitere Versuche mit dem Vpr des selben SIV-Stamms haben gezeigt, dass Vpr ein Bestandteil des Reverse Transkriptase Komplexes ist (Fletcher III. et al. 1996) und somit während der frühen Phase der viralen Replikation aktiv ist. Während der späten Phase der Replikation konnte durch Zellkultur-experimente gezeigt werden, dass HIV-2 Vpr für eine effiziente Freisetzung frisch assemblierter Virionen von infizierten Lymphozyten notwendig ist (Ueno et al. 2003). In primären humanen Makrophagen ist HIV-2 Vpr essentiell für die virale Vermehrung, wobei die Transaktivierung der LTRs und anderer Promotoren durch Vpr in diesen Zellen eine entscheidende Rolle spielen kann (Hattori et al. 1990). Neben Vpr alleine hat gerade das Vorhandensein von HIV-2 Vpr und Vpx einen großen Einfluss auf die Verbreitung des Virus. So konnte gezeigt werden, dass Viren in Abwesenheit von Vpr und Vpx zwar ihre intakte Struktur beibehielten, allerdings ihre Infektiösität fast vollständig verloren ging (Piroozmand et al. 2006).

Für HIV-1 Vpr ist zusätzlich bekannt, dass dieses in der Lage ist, mit Membranen zu interagieren. Unter anderem wurde gezeigt, dass HIV-1 Vpr Ionenkanäle in Lipidmembranen bilden kann (Piller et al. 1996; Piller et al. 1998; Piller et al. 1999; Chen et al. 2010). Besonders von der N-terminalen Region des HIV-1 Vpr wird vermutet, dass diese für die Kationenkanalktivität verantwortlich ist (Piller et al. 1999). Ausserdem ist HIV-1 Vpr in der Lage, Lipiddoppelschichten zu destabilisieren (Greiner et al. 2011) und in diese einzudringen (Arunagiri et al. 1997). Das Eindringen in die Membran wird durch die stark konservierte Sequenz HFRIGCRHSRIG am C-Terminus von HIV-1 Vpr erreicht. Funktionen dieser Art sind für HIV-2 Vpr bisher nicht untersucht worden und somit nicht bekannt.

Auch strukturell ist HIV-1 Vpr wesentlich besser untersucht als HIV-2 Vpr. Unter anderem wurden zwei NMR-Strukturen von HIV-1 Vpr voller Länge in 30 % Acetonitril-d₃ (AcN-d₃)/70 % H₂O (Morellet et al. 2003) bzw. 30 % Trifluoroethanol (TFE)/70 % H₂O (Wecker et al. 2002) aufgeklärt. Die Strukturen wurden in den verdünnten organischen Lösungsmitteln AcN bzw. TFE bestimmt, da Vpr in membranfreier, wässriger Umgebung schlecht löslich ist und Liposomen für die Flüssig-NMR-Spektroskopie ungeeignet sind. Beide Proteinstrukturen zeigen drei α -Helices, die entweder als Helixbündel (Morellet et al. 2003) oder U-förmig (Wecker et al. 2002) zueinander angeordnet sind. Die strukturelle Charakterisierung von HIV-2 Vpr beschränkt sich dagegen auf CD-Spektroskopiedaten die zeigen, dass HIV-2 Vpr α -helikale Sekundärstrukturelemente besitzt (Hänel et al. 2014). Des Weiteren wurde eine computerbasierte Modellierung der HIV-2 Struktur auf Basis der NMR-Struktur von HIV-1 Vpr in 30 % TFE/70 % H₂O durchgeführt (Khamsri et al

2006). Diese Struktur ist in Abbildung 1.3 dargestellt und zeigt eine U-förmige Anordnung der drei α -Helices, ähnlich wie bei der zur Modellierung genutzten Struktur von HIV-1 Vpr.

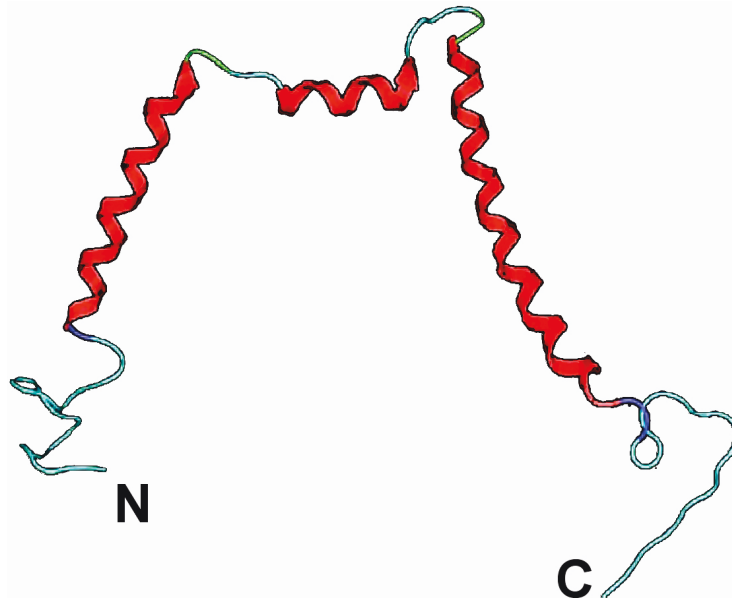


Abbildung 1.3: Computerbasiertes Modell der Struktur von HIV-2 Vpr. Zum Erstellen des Modells wurde von Khamsri et al. (2006) die Struktur von HIV-1 Vpr in 30% TFE/70 % H₂O genutzt. Rot: α -Helices; blau: 3₁₀-Helix; grün: Schleife; hellblau: unstrukturierte Bereiche. (Verändert nach Khamsri et al. 2006)

1.1.3. Das Protein 6 aus HIV-2

Das virionassoziierte HIV-2 Protein p6 besteht aus etwa 77 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von ca. 9 kDa auf (Swiss-Prot-Nr. P04590). Es wird in der Zelle als C-terminaler Teil des Gag-Polypeptids exprimiert (Abb. 1.4). Neben dem p6 codiert das *gag*-Gen für das Matrixprotein p17 und das Kapsidprotein p24 sowie für die Proteine p1, p2 und p7. Das zunächst exprimierte Gag-Polypeptid wird zu einem späteren Zeitpunkt des viralen Lebenszyklus durch die virale Protease in die einzelnen Proteine gespalten (de Oliveira et al. 2003). Die Funktionen von p2 und p1 sind weitgehend unbekannt, wohingegen das p7 an der Bildung des Nukleokapsids (NC) beteiligt ist (Coffin et al. 1997). Versuche mit HIV-1 p6 bzw. Gag haben gezeigt, dass p6 unter anderem für den Einbau von HIV-1 Vpr in Virionen verantwortlich ist (Kondo et al. 1995; Bachand et al. 1999). Es konnte anhand von HIV-1 p6 auch deutlich gemacht werden, dass dieses bei der Freisetzung (Budding) von neuen Virionen des HIV-1 eine entscheidende Rolle spielt. Durch die Interaktion von HIV-1 p6 mit ALIX, einem am programmierten Zelltod beteiligten Protein, kommt es zu einer Interaktion mit ESCRT-III (engl. Abk. für Endosomal Sorting Complex Required for Transport) und anschließend zur Freisetzung der Virionen (Strack et al. 2003). Das ESCRT-III ist

ein Komplex aus cytosolischen Proteinen der infizierten Zelle, welcher unter anderem am Abbau von Membranproteinen in Lysosomen beteiligt ist. Strukturell wurde HIV-2 p6 bisher nicht charakterisiert. Vom 52 Aminosäuren großen HIV-1 p6 wurde dagegen eine NMR-Struktur in 50 % TFE bestimmt. Diese Struktur besitzt zwei α -Helices bestehend aus 5 bzw. 11 Aminosäuren (Fossen et al. 2005). Die übrigen Aminosäuren des HIV-1 p6 liegen unstrukturiert vor.



Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Gag-Polypeptids von HIV-2.

1.1.4 Die Interaktion der HIV Proteine Vpr und p6

Die Interaktion von HIV-1 Vpr mit p6 dient dem Einbau des Vpr in Virionen (Kondo et al. 1995; Kondo et al. 1996; Bachand et al. 1999). Als vermeintliche Bindestelle des HIV-1 Vpr wurde ein LXXLFG-Motiv in p6 identifiziert, da es bei Abwesenheit dieses Motivs oder des kompletten p6 Proteins zu keiner Assoziation von Vpr mit dem Virion kam (Bachand et al. 1999). Als weitere mögliche Bindemotive des HIV-1 Vpr in p6 wurden die Aminosäuren F₁₅RFG₁₈ (Zhu et al. 2004) sowie die Aminosäurereste E₃₄LY₃₆ des HIV-1 p6 identifiziert (Salgado et al. 2009). Welches dieser Motive essentiell für die Interaktion ist oder ob mehrere dieser Motive benötigt werden, ist bisher nicht bekannt.

Für HIV-2 Vpr liegen dagegen keine Daten über die mögliche Bindestelle in p6 vor. Es kann lediglich vermutet werden, dass in HIV-2 ein DXAXLL-Motiv in p6 für die Interaktion der HIV-2 Proteine Vpr und p6 nötig ist. Dieses DXAXLL-Motiv wurde bei Interaktionsstudien zwischen Vpr und p6 aus dem nahe mit HIV-2 verwandten SIV_{mac} gefunden (Accola et al. 1999).

Obwohl die Interaktion zwischen Vpr und p6 mit verschiedenen HIV- und SIV-Stämmen mehrfach untersucht wurde (Accola et al. 1999; Bachand et al. 1999; Selig et al. 1999), konnte die exakte Bindestelle des p6 in Vpr noch nicht lokalisiert werden. Es wurde lediglich durch Mutation der Aminosäuren E25 und A30 in der ersten α -Helix von HIV-1 Vpr gezeigt, dass dieser Bereich für die Interaktion mit p6 von Bedeutung ist. So kam es bei Mutation dieser beiden Aminosäuren zu keiner Interaktion von Vpr mit p6 (Bachand et al. 1999). Dadurch war es zumindest möglich zu zeigen, dass die Region der ersten α -Helix von Vpr essentiell für die Interaktion zwischen HIV-1 Vpr und p6 ist. Eine genaue Lokalisation der Bindestelle von p6 in Vpr, wie sie mittels Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie möglich sein sollte, konnte durch diese Mutationsstudien nicht erreicht werden und wurde bisher weder für HIV-1 Vpr noch HIV-2 Vpr durchgeführt.

1.2. Modellmembranen

Neben den löslichen Proteinen gibt es die Membranproteine. So kodieren z.B. 20-30 % aller offenen Leserahmen für Membranproteine (Wallin & von Heijne, 1998). Diese Proteine benötigen zur funktionellen Faltung Lipiddoppelschichten, die aus amphiphilen Phospholipiden bestehen. Die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide sind dabei nach außen gerichtet, also dem wässrigen Milieu zugewandt, während die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Lipide das Innere der Membran bilden. Die Funktion von Lipidmembranen besteht unter anderem darin, die äußere Membran von Zellen zu bilden sowie Zellkompartimente innerhalb der Zelle voneinander abzugrenzen.

Membranproteine lassen sich in verschiedene Klassen einteilen. Transmembranproteine durchspannen die Membran vollständig mit einer oder mehreren α -Helices oder einem β -Fass. Eine Transmembranhelix besteht aus etwa 20 bis 30 überwiegend hydrophoben Aminosäuren, wie z.B. die Aminosäuren 4 bis 27 des HIV-1 Vpu (Strebel et al. 1989). Eine weitere Klasse stellen die peripheren Membranproteine dar. Diese können über elektrostatische oder Van-der-Waals Wechselwirkung locker mit der Membran assoziiert sein. Periphere Membranproteine können aber auch partiell in die Membran eingebettet sein und über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran interagieren. Diese Art der Interaktion tritt häufig bei amphipathischen α -Helices auf, die mit ihrer hydrophoben Seite in die Membran eingebettet sind und so mit den hydrophoben Fettsäureketten der Lipide interagieren. Als weitere Klasse von Membranproteinen gibt es Proteine, die kovalent mit einem Lipidanker verknüpft sind. Dieser Anker kann in die Membran eingebaut werden und so für die Interaktion des Proteins mit der Membran sorgen.

Zur Untersuchung von Membranproteinen müssen diese je nach Messmethode mit Modellmembranen oder membranimitierenden Komplexen in Lösung gehalten werden. Neben Detergenzmizellen, Liposomen und Bizellen bieten sich hierfür auch Nanodisks an. In den folgenden Kapiteln wird auf die in dieser Arbeit verwendete Modellmembran bzw. den membranimitierenden Komplex, Nanodisk bzw. Detergenzmizelle, weiter eingegangen. Diese bieten sich im Gegensatz zu Liposomen für die strukturelle Charakterisierung von Membranproteinen mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie an.

1.2.1. Detergenzmizellen

Mizellen sind membranimitierende Aggregate aus amphiphilen Detergenzmolekülen, welche wiederum aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer hydrophoben Kohlenwasserstoffkette bestehen können. Oberhalb ihrer kritischen Mizellenkonzentration (cmc) formen Detergenzien in wässriger Umgebung durch Interaktion der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten miteinander die

Mizelle (Abb. 1.5). Die hydrophilen Kopfgruppen sind dann der wässrigen Umgebung zugewandt und die Kohlenwasserstoffketten zeigen ins Innere der Mizelle. So sind Detergenzien in der Lage Membranproteine in Lösung zu halten, indem die hydrophoben Bereiche eines Proteins mit den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Detergenzmoleküle interagieren und einen wasserlöslichen Komplex bilden (Warschawski et al. 2011). Detergenzien werden in anionisch, kationisch, nichtionisch und zwitterionisch eingeteilt. Bezüglich ihrer Fähigkeit Proteine zu solubilisieren, werden Detergenzien auch in milde bzw. starke Detergenzien eingeteilt. In Gegenwart milder Detergenzien bleibt die native Struktur von Membranproteinen in der Regel erhalten. In diese Kategorie fallen viele nicht-ionische Detergenzien (Seddon et al. 2004). Demgegenüber haben starke Detergenzien die Tendenz, Proteine zu denaturieren. Demzufolge stellen starke Detergenzien (z.B. viele anionische Detergenzien) in der Regel keine geeignete Umgebung für die Untersuchung von Membranproteinen dar. Potentiell können alle Detergenzien einen Einfluss auf die Struktur von Proteinen haben und diese modifizieren, so dass die native Faltung des Proteins in Gegenwart von Detergenzien unter Umständen nicht erhalten bleibt (Bowie, 2001).

Wie bereits erwähnt besitzt jedes Detergenz eine kritische Mizellenkonzentration, welche detergenzspezifisch ist und die Detergenzkonzentration angibt, bei der es zur Ausbildung von Mizellen kommt (Warschawski et al. 2011). Eine weitere Kenngröße von Detergenzien ist die sogenannte Aggregationszahl. Diese gibt an, wie viele Detergenzmoleküle eine Mizelle bilden. Je nach zu untersuchendem Protein und angewendeter Messmethode stehen unterschiedliche Detergenzien zur Auswahl. Laut Warschawski et al. (2011) eignet sich zum Beispiel das zwitterionische DPC (N-Dodecylphosphocholin) zur Imitation eukaryontischer Membranen, wohingegen anionisches SDS (Natriumdodecylphosphat) zur Imitation bakterieller Membranen geeignet ist. Bei der Untersuchung von Membranproteinen mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie sollten Detergenzien mit geringem Molekulargewicht und kleiner Aggregationszahl verwendet werden. Diese Detergenzien bilden relativ kleine Mizellen bzw. Protein-Mizellen-Komplexe, die eine schnellere Rotationsdiffusion aufweisen als größere Komplexe (Warschawski et al. 2011), was sich positiv auf die Anwendbarkeit der Flüssig-NMR-Spektroskopie für die Untersuchung solcher Komplexe auswirkt (siehe Kap. 1.3.).

1.2.2. Nanodisks

Nanodisks sind selbstassemblierende, diskoidale Modellmembransysteme (Abb. 1.5) aus einer Phospholipiddoppelschicht und zwei Kopien des sogenannten Membrane Scaffold Proteins (MSP) (Bayburt et al. 2002). Bei dem ursprünglichen MSP handelt es sich um ein Derivat des Apolipoproteins A-I (Apo-A-I). Das humane Apolipoprotein A-I bildet mit Phospholipiden im Blut von

Wirbeltieren die High-Density-Lipoprotein (HDL) Partikel, welche überschüssiges Cholesterin zum Abbau in die Leber transportieren (Ohashi et al. 2005).

His-MSP1 ist ein rekombinantes Protein, welches die Aminosäuren 68 bis 267 des humanen Apolipoprotein A-I (Swiss-Prot-Nr. P02647) sowie einen N-terminalen His-Tag gefolgt von einer TEV-Schnittstelle enthält (Denisov et al. 2004). Das nach der TEV-Spaltung resultierende MSP1 enthält neben den 200 Aminosäuren des Apo-A-1 ein N-terminales Glycin der TEV-Schnittstelle. Es wurde berichtet, dass an der Bildung von Nanodisk aus MSP1 und Lipiden maximal die Aminosäuren 79 bis 267 des Apo-A-I beteiligt sind, während die N-terminalen Aminosäuren 68 bis 78 bzw. sogar die Aminosäuren 68 bis 89 keinen Kontakt zum Lipidbilayer der Nanodisk haben (Denisov et al. 2004). Die so assemblierten MSP1-Nanodisks besitzen einen Durchmesser von etwa 10 nm (Bayburt et al. 2002; Denisov et al. 2004). Für die Assemblierung der Nanodisks wird das MSP1 mit Lipid gemischt, welches durch Detergenzien in Lösung gehalten wird. Durch langsames Entfernen des Detergenz kommt es zur Selbstassemblierung der Nanodisks, indem sich die Lipide zu einer Lipiddoppelschicht zusammenlagern, die durch die zwei MSP1-Moleküle begrenzt wird. Die amphipathischen α -Helices der zwei Kopien des MSP1 binden dabei um die Lipiddoppelschicht und schirmen die hydrophoben Ketten der Fettsäuren von der wässrigen Umgebung ab.

Durch Einfügen und Entfernen von Aminosäuren wurden weitere modifizierte MSPs hergestellt. Beim MSP1D1 wurden die ersten 11 Aminosäuren nach dem N-terminalen Glycin des MSP1 entfernt, so dass dieses nur noch aus 189 Aminosäuren des Apo-A-1 besteht (Denisov et al. 2004). Das MSP1D1 bildet wie auch das MSP1 Nanodisk mit einem Durchmesser von etwa 10 nm (Denisov et al. 2004). Durch das Einfügen weiterer Aminosäuren in MSP1D1 können Nanodisks mit Durchmessern bis zu 17 nm hergestellt werden (Denisov et al. 2004; Grinkova et al. 2010). Das Entfernen von Aminosäuren aus MSP1D1 macht es dagegen möglich, Nanodisks mit hydrodynamischen Durchmessern von weniger als 7 nm zu assemblieren (Hagn et al. 2013). Das in dieser Arbeit verwendete 167 Aminosäuren große MSP1D1 Δ 5, bei dem die Aminosäuren 145 bis 166 bzw. nach der Aminosäurenummerierung von Hagn et al. (2013) die Aminosäuren 121 bis 142 des MSP1D1 entfernt wurden, bildet Nanodisks, die laut Größenausschlusschromatographie einen hydrodynamischen Durchmesser von 9,2 nm besitzen (Hagn et al. 2013).

Die Benutzung von Nanodisks zur Charakterisierung von Proteinen hat gegenüber anderen Modellmembransystemen wesentliche Vorteile. So bestehen Nanodisks aus einer Lipiddoppelschicht und denaturieren Proteine im Gegensatz zu einigen Detergenzien nicht. Sie stellen somit eine wesentlich physiologischere Umgebung als Detergenzmizellen dar und machen die native Faltung des Proteins wahrscheinlicher als es bei der Benutzung von Mizellen der Fall ist. Gegenüber Liposomen erlauben Nanodisks eine Zugänglichkeit des Zielproteins auf beiden Seiten

der Membran. Ausserdem weisen Nanodisks eine größere Monodispersität und Homogenität als Liposomen auf, da der Durchmesser strikt durch das MSP-Protein bestimmt wird. Des Weiteren besitzen sie eine größere Stabilität als Liposomen und erlauben Experimente bei höheren Temperaturen (Nath et al. 2007). Gerade für die strukturelle Charakterisierung von Membranproteinen mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie sind Nanodisks äußerst nützlich, da sie aufgrund ihres relativ geringen hydrodynamischen Radius die Charakterisierung des Proteins in Lipiddoppelschichten erlauben. Liposomen dagegen besitzen hydrodynamische Radien von 30 nm und mehr, was ihre Verwendung in der Flüssig-NMR-Spektroskopie limitiert.

Nichts desto trotz besitzen Nanodisks auch Nachteile. So kann mit ihnen nicht die Ionenkanalaktivität von Proteinen gemessen werden, da Nanodisks keinen abgeschlossenen Innenraum wie Liposomen bilden. Des Weiteren muss für die Assemblierung Detergenz zur Probe gegeben werden. Diese Detergenzien könnten zu einer irreversiblen Modifikation des Zielproteins führen, die auch durch den Einbau in die Lipiddoppelschicht und die Entfernung der Detergenzien unter Umständen nicht aufgehoben werden kann. Zusätzlich kann es zum Einbau von Detergenzien in die Membran der Nanodisks kommen, was wiederum einen negativen Einfluss auf die native Faltung des Zielproteins haben kann.

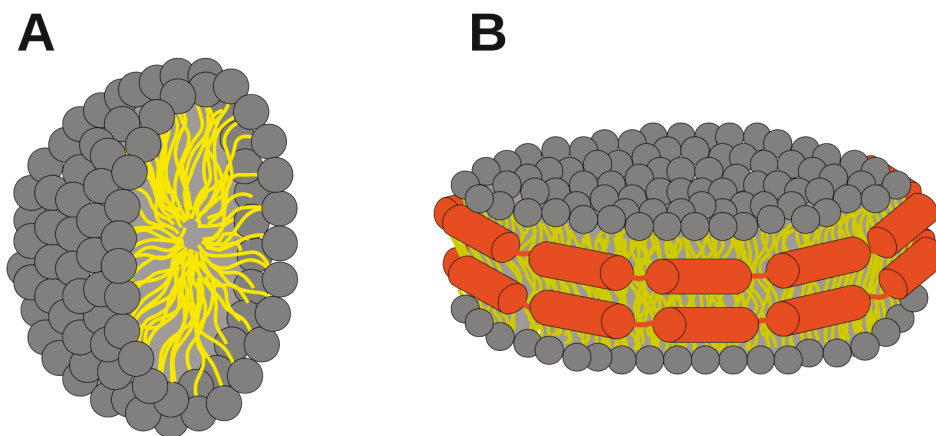


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Querschnitts einer Detergenzmizelle (A) und einer Nanodisk (B). Die hydrophilen Kopfgruppen sind in grau dargestellt. Detergenzien besitzen häufig nur eine Kohlenwasserstoffkette pro Molekül (hellgelb), wohingegen Lipide meist zwei Fettsäureketten pro Molekül aufweisen (dunkelgelb). Die Nanodisk ist aus einer Lipiddoppelschicht und zwei Kopien eines MSP (orange) aufgebaut. Die Darstellung entspricht nicht dem realen Größenverhältnis.

1.3. Kernresonanz-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie (engl. Abk. für nuclear magnetic resonance spectroscopy) ist eine physikalische Methode, die zur Analyse von Biomolekülen verwendet werden kann. Dafür werden

Atomkerne mit einem magnetischen Dipolmoment genutzt, deren Kernspinzustände in einem äußeren, statischen Magnetfeld energetisch aufspalten. Nachdem sich diese magnetischen Momente im Magnetfeld ausgerichtet haben, wird mit Hilfe eines Radiofrequenzpulses eine Störung dieser Ausrichtung erreicht. Gemessen wird bei der NMR-Spektroskopie die zeitliche Entwicklung der Spinsysteme bei der Rückkehr in ihren Gleichgewichtszustand. Auf diese Art und Weise wird das NMR-Signal in der Zeitdomäne als Überlagerung gedämpfter Sinusschwingungen beobachtet. Mit Hilfe einer Fourier-Transformation lässt sich das NMR-Signal aus der Zeitdomäne in die häufiger verwendete Frequenzdomäne übertragen.

Das physikalische Phänomen des Kernspins wurde 1922 von Otto Stern und Walther Gerlach entdeckt, als diese ein Ablenken von Silberatomen in einem inhomogenen Magnetfeld in zwei Richtungen beobachteten (Gerlach & Stern, 1922a/b). Diese Ausrichtung von Kernspins in einem Magnetfeld wird für NMR-Experimente ausgenutzt, so dass 1946 die ersten NMR-Experimente von Bloch et al. und Purcell et al. durchgeführt werden konnten. Im Laufe der Jahre kam es zu einer stetigen Verbesserung der NMR-Spektroskopie. So können heute unter anderem durch die Einführung mehrdimensionaler NMR-Experimente (Jeener, 1971) und der Fourier-Transformations-NMR-Spektroskopie (Aue et al. 1976) biologische Makromoleküle strukturell aufgeklärt werden.

Dennoch bleibt die Größe der zu untersuchenden Moleküle ein limitierender Faktor der Flüssig-NMR-Spektroskopie. Mit der Größe nimmt auch die temperaturabhängige globale Rotationskorrelationszeit eines Moleküls zu. Dies führt wiederum zu einer erhöhten transversalen Relaxationsrate, was zu einer Linienverbreiterung der detektierten Resonanzsignale und schließlich zu deren Verschwinden führt. Durch die Benutzung sogenannter TROSY-Pulsesequenzen (engl. Abk. für Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy) ist es aber inzwischen möglich, Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 100 kDa mit der Flüssig-NMR-Spektroskopie zu untersuchen (Peruvshin et al. 1997).

Neben der Aufklärung von Proteinstrukturen eignet sich die NMR-Spektroskopie auch zur Charakterisierung dynamischer Prozesse. So können auch intermediäre Proteinfaltungszustände (Neudecker et al. 2012) oder Protein-Protein-Interaktionen (Schuker et al. 1996) mit Hilfe der NMR-Spektroskopie auf atomarer Ebene untersucht werden.

1.3.1. NMR-Spektroskopie mit Proteinen in Modellmembranen

Für die Analyse von membraninteragierenden Proteinen mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie müssen diese in membranähnlicher Umgebung wie Detergenzmizellen oder Nanodisks untersucht werden. Aufgrund der Größe der Modellmembranen erweist sich die Analyse des Membranproteins

allerdings oft als wesentlich schwieriger, im Vergleich mit einem löslichen Protein mit ähnlicher Zahl von Aminosäuren. Die globale Rotationskorrelationszeit erhöht sich mit Zunahme der Komplexgröße, was wiederum zu einer Abnahme der Signalintensität führt. So besitzt beispielsweise der 6 kDa Nedd4WW3- α hENaC-Komplex eine globale Rotationskorrelationszeit von 3,9 ns bei 25 °C (Bobby et al. 2013), wohingegen eine 95 kDa MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks bei 45 °C eine globale Rotationskorrelationszeit von 34 ns besitzt (Hagn et al. 2013). Dieser Unterschied verdeutlicht die Schwierigkeiten, die strukturelle Untersuchungen von Membranproteinen mit sich bringen. Durch Benutzung kleiner membranimitierender Partikel, wie zum Beispiel Detergenzmizellen mit geringer Aggregationszahl oder Nanodisks mit kurzen MSPs, kann der starken Linienverbreiterung entgegengewirkt werden. Eine DPC-Mizelle besitzt bei einer Aggregationszahl von 54 DPC-Molekülen pro Mizelle ein Molekulargewicht von etwa 19 kDa. Bei Inkorporation eines 10 kDa Proteins ergibt sich ein Komplex von ~29 kDa, der noch immer mit konventionellen Flüssig-NMR-Experimenten untersucht werden kann. So konnte die Struktur der transmembranen und cytosolischen Domäne des humanen CD4 als sogenanntes CD4mut in DPC-Mizellen bestimmt werden (Wittlich et al. 2010). Noch schwieriger gestaltet sich die Arbeit mit Nanodisks, da diese ein Molekulargewicht von über 100 kDa aufweisen können. Es konnten bereits verschiedene Proteine in Nanodisks mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie untersucht werden (Glück et al. 2009; Raschle et al. 2009, Yu et al. 2012). Allerdings erwies es sich bisher als äußerst schwierig, die hochaufgelöste NMR-Struktur eines Proteins in Nanodisks zu ermitteln. Erst durch die Nutzung kleinerer Nanodisks wie MSP1D1 Δ 5-Nanodisks war es möglich, die erste Struktur eines Transmembranproteins (OmpX) in einer Lipiddoppelschicht mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie zu bestimmen (Hagn et al. 2013).

1.3.2. Die chemische Verschiebung

Details zur chemischen Verschiebung, sowie die Definitionen aller physikalischen Größen und Parameter finden sich in den Kapiteln 3.8.1. und 3.8.4.

In einem 1D-NMR-Spektrum besitzen die Resonanzsignale der NMR-aktiven Kernspins von Proteinen eine spezifische Frequenzdispersion.

In erster Näherung erwartet man für eine Isotopensorte (z.B. Protonen) in einem gegebenen Magnetfeld B_0 genau eine Resonanzfrequenz (Larmorfrequenz). In der Praxis beobachtet man jedoch im ^1H -Spektrum eines Proteins eine Frequenzdispersion, d.h. die ^1H -NMR-Signale verteilen sich über ein enges Frequenzband und können um einige parts per million (ppm) von der Larmorfrequenz einer wählbaren Standardsubstanz (z.B. DSS oder TMS) abweichen. Diese Abweichung beruht auf der lokalen Abschirmung der Kerne vom externen Magnetfeld B_0 , welche

durch die unterschiedliche elektronische Umgebung der einzelnen Kerne zu Stande kommt. Da diese Signalverschiebung auf der Abschirmung des beobachteten Kernspins durch Elektronen beruht, bezeichnet man sie als chemische Verschiebung. Dies bedeutet, dass alle ^1H -Kerne eines Proteins, die sich in einer ähnlichen chemischen Umgebung befinden, eine vergleichbare chemische Verschiebung aufweisen. Das eindimensionale (1D) Protonenspektrum eines gefalteten Proteins weist in der Regel eine Dispersion von -1 bis 12 ppm auf.

Signale von stark abgeschirmten Protonen findet man auf dieser Skala im Bereich von niedrigen ppm-Werten, während schwach abgeschirmte Protonen NMR-Signale bei höheren ppm-Werten zeigen. Historisch bedingt spricht man bei einer Verschiebung der Resonanzen in Richtung hoher ppm-Werte von tieffeldverschobenen und dementsprechend in Richtung niedriger ppm-Werte von hochfeldverschobenen Signalen.

In dem 1D-Spektrum eines gefalteten Proteins liegen die Resonanzsignale der aliphatischen Protonen zwischen -1 ppm und 4 ppm, die Resonanzsignale der H^α -Protonen zwischen 4 ppm und 6 ppm und die Signale der Seitenketten- H^N zwischen 5,5 ppm und 7,5 ppm. Dazu sind die Signale der aromatischen Protonen zwischen 6 ppm und 8 ppm, sowie die Proteinerückgrat- H^N zwischen 6 ppm und 10 ppm zu finden. Charakteristisch sind ebenfalls die chemischen Verschiebungen von Seitenketten- H^N von Tryptophanen, welche tieffeldverschoben von 10 ppm liegen. Da es in einem 1D-Spektrum eines Proteins zu zahlreichen Signalüberlagerungen kommt, können 2D- und 3D-NMR-Experimente genutzt werden, um die Signale in diesen Dimensionen getrennt voneinander darzustellen. Damit können zum Beispiel die Änderungen der chemischen Verschiebung einzelner Resonanzsignale mit Hilfe eines 2D-Experiments bei Interaktionsstudien analysiert werden. So wurde beispielsweise die Bindestelle von Indol-Ringen im humanen Protein GABARAP lokalisiert (Thielmann et al. 2008).

Bei einer Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Interaktion ändert sich die chemische Umgebung der interagierenden Aminosäuren. Dies führt zu einer Änderung der chemischen Verschiebung ihrer Resonanzsignale. Im Falle des schnellen Austausches (Details siehe Kap. 3.8.4.) kann eine mittels Titration mit einem Liganden hervorgerufene Änderung der chemischen Verschiebung von Proteinsignalen für die Ermittlung der Dissoziationskonstante der Protein-Ligand-Wechselwirkung genutzt werden. Darüber hinaus lässt sich aus solchen Experimenten die Bindestelle im detektierten Protein lokalisieren.

1.3.3. Die paramagnetische Relaxationsverstärkung

Die Verstärkung der Kernspinrelaxation eines Kerns durch ein benachbartes paramagnetisches Zentrum (PRE, engl. Abk. für paramagnetic relaxation enhancement) eignet sich zur Untersuchung

von Protein-Protein-Interaktionen, zur Bestimmung von Proteinstrukturen, sowie zum Lokalisieren von pufferzugänglichen Aminosäureresten eines mizelleninteragierenden Proteins. Durch Nutzung paramagnetischer Substanzen lässt sich eine distanzabhängige Verstärkung der Relaxation von Kernspins beobachten. Dies führt zur Verringerung der NMR-Signalintensität bis hin zum kompletten Verschwinden der Resonanzsignale von Aminosäuren, die sich in räumlicher Nähe zum paramagnetischen Zentrum befinden. Details zur Theorie der PRE-NMR-Spektroskopie sind in Kapitel 3.8.3. und 3.8.7.5.2. aufgeführt.

Durch kovalente Kopplung einer paramagnetischen Sonde an ein nicht isotopenmarkiertes Protein kann die Interaktion dieses mit einem ^{15}N -markierten Partner untersucht werden. Dies wurde beispielsweise bei der Charakterisierung der Interaktion des humanen CD4mut mit VpUcyt₍₃₉₋₈₁₎ aus HIV-1 genutzt (Singh et al. 2012). Pufferexponierte Aminosäuren von mizellenassoziierten Proteinen können dagegen durch Titration von paramagnetischem Mn^{2+} in die Proteinklösung identifiziert werden. So konnte gezeigt werden, dass die beiden α -Helices des HIV-1 VpUcyt₍₃₉₋₈₁₎ von der wässrigen Lösung abgeschirmt vorliegen (Wittlich et al. 2009).

Den größten Nutzen hat die PRE-NMR-Spektroskopie aber in der Berechnung von NMR-Strukturen. Für die konventionelle Berechnung einer NMR-Struktur auf Basis des Kern Overhauser Effekts (NOE; siehe Kapitel 3.8.) müssen alle Kerne eines Proteins ihrem jeweiligen Resonanzsignal zugeordnet werden. Anschließend müssen NOESY-Experimente zur Bestimmung von Abständen zwischen einzelnen Aminosäuren aufgenommen werden. Vor allem die NOESY-Experimente stoßen bei großen Proteinen bzw. Komplexen schnell an ihre Grenzen, so dass diese nicht immer für eine Strukturberechnung großer Moleküle geeignet sind. Für die Bestimmung einer Proteinstruktur mit Hilfe PRE-basierter Abstände reicht dagegen eine Proteintrückgratzuordnung aus, sowie die Aufnahme von sensitiven 2D-NMR-Experimenten zur Bestimmung von Abständen zwischen einer hinreichenden Zahl von strategisch im zu untersuchenden Protein platzierten, einzelnen PRE-Sonden und den davon beeinflussten Kernen der übrigen Aminosäuren. Klammt et al. (2012) konnten die Proteintrückgratstrukturen von sechs humanen Transmembranproteinen auf diese Art und Weise berechnen. Für die Berechnung dieser Strukturen wurden zwischen 342 und 801 Distanzen verwendet, die mit Hilfe von PREs ermittelt wurden. Gleichzeitig bestimmten Klammt et al. (2012) von einem dieser humanen Transmembranproteine eine NOE-basierte Struktur. Diese Struktur besaß im Vergleich zur PRE-basierten Struktur ein kompakteres Helixbündel. Die Orientierung und Topologie der Helices war in der PRE- und NOE-Struktur dagegen sehr ähnlich. Der Grund für die geringere Kompaktheit der PRE-Struktur liegt darin, dass mit Hilfe von PREs keine kurzen Distanzen von weniger als 12 Å ermittelt werden können (Klammt et al. 2012).

Neben der Berechnung von Proteinstrukturen mittlerer Auflösung lässt sich mit der PRE-Methode auch die globale Faltung bestimmen. So haben Battiste und Wagner (2000) die globale Faltung

des 25 kDa eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors 4E unter anderem mit PRE- und NOE-basierten Abständen berechnet. Gaponenko et al. (2000) konnten die globale Faltung der 17,5 kDa Barnase_H102A-Mutante nur mit Hilfe von PRE-basierten Abständen und Informationen zur Sekundärstruktur bestimmen. Anhand der hier aufgeführten Beispiele wird deutlich, dass PREs besonders für die schnelle Berechnung von Strukturen mit niedriger bis mittlerer Auflösung von größeren Proteinen/Komplexen mit mehr als 15 kDa geeignet sind.

1.4. Ziel dieser Arbeit

Das virionassoziierte virale Protein R aus HIV-2 ist ein akzessorisches und multifunktionelles Protein. Versuche mit Vpr aus unterschiedlichen HIV- und SIV-Stämmen haben gezeigt, dass dieses zu verschiedenen Zeitpunkten des viralen Lebenszyklus Funktionen erfüllt, welche unter anderem die virale Infektiosität erhöhen. So ist das Protein am Komplex der Reversen Transkriptase zu Beginn der Infektion neuer Zellen genauso beteiligt, wie an der Freisetzung neu assemblierter Virionen. Ausserdem besitzen Vpr-Proteine eine Ionenkanalaktivität, die allerdings kaum charakterisiert ist. Auch die strukturelle Charakterisierung von Vpr-Proteinen beschränkt sich auf wenige Studien. Bei diesen wurden hauptsächlich einzelne Fragmente von HIV-1 Vpr in wässriger Lösung oder HIV-1 Vpr voller Länge in organischen Lösungsmitteln wie AcN oder TFE untersucht (Wecker et al. 1999; Engler et al. 2001; Engler et al. 2002, Wecker et al. 2002; Morellet et al. 2003).

Das Ziel dieser Arbeit war es, HIV-2 Vpr strukturell in einer physiologischen Membrenumgebung mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie zu charakterisieren. Nach Expression und Reinigung von rekombinantem Vpr sollten die Kerne des Proteinrückgrats den jeweiligen Resonanzsignalen zugeordnet werden. Die so erhaltenen chemischen Verschiebungen sollten dann genutzt werden, um die Sekundärstruktur von HIV-2 Vpr zu bestimmen. Die globale Faltung von Vpr in DPC-Mizellen sollte mit Hilfe von PRE-basierten Abständen berechnet werden. Unter dieser globalen Faltung bzw. Struktur kann man in erster Linie die Orientierung der Sekundärstrukturelemente zueinander verstehen. Für die Berechnung sollte die paramagnetische Sonde Methanthiosulfonat (MTSL) an C81 des wildtypischen Vpr und an C39 der Einzel-Cystein-Variante Vpr_C81S_F39C gebunden werden.

Mit Hilfe von Relaxationsexperimenten sollten flexible und rigide Bereiche von Vpr identifiziert werden. Ausserdem sollte mit diesen Experimenten untersucht werden, ob das Vpr als Monomer vorliegt und ob ein Vpr-Molekül an eine oder mehrere DPC-Mizellen bindet.

Durch Titration von Mn^{2+} und DPC zu Vpr sollte die Topologie von Vpr in der DPC-Mizelle untersucht werden. Unter Verwendung von Nanodisks, sollte Vpr in Lipiddoppelschichten mittels

NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Dadurch sollten eventuelle strukturelle Unterschiede des Vpr in Lipidmembranen und Detergenzmizellen aufgeklärt werden.

Da in HIV und SIV die Interaktion von Vpr mit p6 zum Einbau des Vpr in das Virion führt, wurde diese Interaktion hier charakterisiert. Dafür wurde unmarkiertes HIV-2 p6 zu ^{15}N -markiertem HIV-2 Vpr titriert und 2D-NMR-Experimente des Vpr aufgenommen. Durch diese Experimente sollte die Bindestelle des p6 in Vpr identifiziert werden und die Dissoziationskonstante der Vpr-p6-Interaktion ermittelt werden.

2. Material

2.1. Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine

Aminosäuresequenz des HIV-2 Vpr (Swiss-Prot-Nr. P06938; HIV-2 Subtyp A, Isolat ROD):

A₂EAPTELPPV D₁₂GTPLREPGD E₂₂WIEILREI K₃₂EEALKHFDP R₄₂LLIALGKYI Y₅₂TRHGDLEG
A₆₂RELIKVLQR A₇₂LFTHFRAGC G₈₂HSRIGQTRG G₉₂NPLSAIPTP R₁₀₂NMA₁₀₅

Das verwendete Protein bestand aus 104 Aminosäuren. Für eine effiziente Intein-Spaltung wurde das N-terminale M1 entfernt und das C-terminale Q105 in ein A105 mutiert.

Aminosäuresequenz von HIV-2 Vpr_**C81S**_F**39C**:

A₂EAPTELPPV D₁₂GTPLREPGD E₂₂WIEILREI K₃₂EEALKH**C**DP R₄₂LLIALGKYI Y₅₂TRHGDLEG
A₆₂RELIKVLQR A₇₂LFTHFRAG**S** G₈₂HSRIGQTRG G₉₂NPLSAIPTP R₁₀₂NMA₁₀₅

Einzel-Cystein-Variante von HIV-2 Vpr mit einem **S81** anstelle des C81 und einem **C39** anstelle des F39.

Aminosäuresequenz von HIV-2 p6 (Swiss-Prot-Nr. P04590; HIV-2 Subtype A, Isolate ROD):

SP₁VAQVPQGLT P₁₁TAPPVDPVAV D₂₁LLEKYMQQG K₃₁RQREQRERP Y₄₁KEVTEDLLH
L₅₁EQGETPYRE P₆₁PTEDLLHLN S₇₁LFGKDQ₇₇

Das verwendete Protein bestand aus 78 Aminosäuren, wobei das N-terminale **Serin** nicht zur originalen Sequenz des p6 gehört. Dieses blieb nach dem Verdau mit der TEV-Protease als Teil der TEV-Schnittstelle am p6 zurück.

2.2. Verwendete Biochemikalien, Chemikalien und Kits

In Tabelle 2.1 nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm) oder Roth (Karlsruhe) in p.a. oder vergleichbarer Qualität bezogen.

Tabelle 2.1: Verwendete Biochemikalien, Chemikalien und Kits.

Material	Bezugsquelle
Acrylamid 4K Lösung (30%) (Mix29:1)	AppliChem, Darmstadt
Dodecyl-Phosphocholin (DPC)	Anatrace, High Wycombe, UK
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycerol-3-Phosphocholin (DMPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -Glycerol-3-Phosphocholine (POPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
¹⁵ N-Ammoniumchlorid	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
¹³ C-Glukose	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
AcN-d ₃	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-Δ ³ -pyrroline-3-methyl) methanethiosulfonate (MTSL)	Toronto Research Chemical, Toronto, Kanada
D ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Aminolävulinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,2-Dimethyl-2-silapentanon-5-sulfonsäure (DSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena, Jena
Midi Nucleobond AX 100 Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
BioBeads SM-2	Bio-Rad, München

2.3. Verwendete Bakterienstämme

Kompetente Bakterienstämme wurden in 300 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2.2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i> ⁻), <i>gal</i> , λ(DE3)	Novagen, Darmstadt
<i>E. coli</i> SE1	<i>E. coli</i> B strain, F ⁻ , Cmr, <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdB</i> (restriction- modification-), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE13) (<i>lacI</i> , <i>t7</i> polymerase unter Kontrolle des PlacUV5promoter), <i>ccdB</i> ⁺	Delphie Genetics, Charleroi, Belgien
<i>E. coli</i> Omnimax	<i>E. coli</i> F ⁻ { <i>proAB</i> + <i>lacIqlacZ</i> ΔM15 Tn10(TetR) Δ(<i>ccdAB</i>)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>tonA</i> <i>panD</i>	Invitrogen, Darmstadt
<i>E. coli</i> BL21 Codon Plus (DE3) RIL	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i> ⁻), <i>gal</i> , λ(DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i> , [<i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i> , <i>Cam_r</i>]	Stratagene Europa, Amsterdam, Niederlande

2.4. Verwendete Plasmide

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide

Plasmidname	Resistenz	Art des Plasmids	Quelle
pET28a	Kanamycin	Expressionsvektor	Novagen, Darmstadt
HIV-2_p6	Ampicillin	Plasmid mit synthetischem HIV-2 p6 Gen	Geneart, Darmstadt (im Auftrag des ICS-6)
pET28a_HIV-2_His-p6	Kanamycin	Expressionsvektor für HIV-2 His-p6	Diese Arbeit
pSCodon1.2-MBP-Vpr-CytB5	Ampicillin	Expressionsvektor des HIV-2 Vpr-Fusionsproteins	AG Loidl-Stahlhofen, Hochschule Gelsenkirchen
pSCodon1.2-MBP-Vpr_C81S_F39C-CytB5	Ampicillin	Expressionsvektor des HIV-2 Vpr_C81S_F39C-Fusionsproteins	ICS-6, AG Willbold
pET28a_MSP1	Kanamycin	Expressionsvektor des His-MSP1	ICS-6, AG Willbold
pET28a_MSP1D1	Kanamycin	Expressionsvektor des His-MSP1D1	AG Sligar, University of Illinois, USA [#]
pET28a_MSP1D1Δ5	Kanamycin	Expressionsvektor des His-MSP1D1Δ5	AG Wagner, Harvard Medical School, USA
pRK792_TEV_S219P	Ampicillin	Expressionsvektor der His-TEV-Protease (Tobacco etch virus protease S219V)	AG Waugh, Center for Cancer Research, Bethesda, USA [#]

[#] bezogen von Addgene, Cambridge, USA

2.5. Verwendete Enzyme

Tabelle 2.4: Verwendete Enzyme

Enzym/Peptid	Bezugsquelle
BamH1, Nhe1	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas St. Leon-Rot
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNAse A	AppliChem, Darmstadt

2.6. Verwendete Größenstandards

Zur Größenabschätzung von Proteinen auf SDS-Gelen bzw. DNA-Fragmenten auf Agarosegelen, wurden die Standards Unstained Molecular Weight Marker 26610 (Thermo Scientific, Schwerte) und GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Schwerte) verwendet.

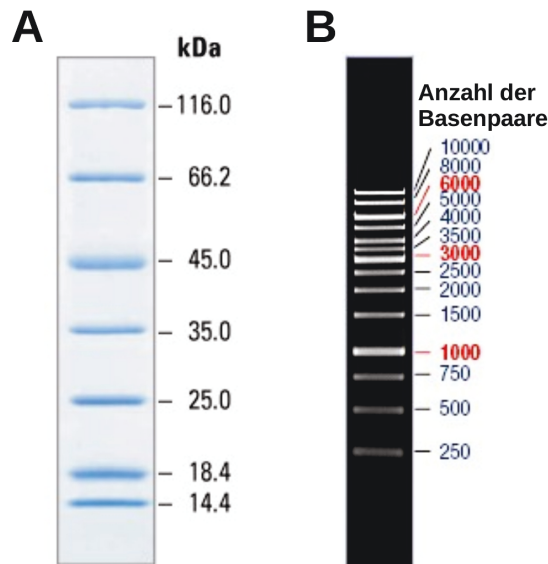


Abbildung 2.1: Verwendete Größenstandards. A) Unstained Molecular Weight Marker für SDS-PAGES mit Molekulargewichtsangaben der Standardproteine in kDa. B) GeneRuler 1kb DNA Ladder für DNA-Agarosegele mit Angabe der Basenpaare pro DNA-Fragment.

2.7. Chromatographien

Tabelle 2.5: Materialien für Gravitationsfluss betriebene Chromatographiesäulen

Material	Bezugsquelle
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
SP-Sepharose	GE Healthcare, Freiburg
Q-Sepharose	GE Healthcare, Freiburg

Tabelle 2.6: Mittels ÄKTAPurifier Chromatographiesystem betriebene Säulen

Säule	Bezugsquelle
Superdex 200 10/30 GL	GE Healthcare, Freiburg
HiLoad Superdex 75 XK 16/600 pg	GE Healthcare, Freiburg
HiLoad Superdex 200 XK 16/600 pg	GE Healthcare, Freiburg
HiLoad Superdex 200 XK 26/600 pg	GE Healthcare, Freiburg

2.8. Datenbanken und Programme

Tabelle 2.7: Verwendete Datenbanken und Programme

Datenbank/Programm	Verwendungszweck
ExPASy-ProtParam (http://web.expasy.org)	Analyse von Proteinsequenzen
ExPASy-Translate Tool (http://web.expasy.org)	Translation von DNA- Sequenzen in Aminosäuresequenzen
ClustalW-Alignment Tool (http://ebi.ac.uk)	Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen
PyMOL Wiki (http://pymolwiki.org)	Beschreibungen und Skripte zum Analysieren von Proteinstrukturen mittels PyMOL
nmrPipe (Delaglio et al. 1995)	Prozessieren von NMR-Daten
CcpnNmr Analysis Software (Vranken et al. 2005), nmrView (Johnson & Blevins, 1994), nmrDraw	Visualisierung und Analyse von NMR-Daten
Tensor2 (Dosset et al. 2000)	Analyse von NMR-Relaxationsdaten
Cyana (Version 2.1; Güntert et al. 1997; Herrmann et al. 2002; Güntert, 2004)	Berechnung von NMR-Strukturen
TALOS-N (Shen & Bax, 2013)	Vorhersage von Torsionswinkeln
PyMOL	Visualisierung und Analyse von Proteinstrukturen
PROCHECK-NMR (Laskowski et al. 1996)	Validierung von NMR-Strukturen
Xmgrace	Darstellung und Fitten experimenteller Daten
Quantity One Version 5.01	Visualisierung und Dokumentation von Agarose- und SDS-Gelen
DichroWeb Webserver (Whitmore & Wallace, 2004) (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk)	Quantitative Analyse von CD-Spektroskopiedaten
Uniprot-Datenbank (http://uniprot.org)	Informationen zu Proteinsequenzen und -funktionen
PDB-Datenbank (http://rcsb.org)	Datenbank mit Strukturen biologischer Makromoleküle
BMRB-Datenbank (http://bmrb.wisc.edu)	Datenbank mit NMR-Daten von Biomolekülen (Resonanzzuordnungen, Validierungs-Software)

2.9. Sonstige Materialien und Geräte

Alle weiteren nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen VWR International (Darmstadt), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf), Sartorius-Stedim (Göttingen), Roth (Karlsruhe) oder Braun (Bad-Arolsen) bezogen.

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.8 aufgeführt. Die genutzten NMR-Spektrometer sowie Probenköpfe sind in Kapitel 3.8.7.1. spezifiziert.

Tabelle 2.8: Verwendete Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Avanti J-20XP (Zentrifuge)	Beckman-Coulter, Palo Alto, USA
Branson Sonifier 250 (Ultraschallstab)	Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA
ÄKTAPurifier (Chromatographiesystem)	GE Healthcare, Freiburg
GelDoc 2000	BioRad, München
Lambda 25 UV-/Vis-Spektrophotometer	Perkin Elmer, Skelton, USA
Jasco J810 Spektropolarimeter	Jasco, Groß-Umstadt

3. Methoden

3.1. Arbeiten mit DNA

3.1.1. Isolierung von DNA aus *E. coli*

Kleine Mengen Plasmid-DNA (5 µg) wurden aus 5 ml *E. coli* Omnimax Kulturen mit Hilfe des innuPREP Plasmid Mini Kits, basierend auf der alkalischen Lyse nach Ish-Horowitz & Burke (1981), isoliert.

Unter Verwendung des Midi Nucleobond AX 100 Kits wurden große Mengen Plasmid-DNA (50 µg) aus 50 ml *E. coli* Omnimax Kulturen isoliert. Es wurde immer nach dem Protokoll der Hersteller vorgegangen.

3.1.2. Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentrationen von DNA wurden photometrisch nach Sambrook et al. (1989) bestimmt. Dafür wird die Absorption von DNA in Lösung bei 260 nm (A_{260}) gemessen. Eine optische Dichte von eins bei dieser Wellenlänge und einer optischen Weglänge von 1 cm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Für die Aufnahme von Absorptionsspektren wurde ein Lambda 25 UV-/Vis-Spektrophotometer verwendet.

3.1.3. DNA-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle kontinuierlich nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Methode dient vor allem zur Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten. Zur Größenabschätzung des DNA-Fragments wird ein Standard mit DNA-Fragmenten bekannter Größe mit auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese nach Dechwer et al. (1999) beruht auf der Wanderung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen ist bei dieser Methode abhängig von der Form und Größe der Moleküle, ihrer Ladung, dem pH-Wert sowie der Temperatur, der Agarosegel-Konzentration und der elektrischen Feldstärke. Kleinere Moleküle wandern demnach schneller durch das elektrische Feld als größere DNA-Moleküle.

Durchgeführt wurde die DNA-Gelelektrophorese mit einem 1 %-igen Agarose-Gel (Agarose MP, AppliChem, Darmstadt) in TAE-Puffer (Tab. 3.1), mit Hilfe von Horizontalelektrophorese-Geräten (GE Healthcare, Freiburg) bei einer konstanten Spannung von 80 V. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurde in diese 5-fach DNA-Auftragspuffer gegeben, ausserdem wurde ein

DNA-Standard mit auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die Dokumentation des Gels bei UV-Durchlicht mit Hilfe einer GelDoc 2000 und der Software „Quantity One“ durchgeführt.

Tabelle 3.1: Puffer der DNA-Gelelektrophorese

Agarosegellösung	1-fach TAE-Puffer	5-fach DNA-Auftragspuffer
1 % (w/v) Agarose	40 mM Tris-Acetat	50 mM EDTA
1-fach TAE-Puffer	1 mM EDTA	50% (w/v) Glycin
1 µg/ml Ethidiumbromid	pH 8	wahlweise: 0,15% (w/v) Bromphenolblau

3.1.4. Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme

Zur Linearisierung von Plasmiden und zum Spalten von DNA-Fragmenten aus Plasmiden wurden Restriktionsenzyme verwendet. Diese Restriktionsenzyme wurden käuflich erworben und nach Angaben des Herstellers mit dem entsprechenden Reaktionspuffer verwendet.

Bei dem Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme erkennen diese spezifische Sequenzen und spalten immer an einer spezifischen Stelle dieser Sequenz durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Anschließend können die Proben für eine DNA-Gelelektrophorese vorbereitet und mittels dieser aufgetrennt werden.

3.1.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach erfolgter Auftrennung von DNA-Fragmente mittels DNA-Gelelektrophorese, wurden diese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Extraktion des DNA-Fragments aus dem Gelstück nach Anleitung des Herstellers mit dem NucleoSpin Extract II Kits. Dazu wird das Gelstück in einem chaotropen Reagenz bei 50 °C aufgelöst. Anschließend wird diese Lösung zentrifugiert, wobei eine kleine Säule mit Filter verwendet wird, an welchen die DNA bindet. Nach Waschen des Filters mit 70 % Ethanol wird die DNA aus diesem mit H₂O oder Puffer eluiert.

3.1.6. Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation eines geschnittenen Plasmids zu verhindern, wird dieser dephosphoryliert. Dabei werden die 5'-Phosphatgruppen an den Vektorenden des geschnittenen Plasmids durch die

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) entfernt. Dafür wird das aus dem DNA-Agarosegel extrahierte Plasmid mit 1 U SAP pro 1 µg DNA sowie 10-fach SAP Puffer versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Dephosphorylierung wird der Ansatz für 5 min bei 75 °C inkubiert, um die SAP zu deaktivieren. Das dephosphorylierte Plasmid kann anschließend für die Ligation mit einem gewünschten DNA-Fragment verwendet werden.

3.1.7. Ligation von DNA

Zur Insertion eines DNA-Fragments in ein linearisiertes Plasmid wurde die T4 DNA Ligase verwendet. Diese erkennt komplementäre DNA-Sequenzen in DNA-Fragment und Plasmid und verbindet jeweils das 3'-Ende mit dem 5'-Ende der beiden DNA-Moleküle durch die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung.

3.1.8. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Proben wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt, nachdem diese den Anforderungen der Firma entsprechend vorbereitet wurden. Die Analyse der DNA-Sequenzen erfolgte anschließend mit Hilfe des Programms ClustalW2 (<http://ebi.ac.uk>).

3.1.9. Klonierung des Plasmids pET28a_HIV-2_His-p6

Zur Klonierung des pET28a_HIV-2_His-p6 Expressionsplasmids wurde das synthetische *p6*-Gen zunächst aus dem Lieferplasmid geschnitten. Dafür wurde der HIV-2_p6-Plasmid, sowie der pET28a-Vektor durch die Restriktionsenzyme Nhe1 und BamH1 verdaut. Es wurden je 6 µg pET28a- und HIV-2_p6-Plasmid mit 1 U Nhe1 und BamH1 pro 1 µg DNA versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Spaltansätze wurden anschließend für eine DNA-Gelelektrophorese vorbereitet und mit Hilfe dieser aufgetrennt. Daraufhin erfolgte die Extraktion des p6-inserts und des linearisierten pET28a-Plasmids aus dem Gel (Kap. 3.1.5). Zur Verhinderung einer Religation des Plasmids pET28a, wurde dieser mit der SAP dephosphoryliert. Nach Beendigung der Dephosphorylierung und Inaktivierung der SAP wurden 220 ng p6-Insert, mit 40 ng pET28a-Plasmid, 1 U T4 DNA Ligase, sowie Ligasepuffer versetzt und dann für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* Omnimax Zellen (Kap. 3.3.1) mit dem Ligationsansatz. Die Zellen wurden auf kanamycinenthaltenden LB-Agarplatten ausplattiert und 16 bis 20 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 5 ml und 50 ml kanamycinenthaltendes LB-Medium mit jeweils einer Kolonie von der LB-Platte angeimpft und für

weitere 20 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde das p6-Plasmid isoliert (Kap. 3.1.1.) und für die DNA-Sequenzierung vorbereitet (Kap. 3.1.8). Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit dem pET28a_HIV-2_His-p6 Expressionsplasmid transformiert und konnten für die rekombinante Expression des His-p6 in *E. coli* verwendet werden.

3.2. SDS-PAGE nach Laemmli

Mittels der diskontinuierlichen Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) wurden Proteine analytisch aufgetrennt. Zunächst wird der Probe zur Vorbereitung SDS als 4-fach Probenpuffer (Tab. 3.2) hinzugefügt und diese dann auf 95 °C erhitzt. Dadurch kommt es zur Denaturierung der Proteine und einem Überdecken der Proteineigenladung durch anionische SDS-Moleküle. Des Weiteren werden durch das β -Mercaptoethanol (β -ME) des Probenpuffers intra- und intermolekulare Disulfidbrücken gelöst. Somit ist die Ladung proportional zur Masse der Proteine und es kommt in einem elektrischen Feld zu einer Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht.

Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenngel, welches wiederum von einem Sammelgel überschichtet ist. Die Gelelektrophorese wurde in vertikalen Plattenelektrophoresekammern (Mighty Small II, GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Die SDS-Gele hatten die Maße 10 cm x 15 cm, bei einer Dicke von 0,75 mm. Die Gelelektrophorese wurde mit einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel für etwa 40 min durchgeführt.

Nach dem Auftrag der Probe wird diese zunächst im Sammelgel konzentriert. Diese Konzentrierung wird erreicht, da sich im Gel Chlorid-Ionen (Leitionen) und im Elektrodengefäß Glycin-Moleküle (Folgeionen) befinden. Das Leition wandert dabei am schnellsten, wohingegen das Folgeion am langsamsten wandert. Dadurch bilden die Proteine zwischen Leit- und Folgeionen eine schmale, scharfe Zone mit hoher Proteinkonzentration und wandern Richtung Anode bis sie an die Grenzschicht des engporigen Trenngels gelangen. Durch den jetzt höheren Reibungswiderstand entsteht ein Stau, welcher die Zonenschärfe noch weiter erhöht. Das niedermolekulare Folgeion ist davon nicht betroffen, da der pH-Wert im Trenngel basisch (pH 8,8) ist und somit das Glycin eine negative Nettoladung erhält. Dies führt dazu, dass das Folgeion die Proteine überholt, woraufhin im Trenngel die eigentliche Trennung der Proteine stattfindet. Kleine Proteine laufen dabei schneller durch das Gel als größere Proteine.

Nach dem Auftrennen der Proteine wurden die SDS-Gele aus der Kammer entnommen und in Coomassie-Färbelösung gelegt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 60 °C wurden die Gele mittels Aufkochen in Wasser entfärbt. Die Dokumentation erfolgte anschließend mit einer GelDoc 2000

bei Normallicht. Zur besseren Analyse des Gels wurde ein Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen, welcher Proteine mit bekanntem Molekulargewicht enthielt.

Es wurden immer 15 %-ige Trenngele verwendet. Alle Puffer, Gele, sowie die Coomassie-Färbelösung sind in den Tabellen 3.2 und 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Puffer, Gele und Lösungen zur SDS-Gelelektrophorese

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 % (v/v) TEMED	0,04 % (v/v) TEMED
1-fach SDS-Laufpuffer	4-fach Probenpuffer
50 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl pH 6,8
385 mM Glyzerin	8 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) SDS	8 % (v/v) β -ME
pH 8,3	40 % (v/v) Glyzerin
	3 g/l Bromphenolblau

Tabelle 3.3: Coomassie-Färbelösung zum Anfärben von Proteinen auf SDS-Gelen

Coomassie-Färbelösung
25 % Isopropanol
10 % Essigsäure
0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R250
in H ₂ O

3.3. Bakterienkulturen

3.3.1. Transformation von *E. coli* mit DNA

Zur Transformation wurden bei -80 °C gelagerte kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, mit 100 ng des Zielplasmids versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min wurden die Zellen für weitere 5 min auf Eis inkubiert, bevor 600 µl antibiotikafreies LB-Medium (Tab. 3.4) zugegeben wurde. Nachdem die Zellen 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert wurden, wurden 20 µl und 200 µl der Bakteriensuspension auf je einer antibiotikumenthaltenden LB-Agarplatte ausgestrichen und für 16 bis 20 h bei 37 °C inkubiert.

3.3.2. Herstellung einer Glycerinkultur von *E. coli* Zellen

Von mit pSCodon1.2-MBP-Vpr_CytB5h-Fusionsprotein-Plasmid bzw. pSCodon1.2-MBP-Vpr_C81S_F39C-CytB5h-Fusionsprotein-Plasmid transformierten *E. coli* SE1 Zellen wurden jeweils Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 5 mL LB-Medium mit Ampicillin zu einer finalen Konzentration von 100 µg/ml versetzt und mit einer Kolonie von einer LB-Agarplatte mit frisch transformierten Zellen angeimpft. Nach 16 h bis 20 h Inkubation bei 37 °C wurde der Kultur eine finale Konzentration von 1 % Glukose und 25 % Glycerin zugesetzt. Diese Glycerinkultur wurde in je 200 µL Fraktionen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3.3. Rekombinante Expression der verwendeten Proteine in *E. coli*

Zur heterologen Expression der Zielproteine in *E. coli* Zellen, wurden zunächst die Plasmide in geeignete *E. coli* Stämme eingebracht (Kap. 3.3.1.).

3.3.3.1. Expression von HIV-2 Vpr

Die Expression des HIV-2 Vpr-Fusionsproteins und des HIV-2 Vpr_C81S_F39C-Fusionsproteins (Abb. 3.1) erfolgte nach dem Protokoll von Hänel et al. (2014) in *E. coli* SE1 Zellen. Zunächst wurden 500 ml eines 100 µg/ml Ampicillin enthaltenden LB-Mediums (Tab. 3.4) mit 30 µl Glycerinkultur von *E. coli* SE 1 Zellen angeimpft, die entweder mit dem pSCodon1.2-MBP-Vpr-CytB5 oder dem pSCodon1.2-MBP-Vpr_C81S_F39C-CytB5 Plasmid transformiert worden waren. Diese Kultur wurde für 16 bis 20 h bei 30 °C unter Schütteln in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikane inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen mittels Zentrifugation in einer Beckman-Coulter

Avanti J-20XP Zentrifuge bei 5000 x g und 11 °C für 25 min wurde das Zellpellet in 500 ml antibiotikafreiem M9 Minimal-Medium (Tab. 3.4) resuspendiert. Das M9 Minimal-Medium enthielt je nach Bedarf ^{15}N -Ammoniumchlorid oder ^{15}N -Ammoniumchlorid bzw. ^{13}C -Glukose als einzige Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle, sowie immer 0,5 mM 5-Aminolävulinsäure. Nach 60 min Inkubation der Kultur bei 20 °C unter Schütteln in einem 2 l Erlenmeyerkolben, welcher mit Schikanen versehen war, wurde die Expression des Vpr-Fusionsproteins durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-beta-D-Thiogalactosid (IPTG) induziert. Die Kultur wurde daraufhin 16 bis 20 h bei gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 5000 x g und 11 °C für 25 min geerntet. Nach einmaligem Waschen mit PBS-Puffer (Tab. 3.4) wurde das Zellpellet bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Dazu wurden Proben vor Zugabe des IPTG sowie kurz vor dem Ernten aus der Expressionskultur entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen.



Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des exprimierten Vpr-Fusionsproteins, bestehend aus N-/C-terminalen Hexa-Histidin-Tags (H), dem Maltosebindepotein (MBP), zwei Inteinensequenzen (Intein 1/2), Vpr bzw. Vpr_C81S_F39C und dem Cytochrom B5 (Cyt). Zu jedem Fragment ist das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben. Die Abbildung wurde nach Hänel et al. (2014) verändert.

3.3.3.2. Expression von HIV-2 His-p6

Zur Expression des HIV-2 His-p6 (Abb. 3.2) wurden 100 ml LB-Medium (Tab. 3.4) in einem mit Schikane versehenen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 50 µg/ml Kanamycin versetzt und mit einer Kolonie pET28a_HIV-2_p6 Plasmid enthaltenden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen angeimpft. Nach 16 bis 20 h Inkubation bei 37 °C unter Schütteln, wurden zwei 500 ml Volumina eines 50 µg/ml Kanamycin enthaltenden LB-Mediums mit der Vorkultur jeweils auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Diese Kulturen wurden bei 37 °C unter Schütteln in je einem 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikane inkubiert, bis eine OD₆₀₀ zwischen 1 und 1,5 erreicht war. Anschließend wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden 2 h bei gleichen Bedingungen weiter inkubiert und dann mittels Zentrifugation geerntet, einmalig mit PBS-Puffer (Tab. 3.5) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Analyse der Expression mittels SDS-PAGE wurden Proben vor IPTG-Zugabe und vor dem Ernten der Zellen aus der Expressionkultur entnommen.

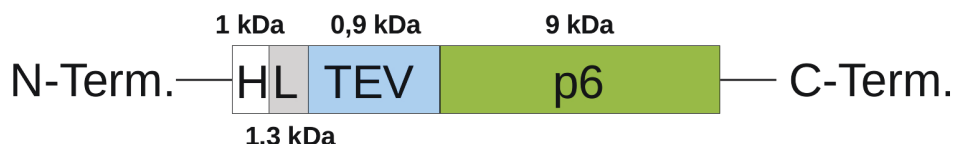


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des exprimierten His-p6, bestehend aus einem Hexa-Histidin-Tag (H), einer kurzen Linkersequenz (L), der TEV-Spaltstelle (TEV) und dem p6. Des Weiteren sind die Molekulargewichte der einzelnen Proteinbestandteile angegeben.

3.3.3.3. Expression der Varianten des MSP

Die Expression von His-MSP1, His-MSP1D1 und His-MSP1D1Δ5 erfolgte nach einem einheitlichen Protokoll. Dazu wurde je 50 ml LB-Medium (Tab. 3.4) mit 50 µg/ml Kanamycin versetzt und mit *E. coli* BL21 (DE3) Zellen angeimpft, welche zuvor mit dem benötigten Plasmid transformiert worden waren. Nach 16 bis 20 h Inkubation bei 37 °C in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane wurde je 1 l eines 50 µg/ml Kanamycin enthaltenden LB-Mediums mit der jeweiligen Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Diese Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C unter Schütteln in 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikane inkubiert. Daraufhin wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 4-5 h Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und nach einmaligem Waschen mit PBS-Puffer bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.3.4. Expression der His-TEV-Protease

Zur Expression der His-TEV-Protease wurden 50 ml 100 µg/ml Ampicillin enthaltendes LB-Medium (Tab. 3.4) mit einer Kolonie *E. coli* BL21 (DE3) RIL Zellen angeimpft, welche mit dem pRK792_TEV_S219P-Plasmid transformiert waren. Diese Vorkultur wurde für 16 bis 20 h bei 37 °C unter Schütteln in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane inkubiert. Mit Hilfe der Vorkultur wurde 1 l LB-Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin) auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C und 150 rpm in einem mit Schikane versehenen 2 l Erlenmeyerkolben inkubiert. Anschließend wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und diese bei 30 °C unter Schütteln für 4 h durchgeführt. Danach wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet, einmalig mit PBS-Puffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.4: Medien und Zusätze für die Expression von Proteinen in *E. coli*

LB-Medium	M9-Minimalmedium
10 g/l Trypton	9,1 g/l NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O
5 g/l Hefeextrakt	3 g/l KH ₂ PO ₄ 2H ₂ O
5 g/l NaCl	0,5 g/l NaCl
	0,5 g/l [¹⁵ N]H ₄ Cl
	100 µM CaCl ₂
	2 mM MgSO ₄
	10 µM Fe(III)-Cl
	4 g/l Glukose bzw. 2 g/l [¹³ C]-Glukose
	0,2 % (v/v) Spurenelemente (TS2)
	5 mg/l Thiaminhydrochlorid
	0,1 % (v/v) Vitamincocktail Stammlösung
Spurenelemente (TS2)	Vitamincocktail (Stammlösung)
30 mg/l MnCl ₂ 4H ₂ O	1 g/l Biotin
58,8 mg/l ZnSO ₄ H ₂ O	1 g/l Cholinchlorid
300 mg/l H ₃ BO ₃	1g/l Folsäure
200 mg/l CoCl ₂ 6H ₂ O	1 g/l Nicotinamid
20 mg/l NiCl ₂ 2H ₂ O	1 g/l Natrium- <i>D</i> -panthothenat
900 mg/l Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1 g/l Pyridoxalhydrochlorid
20 mg/l Na ₂ SeO ₃	0,1 g/l Riboflavin

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des 1-fach PBS-Puffers

PBS-Puffer
140 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na ₂ HPO ₄
1,8 mM KH ₂ PO ₄
pH 7,4

3.4. Reinigung von rekombinant exprimierten Proteinen

3.4.1. Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose

Die Reinigung eines Polyhistidin-Fusionsproteins wird in der Regel mit Ni^{2+} -NTA-Agarose durchgeführt. Diese Art der Chromatographie wird häufig auch IMAC (engl. Abk. für immobilized metal affinity chromatography, Porath et al, 1975) genannt. Dabei wechselwirkt der Polyhistidin-Tag mit einem mit Metallionen beladenen, chelatbildenden Liganden. Im Falle der Ni^{2+} -NTA-Agarose handelt es sich dabei um Nitrilotriessigsäure (NTA, engl. Abk. für nitrilotriacetic acid), wobei vier von sechs Ligandenbindestellen des Nickelions mit der NTA interagieren. Der Polyhistidin-Tag des Proteins geht mit den übrigen zwei Ligandenbindestellen des Nickelions eine starke spezifische Wechselwirkung ein. Vor der Elution des Polyhistidin-Fusionsproteins mittels Imidazol wird die Säule mit ansteigenden Konzentrationen von 10 mM bis 40 mM Imidazol in Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu entfernen.

3.4.2. Ionentauscherchromatographie

Bei der Ionentauscherchromatographie werden Proteine anhand ihrer Ladung aufgetrennt. Proteine haben abhängig von ihrem isoelektrischen Punkt unterschiedliche Ladung bei verschiedenen pH-Werten. Wählt man einen pH-Wert, bei dem das Protein eine positive Nettoladung besitzt, so kann es an eine negativ geladene Sulfopropyl SP-Sepharose (Kationentauscher) gebunden werden. Ist das Protein dagegen negativ geladen, so kann Q-Sepharose mit positiv geladenen quaternären Ammoniumgruppen (Anionentauscher) genutzt werden. Durch Zugabe von NaCl wird das Protein eluiert, da die positiv geladenen Na-Ionen, bzw. die negativ geladenen Cl-Ionen mit den geladenen Aminosäureresten des Proteins um die Bindestellen des Ionentauschers konkurrieren. Je höher die Nettoladung des Proteins, desto höher ist die NaCl-Konzentration, die zur Elution des Proteins nötig ist.

3.4.3. Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie (SEC, engl. Abk. für size exclusion chromatography) werden Proteine nach ihrem hydrodynamischen Radius aufgetrennt. Dazu wird eine Probe eines Proteingemisches auf eine Säule geladen, welche mit einem Material aus Partikeln quervernetzter Agarose (Sepharose), quervernetzten Dextran (z.B. Superdex) oder mit anderen porösen Materialien befüllt ist. Das Säulenmaterial enthält Poren unterschiedlicher Größe, in welche die Moleküle hinein diffundieren können. Das für die Diffusion eines gegebenen Proteins zur

Verfügung stehende Porenvolumen hängt von der Proteingröße ab. Proteine mit großem hydrodynamischen Radius eluieren dabei früher von der Säule, da diesen insgesamt ein kleineres Porenvolumen für die Diffusion zur Verfügung steht als kleineren Molekülen.

Die SEC-Säulen Superdex 200 10/30 GL und HiLoad Superdex 200 XK 16/600 pg wurden von einer Mitarbeiterin des ICS-6 (AG Willbold) mit einem Proteinstandard kalibriert, um mit Hilfe des Elutionsvolumens den hydrodynamischen Durchmesser und das Molekulargewicht des eluierenden Moleküls abschätzen zu können. Der Standard enthielt globuläre Proteine bekannter Größe und die Säulen wurden dafür mit ND-SEC-Puffer (Tab. 3.11) betrieben.

3.4.4. Die autokatalytische Inteinspaltung

Das Spleißen von Proteinen ist ein natürlich vorkommender biochemischer Prozess, welcher der posttranslationalen Modifikation von Intein-Vorläuferproteinen dient. Dabei wird das Vorläuferprotein durch den autokatalytischen Spleißvorgang in zwei oder mehr Einzelproteine gespalten, wobei es zum Rausspleißen des Inteins und zu einer Fusion der Exteine kommt. Dieses Rausspalten des Inteins und Fusionieren der Exteine wird durch die Eigenschaften des Inteins erreicht, welches als Katalysator der Reaktion dient und als einziges Kriterium eine korrekte Faltung aufweisen muss (Mootz, 2007).

Bei der allgemeinen Inteinspaltung besteht das Vorläuferprotein meist aus je einer externen N-Extein- und C-Extein-Domäne, welche eine interne Intein-Domäne N- bzw. C-terminal flankieren (Abb. 3.3). Nach Noren et al. (2000) besitzt das Intein am N-Terminus meist ein Cystein, Serin oder Alanin und am C-Terminus die Abfolge Histidin-Asparagin oder Histidin-Glutamin (Abb. 3.3). Im Inneren des Inteins kommt ein konserviertes Threonin-X-X-Histidin Motiv vor. Ausserdem besitzt das C-Extein als N-terminale Aminosäure meist ein Cystein, ein Serin oder ein Threonin.

Der Standard-Protein-Spleißprozess nach Noren et al. (2000) mit je einem Cystein pro Spleiß-Stelle startet mit einer nukleophilen Reaktion der N-terminalen Cystein-Seitenkette des Inteins auf das Carbonyl-C-Atom des N-Exteins. Dadurch kommt es zur Bildung eines linearen Thioesterintermediates. Eine zweite nukleophile Reaktion der N-terminalen Cystein-Seitenkette des C-Exteins mit dem C-Terminus des N-Exteins bildet ein verzweigtes Thioesterintermediate und ermöglicht eine Abspaltung des N-Exteins vom Intein. Daraufhin kommt es zur Zyklisierung des C-terminalen Asparagins/Glutamins des Inteins, was zur Spaltung der Peptidbindung zwischen Intein und C-Extein führt. Somit liegen nach dieser Reaktion zwei Zwischenprodukte vor, bei denen es sich um das freigesetzte Intein mit einem C-terminalen Aminosuccimidrest und die Thioester verknüpften Exteine handelt. Der letzte Schritt der Intein-Reaktion ist die Hydrolyse des C-terminalen Aminosuccimids des Inteins, sowie die Umlagerung der Thioesterbindung zwischen den

beiden Exteinen zu einer stabilen Amidbindung.

Für die Reinigung von rekombinant exprimierten Protein kann das Intein-Spleißen zum Freisetzen des Zielproteins aus einem Fusionsprotein genutzt werden. Dazu wird in der Regel ein Intein mit N- und/oder C-terminal modifizierten Proteinen fusioniert (Esipov et al. 2008; Wang et al. 2012). Durch die Wahl entsprechender Inteine, kann die autokatalytische Spaltung z.B. durch Zugabe von Thiolgruppen oder durch Erhöhung der Temperatur induziert werden.

Im Falle der Intein-Spaltung des Vpr-Fusionsproteins wurden die beiden Inteine so modifiziert, dass die N-terminale Spaltung zwischen Vpr und Intein1 durch Erhöhung der Temperatur und die C-terminale Spaltung zwischen Vpr und Intein2 durch Erhöhung der Temperatur bei gleichzeitiger Zugabe von Thiolen (DTT, β -ME) induziert wird. Des Weiteren lagen keine klassischen Exteine in dem Fusionsproteins vor, so dass lediglich das Vpr aus dem Fusionprotein rausgespleißt wurde. Durch die Spaltung entstanden neben dem HIV-2 Vpr noch die Fragmente His-MBP-Intein1 und Intein2-Cyt-His.

So kam es beim Spleißvorgang am N-Terminus des Vpr aufgrund der Eigenschaften des Intein1 und der Temperaturerhöhung zu einer Zyklisierung des Asparaginrests und Spaltung der Peptidbindung zwischen Intein1 und Vpr. Aufgrund der fehlenden Cysteine an den Aminosäurepositionen 1 des Vpr und Intein1 dauert dieser Vorgang bis zu 12 Tage. Die lange Spaltdauer resultiert aus der nicht-nativen Intein-Extein Umgebung, in der eine Inteinspaltung häufig weniger effizient ist (Perler et al. 1994; Telenti et al. 1997).

Die Spaltung zwischen Vpr und Intein2 wurde durch Zugabe von DTT und Erhöhung der Temperatur induziert. Das DTT ersetzte dabei das normalerweise notwendige Cystein des C-Exteins, so dass es trotz des am N-Terminus der Cyt-Domäne nicht vorhandenen Cysteins zu einer Spaltung der Peptidbindung zwischen Vpr und Intein2 kam. Am N-Terminus von Intein1 sowie am C-Terminus von Intein 2 kam es zu keiner Spaltung.

Um die beschriebenen Freisetzung des Vpr zu ermöglichen, wurde als N-Terminus des Intein1 ein Alanin sowie als C-Terminus die Aminosäurekombination Histidin-Asparagin gewählt (Abb. 3.3). Durch das gewählte Konstrukt wird das N-terminale Methionin des HIV-2 Vpr nicht exprimiert, sondern das Zielprotein beginnt mit dem natürlich vorkommenden Alanin2 der Vpr-Sequenz. Das C-terminale Glutamin des HIV-2 Vpr wurde zur Ermöglichung der Inteinspaltung durch ein Alanin ersetzt. Das Intein2 hatte am N-Terminus ein Cystein und am C-Terminus die Kombination Histidin-Alanin. Des Weiteren war die N-terminale Aminosäure des Cytochrom B5 ein Alanin.

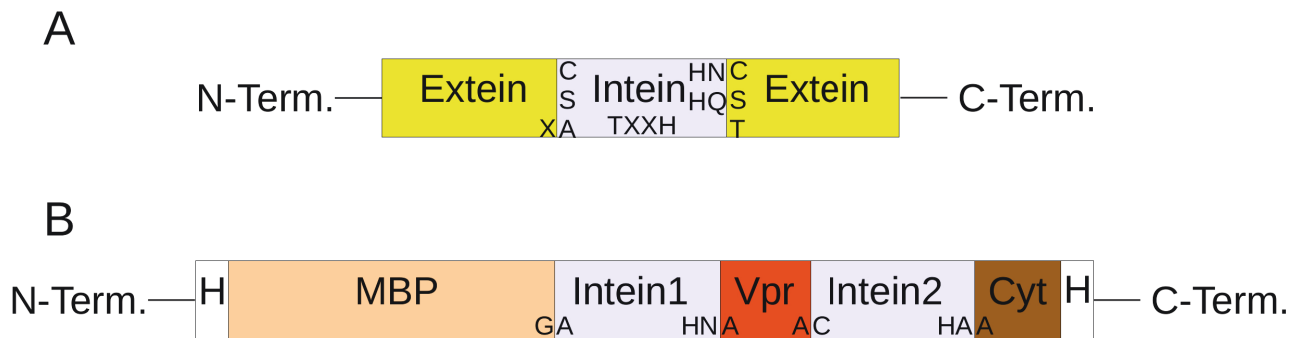


Abbildung 3.3: Aufbau eines Inteins. A) Schematische Darstellung eines typischen Inteins mit den für eine Spaltung nötigen N- und C-terminalen Aminosäuren. B) Das Vpr-Fusionsprotein mit den für die Intein-Spaltung relevanten Aminosäuren.

3.4.5 Reinigung von HIV-2 Vpr

Das HIV-2 Vpr-Fusionsprotein bzw. Vpr_C81S_F39C-Fusionsprotein wurde nach dem Protokoll von Hänel et al. (2014) gereinigt. Eine schematische Darstellung der Reinigung ist in Abbildung 3.4 gezeigt.

Die Zellpellets der Expression wurden in 5 ml Vpr-Lysepuffer (Tab. 3.6) pro Gramm Nasszellgewicht resuspendiert und 45 min bei 4 °C auf einem Rollschüttler inkubiert. Nach Sonifizierung mit einem Branson Sonifier 250 (3 x 45 s, 50 % duty cycle , Stärke 5) auf Eis wurde das Lysat für 30 min bei 35000 x g und 11 °C in einer Beckman-Coulter Avanti J-20XP zentrifugiert. Zur Reinigung des Fusionsproteins wurde der zellfreie Überstand bei 4 °C auf eine mit Ni²⁺-NTA-Agarose gefüllte Affinitätschromatographiesäule aufgetragen. Dazu wurde ein Säulenvolumen (SV) von 4 ml Ni²⁺-NTA-Agarose pro Liter Expressionskultur mit Vpr-IMAC-Puffer (Tab. 3.6) äquilibriert und anschließend das Lysat aufgetragen. Das gebundene Vpr-/Vpr_C81S_F39C-Fusionsprotein wurde dann nacheinander mit 10 SV 1 % Triton-X 100 und 20 mM Imidazol in Vpr-IMAC-Puffer, 10 SV 20 mM Imidazol in Vpr-IMAC-Puffer, sowie 10 SV 40 mM Imidazol in Vpr-IMAC-Puffer gewaschen. Das Fusionsprotein wurde daraufhin mit 8 SV 750 mM Imidazol in Vpr-IMAC-Puffer von der Säule eluiert. Nach Analyse aller Fraktionen mittels SDS-PAGE wurde die fusionsproteinenthaltende Elutionsfraktion mittels Vivaspin 20 Konzentrator (MWCO 10 kDa) auf 10 ml eingeeengt. Zum Entfernen des Imidazols wurde das Vpr-/Vpr_C81S_F39C-Fusionsprotein in einem Dialyseschlauch (MWCO 3,5 kDa) über Nacht gegen 2 x 2 l Vpr-IMAC-Puffer dialysiert. Vor der Spaltung des Fusionsproteins wurde DPC bis zu einer Endkonzentration von 30 mM hinzugegeben und der Spaltansatz steril filtriert. Die autokatalytische Inteinspaltung wurde durch Zugabe von DTT bis zu einer finalen Konzentration von 50 mM und Inkubation bei 40 °C induziert.

Nach 12 Tagen Spaltung wurde der Spaltansatz mit Vpr-Q-Puffer 1:5 verdünnt und dann auf eine mit Vpr-Q-Puffer (Tab. 3.6) äquilibrierte Q-Sepharosesäule aufgetragen. Für die Anionentauscherchromatographie wurden 2 ml Q-Sepharose pro Liter Expressionskultur verwendet. Der Vpr-/Vpr_C81S_F39C-enhaltende Durchfluss des Auftrags wurde anschließend mit Natriumphosphatpuffer (pH 6,0) bis zu einer finalen Konzentration von 20 mM versetzt und mit HCl auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Kationentauscherchromatographie an 1 ml SP-Sepharose pro Liter Expressionskultur durchgeführt. Nach Auftragen des Vpr/Vpr_C81S_F39C auf die mit Vpr-SP-Puffer (Tab. 3.6) äquilibrierte SP-Sepharose, wurde die Säule mit je 2 SV 10 mM NaCl und 100 mM NaCl in Vpr-SP-Puffer gewaschen. Die Elution des Vpr erfolgte mit 3 SV 750 mM NaCl in Vpr-SP-Puffer. Nach Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE wurde die Vpr/Vpr_C81S_F39C-enhaltende Fraktion mittels Vivaspin 2 (MWCO 3,5) auf Konzentrationen von etwa 50 µM bis 500 µM Vpr bzw. Vpr_C81S_F39C eingengt. Die Proteinkonzentration wurde vor dem Aufkonzentrieren mittels UV-Absorptionsspektroskopie bei 280 nm bestimmt (Kap. 3.4.9.), da zu diesem Zeitpunkt die exakte DPC-Konzentration in dem Vpr-enhaltenden Puffer bekannt war und daher ein identischer Referenzpuffer verwendet werden konnte.

Tabelle 3.6: Puffer zur Reinigung des HIV-2 Vpr

Vpr-Lysepuffer	Vpr-IMAC-Puffer
20 mM Natriumphosphat, pH 7,4	20 mM Natriumphosphat, pH 7,4
200 mM NaCl	200 mM NaCl
1 Tablette/50 ml Complete Protease Inhibitor EDTA-frei	5 mM β -ME
60 U Lysozyme	
10 U DNAase A	
5 mM β -ME	
Vpr-Q-Puffer	Vpr-SP-Puffer
4 mM Natriumphosphat, pH 7,4	10 mM Natriumazetat, pH 5
40 mM NaCl	5 mM β -ME
	6 mM DPC

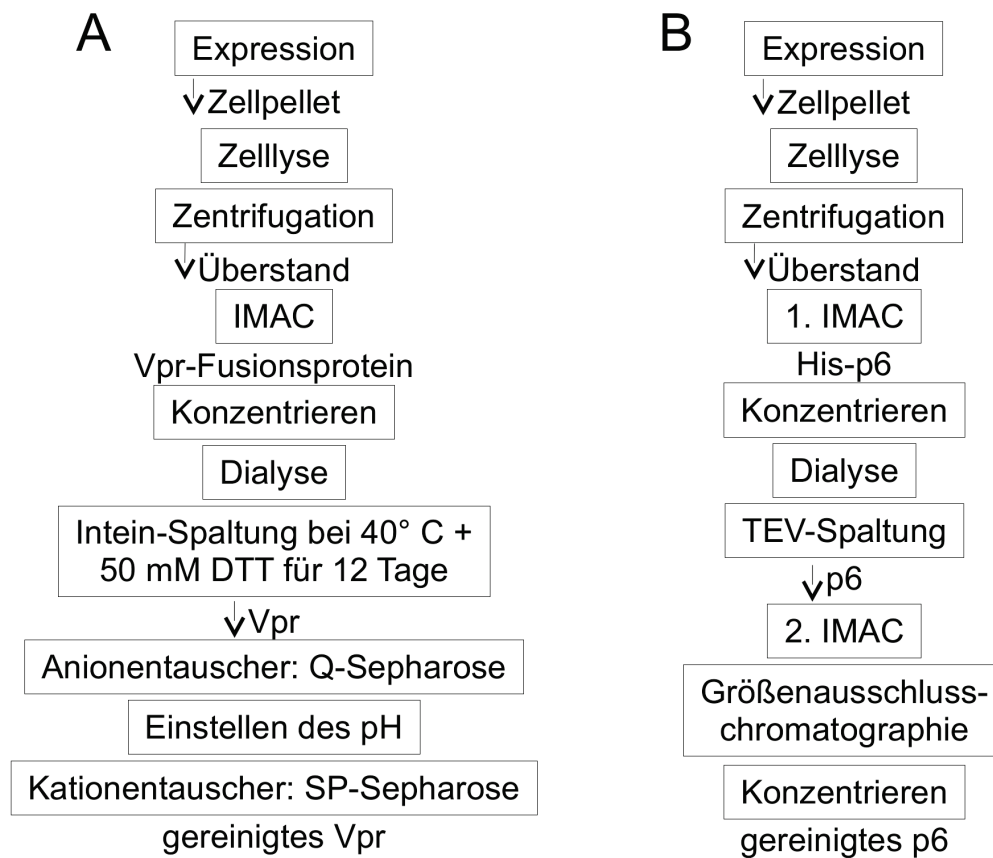


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Reinigungen von HIV-2 Vpr (A) und HIV-2 p6 (B).

3.4.6. Reinigung von HIV-2 p6

Zur Reinigung des HIV-2 p6 (Abb. 3.4) erfolgte zunächst die Homogenisierung des Zellpellets in p6-Lysepuffer (6 ml Puffer pro Gramm Nasszellpellet). Das Homogenat wurde 45 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und anschließend auf Eis sonifiziert (3 x 45 s, Stärke 5, 50 % duty cycle). Es folgte die Zentrifugation des Lysats bei 45000 x g und 11 °C für 30 min, um Zellbestandteile von löslichen Proteinen zu trennen. Der zellfreie Überstand wurde auf eine mit p6-IMAC-Puffer (Tab. 3.7) äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarosesäule (2 ml SV pro Liter Expressionskultur) aufgetragen und 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 4 SV 50 mM Natriumcholat in p6-IMAC-Puffer gewaschen. Diesem Waschschrift folgten zwei Waschschriffe mit je 4 SV p6-IMAC-Puffer und 10 mM Imidazol in p6-IMAC-Puffer. Das His-p6 wurde anschließend mit je 5 SV 300 mM und 750 mM Imidazol in p6-IMAC-Puffer von der Säule eluiert. Alle Fraktionen, sowie das Lysat vor und nach Auftragung auf die Säule wurden mittels SDS-PAGE analysiert. His-p6-enhaltende Elutionsfraktionen wurden vereint und zum Entfernen des Imidazols für je 1 h gegen 2 x 2 l p6-Spaltpuffer (Tab. 3.7) dialysiert. Zur Spaltung des His-p6

wurde 1 mg His-TEV-Protease pro 10 mg His-p6 in den Dialyseschlauch gegeben. Der Spaltansatz wurde anschließend 3 bis 6 Tage bei Raumtemperatur unter Dialyse gegen 3 l frischen p6-Spaltpuffer inkubiert. Zur Kontrolle wurden vor His-TEV Zugabe, sowie nach 3, 4, 5 und 6 Tagen Proben entnommen, mit 4-fach Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Nach erfolgreicher Spaltung wurde eine weitere Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose durchgeführt. Die Säule wurde dafür erneut mit p6-IMAC-Puffer äquilibriert. Diese IMAC diente dem Entfernen der His-TEV, dem vom His-p6 abgespaltenen His-Tag und von ungespaltenem His-p6. Der Durchfluss der IMAC wurde aufgefangen, mit Hilfe eines Vivaspin 20 Konzentrators (MWCO 3,5 kDa) auf 5 ml eingengt und auf eine HiLoad Superdex 75 XK 16/600 pg aufgetragen. Die SEC-Säule war an einem ÄKTAPurifier angeschlossen und wurde mit p6-SEC-Puffer (Tab. 3.7) bei einer Flussrate von 1 ml/min betrieben. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und p6-enhaltende Fraktionen vereint. Anschließend wurde p6 mittels Vivaspin 20 (MWCO 3,5 kDa) Konzentrator auf eine Konzentration von 0,5 mM bis 1 mM eingengt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Konzentration des p6 wurde über die Absorption des p6 bei 280 nm bestimmt (Kap. 3.4.9.).

Tabelle 3.7: Puffer zur Reinigung von HIV-2 p6

p6-Lysepuffer	p6-IMAC-Puffer
50 mM Tris-HCl, pH 8	50 mM Tris-HCl, pH 8
300 mM NaCl	300 mM NaCl
60 U Lysozym	
1 mg/100 mL DNAase A	
1 Tablette/50 mL Complete Protease Inhibitor EDTA-frei	
p6-Spaltpuffer	p6-SEC-Puffer
50 mM Tris-HCl, pH 8	20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4
200 mM NaCl	
0,5 mM EDTA	150 mM NaCl
1 mM DTT	

3.4.7. Reinigung der Varianten des MSP

Die Reinigung von MSP1, MSP1D1 (Denisov et al. 2004) und MSP1D1Δ5 (Hagn et al. 2013), erfolgte nach dem Protokoll von Bayburt et al. (2002). Das MSP1D1 ist eine verkürzte Variante des MSP1, bei dem die Aminosäuren 2 bis 12 des MSP1 fehlen. Das MSP1D1Δ5 ist das MSP1D1 aus dem die Aminosäuren 145 bis 166 entfernt wurden bzw. nach der Aminosäurenummerierung von Hagn et al. (2013) die Aminosäuren 121 bis 142. Im Folgenden werden diese drei Proteine nur noch als His-MSP bzw. MSP bezeichnet.

Im ersten Schritt wurde das jeweilige Zellpellet in MSP-Lysepuffer (Tab. 3.8) resuspendiert und anschließend auf Eis sonifiziert (3 x 45 s, Stärke 5, 50 % duty cycle). Zelltrümmer wurden von löslichen Proteinen mittels Zentrifugation für 30 min bei 45000 x g und 11 °C getrennt. Mit dem zellfreien Überstand wurde eine Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose durchgeführt. Nach Binden des His-MSPs an die Säule wurde diese mit je 4 SV MSP-Waschpuffer I, II, III und IV (Tab. 3.8) gewaschen. Daraufhin erfolgte die Elution des His-MSPs mit je 4 SV 300 mM Imidazol und 750 mM Imidazol in MSP-Elutionspuffer. Nach Analyse aller Wasch- und Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE wurden His-MSP-enthaltende Fraktionen vereint und 1 h gegen 2 l MSP-Dialysepuffer (Tab. 3.8) dialysiert. Zum Abspalten des His-Tags wurde je 1 mg His-TEV-Protease zu 10 mg His-MSP in den Dialyseschlauch gegeben. Der Spaltansatz wurde daraufhin über Nacht unter Dialyse gegen 4 l frischen MSP-Dialysepuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgreichem Abspalten des His-Tags vom MSP wurde eine zweite Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose durchgeführt, um ungespaltenes His-MSP sowie den abgespaltenen His-Tag und die His-TEV-Protease zu entfernen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und über Nacht gegen 2 x 2 l Assemblierungspuffer (Tab. 3.8) dialysiert. Anschließend wurde MSP mittels Vivaspin 20 (MWCO 3 kDa) auf eine Konzentration von 3 mg/ml eingengt, in 1 ml Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die Absorption der Varianten des MSP bei 280 nm genutzt (Kap. 3.4.9.). Die gefriergetrockneten Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Lyse sowie die beiden IMACs und die Spaltung der MSPs wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

Das His-MSP1D1 und das His-MSP1D1Δ5 wurden immer mittels His-TEV-Protease gespalten und wie oben beschrieben weiter verarbeitet. Das His-MSP1 wurde nie gespalten und nach der ersten IMAC direkt in Assemblierungspuffer dialysiert, eingengt und gefriergetrocknet. Ab Kapitel 3.6. wird das ungespaltene His-MSP1 nur noch als MSP1 bezeichnet.

Tabelle 3.8: Puffer zur Reinigung der Varianten des MSP

MSP-Lysepuffer	MSP-Waschpuffer I	MSP-Waschpuffer II	MSP-Waschpuffer III
20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4	40 mM Tris-HCl, pH 8	40 mM Tris-HCl, pH 8	40 mM Tris-HCl, pH 8
1 Tablette/50 mL Complete Protease Inhibitor EDTA-frei	300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
1 % (v/v) Triton X-100	1 % (v/v) Triton X-100	50 mM Natriumcholat	
60 U Lysozym			
MSP-Waschpuffer IV	MSP-Elutionspuffer	MSP-Dialysepuffer	Assemblierungspuffer
40 mM Tris-HCl, pH 8	40 mM Tris-HCl, pH 8	50 mM Tris-HCl, pH 8	20 mM Tris-HCl, pH 7,4
300 mM NaCl	300 mM NaCl	0,5 mM EDTA	100 mM NaCl
10 mM Imidazol		1 mM DTT	0,5 mM EDTA

3.4.8. Reinigung der His-TEV-Protease

Um die His-TEV-Protease aus *E. coli* Zellen zu reinigen wurden die Zellpellets in 30 ml TEV-Lysepuffer (Tab. 3.9) pro Liter Expressionskultur resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin 3 x 40 s auf Eis sonifiziert und dann Polyethyleneimin bis zu einer finalen Konzentration von 0,1 % in das Lysat gegeben. Nach Zentrifugation bei 50000 x g und 11 °C für 30 min wurde der zellfreie Überstand für eine Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose genutzt. Dazu wurden 5 ml Ni²⁺-NTA-Agarose pro Liter Expressionskultur mit lysozymfreiem Lysepuffer äquilibriert und dann der zellfreie Überstand auf die Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 15 SV lysozymfreiem Lysepuffer wurde die His-TEV-Protease mit 1 SV 100 mM Imidazol in TEV-IMAC-Puffer, 6 SV 300 mM Imidazol in TEV-IMAC-Puffer und 1 SV 750 mM Imidazol in TEV-IMAC-Puffer (Tab. 3.9) eluiert. His-TEV-Protease-enthaltende Fraktionen wurden vereint und nach Zugabe von EDTA und DTT zu einer finalen Konzentration von jeweils 1 mM, mittels des Konzentrators Vivaspin 20 (MWCO 3,5 kDa) auf 5 ml eingengt. Anschließend wurde eine SEC mit TEV-SEC-Puffer und einer HiLoad Superdex 75 XK 16/600 pg Säule an einem ÄKTAPurifizierung-Chromatographiesystem bei 4 °C durchgeführt. Nach Vereinigen der His-TEV-Protease-enthaltenden Fraktionen wurden diese in eine Dialysemembran (MWCO 3,5 kDa) gegeben und für 16 bis 20 h gegen 2 x 2 l TEV-Dialysepuffer (Tab. 3.9) bei 4 °C dialysiert. Als letzter Schritt wurde zur His-TEV-Protease Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 20 % hinzugegeben und das Protein in 1 ml Aliquots aufgeteilt. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurde die

His-TEV-Protease bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Das Lysat sowie alle Fraktionen der Affinitätschromatographie und SEC wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Tabelle 3.9: Puffer zur Reinigung der His-TEV-Protease

TEV-Lysepuffer	TEV-IMAC-Puffer
20 mM Tris-HCl, pH 8,0	20 mM Tris-HCl, pH 8,0
500 mM NaCl	500 mM NaCl
10 mM Imidazol	10 % (v/v) Glycerin
60 U Lysozym	
TEV-SEC-Puffer	TEV-Dialysepuffer
25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
200 mM NaCl	25 mM NaCl
10 % (v/v) Glycerin	0,5 mM EDTA
2 mM EDTA	2 mM DTT
10 mM DTT	10 % (v/v) Glycerin

3.4.9. Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels UV-Absorptionsspektroskopie

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde ein UV-Absorptionsspektrum des Proteins im Bereich von 220 bis 330 nm aufgenommen. Dazu wurde ein Lambda 25 UV-/Vis-Spektrophotometer der Firma Perkin Elmer verwendet (Skelton, USA). In dem genannten Wellenlängenbereich zeigen die Peptidbindungen Absorption bei 220 nm, die Aminosäure Phenylalanin bei 260 nm, Tyrosin bei 274 nm und Tryptophan bei 280 nm. Die stärkste Absorption zeigt dabei das Tryptophan mit einem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} von 5690 l mol⁻¹ cm⁻¹ bei 280 nm. Da die Konzentration eines Proteins meist anhand seiner Absorption bei 280 nm (A_{280}) abgeschätzt wird, berechnet man den molaren Extinktionskoeffizienten eines Proteins näherungsweise aus der Anzahl und den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin ($\epsilon_{280}=1280 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Die Proteinkonzentration wird anschließend mit Hilfe der A_{280} und dem Lambert-Beerschen-Gesetz (Gleichung 1) bestimmt:

$$(1) \quad A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d$$

Im Lambert-Beerschen-Gesetz ist A_{280} die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm, ϵ_{280} der molare Extinktionskoeffizient des Proteins in $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, c die Proteinkonzentration in mol/l und d die optische Weglänge der verwendeten Küvette in cm.

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde immer ein proteinfreies Pufferspektrum aufgenommen, welches von den Proteinspektren abgezogen wurde. Alle molaren Extinktionskoeffizienten wurden anhand der Aminosäuresequenzen der Proteine mit Hilfe des Online-Programms ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org>) berechnet.

3.5. Markieren von Vpr mit MTSL

Zur Bestimmung der globalen Proteinrückgratstruktur des HIV-2 Vpr wurden die Aminosäuren C81 in Vpr sowie C39 in Vpr_C81S_F39C mit der paramagnetischen Sonde (1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- Δ^3 -pyrroline-3-methyl) methanethiosulfonate (MTSL) markiert. Dazu wurden jeweils 150 μM Vpr bzw. Vpr_C81S_F39C in PBS-Puffer und 10 mM DPC gelöst. Die paramagnetische Sonde MTSL wurde in Acetonitril aufgenommen, so dass ein Stock von 185 mM MTSL in 100 % Acetonitril vorlag. Anschließend wurde MTSL in Acetonitril zu der jeweiligen Variante des Vpr im molaren Verhältnis von 10:1 (MTSL:Vpr) gegeben. Dieser Ansatz wurde 18 h bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen dem Cystein der Vpr-Variante und der paramagnetischen Sonde kam (Abb. 3.5). Anschließend wurde freies MTSL mittels Zentrifugation unter Verwendung des Konzentrators Vivaspin 2 (MWCO 3,5 kDa) von markiertem Vpr_C81-SL bzw. Vpr_C81S_F39C-SL getrennt. Dazu wurde 1 ml der Probe 6 mal auf 100 μl eingengt und anschließend jeweils mit PRE-Wasch-Puffer (Tab. 3.10) wieder zu 1 ml aufgefüllt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Probe auf 320 μl eingengt und die DPC-Konzentration für die NMR-Messung auf 50 mM DPC eingestellt, um den NMR-SL-Puffer zu erhalten (Tab. 3.9).

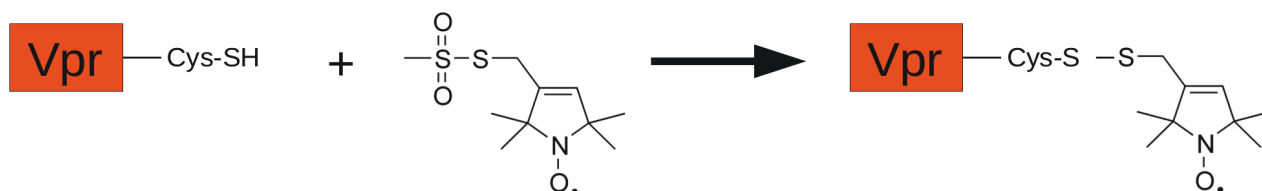


Abbildung 3.5: Reaktion des MTSL mit dem Cystein des Vpr

Tabelle 3.10: PRE-Wasch-Puffer und NMR-SL-Puffer

PRE-Wasch-Puffer	NMR-SL-Puffer
10 mM Natriumazetat, pH 5	10 mM Natriumazetat, pH 5
50 mM NaCl	50 mM NaCl
5 mM DPC	50 mM DPC
	10 % D ₂ O

3.6. Assemblierung von Nanodisks

Je nach verwendetem Lipid musste das Assemblierungsprotokoll leicht variiert werden. Die Assemblierungsprotokolle werden in den folgenden zwei Kapiteln beschrieben. Bei der Herstellung von Nanodisks wurde im Wesentlichen nach den Protokollen von Bayburt et al. (1998) und Glück et al. (2009) vorgegangen.

3.6.1. Assemblierung von Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks

Zur Assemblierung von Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks wurde zunächst das in Chloroform gelöste POPC eingetrocknet. Dazu wurde das Chlorform mit einem feinen Strahl gasförmigen Stickstoffs abgedampft. Der erhaltene Lipidfilm wurde anschließend in Cyclohexan gelöst. Nach vollständiger Resuspendierung des Lipids wurde die Lösung in flüssigen Stickstoff für 10 min eingefroren und anschließend über Nacht an einer Vakuumpumpe unter Verwendung eines mit flüssigem Stickstoff gekühlten Lösungsmittelkondensators gefriergetrocknet. Das getrocknete Lipid wurde daraufhin in einer definierten Menge Lipidpuffer (Tab. 3.11) aufgenommen, um eine Lipid-Endkonzentration von 50 mM POPC zu erhalten. Damit betrug das Lipid-Natriumcholat-Verhältnis 1:2. Das lyophilisierte MSP1 wurde in 1 ml H₂O pro 3 mg MSP1 gelöst, um den Assemblierungspuffer (Tab. 3.8) zu erhalten und im molaren Verhältnis von 1:45 (MSP1:POPC) mit POPC in Lipidpuffer gemischt. HIV-2 Vpr in 10 mM DPC wurde im molaren Verhältnis von 0,5:1:45 (Vpr:MSP1:POPC) zum MSP1-POPC-Gemisch gegeben und β -ME bis zu einer finalen Konzentration von 2 mM hinzugefügt.

Daraufhin wurde der Ansatz 5 mal für je 20 min im Wechsel auf Eis und bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Assemblierung der Nanodisks durch langsames Entfernen des Detergenz. Dazu wurden 0,5 g BioBeads SM-2 pro 1 ml Assemblierungsansatz zugegeben und es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 4 h auf einem Rollschüttler. Nach der Assemblierung wurde die Probe auf eine HiLoad Superdex 200 XK 26/600 pg aufgetragen, die an ein ÄKTAPurifier Chromatographiesystem angeschlossen war. Die SEC wurde mit einer Flussrate

von 2,2 ml/min und mit ND-SEC-Puffer (Tab. 3.11) durchgeführt. Elutionsfraktionen mit Absorption bei 280 nm wurden mittels SDS-PAGE analysiert und nanodisksenthaltende Fraktionen wurden vereint. Die Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks wurden mit Hilfe eines Vivaspin 2 Konzentrators (MWCO 10 kDa) und Zentrifugation bei 600 x g bis maximal 100 μ M konzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C für maximal 14 Tage gelagert.

3.6.2. Assemblierung von MSP1D1-/MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks

Die Assemblierung von Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks, sowie leeren MSP1D1-DMPC-Nanodisks und leeren MSP1D1 Δ 5-Nanodisks erfolgte nach dem gleichen Protokoll. Es mussten lediglich die Verhältnisse der MSPs zum DMPC variiert werden.

Das Lipid DMPC lag als lyophilisiertes Pulver vor und wurde direkt in Lipidpuffer (Tab. 3.11) aufgenommen, um eine DMPC-Endkonzentration von 50 mM zu erhalten. Damit betrug das Lipid-Natriumcholat-Verhältnis 1:2. Das MSP1D1/MSP1D1 Δ 5 wurde in 1 ml H₂O pro 3 mg Protein gelöst, um den Assemblierungspuffer (Tab. 3.8) zu erhalten. Anschließend wurde MSP1D1 mit DMPC im molaren Verhältnis von 1:70 (MSP1D1:DMPC) bzw. MSP1D1 Δ 5 im molaren Verhältnis 1:55 (MSP1D1 Δ 5:DMPC) mit DMPC in Lipidpuffer gemischt. Bei Herstellung von Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks wurde zu dem MSP1D1-DMPC-Gemisch zusätzlich Vpr in 10 mM DPC im molaren Verhältnis von 0,5:1:70 (Vpr:MSP1D1:DMPC) gegeben.

Alle Ansätze wurden daraufhin 5 x für je 20 min im Wechsel auf Eis und bei 37 °C inkubiert. Um die Nanodisks zu assemblieren wurde die jeweilige Probe in einen Dialyseschlauch (MWCO 3,5 kDa) gefüllt und für 2 x 1 h gegen je 1 l Assemblierungspuffer (Tab 3.8) und dann für 18 bis 20 h gegen 2 l Assemblierungspuffer zum Entfernen des Detergenz bei 4 °C dialysiert. Für die Herstellung von Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks wurde dem Assemblierungspuffer β -ME bis zu einer finalen Endkonzentration von 2 mM hinzugefügt. Nach der Assemblierung wurde der jeweilige Ansatz auf eine HiLoad Superdex 200 XK 16/600 pg geladen, welche an ein ÄKTAPurifier Chromatographiesystem angeschlossen war. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min und mit ND-SEC-Puffer (Tab. 3.11) betrieben. Wurden Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks mittels SEC aufgetrennt, so wurde dem ND-SEC-Puffer DTT mit einer finalen Konzentration von 1 mM hinzugefügt. Nanodisksenthaltende Fraktionen wurden nach der Analyse mittels SDS-PAGE vereint. Nach Einengen der Proben auf Nanodiskkonzentrationen von 70 bis 120 μ M wurden diese bis zur weiteren Verwendung für maximal 14 Tage bei 4 °C gelagert. Das Einengen erfolgte mittels Zentrifugation der Nanodisks bei 600 x g in einem Vivaspin 2 Konzentrator (MWCO 10 kDa).

Tabelle 3.11: Puffer zur Assemblierung von Nanodisks

Lipidpuffer	ND-SEC-Puffer
20 mM Tris-HCl, pH 7,4	10 mM Natriumphosphat, pH 7,4
100 mM Natriumcholat	150 mM NaCl

3.7. Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Mittels der CD-Spektroskopie lassen sich Sekundärstrukturelemente in Proteinen analysieren und quantitative Aussagen treffen. Dabei handelt es sich um eine UV-Absorptionsspektroskopie, welche die Differenz der Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht in Proteinen misst (Kelly et al. 2005). Bei einem CD-Experiment erhält man die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure des Proteins als Funktion der Wellenlänge.

Die optische Aktivität und somit die Möglichkeit CD zu messen wird in Proteinen durch die asymmetrischen Elemente des Proteinrückgrats hervorgerufen. Diese asymmetrischen Elemente sind die C^α-Atome jeder Aminosäure, welche ein chirales Zentrum darstellen, und die Elektronenkonfiguration der Peptidbindung. Die Peptidbindung zeigt in Proteinen Absorption im Bereich von 180 bis 240 nm. Dies führt zu proteinkonformationsspezifischen CD-Spektren, so dass beim Vorliegen einer α-Helix ein Maximum bei etwa 192 nm, sowie Minima bei 209 nm und 222 nm auftreten. Ein β-Strang dagegen hat ein Maximum bei 196 nm und ein Minimum bei 218 nm zur Folge.

Von 50 μM HIV-2 Vpr wurde ein CD-Spektrum in NMR-Puffer (Tab. 3.12) an einem Jasco J810 CD-Spektropolarimeter aufgenommen. Es wurde eine rechteckige Quarz-Küvette mit einer optischen Weglänge von 0,1 cm genutzt. Die quantitative Analyse der CD-Daten erfolgte mit Hilfe des DichroWeb Webservers (Whitmore & Wallace, 2004). Zur Analyse wurde von dem Proteinspektrum zunächst das Spektrum des proteinfreien Puffers subtrahiert. Zum Abbilden des Spektrums von 50 μM Vpr in 50 mM DPC wurde die Mean Residue Ellipticity ($\Theta_{MRW, \lambda}$) bei jeder Wellenlänge berechnet und als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Die $\Theta_{MRW, \lambda}$ berechnet sich mit Hilfe von Gleichung 2.

$$(2) \quad \Theta_{MRW, \lambda} = \frac{MRW \cdot \Theta_{\lambda}}{10 \cdot d \cdot c}$$

In dieser ist MRW das durchschnittliche Molekulargewicht der Aminosäuren des Proteins, Θ_{λ} die gemessene Elliptizität in Grad, c die Vpr-Konzentration in g/ml und d die optische Weglänge der Küvette (Kelly et al. 2005).

3.8. Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ist eine analytische Methode mit der sich die Strukturen und Dynamiken von Proteinen charakterisieren lassen. Während bei anderen spektroskopischen Methoden der elektrische Teil elektromagnetischer Wellen ausgenutzt wird, nutzt die NMR-Spektroskopie den magnetischen Anteil dieser Wellen.

Für die NMR-Spektroskopie sind Atomkerne mit einem magnetischen Dipolmoment μ nötig, welches über das gyromagnetische Verhältnis γ mit dem quantenmechanischen Eigendrehimpuls I (Spin) des Atomkerns verknüpft ist.

$$(3) \quad \mu = \gamma \cdot I$$

Das gyromagnetische Verhältnis ist eine für jede Isotopensorte spezifische Konstante. Alle Kerne die nicht gleichzeitig eine gerade Anzahl an Protonen und eine gerade Anzahl an Neutronen haben, besitzen einen von Null verschiedenen Spin und sind NMR-aktiv. Die wichtigsten Kerne für die NMR-Spektroskopie an Proteinen sind ^1H , ^{15}N und ^{13}C mit einem Spin $1/2$. In einem angelegten statischen Magnetfeld (B_0) spalten die Energieniveaus von ^1H -, ^{15}N - und ^{13}C -Kernen in jeweils zwei Energieniveaus gemäß Gleichung 4 mit den Spinzuständen $m=+1/2$ und $m=-1/2$ auf.

$$(4) \quad E_m = -\mu \cdot B_0 = -\frac{m \cdot h \cdot \gamma \cdot B_0}{2 \cdot \pi}$$

Das Besetzungsverhältnis der Zustände kann wiederum durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben werden

$$(5) \quad \frac{N_{(+1/2)}}{N_{(-1/2)}} = e^{-\frac{h \cdot \gamma \cdot B_0}{2 \cdot \pi \cdot k_B \cdot T}}$$

In den Gleichungen 4 und 5 sind h das Planck'sche Wirkungsquantum und k_B die Boltzmann-Konstante. Die Energiedifferenz zwischen beiden Zuständen kann mit

$$(6) \quad \Delta E = \frac{h \cdot \gamma \cdot B_0}{2 \cdot \pi}$$

beschrieben werden. Die magnetischen Momente der Kernspins des energetisch günstigeren Zustands stellen sich mit $m=+1/2$ parallel zum angelegten Magnetfeld B_0 ein, wohingegen sich die

magnetischen Momente des energetisch ungünstigeren Zustand mit $m=-1/2$ antiparallel zum äußeren Magnetfeld B_0 ausrichten. Aus Gleichung 6 wird deutlich, dass der ^1H -Kern die größte NMR-Sensitivität aufweist, da dieser das größte gyromagnetische Verhältnis aller stabilen Isotope besitzt.

Angenommen in einem ortsfesten Bezugssystem (x, y, z) zeigt B_0 entlang der z-Achse, so präzedieren die magnetischen Momente des Kernspins parallel und antiparallel um die z-Achse. Die Präzessionsfrequenz der Kernspins, auch Larmorfrequenz (ω_0) genannt, ist dabei abhängig von der Stärke des äußeren Magnetfeldes (B_0) sowie dem gyromagnetischen Verhältnis γ des jeweiligen Isotops. Die Larmorfrequenz ist gegeben durch

$$(7) \quad \omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad .$$

Aufgrund der Präzession um die z-Achse und der höheren Besetzung des energetisch günstigeren Zustandes $m=+1/2$, ergibt sich eine makroskopische Magnetisierung (M_0) entlang der z-Achse. Durch Einstrahlen eines zweiten Magnetfeldes B_1 , z.B. in Form eines 90° Radiofrequenzpulses mit der Larmorfrequenz des betrachteten Isotops in Richtung der x-Achse, kommt es zur Störung der magnetischen Momente aller Kernspins dieser Isotopensorte. Dadurch ergibt sich am Ende eines 90° Pulses in Richtung der x-Achse eine makroskopische Magnetisierung entlang der -y-Achse (M_y). Nach Abschalten des B_1 -Feldes präzedieren die Kernspins nicht mehr statistisch verteilt, sondern gebündelt (d.h. in Phase) um die z-Achse, was als Phasenkohärenz bezeichnet wird. Die Detektion des NMR-Signals erfolgt durch eine Radiofrequenzspule im Probenkopf des Spektrometers, in der durch die präzedierende transversale Magnetisierung eine Spannung erzeugt wird. Dieses detektierte Signal wird als Freier Induktionsabfall (FID, engl. Abk. für free induction decay) bezeichnet, da das Spinsystem durch Relaxation in seinen Gleichgewichtszustand zurückkehren kann und die Stärke der induzierten Spannung abnimmt. Dabei dephasieren die Spins durch T_2 -Relaxation (Spin-Spin-Relaxation) in der xy-Ebene und kehren durch die T_1 -Relaxation (Spin-Gitter-Relaxation) wieder in die Richtung bzw. Gegenrichtung des äußeren Magnetfelds zurück. Das detektierte Signal stellt also zunächst eine Funktion der Zeit dar, welche mit Hilfe einer Fourier-Transformation in die NMR typische Frequenzdomäne umgerechnet werden kann.

Kernspins, die über eine oder mehrere kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind, erfahren eine skalare Kopplung. In Abhängigkeit von der Stärke der Kopplung und der Zahl der untereinander wechselwirkenden Kernspins kann dies zu einer Signalaufspaltung führen. Bei dieser indirekten Kopplung, wird die Magnetisierung über die Bindungen zwischen Kernen

übertragen und ist in der Regel auf eine maximale Reichweite von 3 Bindungen beschränkt. Diese Kopplungen werden unter anderem bei der Zuordnung von Proteinerückgratkernen genutzt. So wird bei einem 3D HNCACB Experiment die Magnetisierung über die skalare Kopplung von $^1\text{H}^{\text{N}}$ auf ^{15}N , auf $^{13}\text{C}^{\alpha}$, auf $^{13}\text{C}^{\beta}$ und wieder zurück übertragen.

Eine zweite Art, Magnetisierung von einem Kern auf einen anderen zu übertragen, ist die dipolare Kopplung. Diese findet durch dipolare Wechselwirkung benachbarter Kerne über den Raum statt. Die dipolare Kopplung bildet u.a. die Grundlage des NOE (Kern-Overhauser-Effekt, engl. Abk. für nuclear Overhauser effect) zwischen Kernen. Der NOE zwischen zwei Protonen ist auf einen Abstand von maximal 6 Å zwischen den korrelierten Kernen beschränkt. So zeigen die detektierten NOEs eine Abhängigkeit ihrer Intensität I vom Abstand r der Protonen zueinander, wobei I proportional zu $1/r^6$ ist. Die NOEs können mit sogenannten NOESY-Experimenten (engl. Abk. für Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) gemessen werden und liefern wichtige Abstandsinformationen für die Berechnung von NMR-Strukturen. Mit Hilfe des NOESY-Experiments lassen sich Kerne miteinander korrelieren, die räumlich benachbart sind, aber sequentiell weit voneinander entfernt liegen können. Aufgrund der Abhängigkeit der NOE-Intensität vom Abstand der beiden korrelierten Kerne zueinander, lässt sich so auf die Faltung des Proteins schließen.

3.8.1. Chemische Verschiebung (δ)

Die geringfügige Abweichung der Larmorfrequenzen der Kerne einer Isotopensorte untereinander in einem gegebenen äußeren Magnetfeld B_0 geht auf die unterschiedliche magnetische Abschirmung der Kerne in einem Molekül zurück. Diese Abschirmung kommt durch die Elektronenhülle der beobachteten Kerne und ihrer Nachbarn zustande. Das B_0 -Feld induziert in der Atomhülle einen Elektronenstrom und somit am Ort des Kerns ein weiteres Magnetfeld. Dieses lokale Magnetfeld schirmt den Kern von B_0 ab, so dass es zu einer geringfügigen Änderung der Larmorfrequenz kommt. Als Maß für den Effekt der Abschirmung wird die sogenannte Abschirmungskonstante (σ) genutzt. Einen großen Einfluss auf die Abschirmung und somit auf die chemische Verschiebung der Resonanzsignale hat demnach die chemische Umgebung eines Kernspins. Unter anderem befinden sich die Kerne in einem Protein in einer nicht-symmetrischen Umgebung. Dadurch werden diese nicht in alle Richtungen gleich von B_0 abgeschirmt und die chemische Verschiebung eines gegebenen Kernes hängt von der Orientierung des Proteins relativ zum äußeren Magnetfeld B_0 ab. Dieser Effekt wird auch die Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA, engl. Abk. für chemical shift anisotropy) genannt. Weiterhin zeigt die chemische Verschiebung eine starke Abhängigkeit von der Sekundär- und Tertiärstruktur eines

Proteins. Auch die Temperatur und der pH-Wert können zu Änderungen der chemischen Verschiebung führen. Des Weiteren kann die Interaktion von zwei Proteinen zu einer Änderung der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale solcher Kerne führen, deren chemische Umgebung sich infolge der Interaktion ändert.

Die chemische Verschiebung bezieht sich auf die bereits erwähnte Referenzlarmorfrequenz (ω_{Referenz}), bei der es sich meistens um die ^1H -Frequenz der Methylgruppen von Tetramethylsilan (TMS) oder 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) handelt. Die chemische Verschiebung wird in ppm (engl. Abk. für parts per million) angegeben und ist definiert als

$$(8) \quad \delta = \frac{\omega_{\text{Signal}} - \omega_{\text{Referenz}}}{\omega_{\text{Referenz}}} \cdot 10^6 .$$

Die Larmorfrequenz eines detektierten Korns in dem untersuchten Protein ist in Gleichung 8 als ω_{Signal} bezeichnet.

3.8.2. Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Eindimensionale NMR-Spektren von Proteinen zeigen aufgrund der großen Anzahl ihrer Protonen eine starke Überlagerung von Signalen. Dies macht es in der Regel unmöglich, die Spektren auf atomarer Ebene auszuwerten. So werden 2D- und 3D-NMR-Experimente genutzt, um einzelne Signale des 1D-Spektrums getrennt voneinander darzustellen.

Das 2D-Experiment besteht aus den vier Phasen Präparation, Evolution mit inkrementierten t_1 Zeit, Mischzeit und Detektion. Nach der Präparation, in der ein Nichtgleichgewichtszustand erreicht wird, können die Spins während der Evolution mit der Dauer t_1 frei präzedieren und sich entwickeln. In der folgenden Mischzeit kann die Magnetisierung zwischen den Kernen durch skalare oder dipolare Kopplung übertragen werden. In der Detektionsphase wird der FID als Funktion der Zeit t_2 detektiert. Durch Fourier-Transformation entlang der direkten Zeit t_2 erhält man ein gewöhnliches 1D-Spektrum in der Frequenzdomäne. Durch inkrementieren von t_1 um die Zeit Δt_1 wird die zeitliche Entwicklung des Spinsystems aufgenommen. Nach Fourier-Transformation aller FIDs entlang der direkten Zeit t_2 erhält man eine Aneinanderreihung von 1D-Spektren, die Momentaufnahmen des Spinsystems bei unterschiedlichen Magnetisierungszuständen zeigen. Diese Serie von 1D-Spektren stellt gleichzeitig eine Serie von FIDs entlang der indirekten Zeit t_1 dar. Eine Fourier-Transformation dieser FIDs entlang der indirekten Zeit t_1 ergibt schließlich das 2D-Spektrum.

Durch Einführen einer weiteren Dimension erhält man ein 3D-NMR-Experiment. Bei diesen

Experimenten wird nach der ersten Mischphase eine weitere indirekte Evolutionsphase, gefolgt von einer zweiten Mischphase eingefügt, bevor es dann zur Detektion in der direkten Zeitdimension kommt. Somit werden die Zeiten t_1 und t_2 unabhängig voneinander inkrementiert und in der Zeitdomäne t_3 erfolgt die Detektion. Nach Fourier-Transformation entlang t_3 werden die FIDs für t_2 erhalten, die wiederum durch Fourier-Transformation zu den FIDs von t_1 führen. Somit wird durch eine dritte Fourier-Transformation entlang t_1 das 3D-Spektrum erhalten. So ist es möglich, die Magnetisierung nicht nur auf eine, sondern auf zwei zusätzliche Kernsorten zu übertragen.

In den folgenden Kapiteln wird auf einige Beispiele der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie eingegangen.

3.8.2.1. 2D HSQC- und TROSY-Spektren

Da das 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum eines der wichtigsten Spektren der NMR-Spektroskopie an Proteinen ist, soll dieses hier näher beschrieben werden.

Bei dem [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum handelt es sich um ein heteronukleares 2D-NMR-Spektrum, an dem $^1\text{H}^{\text{N}}$ - und ^{15}N -Kerne beteiligt sind. Während des Experiments wird die Magnetisierung durch zwei INEPT-Sequenzen (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer) vom $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kern über skalare Kopplung auf den ^{15}N -Kern und wieder zurück übertragen. Es kommt im [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum somit zu einer Korrelation der chemischen Verschiebung von ^{15}N -Kernen mit der chemischen Verschiebung von kovalent an diesen ^{15}N -Kern gebundenen Protonen.

In der Präparationsphase wird die Protonenmagnetisierung durch einen Radiofrequenzpuls zunächst in die transversale Ebene gebracht. In der anschließenden Evolutionsphase präzedieren die $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Spins unter dem Einfluss des äußeren Magnetfeldes B_0 und der skalaren Kopplung. Während der Mischzeit wird die Magnetisierung über eine Bindung durch den INEPT vom $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kern auf den ^{15}N -Kern übertragen. Anschließend können die ^{15}N -Spins frei präzedieren, bevor die Magnetisierung durch einen inversen INEPT zurück vom ^{15}N -Kern auf den $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kern übertragen wird. Durch diesen Polarisationstransfer der Magnetisierung vom $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kern auf den ^{15}N -Kern und wieder zurück kommt es zu einer Sensitivitätssteigerung. Während der Detektionsphase wird das Signal schlussendlich in der Protonendimension detektiert. Nach der Fourier-Transformation in beiden Dimensionen erhält man das 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum. Durch Entkoppeln werden die Signale als Singulett und nicht, wie aufgrund der skalaren Kopplung zu erwarten, als Quartett dargestellt.

Da bei einem [^1H , ^{15}N]-HSQC-Experiment ^1H -Kerne detektiert werden, die kovalent an einen ^{15}N -Kern gebunden sind, repräsentiert jedes Signal im Spektrum zunächst eine NH-Gruppe des

Proteins. Somit kommen die meisten Signale von den NH-Gruppen des Proteinrückgrats sowie je zwei Signale von den NH₂-Gruppen der Seitenketten von Asparagin bzw. Glutamin. Des Weiteren sind die Resonanzsignale des Seitenketten-HN von Tryptophan sichtbar. Die NH- bzw. NH₃⁺-Gruppen der Seitenketten von Lysin, Arginin und Histidin sind ebenfalls in einem [¹H, ¹⁵N]-HSQC-Spektrum zu erkennen, wenn diese sich innerhalb des Proteins in einer Salz- oder Wasserstoffbrückenbindung befinden. Nicht detektierbar ist die N-terminale Aminosäure des Proteins, da ein zu schneller Austausch zwischen den Protonen der NH₃⁺-Gruppe und des Lösungsmittels vorliegt sowie die Proline, da diese in der Peptidkette kein Proton besitzen, das kovalent an ein Stickstoff gebunden ist.

Ein weiteres 2D-NMR-Spektrum ist das [¹H, ¹⁵N]-TROSY-Spektrum, welches wie auch das [¹H, ¹⁵N]-HSQC Protonen detektiert, die an ein Stickstoffatom gebunden sind. TROSY steht hier für Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy und bietet sich besonders für große Moleküle an. Mit Zunahme der Größe des Proteins kommt es zu kürzeren T₂-Zeiten der Spins, aufgrund von Dipol-Dipol-Kopplung (DD) und der Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA). Die Relaxationsmechanismen DD und CSA sind in großen Proteinen stärker als in kleinen Proteinen, da ihr Einfluss auf die Relaxation abhängig von der Brown'schen Molekularbewegung ist (Pervushin et al. 1997). In hohen Feldstärken nähert sich unter anderem die Frequenz der Rotationsdiffusion eines großen Proteins der Larmorfrequenz der Stickstoffkerne an und der Einfluss von CSA und DD auf die Relaxation nimmt zu. So zeigen die vier Komponenten eines ohne Entkopplung detektierten Korrelationssignals für ein kleines Molekül aufgrund der schnellen Rotationsdiffusion identische Linienbreiten, so dass es beim Entkoppeln zu einem scharfen Signal kommt. In einem großen Molekül dagegen ist der Einfluss der Relaxationsmechanismen aufgrund der langsamen Rotationsdiffusion und damit verbundenen Annäherung an die Larmorfrequenz unterschiedlich stark für die Komponenten des Quartetts. Dadurch haben die Komponenten unterschiedliche R₂-Raten und es entsteht beim Entkoppeln ein breites Signal, welches im Rauschen des Spektrums verschwinden kann. Durch Nutzung einer TROSY Pulssequenz wird nur die Komponente des Quartetts ausgewählt, bei der sich die Relaxationsmechanismen nahezu aufheben und diese somit die langsamste Relaxation aufweist. Dadurch können schärfere Signale detektiert werden und die Qualität der Spektren großer Proteine bzw. Proteine mit geringer Rotationsdiffusion nimmt zu.

3.8.2.2. 3D NMR-Spektren für die Resonanzzuordnung

Für die Zuordnung von Proteinrückgratresonanzsignalen zu den korrespondierenden Kernen werden 3D-NMR-Experimente verwendet. Bei den im weiteren Verlauf beschriebenen 3D-NMR-

Experimenten sind immer drei oder mehr Kerne miteinander korreliert. Diese Korrelation kann sowohl intraresidual als auch interresidual erfolgen. Dadurch lassen sich die Aminosäuretypen identifizieren, zu denen die jeweiligen Resonanzsignale gehören und diese sequentiell den Aminosäuren der Peptidkette zuordnen. Zwei der drei Dimensionen bilden bei den hier beschriebenen Experimente die ^1H - und ^{15}N -Dimensionen eines 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum. Die dritte Dimension (z.B. eine ^{13}C -Dimension) wird typischerweise als Streifen bei einer gewählten chemischen Verschiebung eines [^1H , ^{15}N]-Korrelationssignals dargestellt.

Als Ausgangsspektren für die Zuordnung können ein 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC sowie ein 3D [^1H , ^{13}C , ^{15}N]-HNCACB (Wittekind & Mueller, 1993) aufgenommen werden. Mit diesen Spektren ist eine sequentielle Zuordnung der HN-Gruppen sowie der $^{13}\text{C}^\alpha$ - und der $^{13}\text{C}^\beta$ -Resonanzsignale möglich. In einem HNCACB-Spektrum sind die Resonanzen der Proteinrückgrat-HN-Gruppe der Aminosäure (i) mit den $^{13}\text{C}^\alpha$ und $^{13}\text{C}^\beta$ der eigenen Aminosäure (i), sowie mit den $^{13}\text{C}^\alpha$ und $^{13}\text{C}^\beta$ der Vorgängeraminosäure (i-1) korreliert. Dabei sind die Korrelationssignale mit den ^{13}C -Frequenzen der Vorgängeraminosäure in der Regel schwächer als die intraresiduellen Korrelationssignale. Dies beruht auf der kleineren Kopplungskonstante von N(i) zu $^{13}\text{C}^\alpha(\text{i-1})$ von ca. 8 Hz im Vergleich zur ca. 11 Hz Kopplungskonstante von N(i) zu $^{13}\text{C}^\alpha(\text{i})$. Des Weiteren haben $^{13}\text{C}^\alpha$ und $^{13}\text{C}^\beta$ Korrelationssignale im HNCACB-Spektrum entgegengesetzte Vorzeichen. Zur leichteren Identifizierung des $^{13}\text{C}^\alpha$ - und des $^{13}\text{C}^\beta$ -Resonanzsignals der Aminosäure (i-1) kann zusätzlich ein 3D [^1H , ^{13}C , ^{15}N]-CBCAcoNH-Spektrum (Grzesiek & Bax, 1992) aufgenommen werden. In diesem sind die Resonanzsignale der Proteinrückgrat-HN-Gruppen von (i) ausschließlich mit dem $^{13}\text{C}^\alpha$ - und dem $^{13}\text{C}^\beta$ -Resonanzsignal von (i-1) korreliert. Als drittes Spektrum zur sequentiellen Resonanzzuordnung der $^{13}\text{C}^\alpha$ -Resonanzsignale kann das 3D [^1H , ^{13}C , ^{15}N]-HNCA-Experiment (Kay et al. 1990) verwendet werden. In diesem Spektrum sind die Signale der Proteinrückgrat-HNs der Aminosäure (i) mit dem Resonanzsignal des eigenem $^{13}\text{C}^\alpha$, sowie dem $^{13}\text{C}^\alpha$ der Aminosäure (i-1) korreliert. Der Vorteil dieses Spektrums ist, dass es eine wesentlich höhere Empfindlichkeit hat als das 3D [^1H , ^{13}C , ^{15}N]-HNCACB. Die sequentielle Zuordnung der Streifen zu der jeweiligen Aminosäure in der Proteinsequenz erfolgt dann über die $^{13}\text{C}^\alpha$ und $^{13}\text{C}^\beta$ chemischen Verschiebungen, welche spezifische Werte für einige Aminosäuretypen besitzt. So zeigt Glycin keine $^{13}\text{C}^\beta$ chemische Verschiebung und eine $^{13}\text{C}^\alpha$ chemische Verschiebung zwischen 40 und 50 ppm. Die $^{13}\text{C}^\beta$ chemische Verschiebung von Alanin ist dagegen mit 15 bis 20 ppm stark hochfeldverschoben, wohingegen die $^{13}\text{C}^\beta$ chemische Verschiebung der übrigen Aminosäuren in der Regel bis maximal 25 ppm hochfeldverschoben ist. Ebenfalls spezifisch sind die $^{13}\text{C}^\beta$ chemischen Verschiebungen von Serin und Threonin, welche als einzige Aminosäuren stärker tieffeldverschobene $^{13}\text{C}^\beta$ als $^{13}\text{C}^\alpha$ Resonanzen aufweisen.

Nach der Zuordnung der HN-Resonanzsignale, sowie der $^{13}\text{C}^\alpha$ - und der $^{13}\text{C}^\beta$ -Resonanzsignale zu den jeweiligen Aminosäuren eines Proteins, können die Signale der Carbonyl-C-Atome zugeordnet

werden. Diese Zuordnung kann mit Hilfe eines [^1H , ^{13}C , ^{15}N]-HNCO-Experiments (Ikura et al. 1990) erreicht werden, in welchem die Aminogruppe von (i) mit dem Carbonyl-C-Signal von (i-1) korreliert ist. Bei diesem Experiment handelt es sich um eines der sensitivsten 3D-Experimente, die zur Zuordnung von Proteinerückgratresonanzsignalen genutzt werden, da zwischen dem Amidgruppen-N von (i) und dem Carbonyl-C von (i-1) eine Kopplungskonstante von ca. 15 Hz vorliegt. Als letzte Kernsorte müssen die $^1\text{H}^\alpha$ - und $^1\text{H}^\beta$ -Kerne zugeordnet werden, indem z.B. ein [^1H , ^1H , ^{15}N]-HBHAcNH-Experiment (Grzesiek & Bax, 1993) aufgenommen wird. In diesem Spektrum sind die Aminogruppen-Resonanzsignale von (i) mit den $^1\text{H}^\alpha$ - und $^1\text{H}^\beta$ -Resonanzsignalen der in der Peptidkette davor liegenden Aminosäure (i-1) korreliert. Bei allen bisher genannten Experimenten wird die Magnetisierung durch skalare Kopplung zwischen den Kernen übertragen.

Liegt eine starke Signalüberlagerung vor, so kann es hilfreich sein, zusätzlich ein 3D [^1H , ^1H , ^{15}N]-NOESY-HSQC-Spektrum zur Resonanzzuordnung zu verwenden. Da der NOE eine distanzabhängige Kreuzkorrelation zwischen zwei Protonen über den Raum beschreibt, können $^1\text{H}^\text{N}$ - $^1\text{H}^\text{N}$ -NOEs genutzt werden, um in Bereichen des Spektrums mit schlechter Dispersion die $^1\text{H}^\text{N}$ Signale von Kernen in benachbarten Aminosäuren anhand von sequentiellen $^1\text{H}^\text{N}$ - $^1\text{H}^\text{N}$ -NOEs zu identifizieren. Bei diesem Experiment wird die Magnetisierung zunächst durch skalare Kopplung vom ^{15}N -Kern auf den $^1\text{H}^\text{N}$ -Kern übertragen. Der anschließend gemessene NOE stellt dann eine dipolare Wechselwirkung zwischen zwei Protonen über den Raum dar.

3.8.3. Paramagnetische Relaxationsverstärkung

Mittels paramagnetischer Relaxationsverstärkung lassen sich unter anderem Protein-Protein-Interaktionen messen (Singh et al. 2012), Proteinstrukturen bestimmen (Battiste and Wagner, 2000; Gaponenko et al. 2000; Klammt et al. 2012) und pufferzugängliche Aminosäuren in mizellengebundenen Proteinen identifizieren (Damberg et al. 2001; Wittlich et al. 2009). Der Prozess der paramagnetischen Relaxationsverstärkung ist distanzabhängig und wird z.B. durch das ungepaarte Elektron von MTSL bzw. die ungepaarten Elektronen von Mn^{2+} hervorgerufen, welche mit räumlich nahen Kernspins interagieren. Ist zum Beispiel MTSL kovalent über ein Cystein an ein Protein gebunden, so zeigen alle Kernspins die einen Abstand von maximal 20 bis 25 Å von der Sonde haben eine verstärkte Relaxation (Battiste and Wagner, 2000). Diese Relaxationsverstärkung zeigt sich als Linienverbreiterung bis hin zum kompletten Verschwinden von Resonanzsignalen.

Zur Bestimmung von Protein-Strukturen wird MTSL an Einzel-Cystein-Varianten eines Proteins gebunden und zunächst ein [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektrum des Proteins aufgenommen. Da die Sonde in diesem Spektrum ihren paramagnetischen Zustand besitzt, zeigen Resonanzsignale in

räumlicher Nähe zur Sonde eine Linienverbreiterung. Nach Zugabe von Ascorbinsäure ist die Sonde diamagnetisch und es wird ein zweites [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektrum aufgenommen. Dieses diamagnetische Spektrum entspricht dann einem gewöhnlichen [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektrum des Proteins. Anschließend werden die Intensitäten jedes Resonanzsignals des paramagnetischen Spektrums (I_{para}) auf die Signalintensitäten des diamagnetischen Spektrums (I_{dia}) bezogen. Mit Hilfe dieser Intensitätsverhältnisse können die Abstände der jeweiligen betroffenen Aminosäure zur Sonde abgeschätzt werden (siehe Kapitel 3.8.6.2.) und für die Berechnung der Proteinstruktur genutzt werden (Klammt et al. 2013).

Pufferzugängliche Aminosäurereste eines mizelleninteragierenden Proteins können mittels Titration mit Mn^{2+} identifiziert werden (Damberg et al. 2001). Dazu wird zunächst ein [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum des Proteins in Abwesenheit von Mn^{2+} aufgenommen. Anschließend wird Mn^{2+} zur Proteinlösung titriert und jeweils ein [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum aufgenommen. Die Peakintensitäten der Resonanzsignale eines jeden Titrationsschrittes werden anschließend auf die Peakintensitäten in Abwesenheit von Mn^{2+} bezogen.

3.8.4. Chemical Shift Perturbation (CSP)

Die Interaktion eines Proteins mit einem Liganden führt zu einer Änderung der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale der an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste. Diese Änderungen werden in der Regel als Chemical Shift Perturbation (CSP) bezeichnet und eignen sich zur Bestimmung von Bindestellen in Proteinen (Zuiderweg, 2002). Dazu wird ein [^1H , ^{15}N]-markiertes Protein mittels [^1H , ^{15}N]-HSQC/TROSY-Spektrum detektiert und ein unmarkierter Ligand hinzutitriert. Somit kann die Änderung der chemischen Verschiebung der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration beobachtet werden. Je größer die CSP eines Resonanzsignals bei Anstieg der Ligandenkonzentration wird, desto wahrscheinlicher ist es, dass dieser Aminosäurerest direkt an der Interaktion beteiligt ist. Die CSP lässt sich mit folgender Gleichung (9) berechnen:

$$(9) \quad CSP = \sqrt{(\Delta\delta^1 H^N)^2 + \left(\frac{\Delta\delta^{15} N}{5}\right)^2}$$

Dabei werden $\Delta\delta^1\text{H}^N$ und $\Delta\delta^{15}\text{N}$ aus der Differenz der chemischen Verschiebung der $^1\text{H}^N$ - bzw. ^{15}N -Kerne in Abwesenheit des Liganden und der chemischen Verschiebung bei der jeweils vorliegenden Ligandenkonzentration berechnet. Die CSPs werden typischerweise als Balkendiagramm gegen die Aminosäuresequenz des detektierten Proteins aufgetragen.

Bei ausreichend vielen Titrationsschritten und einem schnellem Austausch zwischen gebundener und freier Form des Proteins können die CSPs eines Aminosäurerests gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen werden und zur Berechnung der Dissoziationskonstante (K_D) dieser Interaktion genutzt werden. Ein schneller Austausch mit einer Austauschrate $k > 10^5 \text{ s}^{-1}$ zeigt sich in einem $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC/TROSY-Spektrum durch eine kontinuierliche Änderung der chemischen Verschiebung der an der Bindung beteiligten Aminosäure. Dabei tritt keine Linienverbreiterung auf und bei Sättigung der Interaktion erreicht das Resonanzsignal seine maximale Änderung der chemischen Verschiebung. Die Differenz zwischen der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale der freien und der gebundenen Form ist dabei wesentlich kleiner als die Austauschrate k . Bei einem langsamen Austausch mit einer Austauschrate $k < 10 \text{ s}^{-1}$ dagegen kommt es zu einer Abnahme der Intensität des Resonanzsignals, das die freie Konformation des Proteins darstellt. Gleichzeitig erscheint ein zweites Resonanzsignal für diese Aminosäure, welches die ligandengebundene Form repräsentiert. Durch Erhöhung der Ligandenkonzentration verliert das Signal der freien Form an Stärke, wohingegen das Signal der gebundenen Form an Signalstärke zunimmt. Bei Sättigung der Interaktion ist das Signal der freien Form komplett verschwunden. Die Signalintensitäten bei jedem Titrationsschritt spiegeln die Anteile der gebundenen und freien Population des detektierten Proteins wider. Des Weiteren ist die Differenz der chemischen Verschiebung zwischen dem Resonanzsignal der freien und gebundenen Form wesentlich größer als die Austauschrate k . Als letztes ist der intermediäre Austausch zwischen ligandengebundener und freier Proteinform zu erwähnen. Dieser stellt eine Mischung aus langsamen und schnellen Austausch dar. Der intermediäre Austausch zeigt sich durch eine Änderung der chemischen Verschiebung in Verbindung mit einer Linienverbreiterung des Resonanzsignals einer an der Interaktion beteiligten Aminosäure. Bei dieser Art des Austausch ist die Differenz der chemischen Verschiebung der freien und gebundenen Form in etwa gleich der Austauschrate k .

3.8.5. Berechnung von Proteinstrukturen aus NMR-Daten

Für die Berechnung von Strukturen aus NMR-Daten werden Randbedingungen benötigt, bei denen es sich für gewöhnlich um Torsionwinkleinschränkungen und Distanzeinschränkungen handelt. Dabei stellen Distanzeinschränkungen zur Berechnung der Raumstruktur eines Proteins die wichtigsten Parameter dar. In den meisten Fällen werden diese Distanzeinschränkungen aus NOEs gewonnen, können aber auch aus PRE Daten (Kap. 3.8.3./3.8.7.5.2.) ermittelt werden. Zu Beginn der Strukturrechnung nach Nilges et al. (1998) werden zufällige Anfangskonformationen des Proteins generiert, die in der Regel energetisch ungünstig sind. Des Weiteren wird für das

System eine hohe Temperatur von 10000 K angenommen, was eine hohe kinetische Energie für die Atome bedeutet und diese sich somit während der Strukturrechnung leicht aus lokalen Minima bewegen können. Durch schrittweise Abkühlung des Systems falten sich die zufälligen Anfangskonformationen innerhalb der Randbedingung zu ihren energetisch günstigsten Konformationen. Diese Konformationen stellen die eigentliche Proteinstruktur auf Basis der experimentell bestimmten Daten dar. Da angenommen werden muss, dass mit den vorgegebenen Randbedingungen nicht die exakte Struktur berechnet werden kann, wird durch Wiederholen der Rechnung meist ein Ensemble aus 10 oder mehr Konformationen des Proteins berechnet. Die Genauigkeit der Strukturen wird mit Hilfe des RMSD (Root Mean Square Deviation) quantifiziert, der zum Beispiel die Abweichung der Atomkoordinaten eines Ensembles von den Atomkoordinaten der energetisch günstigsten Struktur oder der Durchschnittsstruktur eines Ensembles in Angström angibt.

3.8.6. Dynamiken des Proteinrückgrats

Neben der reinen Aufklärung von Proteinstrukturen lassen sich auch Dynamiken des Proteinrückgrats mit Hilfe der NMR-Spektroskopie charakterisieren. Die globale Rotationskorrelationszeit des Proteins und lokale Bewegungen von Atomkernen bzw. Bindungsvektoren innerhalb des Proteins haben einen Einfluss auf die zeitliche Änderung der lokalen Magnetfelder am Ort des Kernspins. Diese Fluktuationen führen wiederum zu unterschiedlichen Relaxationszeiten der einzelnen Kerne. Um diese Unterschiede zu bestimmen, werden die longitudinale Relaxationsrate R_1 der ^{15}N -Kerne, die transversale Relaxationsrate R_2 der ^{15}N -Kerne und das heteronukleare $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -NOE-Verhältnis (hetNOE) ermittelt. Die Bestimmung dieser drei Parameter liefert in erster Linie Informationen über dynamische Prozesse des Proteins auf der Pico- bis Nanosekunden Zeitskala.

Um die hetNOE-Verhältnisse zu bestimmen, wird ein 2D-Spektrum des Proteins mit angeregtem $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -NOE durch Sättigung des Amidprotons während der Relaxationswartezeit (d_1) aufgenommen. Bei einem zweiten Spektrum fehlt die Sättigung (Farrow et al. 1994). Durch Normalisieren der Intensitäten der Resonanzsignale des gesättigten Spektrums auf die Intensitäten des ungesättigten Spektrums wird der hetNOE berechnet. Für rigide Bereiche, die in ihrer Bewegung eingeschränkt sind treten hetNOEs von bis zu 0,78 auf, wohingegen flexible Bereiche geringe hetNOE Werte aufweisen oder sogar negative hetNOEs besitzen können (Kay et al. 1989).

Für die Bestimmung der ^{15}N T_1 -Zeit wird eine Serie von 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC basierten Spektren aufgenommen, bei denen eine sogenannte Inversion-Recovery-Zeit τ eingefügt wird (Farrow et al.

1994). Bei der Messung wird die ^{15}N Magnetisierung zu Beginn durch einen 180° Puls in Richtung -z gedreht. Anschließend wird die Zeit τ gewartet und die Spins können relaxieren. Darauf folgt ein 90° Puls aus -x, der die ^{15}N -Magnetisierung in Richtung y dreht, worauf das Signal detektiert werden kann. Durch Variation von τ detektiert man die Kernspins immer in einem veränderten Relaxationszustand, was zu Spektren mit unterschiedlicher Signalintensität führt. Durch diese Serie lässt sich anhand der Intensitäten die T_1 -Zeit der Kernspins bestimmen aus denen sich die Relaxationsraten R_1 der Kerne berechnen lassen.

Die ^{15}N T_2 -Zeit kann entweder direkt mit Hilfe eines CPMG-Experiments (Loria et al. 1999; Tollinger et al. 2001) oder, wie in dieser Arbeit, nach Korzhnev et al. (2002) indirekt über die ^{15}N $T_{1\rho}$ -Zeit ermittelt werden. Der Vorteil der Bestimmung mittels $T_{1\rho}$ liegt darin, dass T_2 auch im Falle eines chemischen Austausch exakt bestimmt werden kann. Die Zeit $T_{1\rho}$ ist die Rotations-Spin-Gitter Relaxationszeit, welche bei isotropen Bedingungen gleich der T_2 -Zeit ist. Zum Messen von $T_{1\rho}$ wird eine Serie von Spektren aufgenommen, bei denen die sogenannte Spin-Lock-Periode variiert wird. Während dieser Spin-Lock-Periode wird die Magnetisierung in der transversalen Ebene fixiert. Dadurch werden Spektren mit unterschiedlichen Signalintensitäten erhalten mit denen anschließend die $T_{1\rho}$ -Zeiten der Spins ermittelt werden können. Nach Berechnung von ^{15}N R_1 und ^{15}N $R_{1\rho}$ kann mit diesen sowie der Stärke des Spin-Lock-Feldes nach Tjandra et al. (1996) die transversale Relaxationsrate R_2 berechnet werden.

3.8.7. NMR-Spektroskopie mit HIV-2 Vpr

3.8.7.1. NMR-Spektrometer

Alle NMR-Messungen wurden an Varian Unity INOVA oder VNMRS NMR-Spektrometern mit Protonenlarmorfrequenzen von 600 MHz, 800 MHz oder 900 MHz durchgeführt. Die NMR-Spektrometer waren mit cryogengekühlten 5 mm Z-PFG ^1H - $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ -Probenköpfen ausgestattet. Des Weiteren wurde ein 600 MHz Varian Unity INOVA NMR-Spektrometer genutzt, welches mit einem Raumtemperatur-XYZ-PFG- ^1H - $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^{31}\text{P}\}$ -Probenkopf ausgestattet war. Eine Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz entspricht einer Magnetfeldstärke von 14,1 Tesla, 800 MHz entsprechen 18,8 Tesla und 900 MHz entsprechen 21,2 Tesla.

3.8.7.2. Probenvorbereitung

Für alle NMR-Experimente wurden 5 mm Shigemi-Rundröhrchen des Typs BMS-005V verwendet. Für die 3D NMR-Experimente zur Resonanzzuordnung (Tab. 3.14) des HIV-2 Vpr Rückgrats wurden 500 μM Vpr in NMR-Puffer (Tab. 3.12) gelöst. Die Experimente zur Bestimmung der

Dynamiken des Proteinerückgrats (^{15}N T_1 , ^{15}N $T_{1\rho}$, hetNOE), sowie die Titration von Mn^{2+} zu Vpr wurden ebenfalls in NMR-Puffer durchgeführt. Des Weiteren wurde ein HSQC-Spektrum von HIV-2 Vpr in 30 % AcN- d_3 /70 % H_2O bei pH 2,5 aufgenommen. Dazu wurde Vpr zweimal für 24 h gegen je 4 l 30 % AcN/70 % H_2O dialysiert, dann lyophilisiert und schließlich in 30 % AcN- d_3 /70 % H_2O gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes auf pH 2,5 wurde die Lösung in ein Shigemi-Rundröhrchen gefüllt.

Tabelle 3.12: Teilweise für die NMR-Messungen verwendete Puffer

NMR-Puffer	DPC-Titrations-Puffer
10 mM Natriumazetat, pH 5	10 mM Natriumazetat, pH 5
50 mM NaCl	50 mM NaCl
50 mM DPC	0,5 mM DPC
5 mM β -ME	5 mM β -ME
10 % D_2O	10 % D_2O

Die Experimente mit Vpr in DMPC-Nanodisks wurden in DPC-freiem NMR-Puffer aufgenommen. Dazu wurden die Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks oder leere MSP1D1-DMPC-Nanodisks bzw. leere MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks jeweils in einem Dialyseschlauch mit einem MWCO von 3,5 kDa bei Raumtemperatur in DPC-freiem NMR-Puffer dialysiert. Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks konnten anschließend sofort in ein Shigemi-Rundröhrchen gefüllt und für die NMR-Experimente genutzt werden. Zu leeren MSP1D1-DMPC-Nanodisks bzw. MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks wurde Vpr im molaren Verhältnis von 1:1 gegeben. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Rollschüttler inkubiert und anschließend für eine Minute bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Shigemi-Rundröhrchen gefüllt und für die NMR-Experimente verwendet. Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks wurden nach der Gelfiltration mittels Zentrifugation in einem Vivaspin 2 (MWCO 10 kDa) auf eine Konzentration von 70 μM eingengt und anschließend nach Zugabe von D_2O bis zu einer Endkonzentration von 10 % für die NMR-Messungen in ein Shigemi-Rundröhrchen gefüllt.

Für die Titration von DPC zu HIV-2 Vpr wurde gereinigtes Vpr zweimal für 24 h gegen je 4 l H_2O dialysiert und daraufhin lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Vpr wurde anschließend in DPC-Titrations-Puffer (Tab. 3.12) gelöst und für die NMR-Messungen in ein Shigemi-Rundröhrchen gefüllt.

Für die Bestimmung der globalen Struktur des Vpr wurde das Protein wie in Kapitel 3.5. beschrieben in NMR-SL-Puffer überführt. Als Kontrolle, ob eine unspezifische Interaktion von MTSL mit Vpr vorlag, wurden 500 μM freies MTSL zu 100 μM Vpr in NMR-Puffer gegeben.

Für die Titration des HIV-2 p6 zu Vpr wurde p6 zunächst 2 x 14 h gegen je 3 l H₂O in einem Dialyseschlauch mit einem MWCO von 1 kDa dialysiert und dann gefriergetrocknet. Von HIV-2 Vpr wurde eine 8 µM Probe in 400 µl NMR-Puffer hergestellt. Aus dieser Probe wurden 320 µl in ein Shigemi-Rundröhrchen gefüllt. Die übrigen 80 µl wurden genutzt, um das gefriergetrocknete p6 zu lösen. Somit wurde gewährleistet, dass bei der Titration des p6 zu Vpr, bei jedem Titrationsschritt eine konstante Konzentration von 8 µM Vpr in der Probe vorhanden war.

In Tabelle 3.13 sind alle genutzten NMR-Proben aufgelistet, sowie das durchgeführte Experiment und der Stock des hinzutitrierten Liganden bzw. der hinzutitrierten Chemikalie.

Tabelle 3.13: Hergestellte NMR-Proben von Vpr

NMR-Probe	Puffer	Experiment	Titrationssstock
500 µM [U- ¹³ C/ ¹⁵ N]-Vpr	NMR-Puffer	3D-Experimente mit Vpr	
120 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr	30 % AcN-d ₃ / 70 % H ₂ O pH 2,5	Bedingungen von Morellet et al. (2003) für HIV-1 Vpr	
70 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr_C81-SL	NMR-SL-Puffer	PRE-Experiment	200 mM Ascorbinsäure in NMR-SL-Puffer
120 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr_C81S_F39C-SL	NMR-SL-Puffer	PRE-Experiment	200 mM Ascorbinsäure in NMR-SL-Puffer
100 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr + 500 µM MTSL	NMR-Puffer	Negativkontrolle zu PRE-Experiment	200 mM Ascorbinsäure in NMR-SL-Puffer
400 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr	NMR-Puffer	Dynamiken des Proteinrückgrats von Vpr	
400 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr	NMR-Puffer	Titration von Mn ²⁺ zu Vpr	12 mM Mn ²⁺ in NMR-Puffer
100 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr	DPC-Titrations-Puffer	Titration von DPC zu Vpr	2 M DPC in NMR-Puffer
70-120 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks	DPC-freier NMR-Puffer	Vpr-Nanodisks bzw. Hinzugabe von Vpr zu assemblierten Nanodisks	
100 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr-MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks	DPC-freier NMR-Puffer	Hinzugabe von Vpr zu assemblierten Nandodisks	
70 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks	ND-SEC-Puffer +10 % D ₂ O	Vpr-Nanodisks	
8 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr	NMR-Puffer	Titration von p6 zu Vpr	500 µM p6 + 8 µM [U- ¹⁵ N]-Vpr in NMR-Puffer

3.8.7.3. NMR-Experimente

Zur strukturellen Charakterisierung des HIV-2 Vpr sowie zur Untersuchung der Vpr-p6-Interaktion wurden verschiedene 2D- und 3D-NMR-Experimente aufgenommen. In Tabelle 3.14 sind die aufgenommenen NMR-Spektren, mit dazugehörigen Parametern aufgelistet. Die chemischen Verschiebungen der Protonendimensionen wurden direkt auf das ^1H -Signal der Methylgruppen von DSS referenziert. Die chemischen Verschiebungen der ^{15}N - und ^{13}C -Dimensionen wurden indirekt mittels der Frequenzverhältnisse von $^{15}\text{N}/^1\text{H}=0,101329118$ bzw. $^{13}\text{C}/^1\text{H}=0,25144953$ auf das ^1H -Signal der Methylgruppen von DSS referenziert (Wishart et al. 1995).

3.8.7.4. Proteinrückgratresonanzzuordnung von Vpr

Die Experimente zur Resonanzzuordnung des Vpr wurden mit 500 μM $[\text{U-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]$ -Vpr in NMR-Puffer (Tab. 3.12) bei einer Temperatur von 40 °C durchgeführt. Für die Zuordnung wurden ein 2D $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-, ein 3D HNCACB-, ein 3D CBCAcoNH-, ein 3D HBHAcoNH-, ein 3D HNCO-, ein 3D HNCA- und ein 3D $[^1\text{H}, ^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -NOESY-HSQC-Spektrum von HIV-2 Vpr aufgenommen. Die Spektren wurden mit nmrPipe (Delaglio et al. 1995) prozessiert. Die Zuordnung wurde mit CcpnNmr Analysis durchgeführt (Vranken et al. 2005).

3.8.7.5. Bestimmung der globalen Proteinrückgratstruktur des Vpr

Zur Bestimmung der globalen Faltung des HIV-2 Vpr wurden NOEs kurzer Reichweite, Torsionswinkel sowie auf paramagnetische Relaxationsverstärkung basierte Abstände genutzt.

Tabelle 3.14: Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente. Dabei stehen sw_1 - sw_3 für die aufgenommene spektrale Weite in der jeweiligen Dimension, t_1 - t_3 für die aufgenommenen komplexen Punkte in der jeweiligen Dimension, nt für die Anzahl der Experimentwiederholungen, $d1$ für die Relaxationswartezeit zwischen zwei Wiederholungen, mix für die Mischzeit im NOESY-Experiment, $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ für die Trägerfrequenz des jeweiligen Kerns und ω_1 - ω_3 für die Anzahl der realen Punkte nach dem Prozessieren.

NMR-Experiment	sw_1	t_1	sw_2	t_2	sw_3	t_3	nt	$d1$	mix	^{15}N	^{13}C	ω_1	ω_2	ω_3
	[ppm]	[Pkt.]	[ppm]	[Pkt.]	[ppm]	[Pkt.]		[s]	[ms]	[ppm]	[ppm]	[Pkt.]	[Pkt.]	[Pkt.]
2D [^1H , ^{15}N]-HSQC (Resonanzzuordnung)	32,9	400	13,4	1500	-	-	8	1,5	-	119,37	-	2822	4096	-
2D [^1H , ^{15}N]-HSQC (Mn^{2+} -Titration)	31	144	13,3	1024	-	-	32	1,5	-	117,716	-	2048	2048	-
2D [^1H , ^{15}N]-HSQC (MTSL negativ Kontrolle)	31	256	13,4	1730	-	-	16	1,75	-	119,943	-	2048	4096	-
2D [^1H , ^{15}N]-TROSY (Strukturbestimmung)	31	256	16	1228	-	-	64	1,5	-	117,714	-	2048	2048	-
2D [^1H , ^{15}N]-TROSY (DPC-Titration)	36,2	160	13,3	1024	-	-	60	1,5	-	117,705	-	2827	8192	-
2D [^1H , ^{15}N]-TROSY (p6-Titration)	29	256	16,1	2048	-	-	128	1,25	-	118,002	-	2048	2048	-
2D [^1H , ^{15}N]-HSQC (DMPC-Nanodisks)	31	256	16	1228	-	-	128	1,5	-	117,682	-	2048	2048	-
2D [^1H , ^{15}N]-TROSY (DMPC-Nanodisks)	36,2	200	13,3	1024	-	-	180	1,5	-	117,705	-	2827	8192	-
2D [^1H , ^{15}N]-HSQC (POPC-Nanodisks)	31,5	512	14,1	1440	-	-	200	1,25	-	117,604	-	2677	4096	-
3D HNCACB	19,3	70	56,1	280	13,4	1536	16	1,4	-	120,95	44,327	308	1024	2048
3D CBCAcoNH	19,3	70	56,1	152	13,4	1538	16	1,4	-	120,95	44,327	308	1024	2048
3D HBHAcoNH	19,3	70	3,9	120	13,4	1536	16	1,5	-	120,95	-	128	921	4096
3D HNCO	19,3	70	13,3	120	13,4	1536	8	1,2	-	120,96	175,993	128	921	4096
3D HNCA	29,6	70	25,9	96	13,3	1024	32	1,5	-	118,676	55,663	128	128	1024
3D [^1H , ^1H , ^{15}N]-NOESY-HSQC	19,3	70	4,7	130	15,6	1496	24	1,5	120	120,93	-	128	867	2048
2D [^1H , ^{15}N]- $T_{1\rho}$ (14,1 T)	36,2	256	13,3	1024	-	-	24	2	-	117,724	-	512	2048	-
2D [^1H , ^{15}N]- T_1 (14,1 T)	36,2	256	13,3	1024	-	-	24	2	-	117,857	-	512	2048	-
2D [^1H , ^{15}N]-hetNOE (14,1 T)	36,2	256	13,3	1024	-	-	40	15/9	-	117,724	-	512	2048	-
2D [^1H , ^{15}N]- $T_{1\rho}$ (18,8 T)	30	192	16,1	1650	-	-	16	3	-	117,992	-	512	2048	-
2D [^1H , ^{15}N]- T_1 (18,8 T)	30	192	16,1	1664	-	-	16	3	-	117,992	-	512	2048	-
2D [^1H , ^{15}N]-hetNOE (18,8 T)	30	192	16,1	1650	-	-	24	15/9	-	117,992	-	512	2048	-

3.8.7.5.1. Bestimmung der Torsionswinkeleinschränkungen

Die Torsionswinkeleinschränkungen für HIV-2 Vpr wurden mit Hilfe der chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats und dem Programm TALOS-N (Shen und Bax, 2013) bestimmt. Das Programm nutzt die chemischen Verschiebungen von $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^1\text{H}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}^{\beta}$ und $^{13}\text{C}^{\text{O}}$ sowie die Aminosäuresequenz des Proteins zur Bestimmung der Sekundärstrukturwahrscheinlichkeit und Winkeleinschränkungen. Diese Vorhersage der Torsionswinkel und Sekundärstruktur wird vom Programm TALOS-N erreicht, durch den Vergleich der chemischen Verschiebungen des Vpr mit einer Datenbank, welche die chemischen Verschiebungen von 10.103 Proteinen bekannter Struktur enthält.

Die bestimmte Sekundärstrukturwahrscheinlichkeit für jeden Rest des Vpr wurde zur Analyse gegen die Aminosäuresequenz des Vpr aufgetragen. Die Torsionswinkeleinschränkungen wurden für die Strukturrechnung (Kapitel 3.8.7.5.3.) genutzt.

3.8.7.5.2. Bestimmung von PRE-basierten Abständen

Um Abstandsinformationen einzelner Reste innerhalb des Vpr zu erhalten, wurde die paramagnetische Sonde MTSL an das natürlich vorkommende C81 des Vpr gebunden. Des Weiteren wurde MTSL an die Einzel-Cystein-Variante Vpr_C81S_F39C gebunden und für die NMR-Messungen genutzt (Proben siehe Tab. 3.13). Von Vpr_C81-SL bzw. Vpr_C81S_F39C-SL wurde zunächst je ein 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektrum in NMR-SL-Puffer (Tab. 3.10) bei 40 °C und einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz aufgenommen. Da in diesem Experiment das Spinlabel (SL) paramagnetisch war, wurde anschließend Ascorbinsäure in 10-fachem Überschuss über Vpr_C81-SL bzw. Vpr_C81_F39C-SL in die Probe gegeben und diese für 45 min bei 40 °C inkubiert. Daraufhin wurde ein zweites 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektrum mit dem dann diamagnetischen SL aufgenommen.

Als Negativkontrolle, zum Ausschließen einer unspezifischen Interaktion zwischen Vpr und MTSL, wurden 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektren von 100 μM Vpr in Anwesenheit von 500 μM freiem MSTL in NMR-Puffer aufgenommen. Nach Aufnahme des paramagnetischen Spektrums wurde MTSL durch Zugabe von 5 mM Ascorbinsäure reduziert und ein zweites, diamagnetisches Spektrum von Vpr aufgenommen.

Alle Spektren wurden mit nmrPipe prozessiert. Anschließend konnten diese mit CcpnNmr Analysis analysiert und die Signalintensitäten mit CcpnNmr bestimmt werden. Aus den Signalintensitäten des paramagnetischen Spektrums (I_{para}) und des diamagnetischen Spektrums (I_{dia}) wurden anschließend mit Hilfe von Gleichung 10 die Intensitätsverhältnisse (I_{ratio}) bestimmt.

$$(10) \quad I_{ratio} = \frac{I_{para}}{I_{dia}}$$

Die Distanzen zwischen SL und betroffener Aminosäure wurden ausgehend von I_{ratio} berechnet. Dabei wurde vorgegangen wie von Battiste & Wagner (2000) sowie Klammt et al. (2012) beschrieben. Dafür wurde das I_{ratio} aller Aminosäure auf das I_{ratio} einer ausgewählten Aminosäure des selben Datensatzes normiert, die nicht von der paramagnetischen Sonde beeinflusst war und ein I_{ratio} von ~ 1 aufwies. Mit Hilfe dieses normierten Intensitätsverhältnisses (I_{norm}) wurde anschließend die Rate der paramagnetischen Relaxationsverstärkung R_2^{sp} mit Hilfe der folgenden Gleichung (11) berechnet (Battiste & Wagner, 2002).

$$(11) \quad I_{norm} = \frac{R_2 \cdot \exp(-R_2^{sp} \cdot t)}{R_2 + R_2^{sp}} .$$

In dieser Gleichung ist R_2 die Rate der T_2 -Relaxation des jeweiligen Amids, welche mit Hilfe von R_{1rho} und R_1 bei einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz ermittelt wurde (Kapitel 3.8.7.6.). Der Parameter t ist die INEPT-Zeit des TROSY-Experiments, welche ~ 9 ms betrug.

Die R_2^{sp} Rate jeder Aminosäure von Vpr wurde dann genutzt, um mit Gleichung 12 die Distanz zwischen der Sonde und der jeweiligen Aminogruppe zu berechnen (Battiste & Wagner, 2002).

$$(12) \quad r = \left[\frac{K}{R_2^{sp}} \cdot \left(4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_H^2 \cdot \tau_c^2} \right) \right]^{1/6}$$

In Gleichung 12 ist r der Abstand des ungepaarten Elektrons des SL zum Kernspin, τ_c die Korrelationszeit der Elektron-Kernspin-Interaktion, ω_H ist die bei der Messung genutzte Larmorfrequenz (600 MHz) und K der Wert $1,23 \cdot 10^{-32} \text{ cm}^6 \text{ s}^{-2}$. Für τ_c wurde die globale Rotationskorrelationszeit des Vpr-DPC-Mizellen Komplex genommen, welche mit Hilfe der Spektralen Dichtefunktionen der Relaxationsdaten bei 600 MHz erhalten wurde (Kapitel 3.8.7.6.2.). Mit Hilfe der berechneten Distanzen wurden daraufhin maximale und minimale Distanzeinschränkungen für die Abstände definiert. Dabei wurde eine Abstandseinschränkung immer vom $^{13}\text{C}^\beta$ der MTSL markierten Aminosäure (C81 bzw. F39) zum Amidproton der paramagnetisch betroffenen Aminosäure nach Klammt et al. (2012) definiert. Für Korrelationssignale mit einer I_{norm} von $< 0,15$ wurde lediglich eine maximale Distanzeinschränkung von 15 Å definiert. Für Resonanzsignale mit I_{norm} zwischen 0,15 und 0,9 wurden maximale und minimale Distanzeinschränkungen von $r \pm 4$ Å definiert. Wurde eine I_{norm} von $> 0,9$ berechnet, so wurde nur

eine minimale Distanzeinschränkung von 25 Å für die spätere Strukturrechnung (Kapitel 3.8.7.5.3) genutzt. Waren sowohl die paramagnetische Sonde als auch die paramagnetisch betroffene Aminosäure in einem unstrukturierten Bereich des Vpr, so wurde nur eine minimale Distanzeinschränkung ($r - 4$ Å) für die Berechnung der globalen Struktur genutzt. Aminosäuren in unstrukturierten Bereichen wurden durch die Sekundärstrukturvorhersage durch TALOS-N (Kap. 3.8.7.5.1.) identifiziert.

3.8.7.5.3. Strukturrechnung

Die globale Proteinrückgratstruktur/Faltung des Vpr in DPC-Mizellen wurde mit dem Programm Cyana (Version 2.1) berechnet. Das Programm berechnete mit Hilfe von Randbedingungen, aus Torsionswinkeleinschränkungen und Distanzeinschränkungen, ausgehend von einer Schar zufälliger Anfangskonformationen die Struktur von HIV-2 Vpr. Die Definition der PRE-basierten Abstände sowie die Wahl der Distanzeinschränkungen der kurzreichweitigen NOEs und Wasserstoffbrückenbindungen erfolgte nach Klammt et al. (2012)

Für die Strukturberechnung des Vpr wurden 99 Torsionswinkeleinschränkungen, 55 maximale PRE-basierte Distanzeinschränkungen, sowie 104 minimale PRE-basierte Distanzeinschränkungen genutzt (Kapitel 3.8.7.5.1. und 3.8.7.5.2.). Des Weiteren wurden 44 kurzreichweitige $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^1\text{H}^{\text{N}}$ -NOEs für die Berechnung verwendet. Davon waren 37 NOEs in Bereichen, die durch die Sekundärstrukturberechnung mittels TALOS-N als α -helikal definiert wurden. Für $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^1\text{H}^{\text{N}}$ -NOEs von (i) zu (i-1) wurden als minimale bzw. maximale Distanzeinschränkungen 2 Å bzw. 4 Å manuell definiert. Für $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^1\text{H}^{\text{N}}$ -NOEs von (i) zu (i-2) wurden die Limits manuell mit 3,5 Å bzw. 5,5 Å festgesetzt. Wie auch bei Klammt et al. (2012) wurden α -Helix typische Wasserstoffbrückenbindungen für Bereiche mit α -helikalen Torsionswinkeleinschränkungen manuell eingefügt.

Die Berechnung erfolgte anschließend ausgehend von einer Schar zufälliger Anfangskonformationen, die unter Berücksichtigung der Randbedingungen in jeweils 13000 Schritten zur Berechnung einer Vpr Konformation führte. Es wurden 200 Strukturen von Vpr berechnet und die 10 energetisch günstigsten zur Analyse extrahiert. Die Strukturen wurden mit PyMOL visualisiert und analysiert sowie mit Hilfe des Programms PROCHECK-NMR validiert.

3.8.7.6. Ermittlung der Dynamiken des Proteinrückgrats von Vpr

Die Dynamiken des Proteinrückgrats von HIV-2 Vpr wurden bei Magnetfeldstärken von 14,1 Tesla und 18,8 Tesla durch ^{15}N T_1 -, ^{15}N $T_{1\rho}$ - und $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -hetNOE-Experimente bestimmt. Alle Messungen wurden bei 40 °C mit HIV-2 Vpr in NMR-Puffer (Tab. 3.12) aufgenommen.

Für die T_1 -Experimente wurden pro Magnetfeldstärke 13 Spektren mit Inversion-Recovery-Zeiten von 0-1197 ms und einer d1-Zeit von 2 sec (14,1 Tesla) bzw. 3 sec (18,8 Tesla) aufgenommen. Als $T_{1\rho}$ -Experiment wurden pro Magnetfeldstärke 14 Spektren mit Spin-Lock Perioden von 2-100 ms bei d1-Zeiten von 2 sec (14,1 Tesla) bzw. 3 sec (18,8 Tesla) aufgenommen. Die Spin-Lock-Feldstärke entsprach bei diesen Experimenten 1,4 kHz (14,1 Tesla) und 1,8 kHz (18,8 Tesla). Als $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -hetNOE-Experimente wurden bei beiden Magnetfeldstärken jeweils ein Spektrum mit sowie ein zweites Spektrum ohne Protonensättigung während einer d1-Zeit von 15 s aufgenommen.

Aus den T_1 - und $T_{1\rho}$ -Experimenten wurden nach dem Prozessieren (nmrPipe) mit Hilfe von CcpnNmr Analysis die T_1 - bzw. $T_{1\rho}$ -Zeiten für die Aminosäurereste des Vpr bei der jeweiligen Magnetfeldstärke ermittelt. Diese Zeiten wurden anschließend in R_1 bzw. $R_{1\rho}$ Raten umgerechnet. Die R_2 Raten wurden aus den R_1 und $R_{1\rho}$ Raten mit Hilfe eines im ICS-6 (AG Willbold) vorliegenden Skripts berechnet. Zur Analyse der Dynamiken des Vpr wurden die R_1 und R_2 Raten gegen die Sequenz des Vpr aufgetragen.

Die $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -hetNOE-Spektren wurden nach dem Prozessieren (nmrPipe) mittels nmrView analysiert. Die Verhältnisse der Signalintensitäten wurden durch die Spektren mit und ohne Protonensättigung für beide Magnetfeldstärken mit Hilfe des Programms nmrView und einem im ICS-6 vorliegenden Skripts berechnet. Die Intensitätsverhältnisse wurden zur Analyse gegen die Sequenz des Vpr aufgetragen.

3.8.7.6.1. Tensor2

Die ^{15}N R_1 und ^{15}N R_2 Raten sowie die Verhältnisse aus den $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -hetNOE-Experimenten wurden für eine Model-Free Analyse (Lipari and Szabo, 1982) mit Hilfe der Software Tensor2 (Dosset et al. 2000) genutzt. Es wurde eine isotrope Rotation für einen Komplex aus Vpr und DPC-Mizelle angenommen, wodurch es nicht nötig war, eine Proteinstruktur für die Analyse in Tensor2 einzuladen. Für die Analyse wurde die Anisotropie der ^{15}N chemischen Verschiebung mit -172 ppm und die Länge der N-H-Bindung mit 1,02 Å angegeben. Anschließend wurden 500 Monte Carlo Simulationen zum Erlangen der Model-Free Parameter durchgeführt. Diese Analyse wurde für beide Magnetfeldstärken unabhängig voneinander durchgeführt. Bei der Analyse der Relaxationsdaten mittels Tensor2 wurde wie in der Anleitung des Programms beschrieben vorgegangen.

Einer der wichtigsten Parameter den man mit einer Model-Free Analyse erhält ist der generalisierte Ordnungsparameter S^2 , welcher Auskunft über flexible und rigide Bereiche eines Proteins gibt. Ein S^2 -Wert von 0 bedeutet, dass es sich um einen hochflexiblen Aminosäurerest

handelt, wohingegen ein S^2 -Wert von 1 auf einen sehr rigiden Rest hindeutet, der lediglich durch die Rotation des gesamten Moleküls Bewegung erfährt. Des Weiteren erhält man eine chemische Austauschrate R_{ex} , die unter anderem Indizien für Aminosäuren liefert, die sich in einem konformationellen Austausch befinden. Die interne Korrelationszeit τ_e liefert Hinweise über die interne Bewegung der einzelnen Aminogruppen im Protein auf der Pico- bis Nanosekunden-Skala. Ausserdem berechnet Tensor2 die globale Rotationskorrelationszeit τ_c eines Proteins. Diese wurde genutzt, um mit Hilfe der Stokesschen-Gleichung (Gleichung 13) den hydrodynamischen Radius r_h des Vpr-DPC-Mizellen-Komplexes abzuschätzen.

$$(13) \quad \tau_c = \frac{4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_h^3}{3 \cdot k_B \cdot T}$$

In Gleichung 13 gibt η die Viskosität des Lösungsmittels und T die Messtemperatur in Kelvin an.

3.8.7.6.2. Spektrale Dichtefunktion

Als weitere Methode lassen sich Relaxationsdaten von Proteinen mittels der spektralen Dichtefunktion analysieren. Wie bereits in Kapitel 3.8.1 erwähnt existieren in einem B_0 -Feld lokale Magnetfelder an den Kernspins. Diese lokalen Felder haben eine Zeitabhängigkeit, die aus der Molekularbewegung des Proteins resultiert. Besonders die Rotationsdiffusion hat einen großen Einfluss auf diese lokalen Felder und die Bewegung des Moleküls kann mit Hilfe einer Korrelationsfunktion charakterisiert werden. Diese Korrelationsfunktion ist eine Funktion der Zeit, welche nach einer Fourier-Transformation als Funktion der Frequenz dargestellt werden kann. Diese Funktion der Frequenz gibt Hinweise auf die dynamischen Prozesse eines Molekül.

Mit den Relaxationsdaten des Vpr bei 14,1 Tesla und 18,8 Tesla wurde jeweils ein sogenanntes reduziertes Spektrale-Dichte-Mapping durchgeführt (Farrow et al. 1995). Es wurden die ^{15}N R_1 und ^{15}N R_2 Raten sowie die hetNOE-Werte genutzt. Die Berechnung wurde mit einem im ICS-6 (AG Willbold) vorliegenden Python-Skript durchgeführt, welches die Funktionen nach Farrow et al. (1995) mit Hilfe der Gleichungen 14, 15, und 16 berechnete.

$$(14) \quad J(\omega_H) = \left(\frac{4}{5 \cdot d^2} \right) \cdot \left(\frac{\gamma_N}{\gamma_H} \right) \cdot \left(\frac{\text{hetNOE} - 1}{T_1} \right)$$

$$(15) \quad J(\omega_N) = \frac{\frac{1}{T_1} - \frac{7 \cdot d^2}{4} \cdot J(\omega_H)}{\frac{3 \cdot d^2}{4} + c^2}$$

$$(16) \quad J(0) = \frac{\frac{1}{T_2} - \left(\frac{3 \cdot d^2}{8} + \frac{c^2}{2}\right) \cdot J(\omega_N) - \frac{13 \cdot d^2}{8} \cdot J(\omega_H)}{\frac{d^2}{2} - \frac{2 \cdot c^2}{3}}$$

Dabei sind γ_N und γ_H die gyromagnetischen Verhältnisse von ^{15}N und ^1H . Der Faktor d ist durch die Gleichung 17 und Faktor c durch die Gleichung 18 definiert.

$$(17) \quad d = \left(\frac{\mu_0 \cdot h \cdot \gamma_N \cdot \gamma_H}{8 \cdot \pi^2} \right) \cdot \frac{1}{r_{NH}^3}$$

$$(18) \quad c = \frac{\omega_N}{\sqrt{3}} \cdot (\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})$$

In diesen Gleichungen ist μ_0 die Vakuumpermeabilität, h ist das Planck'sche Wirkungsquantum und r_{NH} die Länge der Amidbindung (1,02 Å). Die beiden Faktoren $\sigma_{\parallel}$ und $\sigma_{\perp}$ sind die parallele und senkrechte Komponente des axial-symmetrischen Tensors der chemischen Verschiebung. Die erhaltenen reduzierten spektralen Dichten $J(\omega_H)$, $J(\omega_N)$ und $J(0)$ wurden als Funktion der Aminosäuresequenz des Vpr abgebildet. Diese Funktionen liefern laut Fairbrother et al. (1998) Hinweise auf die Bewegung der Aminosäurereste in einem Protein. Die $J(0)$ -Werte sind sowohl für schnelle als auch langsame Bewegungen sensitiv. So deuten $J(0)$ -Werte die signifikant kleiner sind als der Mittelwert auf interne Bewegungen im Piko- bis Nanosekunden Bereich hin. $J(0)$ -Werte die signifikant größer sind als der Mittelwert liefern dagegen Indizien für konformationelle Änderungen auf der Mikro- bis Millisekunden Zeitskala. Werte von $J(\omega_H)$, die größer sind als der Durchschnittswert sowie in einem geringeren Ausmaß $J(\omega_N)$ -Werte, die kleiner als der Durchschnittswert sind, deuten auf schnelle Dynamiken im Piko- bis Nanosekunden Bereich hin. Neben der spektralen Dichte berechnete das Skript die globale Rotationskorrelationszeit τ_c von Vpr, welche mit Hilfe von Gleichung 13 zur Berechnung des hydrodynamischen Radius r_h des Vpr-DPC-Mizellen-Komplex genutzt wurde.

3.8.7.7. Lokalisation von Vpr in DPC-Mizellen

Zur Charakterisierung der Interaktion des Vpr mit der DPC-Mizelle, wurden zwei Titrations durchgeführt. Zum einen wurde DPC zu Vpr in DPC-Titrations-Puffer (Tab. 3.12) gegeben, zum anderen wurde zu Vpr in NMR-Puffer (Tab. 3.12) Mn^{2+} in Form von MnCl_2 titriert. Beide Experimente wurden bei 40 °C und 600 MHz Protonenlarmorfrequenz durchgeführt.

In der DPC-Titration wurde der Einfluss des DPC auf die Faltung des Vpr analysiert und die spektrale Dispersion der Proteinerückgrat-Amidprotonen als Funktion der DPC-Konzentration aufgetragen. Dafür wurden [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von 100 μM Vpr in Anwesenheit von 0,5 mM, 1,1 mM, 5 mM, 10 mM und 50 mM DPC aufgenommen. Des Weiteren wurde mit Hilfe der Spektren des Vpr in Anwesenheit von 1,1 und 50 mM DPC die CSPs für jeden Aminosäurerest mittels Gleichung 9 berechnet. Die Spektren wurden zuvor mit nmrPipe prozessiert und mit CcpnNmr Analysis analysiert.

Die Titration von Mn^{2+} diente der Identifikation von pufferzugänglichen Aminosäuren des Vpr. Da Mn^{2+} paramagnetisch ist, zeigen die Resonanzsignale von pufferexponierten Aminosäuren eine stärkere Linienverbreiterung als Resonanzsignale von Aminosäuren, welche sich in der DPC-Mizelle befinden. Zur Charakterisierung der pufferzugänglichen Aminosäuren wurden [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektren von 400 μM Vpr in 50 mM DPC in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von 8 μM , 12,5 μM , 21 μM , 44 μM , 100 μM und 350 μM Mn^{2+} aufgenommen. Nach Prozessieren der Spektren mit nmrPipe wurden die Signalintensitäten jedes Spektrums mit Hilfe von CcpnNmr Analysis ermittelt. Die Signalintensitäten in Anwesenheit der jeweiligen Konzentration von Mn^{2+} ($I_{n\mu\text{M-Mn}}$) wurden mittels Gleichung 19 auf die Intensitäten in Abwesenheit von Mn^{2+} ($I_{0\mu\text{M-Mn}}$) normiert ($I_{\text{Mn-norm}}$) und als Balkendiagramm gegen die Vpr Aminosäuresequenz aufgetragen.

$$(19) \quad I_{\text{Mn-norm}} = \frac{I_{n\mu\text{M-Mn}}}{I_{0\mu\text{M-Mn}}}$$

3.8.7.8. Vpr in Nanodisks

Zur Charakterisierung der Interaktion des HIV-2 Vpr mit Lipiddoppelschichten wurden verschiedene Nanodisks genutzt. Zunächst wurde ein [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum von Vpr in MSP1-POPC-Nanodisks in ND-SEC-Puffer (Tab. 3.11) und 10 % D_2O bei 25 °C aufgenommen. Vpr wurde für diese Probe vor der Assemblierung der Nanodisks zum MSP1-POPC-Gemisch gegeben. Ausserdem wurden [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von Vpr in MSP1D1-DMPC-Nanodisks in DPC-freiem NMR-Puffer (Tab. 3.12) bei 40 °C aufgenommen. Dabei wurde für eine Messung Vpr vor

Assemblierung der Nanodisks zum MSP1D1-DMPC-Gemisch gegeben. Für eine zweite Messung wurde Vpr zu assemblierten MSP1D1-DMPC-Nanodisks gegeben (Kap. 3.8.7.2.).

Des Weiteren wurde ein [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum von Vpr in MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks bei 40 °C in DPC-freiem NMR-Puffer aufgenommen. Bei dieser Probe wurde Vpr zu assemblierten MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks gegeben (Kap. 3.8.7.2.). Zur Analyse wurden die CSPs (Gleichung 9) für alle identifizierten Aminosäuren des Vpr-MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks-Spektrums im Vergleich zu dem Spektrum des Vpr in DPC-Mizellen berechnet. Die CSPs wurden zur Analyse als Balkendiagramm gegen die Vpr-Aminosäuresequenz aufgetragen. Die Vpr-MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks wurden nach der NMR-Messung zusätzlich mittels SEC analysiert. Dazu wurde eine Superdex 200 10/30 GL an einem ÄKTAPurifier genutzt. Die Säule wurde mit 1 mM DTT in ND-SEC-Puffer (Tab. 3.11) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min betrieben. Bei gleichen Bedingungen wurde eine zweite SEC mit Vpr in Abwesenheit einer Modellmembran durchgeführt.

3.8.7.9. Titration von HIV-2 p6 zu HIV-2 Vpr

Um die Interaktion der beiden HIV-2 Proteine Vpr und p6 zu charakterisieren wurde p6 zu Vpr titriert. Dabei wurden 8 μM [$\text{U-}^{15}\text{N}$]-Vpr in DPC haltigem NMR-Puffer (Tab. 3.12) vorgelegt und p6 aus einem p6-Stock hinzugegeben. Dieser Stock bestand aus 500 μM unmarkiertem p6 sowie 8 μM [$\text{U-}^{15}\text{N}$]-Vpr in NMR-Puffer. So wurde gewährleistet, dass bei allen Messungen eine konstante Konzentration von [$\text{U-}^{15}\text{N}$]-Vpr vorlag. Es wurden acht 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von Vpr in Abwesenheit sowie Anwesenheit von 3 μM , 6 μM , 9,5 μM , 16 μM , 29 μM , 55 μM und 100 μM p6 bei einer Protonenlarmorfrequenz von 800 MHz aufgenommen. Zur Analyse wurde die CSP (Gleichung 9) jeder Aminosäure des Vpr mit Hilfe der chemischen Verschiebungen in Abwesenheit und Anwesenheit von 100 μM p6 berechnet. Von Aminosäureresten des Vpr mit einer signifikanten CSP wurden weitere CSPs mit Hilfe der chemischen Verschiebungen in Abwesenheit sowie bei jeder p6-Konzentration berechnet. Diese wurden zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) mit Hilfe von Gleichung 20 genutzt.

$$(20) \quad CSP = CSP_0 + \left(\frac{K_D + [P_{ges}] + [L_{ges}]}{2} + \sqrt{\frac{K_D + [P_{ges}] + [L_{ges}] \cdot 2}{4 - [P_{ges}] \cdot [L_{ges}]}} \right) \cdot \frac{CSP_{max} - CSP_0}{[P]}$$

Dabei stellen CSP_0 die CSP in Abwesenheit des Liganden (p6) und CSP_{max} die CSP bei maximaler Liganden-Konzentration dar. Die Konzentrationen $[P_{ges}]$ bzw. $[L_{ges}]$ berechnen sich aus der Summe der Konzentration des freien Proteins $[P]$ bzw. Liganden $[L]$ und der Konzentration des Komplexes $[PL]$. Das Protein ist in diesem Fall Vpr und der Ligand wird durch das hinzutitrierte p6

repräsentiert. Für das Fitten der Dissoziationskonstante wurde angenommen, dass ein Vpr-Molekül mit einem p6-Molekül interagiert. Der Fit erfolgte mit Hilfe des Programms Xmgrace.

4. Ergebnisse

4.1. Expression und Reinigung von HIV-2 Vpr

Die Expression und Reinigung von HIV-2 Vpr wurde wie in den Kapiteln 3.3.3.1. und 3.4.5. beschrieben nach Hänel et al. (2014) durchgeführt. Die Analysen der einzelnen Reinigungsschritte mittels SDS-PAGE sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

Nach Zugabe von 1 mM IPTG zur Expressionskultur ist nach 20 h Inkubation eine deutliche Überexpression des Vpr-Fusionsproteins zu erkennen (Abb. 4.1). Nach dem Ernten konnte ein Nasszellgewicht von durchschnittlich 8 g/l Expressionskultur bestimmt werden. Mittels Abschätzen von einem SDS-Gel wurde eine Expression von etwa 75 mg Vpr-Fusionsprotein pro Liter Expressionskultur bestimmt. Auf den Zellaufschluss mit Hilfe eines Ultraschallstabes, folgte eine Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose. Nach Analyse der Elutionsfraktion (Abb. 4.1) mittels SDS-PAGE ist zu erkennen, dass das Vpr-Fusionsprotein eine Reinheit von etwa 90 % aufwies. Die Menge des gereinigten Vpr-Fusionsproteins wurde nach der IMAC mit 50 mg/l Expressionskultur vom SDS-Gel abgeschätzt. Die Elutionsfraktion wurde eingengt, dialysiert und steril filtriert, bevor die Spaltung durch Zugabe von 50 mM DTT und 30 mM DPC sowie Inkubation bei 40 °C induziert wurde. Nach 12 Tagen Spaltung waren 95 % des Vpr-Fusionsproteins gespalten und etwa 5 mg Vpr pro Liter Expressionskultur freigesetzt. Nach der Ionentauscherchromatographie an Q-Sepharose befand sich Vpr im Durchfluss, wohingegen die anderen Proteine des Vpr-Fusionsproteins sowie ungespaltenes Vpr-Fusionsprotein mit dem Säulenmaterial interagierten (Abb. 4.1). Das Vpr wies nach diesem Reinigungsschritt bereits eine Reinheit von >90 % auf. Nach Einstellen des pH-Wertes wurde SP-Sepharose zum Konzentrieren des Vpr sowie zur weiteren Reinigung des Proteins verwendet. Die Elutionsfraktion enthielt Vpr mit einer Reinheit von >95 % und lediglich leichte Verunreinigungen aus Proteinen mit Molekulargewichten von >25 kDa (Abb. 4.1). Die Ausbeute der Reinigung betrug in etwa 4 mg Vpr pro Liter Expressionskultur. Gereinigtes ^{15}N -markiertes Vpr wurde mittels ESI-MS analysiert und hatte ein Molekulargewicht von 11834 Da. Das theoretische, berechnete Molekulargewicht von ^{15}N -markiertem Vpr beträgt 11756 Da, wodurch zum experimentell bestimmten Molekulargewicht eine Diskrepanz von 78 Da auftritt. Dieser Unterschied entspricht dem Molekulargewicht von β -ME und deutet darauf hin, dass β -ME kovalent an Vpr gebunden ist.

Gereinigtes Vpr wurde auf Konzentrationen von 50 μM bis 500 μM eingengt, anschließend aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurde Vpr bei -80 °C gelagert.

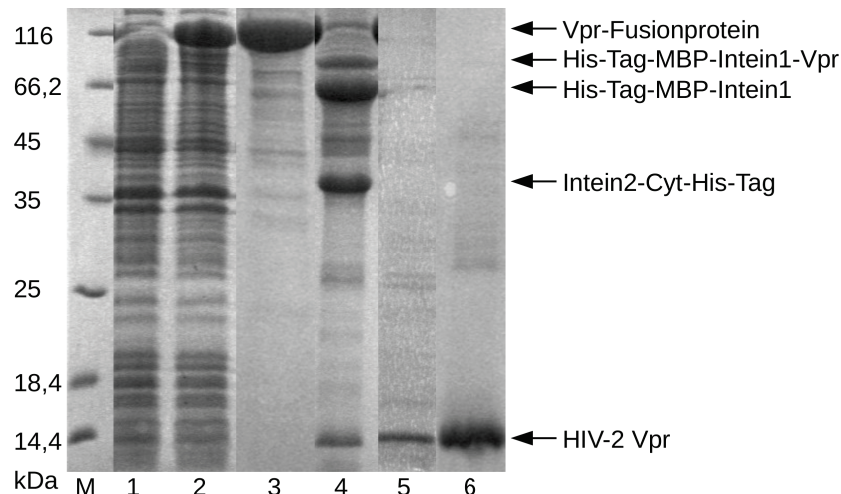


Abbildung 4.1: SDS-Gel der Expression und Reinigung des HIV-2 Vpr. Spur M: enthält den Proteinstandard mit daneben angegebenem Molekulargewicht der einzelnen Proteine. Spur 1: Expressionskultur vor Zugabe von IPTG; Spur 2: Expressionskultur vor dem Ernten; Spur 3: Die Elutionsfraktion der IMAC; Spur 4: Nach 12 Tagen Inteinspaltung; Spur 5: Durchfluss der Anionentauscherchromatographie an Q-Sepharose; Spur 6: gereinigtes Vpr in der Elutionsfraktion der Kationentauscherchromatographie an SP-Sepharose.

4.2. Expression und Reinigung von HIV-2 p6

Nach erfolgreicher Klonierung und positiver Sequenzierung des pET28a_HIV-2_p6-Expressionsplasmids wurde die Expression und Reinigung des HIV-2 p6 im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Die Analysen der einzelnen Reinigungsschritte mittels SDS-PAGE sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Dort ist eine deutliche Überexpression des His-p6 nach Zugabe von 1 mM IPTG und 2 h Inkubation zu erkennen (Abb. 4.2). Nach 2 h mussten die Zellen geerntet werden, da es anschließend zu einer Abnahme der Zelldichte kam. Daraus lässt sich schließen, dass das His-p6 zelltoxisch ist. Nach Aufschluss der Zellen wurde eine Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose durchgeführt. Die Elutionsfraktionen enthielten His-p6 mit einer Reinheit von >98 %. Zum Abspalten des His-Tags wurde die TEV-Protease genutzt, welche im Verhältnis von 1 mg His-TEV-Protease pro 10 mg His-p6 zugegeben wurde. Nach 6 Tagen Spaltung waren >95 % des His-p6 gespalten und p6 freigesetzt (Abb. 4.2). Zum Entfernen der His-TEV, des ungespaltenen His-p6 sowie des abgespaltenen His-Tags wurde eine zweite Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose durchgeführt. Diese entfernte die His-TEV-Protease vollständig sowie kleine Mengen von ungespaltenem His-p6. Der p6-enhaltende Durchfluss wurde auf 5 ml eingengt und für eine SEC genutzt. Nach der SEC lag das p6 mit einer Reinheit von >95 % vor. Es waren lediglich leichte Verunreinigungen aus wahrscheinlich ungespaltenem His-p6 zu erkennen. Das HIV-2 p6 eluierte mit einem Volumen von etwa 70 ml. Die Ausbeute der Reinigung betrug 8 mg p6 pro Liter

Expressionskultur. Nach dem letzten Reinigungsschritt wurde p6 auf eine Konzentration von 0,5 bis 1 mM eingeeengt. Das aliquotierte p6 wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

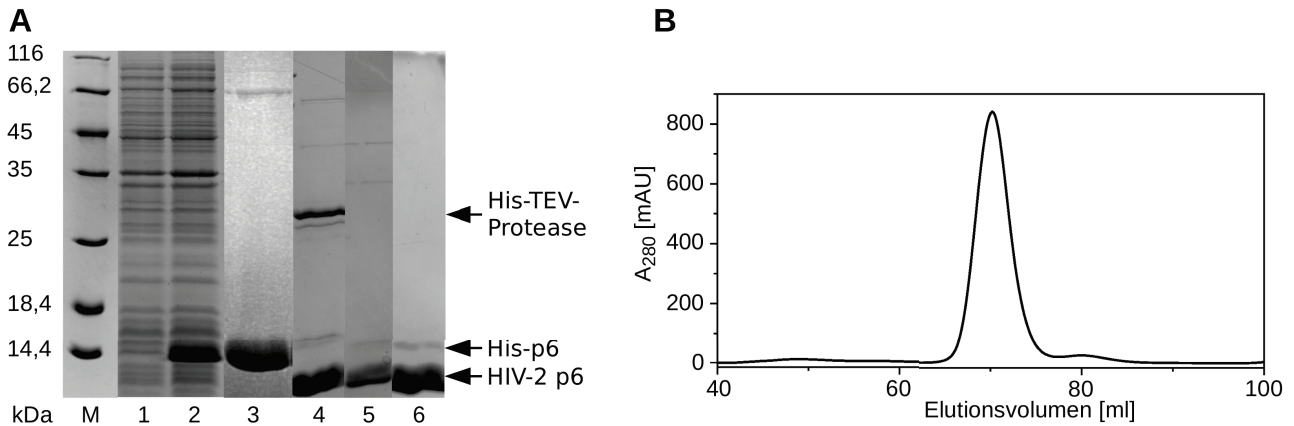


Abbildung 4.2: Expression und Reinigung von HIV-2 p6. A) SDS-PAGE aller Reinigungsschritte des p6. Spur M: Proteingrößenstandard; Spur 1: Expressionskultur vor Zugabe von 1 mM IPTG; Spur 2: Expressionskultur 2 h nach Zugabe von IPTG; Spur 3: Elutionsfraktion der 1. IMAC; Spur 4: Nach 6 Tagen TEV-Spaltung; Spur 5: Durchfluss der 2. IMAC; Spur 6: Elutionsfraktion der SEC. B) Chromatogramm der SEC von p6 mit einer HiLoad Superdex 75 XK 16/600 pg an einem ÄKTAPurifier.

4.3. Nanodisks

4.3.1. Assemblierung von Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks

Die Assemblierung von Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks erfolgte mit Hilfe von BioBeads. Durch Zugabe der BioBeads, wurden die Detergenzien Natriumcholat und DPC aus der Probe entfernt und es kam zur Selbstassemblierung der Nanodisks. Für die Herstellung einer 50 bis 120 μ M NMR-Probe mussten für die Assemblierung 10 mg MSP1 sowie entsprechende Mengen Vpr und POPC eingesetzt werden. Anschließend wurde eine SEC mit einer HiPrep Superdex 200 XK 26/600 pg durchgeführt. Das Chromatogramm der SEC ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Bei Peak 1 (Abb. 4.3) handelt es sich aufgrund des Elutionsvolumen von 115 ml um Aggregate aus MSP1 und Lipiden. Der 2. Peak (141 ml) enthält vermutlich Aggregate von Nanodisks, da diese erfahrungsgemäß bei dieser Art der Assemblierung auftreten können. Die Elution von monomeren Nanodisks erfolgte in Peak 3 bei 161 ml. Mittels SDS-PAGE wurde in den Elutionsfraktionen dieses Peaks sowohl MSP1 als auch Vpr identifiziert (Abb. 4.3). Da das Elutionsvolumen der Nanodisks von 161 ml selbst für ein ungefaltetes Protein von der Größe des Vpr zu gering ist, kann man durch die Koelution von Nanodisks mit Vpr auf eine Interaktion dieser schließen. Die Elutionsfraktionen des freien MSP1 (Peak 4: 202 ml) enthielten kein Vpr (Abb. 4.3) was darauf

hindeutet, dass keine unspezifische Interaktion zwischen Vpr und MSP1 vorlag.

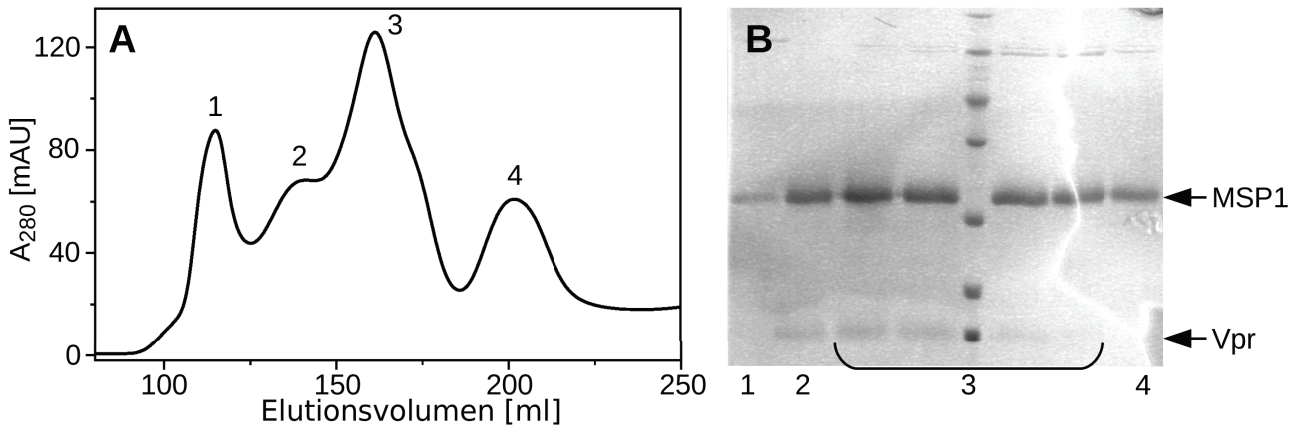


Abbildung 4.3: Größenausschlusschromatogramm von Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks. A) Chromatogramm der SEC nach Assemblierung der Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks sowie B) Analyse der Peakfraktionen mittels SDS-PAGE. 1: Aggregate; 2: Nanodiskmultimere; 3: monomere Nanodisks; 4: freies MSP1

4.3.2. Assemblierung von MSP1D1-DMPC-Nanodisks

Die Assemblierung von leeren MSP1D1-DMPC-Nanodisks sowie Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks erfolgte mit Hilfe der Dialyse-Methode. Die assemblierten Nanodisks wurden mittels SEC mit einer HiPrep Superdex 200 XK 16/600 pg von freiem Lipid, freiem MSP1D1 und Aggregaten getrennt. Für die Herstellung einer 50 bis 120 μ M NMR-Probe mussten bei der Assemblierung 4 mg MSP1D1 und entsprechenden Mengen Vpr und DMPC eingesetzt werden.

Die Chromatogramme der SECs (Abb. 4.4) zeigen ein Elutionsvolumen von etwa 59 bis 70 ml sowohl für leere MSP1D1-DMPC-Nanodisks als auch für Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks. Da das Vpr mit einem Molekulargewicht von $\sim$ 12 kDa nur einen geringen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der Nanodisks hat, war eine große Änderung des Elutionsvolumens auch nicht zu erwarten. Eine vorherige Kalibrierung der Säule mit einem Proteinstandard zeigt, dass ein Elutionsvolumen von 65 ml in etwa einem hydrodynamischen Durchmesser von $\sim$ 11 nm entspricht. Somit ist auch hier, wie schon für Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks, eine Koelution des Vpr mit Nanodisks offensichtlich, da das Elutionsvolumen der Nanodisks für ein Protein von 104 Aminosäuren zu gering ist. Freies MSP1D1 eluiert mit einem Volumen von 78 ml (Abb. 4.4A, rot). Im SEC-Chromatogramm der leeren MSP1D1-DMPC-Nanodisks (Abb. 4.4A, schwarz) ist deutlich zu erkennen, dass es bei 84 ml zur Elution eines Moleküls kommt. Die Analyse dieser Elutionsfraktion mittels SDS-PAGE führte allerdings zu keiner Identifikation des dort eluierenden Moleküls.

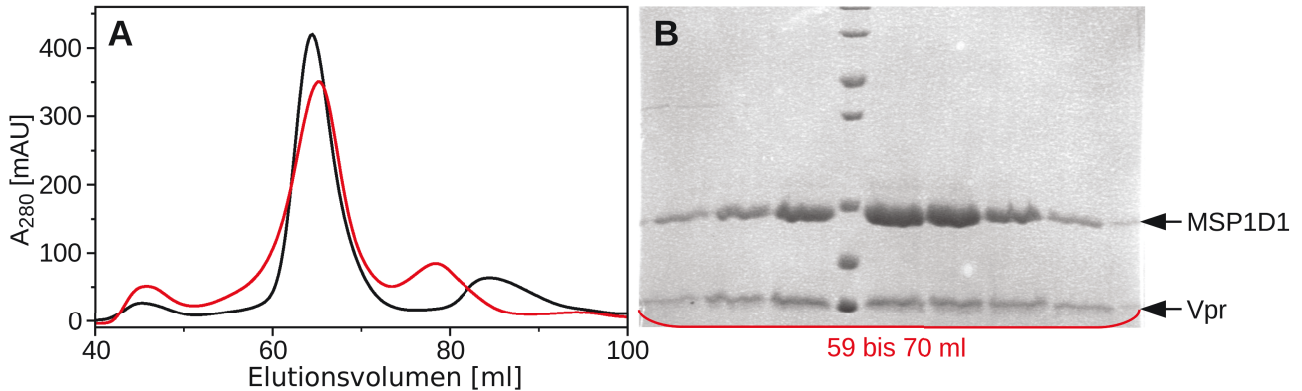


Abbildung 4.4: Größenausschlusschromatogramme von MSP1D1-DMPC-Nanodisks. A) Chromatogramm leerer MSP1D1-DMPC-Nanodisks (schwarz) und Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks (rot) nach der Assemblierung mittels Dialyse. Die Aggregate aus Lipid und Protein eluieren bei etwa 45 ml und freies MSP1D1 bei ~78 ml. Die Elutionsfraktionen der SEC des Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks-Peaks (59 bis 70 ml) wurden mittels SDS-PAGE (B) analysiert.

4.3.3. Assemblierung von MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks

Zur Assemblierung von leeren MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks wurde das Detergenz Natriumcholat durch Dialyse aus der Probe entfernt. Die assemblierten Nanodisks wurden anschließend mittels SEC mit einer HiPrep Superdex 200 XK 16/600 pg von freiem MSP1D1Δ5, freiem DMPC sowie Aggregaten getrennt.

Da MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 9,2 nm (Hagn et al. 2013) kleiner sind als MSP1D1-DMPC-Nanodisks, eluieren diese mit einem Elutionsvolumen von 72 ml auch wesentlich später. Das Chromatogramm zeigt aufgrund des fehlenden Peaks bei ~45 ml, dass bei der Assemblierung der Nanodisks keine Aggregate entstanden sind. Das freie MSP1D1Δ5 eluiert mit einem Volumen von etwa 85 ml.

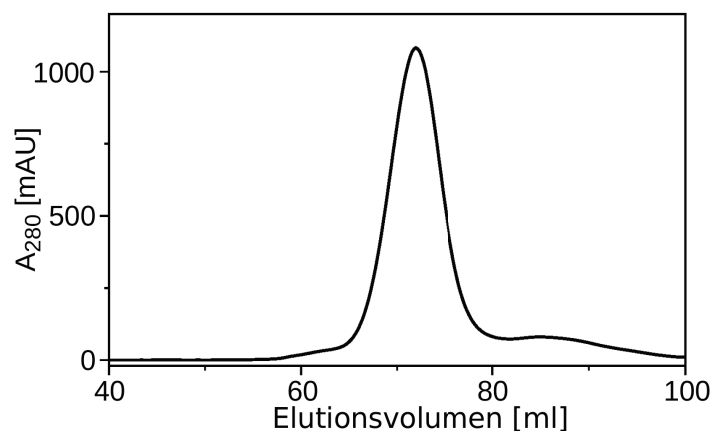


Abbildung 4.5: Größenausschlusschromatogramm von MSPD1Δ5-DMPC-Nanodisks. Gezeigt ist ein präparativer Lauf mit leeren, frisch assemblierten MSPD1Δ5-DMPC-Nanodisks.

4.4. CD-Spektroskopie mit HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen

Zur strukturellen Charakterisierung von HIV-2 Vpr wurde ein CD-Spektrum von 50 μM Vpr in 50 mM DPC (NMR-Puffer) bei 25 °C aufgenommen (Abb. 4.6). Das CD-Spektrum weist α -Helix-typische lokale Minima bei 208 nm und 219 nm sowie ein Maximum bei 195 nm auf. Die Nulldurchgänge des Spektrums liegen bei 201 nm und 238 nm. Die Analyse der CD-Daten mit Hilfe des DichroWeb Webserver berechnete einen Anteil von etwa 40 % α -helikalen Sekundärstrukturelementen. Des Weiteren sollen laut der Berechnung 11 % aller Sekundärstrukturelemente von Vpr β -Stränge und 18 % Loops sein. Die restlichen 31 % von Vpr sind unstrukturierte Bereiche.

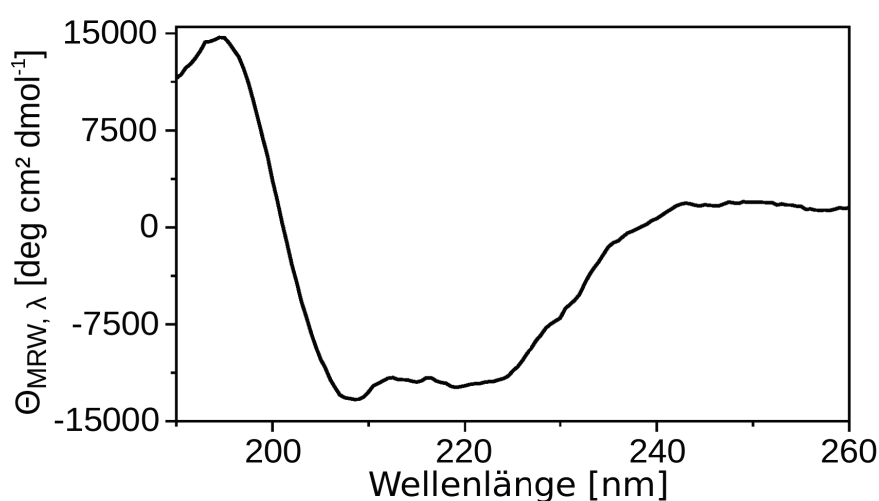


Abbildung 4.6: UV-CD-Spektrum von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen.

4.5. NMR-Spektroskopie

Für die strukturelle Charakterisierung des HIV-2 Vpr mittels NMR-Spektroskopie wurden Experimente mit verschiedenen Detergenzkonzentrationen, verschiedenen Nanodisks sowie in unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.5.1. Optimierung der Messbedingungen

Als erster Schritt zur strukturellen Charakterisierung des HIV-2 Vpr, wurden die Messbedingungen für die NMR-Experimente optimiert. Dabei wurden $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren des Proteins in unterschiedlichen Puffern, mit variierenden pH-Werten (pH 2,5 bis 7,4) und NaCl-Konzentrationen (0 bis 150 mM) sowie bei unterschiedlichen Temperaturen (25 bis 45 °C) aufgenommen. Basierend

auf der Anzahl der detektierten Resonanzsignale und der Dispersion der Signale lieferten die Experimente mit Vpr in DPC-haltigem NMR-Puffer (Tab. 3.12) bei 40 °C die aussagekräftigsten Spektren (Abb. 4.7A). So konnten in dem $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von Vpr in NMR-Puffer 89 von 94 erwarteten Proteinrückgrat-HN-Resonanzsignalen detektiert werden. Des Weiteren zeigte das Spektrum eine spektrale Dispersion der HN-Proteinrückgratresonanzsignale von 7,2 bis 8,8 ppm und eine hinreichende Auflösung der einzelnen Resonanzsignale.

Zu Vergleichszwecken wurde ein $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von HIV-2 Vpr in 30 % AcN-d₃/70 % H₂O (pH 2,5) bei 30 °C aufgenommen. Diese Bedingungen entsprachen denen von Morellet et al. (2003), die genutzt wurden, um die Struktur von HIV-1 Vpr zu bestimmen. Dieses Spektrum (Abb. 4.7B) von HIV-2 Vpr zeigte eine geringere spektrale Dispersion der HN-Proteinrückgratresonanzsignale von 7,2 bis 8,6 ppm und eine stärkere Überlagerung von einzelnen Resonanzsignalen als das Spektrum von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen. Es war in diesem Spektrum nicht möglich, die genaue Anzahl der Resonanzsignale zu bestimmen. Somit wurde für die Zuordnung der Resonanzsignale der NMR-Puffer für HIV-2 Vpr und eine Messtemperatur von 40 °C verwendet.

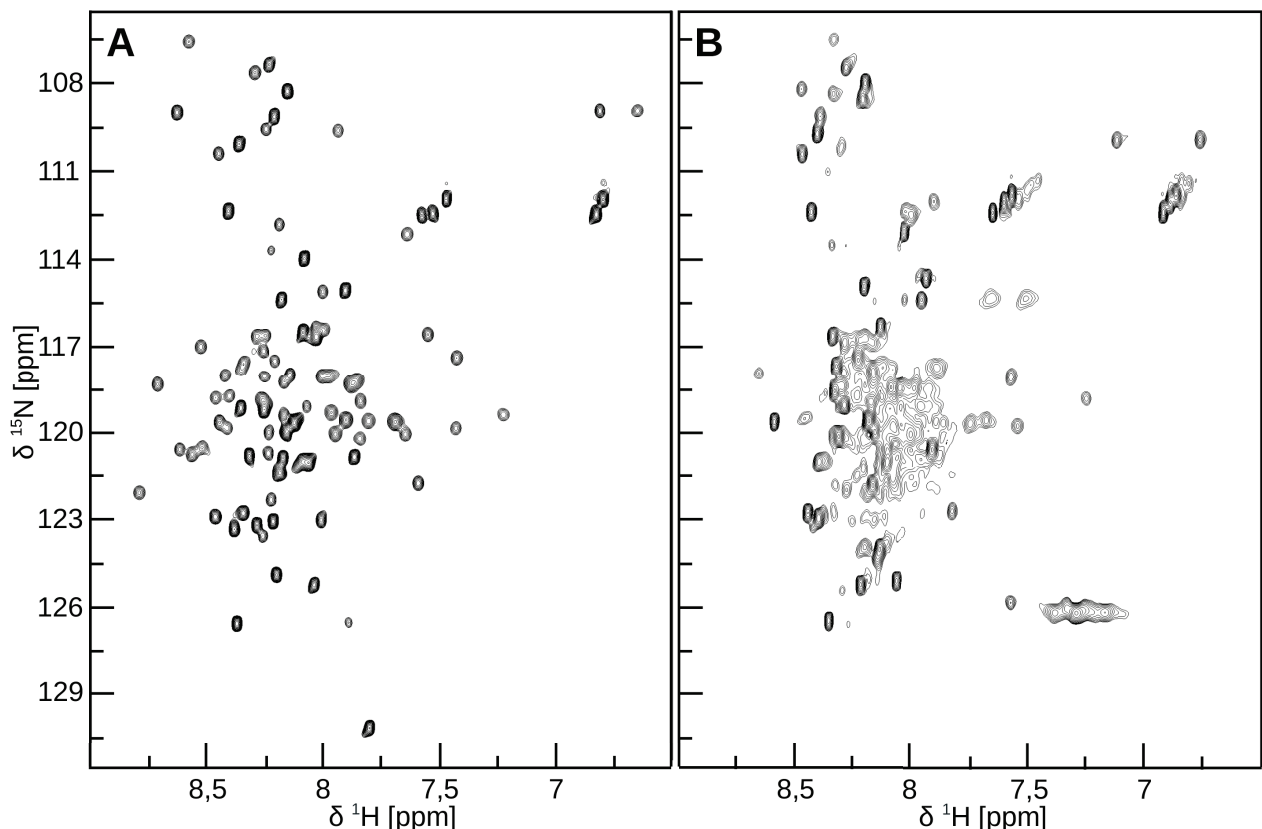


Abbildung 4.7: 2D $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von HIV-2 Vpr. A) Vpr in DPC-haltigem NMR-Puffer bei 40 °C und B) Vpr in 30 % AcN-d₃/70 % H₂O bei pH 2,5 und 30 °C. Beide Spektren wurde bei einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz aufgenommen.

4.5.2. Zuordnung der Proteinrückgratresonanzsignale des Vpr in DPC-Mizellen

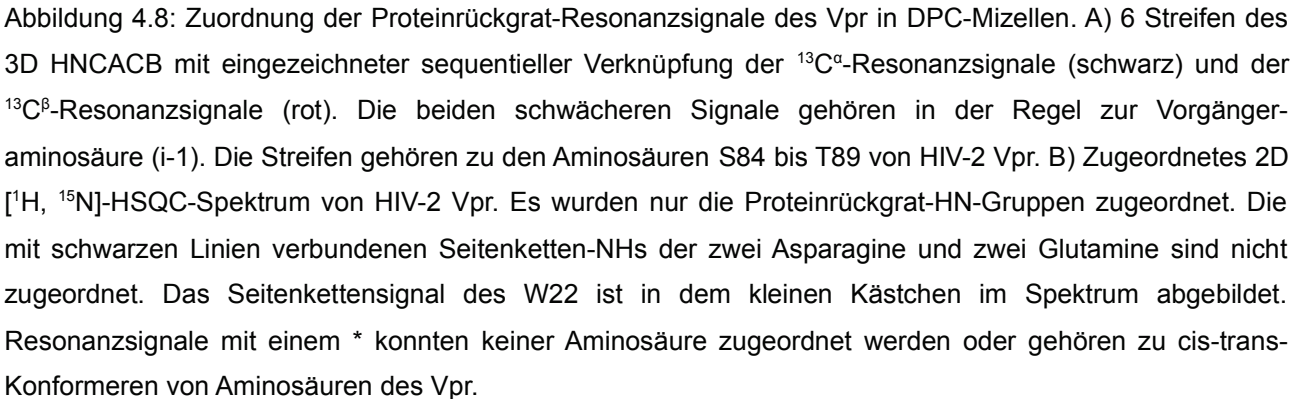
Für die Zuordnung der Resonanzsignale zu den jeweiligen Kernen des Proteinrückgrats des Vpr wurden 2D- und 3D-NMR-Experimente mit Vpr in NMR-Puffer bei 40 °C aufgenommen. Nach Aufnahme der in Kapitel 3.8.7.4. genannten 3D-NMR-Experimente wurde die sequentielle Zuordnung der Resonanzsignale mittels der Software CcpnNmr Analysis durchgeführt.

Die Zuordnung der $^{13}\text{C}^\alpha$ - und $^{13}\text{C}^\beta$ -Resonanzsignale mit Hilfe des 3D HNCACB-Spektrums erfolgte durch Verknüpfen der 3D-Streifen der Aminosäure (i) mit dem 3D-Streifen der Aminosäure (i-1). Diese Verknüpfung ist für 6 Aminosäuren in Abbildung 4.8 dargestellt. Anschließend war es möglich, die Streifen aufgrund der chemischen Verschiebungen der $^{13}\text{C}^\alpha$ - und $^{13}\text{C}^\beta$ -Resonanzsignale den einzelnen Aminosäuren des HIV-2 Vpr zuzuordnen. Durch diese Zuordnung wurden gleichzeitig auch die Aminogruppen-Resonanzsignale des $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums der jeweiligen Aminosäure des Vpr zugeordnet (Abb. 4.8). Insgesamt wurden 95 % aller HN-Gruppen des Proteinrückgrats von Vpr dem korrespondierenden Resonanzsignal zugeordnet. Des Weiteren wurden 96,2 % aller $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne des Vpr dem jeweiligen Resonanzsignal sowie 75,5 % aller $^{13}\text{C}^\beta$ -Kerne zugeordnet. Im $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum konnten die HN-Gruppen-Resonanzsignale von L28, D40, I45, T58, L59 und E60 nicht identifiziert werden.

Nach der nahezu vollständigen Zuordnung des $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums wurden ausgehend von diesem Spektrum, die Kerne von $^1\text{H}^\alpha$, $^1\text{H}^\beta$ sowie $^{13}\text{C}^\text{O}$ des Vpr den jeweiligen Resonanzsignalen zugeordnet. Dabei wurden 71,1 % aller $^1\text{H}^\alpha$ -Kerne, 36 % aller $^1\text{H}^\beta$ -Kerne und 84,6 % aller $^{13}\text{C}^\text{O}$ -Kerne des Vpr zugeordnet. Insgesamt konnten 89,7 % aller Proteinrückgratkerne des Vpr ihrem korrespondierenden Resonanzsignal zugeordnet werden.

Die fehlende Zuordnung einiger HN-Gruppen zu dem entsprechendem Resonanzsignal im $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum sowie das Fehlen der Amidgruppe in Prolinen führte dazu, dass von den Aminosäuren P8, D40, T58 und L59 kein Kern des Proteinrückgrats dem jeweiligen Resonanzsignal zugeordnet werden konnte. Die erhaltenen chemischen Verschiebungen wurden zur Bestimmung der Sekundärstruktur des Vpr genutzt (Kap. 4.5.3.).

Die zugeordneten chemischen Verschiebungen für die Kerne des Proteinrückgrats von HIV-2 Vpr in 50 mM DPC sind in Tab. A.1 im Anhang dieser Arbeit aufgelistet.



Mit Hilfe der chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats des HIV-2 Vpr (Kap. 4.5.2.) konnte die Sekundärstruktur des Proteins bestimmt werden. Dazu wurde das Programm TALOS-N

verwendet, welches auch gleichzeitig basierend auf den chemischen Verschiebungen Torsionswinkeleinschränkungen für die Berechnung der Struktur des Vpr generierte.

Laut der Analyse der chemischen Verschiebungen mittels TALOS-N liegen in HIV-2 Vpr in Anwesenheit von 50 mM DPC drei α -Helices vor. Da der Beginn und das Ende einer α -Helix durch TALOS-N nicht immer exakt definiert werden können, sollen hier nur die Bereiche angegeben werden. So befindet sich die erste α -Helix (α_1) im Bereich von E22 bis K37 und die zweite α -Helix (α_2) wird durch die Aminosäurereste im Bereich von P41 bis R54 gebildet. Durch den Bereich der die Reste G61 bis F77 umfasst wird die dritte α -Helix (α_3) des Vpr ausgebildet. Die Aminosäurereste H38 bis D40 bilden somit den ersten interhelikalen Linker zwischen α_1 und α_2 , wohingegen die Reste H55 bis E60 den zweiten interhelikalen Linker zwischen α_2 und α_3 ausbilden. Der N-Terminus (A2-D21) sowie der C-Terminus (R78-A105) liegen beide in nicht regulären Sekundärstrukturelementen vor.

In DPC-Mizellen kommen etwa 45 % aller Aminosäuren des HIV-2 Vpr in α -Helices vor, wohingegen 55 % unstrukturiert in den zwei interhelikalen Linkern und den beiden Termini vorliegen.

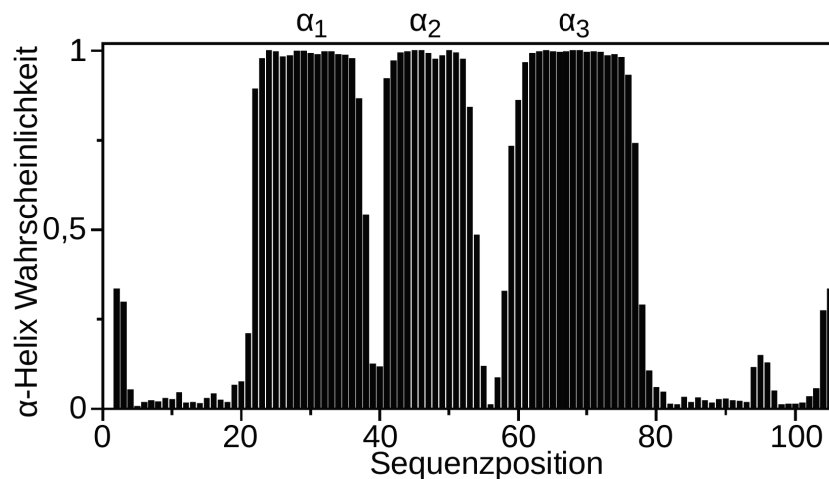


Abbildung 4.9: Sekundärstrukturbestimmung von HIV-2 Vpr mittels TALOS-N. HIV-2 Vpr besitzt in 50 mM DPC drei α -Helices.

4.5.4. Paramagnetische Experimente zur Bestimmung von Abständen

Um Abstände zwischen Aminosäuren des Vpr in DPC-Mizellen zu ermitteln, wurde die paramagnetische Sonde MTSL kovalent an die Cysteine von Vpr (Vpr_C81-SL) und Vpr_C81S_F39C (Vpr_C81S_F39C-SL) gebunden. Nach Entfernen von freiem MTSL von Vpr_C81-SL bzw. Vpr_C81S_F39C-SL wurde für jedes Protein je ein 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektrum mit paramagnetischem Spin-Label (SL) und nach Zugabe von Ascorbinsäure je ein

weiteres 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektrum mit diamagnetischem SL aufgenommen. In Abbildung 4.10 sind die jeweiligen Spektren übereinander gelegt und es ist eine deutliche Verstärkung der Relaxation durch Löschen einzelner Resonanzsignale bei paramagnetischem SL sichtbar. Durch Zugabe von Ascorbinsäure wird das SL diamagnetisch und die Signale erhalten ihre volle Intensität wieder. Betroffen von der Relaxationsverstärkung sind vor allem Signale von Aminosäuren, die sequentiell in räumlicher Nähe zu den SL-markierten Aminosäuren F39C bzw. C81 sind (Abb. 4.10).

Da sich die chemischen Verschiebungen der Resonanzsignale des Vpr_C81-SL nicht stark von dem SL-freien Spektrum unterscheiden bzw. das Spektrum der Einzel-Cystein-Variante Vpr_C81S_F39C nur leicht vom wildtypischen Vpr Spektrum (Abb. 4.8) abweicht ist anzunehmen, dass es durch die Mutation und die Einführung des SL zu keiner strukturellen Änderung im HIV-2 Vpr gekommen ist. Es sind nur Resonanzsignale von leichten Änderungen der chemischen Verschiebung betroffen, die in unmittelbarer räumlicher Nähe der Mutationen oder des SL sind.

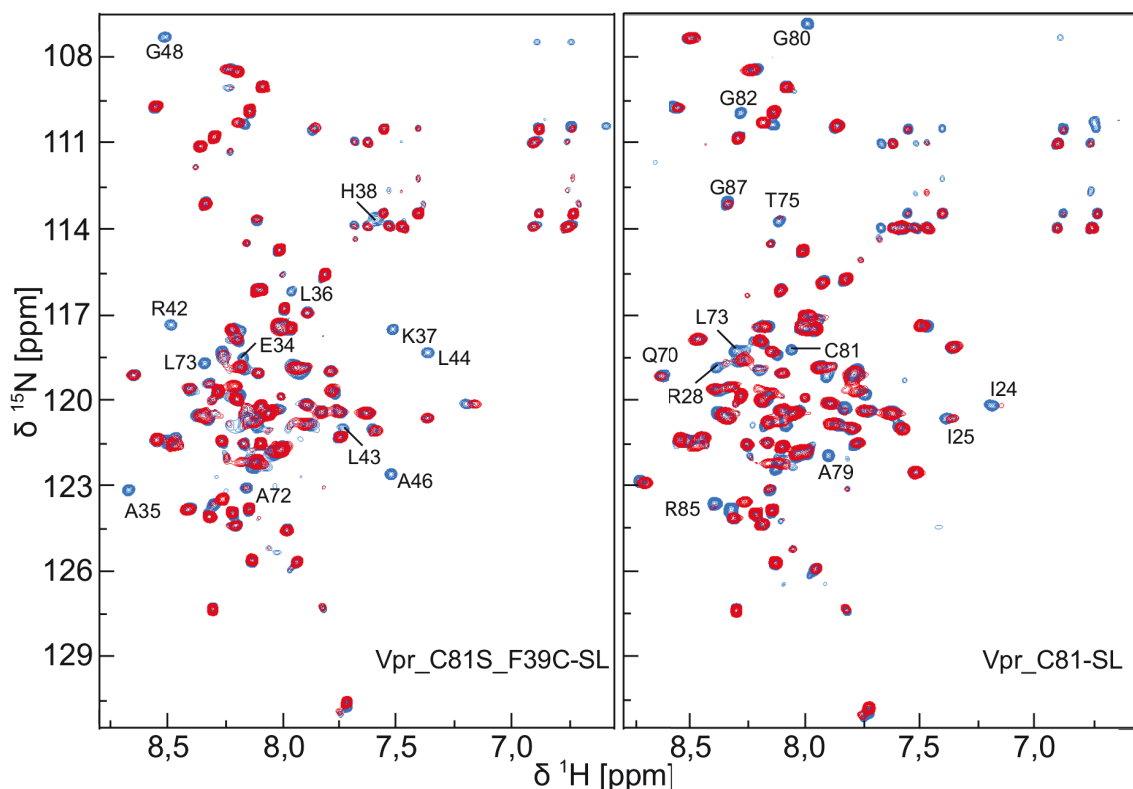


Abbildung 4.10: 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von Vpr_C81S_F39C-SL und Vpr_C81-SL in DPC-Mizellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass es in dem Spektrum mit paramagnetischem SL (rot) zu einer Linienverbreiterung kommt und die Intensitäten der Signale abnehmen. Durch Zugabe von Ascorbinsäure wird das SL diamagnetisch und die Signale erhalten in diesen Spektren ihre vollständige Signalintensität wieder (blau). Einige stark betroffene Signale sind mit der zugehörigen Aminosäure markiert.

Zur besseren Identifikation von räumlich benachbarten Kernen, wurden die Intensitäten jedes Resonanzsignals des paramagnetischen TROSY-Spektrums auf das jeweilige Signal im diamagnetischen TROSY-Spektrum mit Hilfe von Gleichung 10 normiert (I_{ratio}). In Abbildung 4.11 sind die Intensitätsverhältnisse gegen die Sequenz des Vpr aufgetragen. Es wird deutlich, dass sowohl bei Vpr_C81S_F39C-SL als auch Vpr_C81-SL die sequentiell benachbarten Aminosäuren von F39 und C81 von Linienverbreiterungen betroffen sind. Im Falle des PRE-Experiments mit Vpr_C81S_F39C-SL zeigen ausserdem Resonanzsignale von Aminosäureresten in α_3 eine Verstärkung der Relaxation bei paramagnetischem SL. Die am stärksten betroffene Aminosäure dieser Region ist L73 mit einem I_{ratio} von 0,18. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass zwischen F39 im ersten interhelikalen Linker und α_3 eine, durch die Faltung des Proteins bedingte, räumliche Nähe besteht.

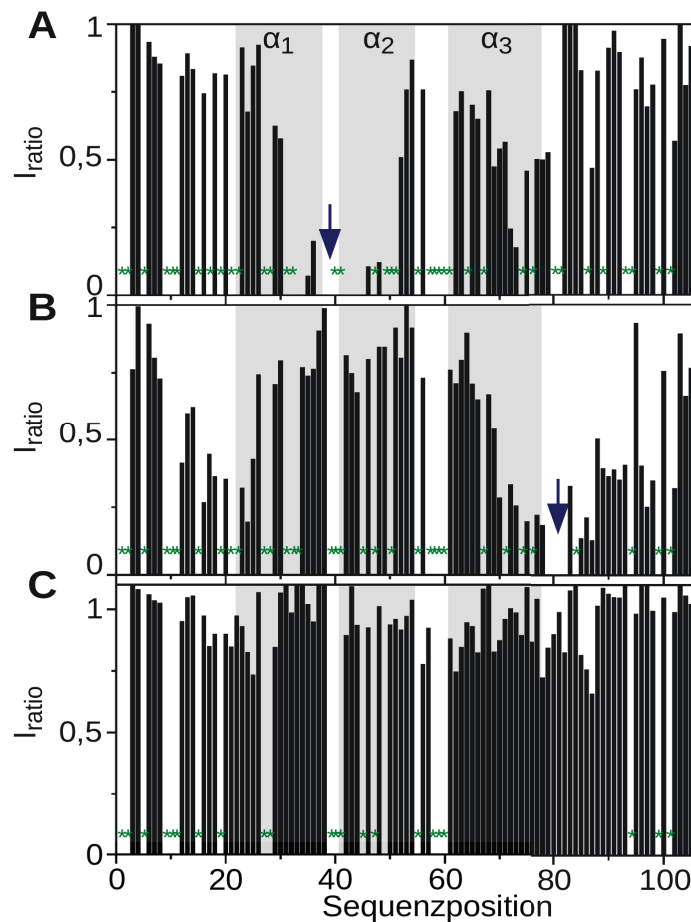


Abbildung 4.11: Intensitätsverhältnisse der PRE-Experimente mit Vpr_C81S_F39C-SL (A) und Vpr-C81-SL (B). C) Intensitätsverhältnisse der Negativkontrolle, bei der Spektren von 100 μM Vpr in Anwesenheit von 500 μM freiem MTSL aufgenommen wurden. Für Aminosäurereste mit einem * konnten keine Intensitätsverhältnisse berechnet werden, da die Signale dieser Reste überlagert waren oder es sich um nicht zugeordnete Aminosäuren handelte. Die grauen Rechtecke deuten die drei α -Helices an und die Position des SL im Vpr wird durch die blauen Pfeile markiert.

Durch das PRE-Experiment mit Vpr_C81-SL wird deutlich, dass der N-terminale Bereich von α_1 eine räumliche Nähe zu C81 im unstrukturierten C-Terminus besitzt. Die am stärksten von Linienverbreiterung betroffene Aminosäure ist I24 mit einem I_{ratio} von 0,2. Auch hier ist von einer durch die Faltung des Vpr bedingten räumlichen Nähe von α_1 und dem N-terminalen Bereich des C-Terminus auszugehen.

Die Negativkontrolle mit 100 μM Vpr in Anwesenheit von 500 μM freiem MTSL zeigte keine signifikanten Veränderungen der Signalintensitäten (Abb. 4.11). Dadurch konnte eine unspezifische Interaktion von Vpr mit MTSL weitgehend ausgeschlossen werden.

Die I_{ratio} aus den PRE-Experimenten mit Vpr_C81S_F39C-SL und Vpr_C81-SL wurden anschließend auf einen I_{ratio} eines nicht betroffenen Aminosäurerest des selben Datensatz normiert und zur Berechnung von Distanzeinschränkungen mit Hilfe der Gleichungen 11 und 12 genutzt (siehe Kap. 3.8.6.2.2.). Die so berechneten Distanzeinschränkungen wurden für die Bestimmung der globalen Struktur von HIV-2 Vpr verwendet (Kap. 3.8.6.2.3 und 4.5.5.).

4.5.5. Berechnung und Analyse der globalen Proteinrückgratstruktur von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen

Die globale Faltung des Proteinrückgrats von HIV-2 Vpr in 50 mM DPC wurde mit Hilfe des Programms Cyana berechnet. Dazu wurden dem Programm Distanzeinschränkungen und Torsionswinkeleinschränkungen vorgegeben, mit welchen die Struktur des Vpr ausgehend von einer Schar zufälliger Proteinkonformationen berechnet wurde. Von 200 berechneten Strukturen wurden die 10 energetisch günstigsten Konformationen extrahiert, mittels PyMOL visualisiert und analysiert sowie mit PROCHECK-NMR validiert.

Die 10 energetisch günstigsten Konformationen des HIV-2 Vpr sind in Abbildung 4.12 dargestellt. Der Proteinrückgrat-RMSD der 10 Strukturen liegt für die Kernregion von E22 bis F77 bei $1,99 \pm 0,87$ Å. Bei der Überlagerung der Kernregionen der 10 Strukturen wird deutlich, dass α_1 und α_2 sowie der erste interhelikale Linker bis auf eine Ausnahmestruktur eine recht genaue Übereinstimmung aufweisen. Wesentlich größere Unterschiede zwischen den 10 Strukturen bestehen dagegen im Bereich des zweiten interhelikalen Linkers und α_3 . Zusätzlich zum RMSD der Kernregion wurden die Rückgrat-RMSDs der drei α -Helices unabhängig von den anderen Regionen von Vpr bestimmt. Diese Proteinrückgrat-RMSDs hatten Werte von $0,1 \pm 0,06$ Å für α_1 , $0,15 \pm 0,09$ Å für α_2 , sowie $0,45 \pm 0,13$ Å für α_3 . Die bereits angesprochenen Unterschiede der 10 Strukturen in Bezug auf α_3 wird auch anhand des RMSDs für diesen Bereich deutlich, da α_3 den größten RMSD der drei α -Helices besitzt. Die Überlagerungen jeder α -Helix der 10 Strukturen ist ebenfalls in Abbildung 4.12 dargestellt.

Des Weiteren wurden die 10 energetisch günstigsten Strukturen mittels PROCHECK-NMR analysiert. Das Programm untersucht die Qualität der Strukturen bezüglich der Region in welcher die zwei Torsionswinkel der Aminosäuren in einem Ramachandran-Diagramm auftreten. So liegen die Torsionswinkel von 62,7 % aller Aminosäurereste der 10 energetisch günstigsten Strukturen von Vpr in der meist begünstigten Region des Ramachandran-Diagramms. Weitere 30,2 % liegen in zusätzlich erlaubten Regionen und 5,3 % in großzügig erlaubten Regionen des Ramachandran-Diagramms. In einer nicht erlaubten Region kommen lediglich 1,8 % aller Aminosäuren vor.

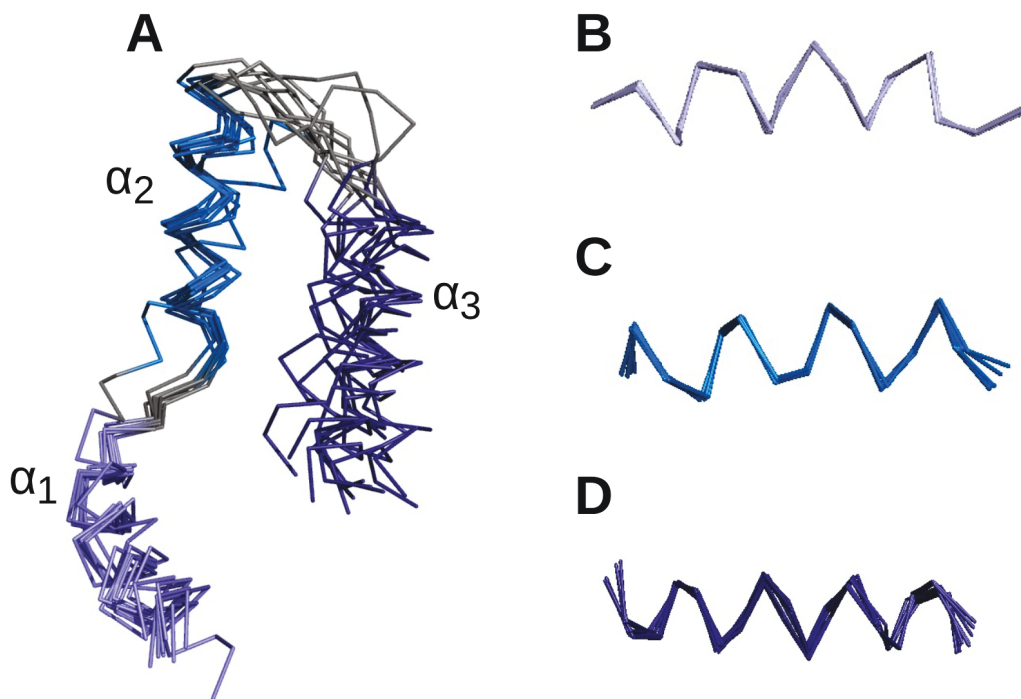


Abbildung 4.12: Die 10 energetisch günstigsten Konformation von Vpr in 50 mM DPC. A) Überlagerung der Kernregion von E22 bis F77 des Vpr. Überlagerung von α_1 (B), α_2 (C) und α_3 (D) des Vpr.

Zur weiteren Analyse der globalen Faltung wurde die energetisch günstigste Struktur von HIV-2 Vpr in 50 mM DPC visualisiert (Abb. 4.13). Durch Analyse der Struktur mit PyMOL konnte zwischen α_1 und α_2 ein Winkel von etwa 79° berechnet werden. Die α -Helices α_2 und α_3 sind dagegen parallel versetzt voneinander in einem Winkel von ca. 143° angeordnet. Alle drei α -Helices weisen eine Krümmung auf, die für α_1 bei ca. 144° , für α_2 bei ca. 167° und für α_3 bei etwa 165° liegt (Abb. 4.13). Des Weiteren wird deutlich, dass vor allem am N- und C-Terminus große Teile des Proteins unstrukturiert vorliegen. Der erste interhelikale Linker ist wie aus der TALOS-N Analyse (Kap. 4.5.3) zu erwarten war kürzer als der zweite interhelikale Linker.

Da es sich bei der berechneten, globalen Struktur nur um die Proteinrückgratstruktur des HIV-2

Vpr handelt, liegen für die Seitenketten der Aminosäuren des Vpr keine Informationen vor. Es ist noch zu erwähnen, dass es bei Berechnung der globalen Proteinrückgratstruktur von HIV-2 Vpr ohne die manuell eingefügten NOE-basierten Distanzeinschränkungen zu keiner Änderung der globalen Faltung des Vpr kam. Lediglich der Proteinrückgrat-RMSD der Vpr-Kernregion (E22 bis F77) der 10 energetisch günstigsten Konformationen war ohne die NOE-basierten Abstände mit $2,57 \pm 1,78$ Å leicht erhöht.

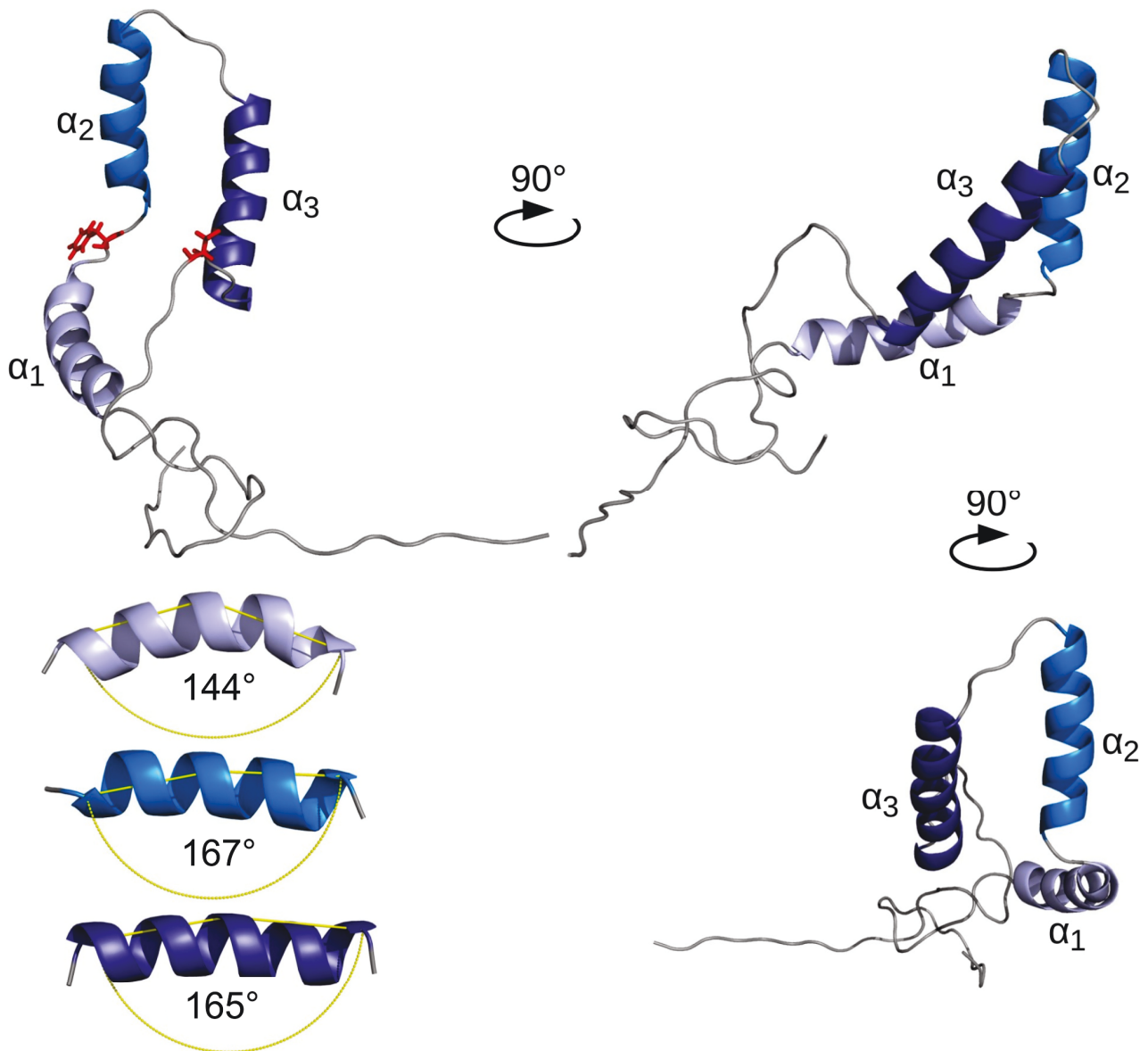


Abbildung 4.13: Energetisch günstigste globale Proteinrückgratstruktur von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen. Die drei α -Helices sind in hellblau (α_1), marineblau (α_2) und dunkelblau (α_3) dargestellt. Die Krümmung jeder α -Helix wurde bestimmt und ist in der Abbildung angegeben. Die paramagnetisch markierten Aminosäuren F39 und C81 sind in rot als Stick Darstellung gezeigt.

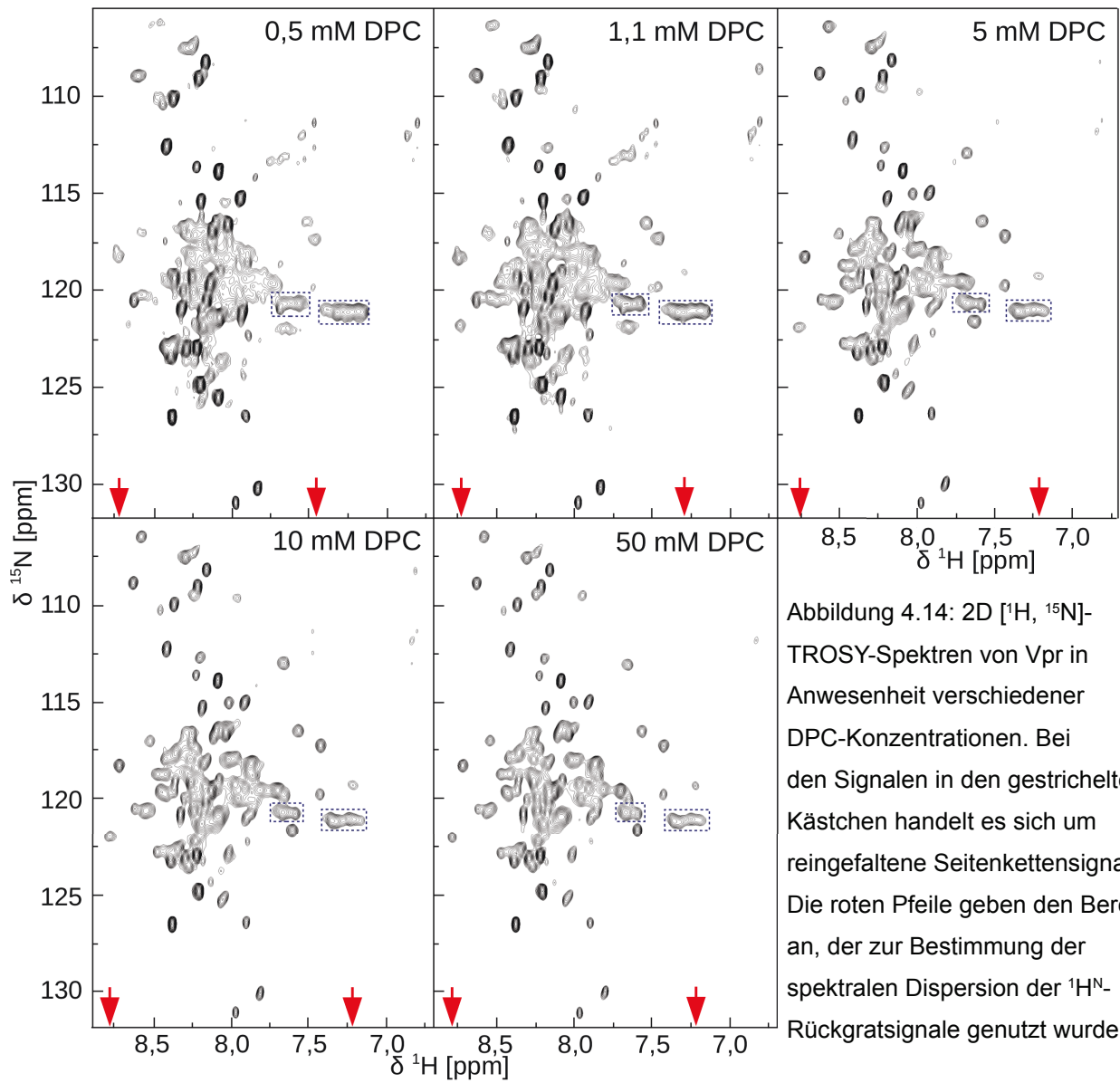
4.5.6. Lokalisation von Vpr in der DPC-Mizellen

Da HIV-2 Vpr in Abwesenheit von DPC eine begrenzte Löslichkeit ($<10\text{ }\mu\text{M}$) aufweist, wurde die Interaktion von Vpr mit DPC-Mizellen durch Titration von DPC und Mn^{2+} untersucht.

4.5.6.1. Titration von DPC zu Vpr

Zur Untersuchung der Interaktion von HIV-2 Vpr mit DPC wurde $100\text{ }\mu\text{M}$ Vpr in DPC-Titrations-Puffer gelöst und DPC hinzutitriert. So konnten 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von Vpr in Anwesenheit von $0,5\text{ mM}$, $1,1\text{ mM}$, 5 mM , 10 mM und 50 mM DPC aufgenommen werden. Die Spektren sind in Abbildung 4.14 dargestellt. In den Spektren wird deutlich, dass die Dispersion der $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Rückgratsignale stark von der Konzentration des DPC abhängig ist. Vor allem bei DPC-Konzentrationen von $0,5\text{ mM}$ und $1,1\text{ mM}$ besteht eine deutliche Signalüberlagerung im Bereich von $7,5\text{ ppm}$ bis $8,5\text{ ppm}$. Zusätzlich wird mit Erhöhung der DPC-Konzentration die Intensität der Resonanzsignale größer. So konnte bereits vor dem Starten der NMR-Messung bei Erhöhung der DPC-Konzentration auf $1,1\text{ mM}$ bzw. 5 mM DPC beobachtet werden, dass es zu einem Lösen von sichtbaren Proteinaggregaten in der Probe kam.

Zur besseren Analyse der spektralen Dispersion wurde diese als Funktion der DPC-Konzentration abgebildet und ist in Abbildung 4.15 dargestellt. So kommt es zu einer Änderung der spektralen Dispersion der $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Rückgratsignale des Vpr von $1,25\text{ ppm}$ auf $1,56\text{ ppm}$ bei Erhöhung der DPC-Konzentration von $0,5\text{ mM}$ auf 50 mM . Diese Vergrößerung der Dispersion deutet zunächst einmal auf eine Zunahme von Strukturelementen im Vpr hin, die eine Abhängigkeit von DPC zeigen. Die stärkste Dispersionsteigerung besteht bei der Erhöhung des DPC von $0,5\text{ mM}$ auf $1,1\text{ mM}$. Nach diesem Titrationsschritt nimmt die Dispersion von $1,25\text{ ppm}$ auf $1,45\text{ ppm}$ zu. Bei ca. $1,1\text{ mM}$ handelt es sich um die kritische Mizellenkonzentration von DPC (cmc), bei der es zur Ausbildung von DPC-Mizellen kommt. Bei der Steigerung der DPC-Konzentration von 10 mM auf 50 mM kommt es zu keiner Änderung der Dispersion mehr. Somit hat Vpr bei einem Verhältnis von 1 Vpr pro 1,6 DPC-Mizellen seine vollständige Struktur in DPC erhalten.



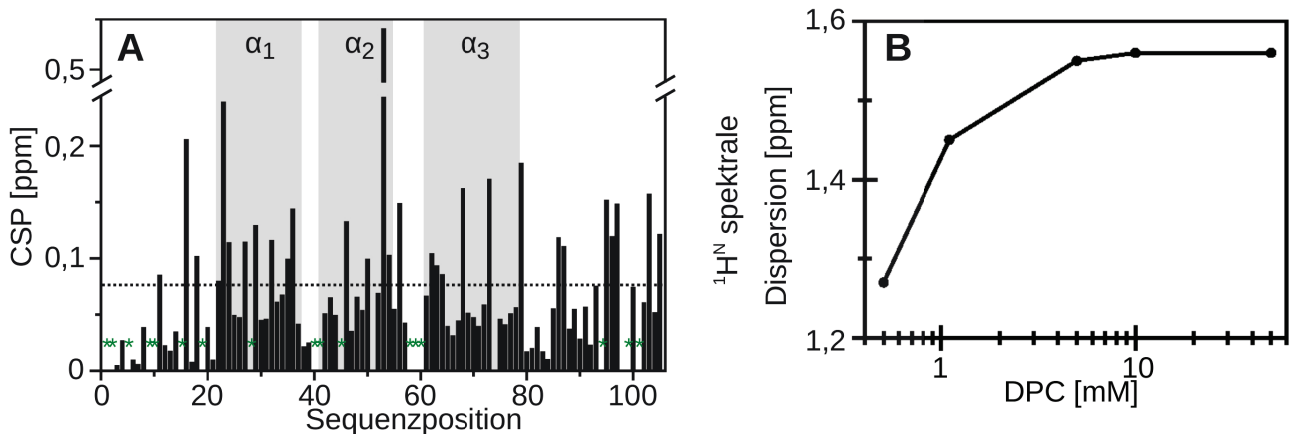


Abbildung 4.15: CSPs und spektrale Dispersion von Vpr bei Titration von DPC. A) CSPs von Vpr bei Erhöhung der DPC-Konzentration von 1,1 mM auf 50 mM. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert aller Signale von 0,075 ppm an. Für Aminosäuren mit einem * konnten keine CSPs ermittelt werden, da diese nicht zugeordnet waren. Die drei α -Helices sind als graue Rechtecke angedeutet. B) Die spektrale Dispersion der ^1H -Rückgratsignale von Vpr als Funktion der DPC-Konzentration.

Um den Einfluss des DPC auf einzelne Aminosäuren zu charakterisieren, wurden die CSPs der Resonanzsignale der Aminosäuren des Vpr bei Erhöhung der DPC-Konzentration von 1,1 mM auf 50 mM berechnet (Abb. 4.15). Da bei dem 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektrum von Vpr in Anwesenheit von 0,5 mM DPC nicht alle Signale einwandfrei identifiziert werden konnten, wurden die chemischen Verschiebungen bei dieser DPC-Konzentration nicht zum Berechnen der CSPs verwendet. Die Analyse der CSPs zeigt, dass Resonanzsignale von Aminosäuren in allen Regionen des Vpr Änderungen der chemischen Verschiebung erfahren. Allerdings befinden sich 17 der 28 (60,7 %) betroffenen Resonanzsignale, die eine Änderung der chemischen Verschiebung größer als den Durchschnittswert von 0,075 zeigen, zu Aminosäuren in den drei α -Helices. Weitere sieben gehören zu Aminosäuren im unstrukturierten C-Terminus sowie drei zum N-Terminus und eine zum zweiten interhelikalen Linker. Die größte Änderung der chemischen Verschiebung bei Erhöhung der DPC-Konzentration von 1,1 mM auf 50 mM zeigt das Resonanzsignal von T53 in α_2 mit 0,54 ppm und die zweitgrößte CSP tritt mit 0,24 ppm für W23 in α_1 auf.

4.5.6.2. Titration von Mn^{2+} zu Vpr in DPC-Mizellen

Um Aminosäurereste von HIV-2 Vpr zu identifizieren, die Zugänglichkeit zum Puffer zeigen, wurde Mn^{2+} zu 100 μM Vpr in 50 mM DPC titriert. Die pufferzugänglichen Reste zeigen aufgrund des paramagnetischen Effekts des Mn^{2+} eine Linienverbreiterung bis hin zum kompletten Verschwinden ihrer Resonanzsignale. Es wurden 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektren von Vpr in DPC-Mizellen in Abwesenheit und Anwesenheit von 8 μM , 12,5 μM , 21 μM , 44 μM , 100 μM und 350 μM Mn^{2+} aufgenommen. In Abbildung 4.16 sind die Spektren von Vpr in Abwesenheit sowie Anwesenheit von 100 μM und 350 μM Mn^{2+} dargestellt. In den Spektren ist erkennbar, dass einige Resonanzsignale, wie die Signale von G19, A35 und G60 bei 100 μM Mn^{2+} bereits komplett gelöscht sind (Abb. 4.16). Es wird aber auch deutlich, dass andere Resonanzsignale auch in Anwesenheit von 350 μM Mn^{2+} nur leichte Linienverbreiterungen zeigen und noch immer sichtbar sind. Zu diesen Signalen gehören unter anderem die Resonanzsignale von L44, Q70 und A79 (Abb. 4.16). Um Regionen des Vpr zu identifizieren die vom Puffer abgeschirmt vorliegen, wurden die Signalintensitäten der Spektren in Anwesenheit von Mn^{2+} mit Hilfe von Gleichung 19 auf das Spektrum in Abwesenheit von Mn^{2+} normiert und gegen die Sequenz des Vpr aufgetragen. Da der Effekt in Anwesenheit von 350 μM Mn^{2+} am stärksten war, sind die normierten Intensitätsverhältnisse bei dieser Mn^{2+} -Konzentration in Abbildung 4.16 dargestellt. Dabei wird deutlich, dass der N-Terminus, die beiden interhelikalen Linker, α_1 sowie die Aminosäuren G61 bis L65 in α_3 von Vpr komplett durch Mn^{2+} gelöscht werden und somit zugänglich für den Puffer sind. Die Aminosäuren R42 bis T53 in α_2 , I66 bis F77 in α_3 und R78 bis I98 sind dagegen noch immer detektierbar. Besonders stark vom Puffer abgeschirmt sind die Aminosäuren von L44 bis I51 in α_2 , L69 bis F74 in α_3 sowie R85 bis I98 und R102 im C-Terminus von Vpr, da deren Resonanzsignale alle ein Intensitätsverhältnis von mehr als 0,2 besitzen. Die stärkste Abschirmung vom Puffer erfährt die Aminosäure L47 in α_2 mit einem Resonanzsignal-Intensitätsverhältnis von 0,62.

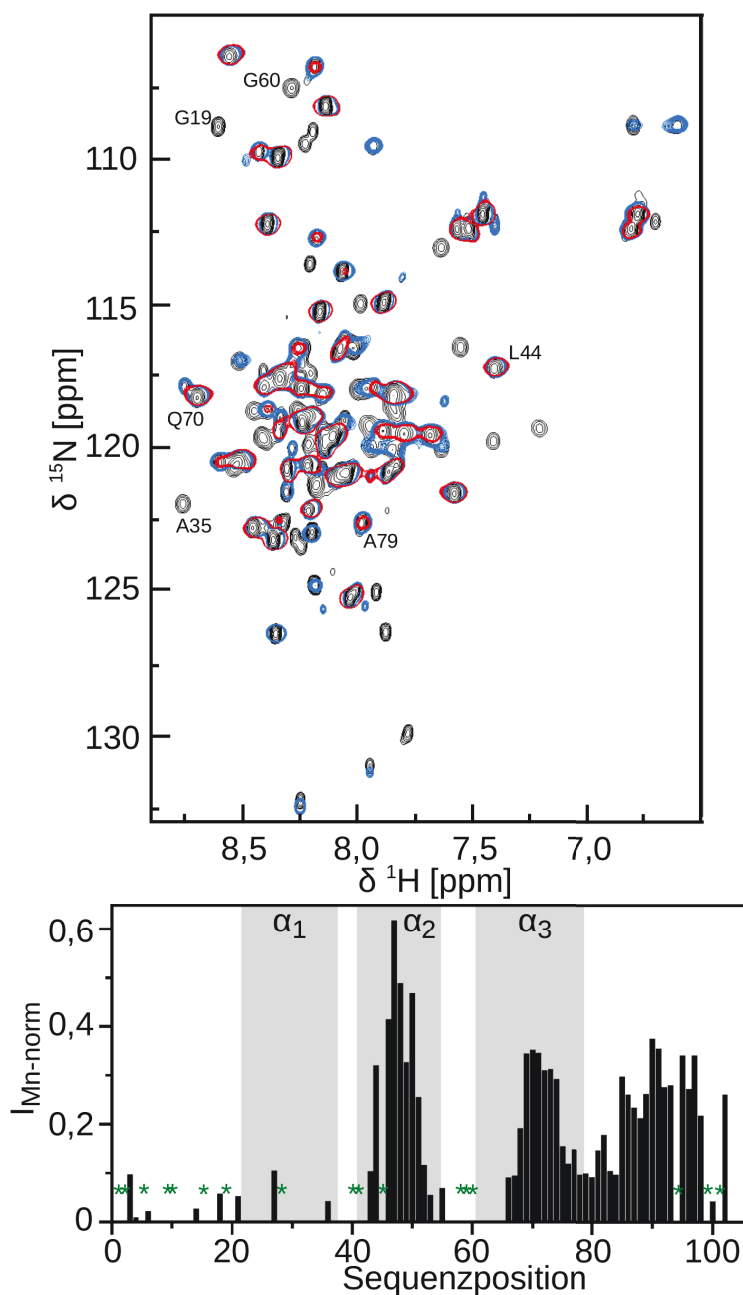


Abbildung 4.16: Titration von Mn^{2+} zu HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen. 2D $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von Vpr in Abwesenheit (schwarz) sowie Anwesenheit von 100 μM (hellblau) und 350 μM (rot) Mn^{2+} . Normierte Intensitätsverhältnisse ($I_{\text{MN-norm}}$) der Resonanzsignale von Vpr in Anwesenheit von 350 μM Mn^{2+} . Für Aminosäuren mit einem * konnten keine $I_{\text{MN-norm}}$ bestimmt werden, da für diese keine Resonanzzuordnung der Aminogruppe vorlag. Die grauen Rechtecke deuten die drei α -Helices von Vpr an.

4.5.7. Dynamiken des Proteinrückgrats von Vpr in DPC-Mizellen

Zur Charakterisierung der Dynamiken des Proteinrückgrats von HIV-2 Vpr wurden ^{15}N T_1 , ^{15}N $T_{1\rho}$ und hetNOE-Experimente mit Vpr in NMR-Puffer bei 40 °C durchgeführt. Die Spektren wurden bei

Magnetfeldstärken von 14,1 und 18,8 T aufgenommen. Mit Hilfe dieser konnten die longitudinale Relaxationsrate R_1 , die transversale Relaxationsrate R_2 und die hetNOE-Verhältnisse berechnet werden. Diese geben Auskunft über flexible und rigide Bereiche des Proteins und wurden gegen die Sequenz des Vpr aufgetragen (Abb. 4.17).

Bei Betrachten der Werte wird deutlich, dass die Kernregion E22 bis F77 relativ rigide ist, wohingegen der N- und C-Terminus hochflexibel vorliegen. So hat die Kernregion eine mittlere R_1 Rate von 1,17 Hz (14,1 T) bzw. 0,85 Hz (18,8 T) und eine mittlere R_2 Rate von 16,33 Hz (14,1 T) bzw. 20,24 Hz (18,8 T). Auch die hetNOE-Verhältnisse zeigen bei beiden Magnetfeldstärken für E22 bis F77 Werte um 0,65. Für die Termini sind die hetNOE-Werte weit unter 0,65 und gehen bis in den negativen Bereich, was die hohe Flexibilität der Termini deutlich macht. Für die Kernregion ist noch zu erwähnen, dass die R_1 und R_2 Raten eine stärkere Flexibilität für den zweiten interhelikalen Linker (H55 bis E60) andeuten könnten als für die anderen Aminosäuren dieser Region. Allerdings liegen für den Bereich des zweiten interhelikalen Linkers nur sehr wenige Daten vor, so dass fundiertere Aussagen im Moment nicht möglich sind.

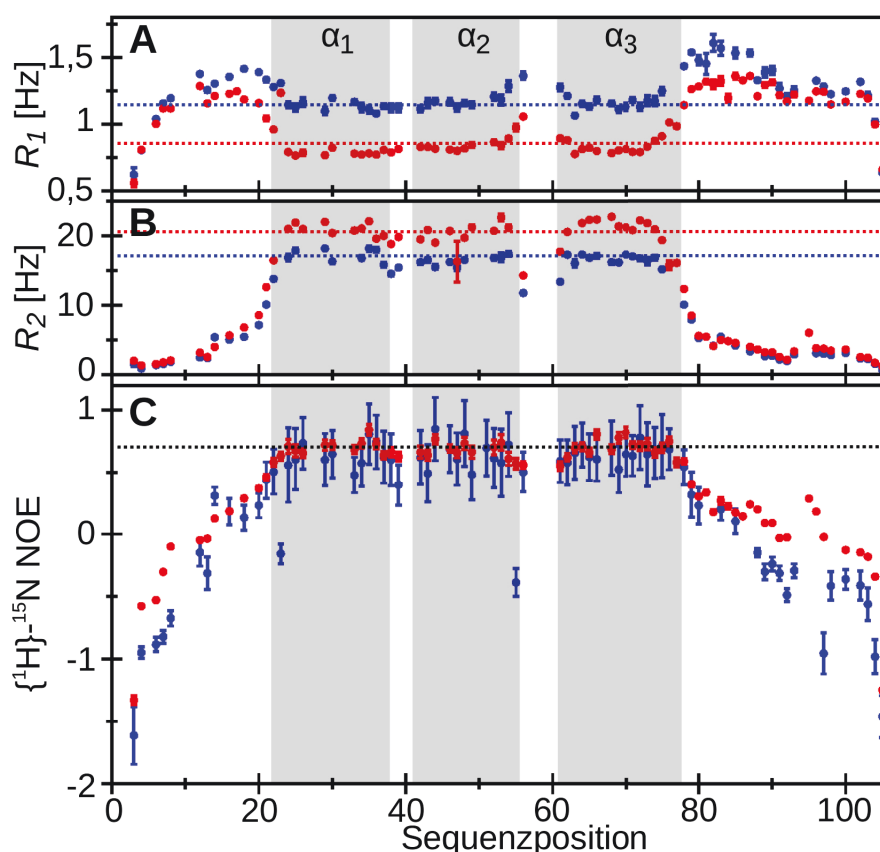


Abbildung 4.17: Dynamiken des Proteinrückgrats von Vpr in 50 mM DPC. R_1 (A) und R_2 (B) Raten sowie die hetNOE-Verhältnisse (C) wurden bei 14,1 T (blau) und 18,8 T (rot) bestimmt. A/B) die gestrichelten, farbigen Linien geben den Mittelwert der Raten der Kernregion von E22 bis F77 an. C) Die gestrichelte schwarze Linie stellt einen hetNOE-Wert von 0,65 dar. Die grauen Rechtecke deuten die drei α -Helices von Vpr an.

4.5.7.1. Analyse der Relaxationsdaten mittels Tensor2

Die R_1 und R_2 Raten sowie die hetNOE-Verhältnisse von Vpr bei Magnetfeldstärken von 14,1 T und 18,8 T wurden für die Modell-Free Analyse mittels Tensor2 (Kap. 3.8.7.6.1.) verwendet. Die Analyse wurde für jede Magnetfeldstärke unabhängig von der anderen durchgeführt und die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

Die Analyse von Relaxationsdaten mit Hilfe von Tensor2 liefert neben den Modell-Free-Parametern S^2 , R_{ex} und τ_e auch die globale Rotationskorrelationszeit τ_c eines Proteins bzw. Protein-Mizellen-Komplexes. Für den Komplex aus Vpr und DPC-Mizelle wurde bei einer Temperatur von 40 °C ein τ_c von $10,72 \pm 0,2$ ns (14,1 T) bzw. $11,45 \pm 0,2$ ns (18,8 T) bestimmt. Mit Hilfe von Gleichung 13 konnten aus der globalen Rotationskorrelationszeit der hydrodynamische Radius r_h des Vpr-DPC-Mizellen-Komplex berechnet werden, wobei man bei 14,1 T $2,55 \pm 0,31$ nm und bei (18,8 T) $2,61 \pm 0,3$ nm erhält.

Da ein S^2 von 0 bedeutet, dass dieser Aminosäurerest hochflexibel ist, wohingegen ein Wert von 1 eine hohe Rigidität für diesen Aminosäurerest angibt, spiegelt der Parameter S^2 die bereits angesprochene Rigidität der Kernregion E22 bis F77 des Vpr wieder (Abb. 4.18). So liegt der Mittelwert dieses Bereiches bei $0,89 \pm 0,016$ bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T und bei $0,92 \pm 0,013$ bei einer Magnetfeldstärke von 18,8 T. An den unstrukturierten Termini des Vpr fällt der Parameter S^2 dagegen innerhalb von zwei Aminosäureresten vor bzw. nach der Kernregion unter 0,5 ab und liegt für die meisten Reste der beiden Termini unter 0,25. Die Aminosäurereste der Kernregion sind dagegen sehr konstant um den jeweiligen Mittelwert verteilt. Es weichen lediglich die Reste F39 mit einem S^2 von $0,81 \pm 0,04$ (14,1 T) und G56 mit einem S^2 von $0,74 \pm 0,02$ (14,1 T) bzw. $0,74 \pm 0,01$ (18,8 T) in den beiden interhelikalen Linker leicht vom Mittelwert hin zu flexibleren S^2 -Werten ab.

Die Auswertung der bei 14,1 T gewonnenen Daten mit dem Programm Tensor2 deutet darauf hin, dass nur für 36 Aminosäuren des Vpr signifikante interne Bewegungen auf der Pico- bis Nanosekunden Skala (τ_e) vorliegen (Abb. 4.18). Diese haben τ_e -Zeiten von 0,122 bis 1,409 ns und sind bis auf E33 (α_1) und G61 (α_3) alle in den flexiblen Termini lokalisiert. Zieht man zur Auswertung die 18,8 T Daten heran, so erhält man für 66 Aminosäurereste, die über das komplette Vpr verteilt sind, τ_e -Zeiten von 0,047 bis 1,2 ns (Abb. 4.18). Im Bereich der Termini variieren die τ_e -Zeiten allerdings wesentlich geringer (von 0,31 bis 1,1 ns) als in der Kernregion mit τ_e -Zeiten von 0,047 bis 1,2 ns.

Die chemische Austauschrate R_{ex} , gibt Hinweise auf chemischen Austausch auf der Mikro- bis Millisekunden Zeitskala. Dies wiederum kann Indizien für konformationelle Änderungen des Vpr geben. Von R_{ex} betroffen sind nur Aminosäurereste der drei α -Helices und dem ersten interhelikalen Linker (H38 und F39) mit Raten von 1,3 Hz bis 5,3 Hz bei 14,1 T bzw. 0,6 Hz bis 5,2 Hz

bei 18,8 T.

Auch hier liegen für den zweiten interhelikalen Linker nur wenige Informationen vor, so dass kaum Aussagen über die Dynamik dieser Region des HIV-2 Vpr getroffen werden können.

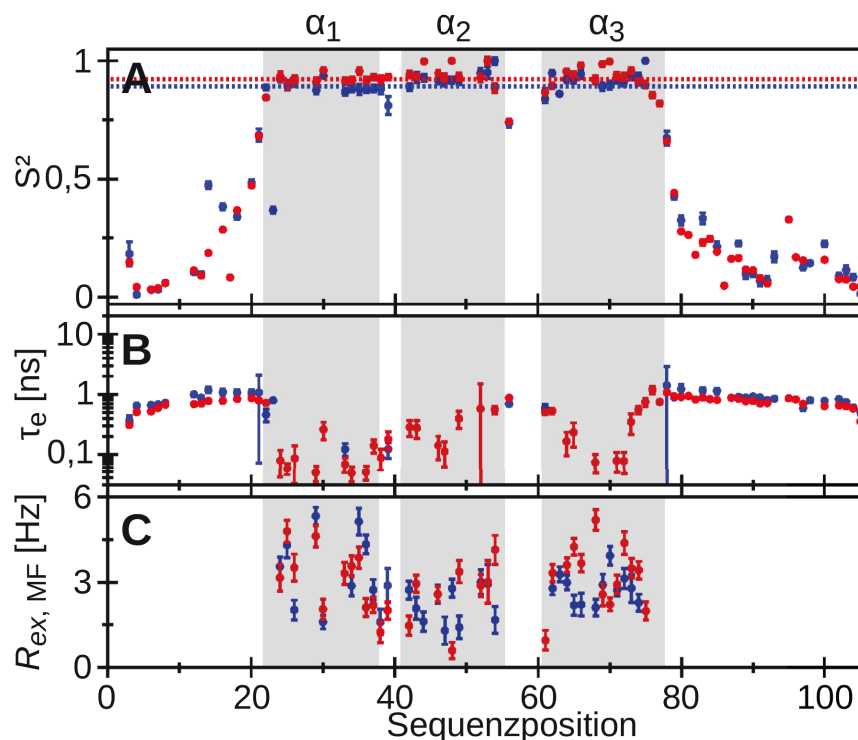


Abbildung 4.18: Analyse der Relaxationsdaten von Vpr mittels Tensor2. Die Analyse wurden mit den R_1 und R_2 Raten sowie hetNOE-Verhältnissen durchgeführt, die bei 14,1 T (blau) und 18,8 T (rot) bestimmt wurden. A) S^2 -Werte von Vpr. Die gestrichelten Linien geben den Mittelwert der Kernregion von E22 bis F77 bei der jeweiligen Protonenlarmorfrequenz an. B) Interne Korrelationszeit τ_e , die Bewegungen der Aminosäuren im Pico- bis Nanosekunde-Bereich angibt. C) Chemische Austauschrate R_{ex} der jeweiligen Aminosäure des Vpr, die Rückschlüsse über mögliche Konformationsänderungen liefert. Die drei α -Helices von Vpr sind als graue Rechtecke angedeutet.

4.5.7.2. Analyse der Relaxationsdaten mittels reduzierter spektraler Dichtefunktion

Zusätzlich zu Tensor2 wurden die Relaxationsdaten von Vpr bei 14,1 T und 18,8 T für ein spektrales Dichte-Mapping genutzt. Auch dieses wurde für beide Magnetfeldstärken unabhängig voneinander durchgeführt. Unter anderem wurde mit Hilfe der reduzierten spektralen Dichtefunktionen die globale Rotationskorrelationszeit τ_c von Vpr bestimmt. Diese betrug bei 14,1 T $11,88 \pm 0,73$ ns und bei 18,8 T $11,97 \pm 0,84$ ns. Dadurch konnte für den Vpr-DPC-Mizellen-Komplex mit Gleichung 13 ein hydrodynamischer Radius r_h von $2,64 \pm 0,48$ nm (14,1 T) bzw.

$2,65 \pm 0,51$ nm (18,8 T) berechnet werden.

Die berechneten Werte der reduzierten spektralen Dichten $J(\omega_H)$, $J(\omega_N)$ und $J(0)$ wurden als Funktion der Vpr-Sequenz aufgetragen und sind in Abbildung 4.19 dargestellt. Zur Analyse wurden immer die Mittelwerte aus der Kernregion des Vpr (E22 bis F77) für jede Magnetfeldstärke und jede spektralen Dichtefunktion berechnet. Bei allen drei Funktionen sind die berechneten Werte für die Aminosäurereste der Kernregion konstant um den Mittelwert verteilt und zeigen bis auf G56 im zweiten interhelikalen Linker keine großen Abweichungen. Die beiden Termini zeigen dagegen signifikante Abweichungen von den Mittelwerten der Kernregion, mit wesentlich geringeren $J(0)$ -Werten und höheren $J(\omega_H)$ -Werten und besitzen somit schnelle Dynamiken im Piko- bis Nanosekunden-Bereich. Aussagen über chemischen Austausch (R_{ex}) konnten mit den Daten des spektralen Dichte-Mappings von Vpr nicht getroffen werden.

Die $J(0)$ -Mittelwerte der Kernregion E22 bis F77 liegen bei $4,45 \pm 0,1$ ns (14,1 T) bzw. $4,64 \pm 0,1$ ns (18,8 T). Die Mittelwerte der Funktionen von $J(\omega_H)$ sind $0,007 \pm 0,004$ ns (14,1 T) bzw. $0,004 \pm 0,001$ ns (18,8 T) und von $J(\omega_N)$ sind diese $0,21 \pm 0,01$ ns (14,1 T) bzw. $0,13 \pm 0,002$ (18,8 T) für die Kernregion von Vpr.

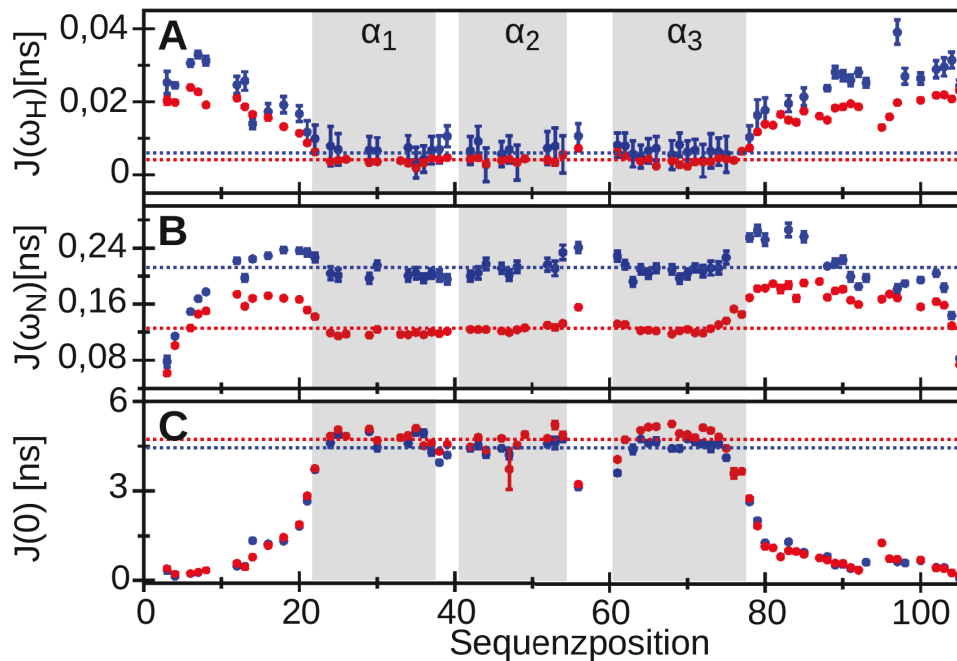


Abbildung 4.19: Reduziertes spektrale Dichtefunktions-Mapping von Vpr bei 14,1 T (blau) und 18,8 T (rot). A) $J(\omega_H)$, (B) $J(\omega_N)$ und (C) $J(0)$. Die gestrichelten Linien geben die Mittelwerte der jeweiligen spektralen Dichtefunktion bei entsprechender Magnetfeldstärke für die Kernregion E22 bis F77 an. Die Positionen der α -Helices von Vpr sind als graue Rechtecke angedeutet.

4.5.8. Vpr in Nanodisks

Neben der strukturellen Charakterisierung von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen wurden Nanodisks als Modellmembran zur Charakterisierung des Vpr verwendet. Diese besitzen Lipiddoppelschichten und stellen eine physiologischere Umgebung für Membranproteinen als Mizellen dar.

4.5.8.1. NMR mit Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks

Nach erfolgreicher Assemblierung von Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks (Kap. 4.3.1) wurde ein 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum von Vpr in ND-SEC-Puffer (+ 10 % D_2O) bei pH 7,4 und 25 °C aufgenommen (Abb. 4.20A). In diesem Spektrum von Vpr waren 24 Resonanzsignale von Proteinerückgrat-HN-Gruppen sichtbar. Die restlichen Signale des Vpr konnten nicht detektiert werden, da der Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks-Komplex aufgrund seiner Größe eine zu langsame Rotationsdiffusion aufweist und somit die transversale Relaxation der Kerne zu schnell ist. Dies führt dazu, dass die Intensität der Signale abnimmt und diese im Rauschen verschwinden. Allerdings weist dies auf eine deutliche Interaktion von Vpr mit Nanodisks hin. Resonanzsignale von HIV-2 Vpr in MSP1-POPC-Nanodisks, die durch Vergleich mit dem Spektrum von Vpr in DPC-Mizellen zugeordnet werden konnten, gehörten zu Aminosäuren in den flexiblen Termini von Vpr. Diese interagieren somit nicht mit der Nanodisks und besitzen zusätzlich zur Rotationsdiffusion des Vpr-Nanodisks-Komplex eine unabhängige Bewegung.

4.5.8.2. NMR mit Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks

Zusätzlich wurden MSP1D1-DMPC-Nanodisks verwendet. Diese besitzen einen ähnlichen hydrodynamischen Durchmesser von ~11 nm wie MSP1-POPC-Nanodisks. Das MSP1D1 ist allerdings 11 Aminosäuren kürzer als das MSP1. Diese Aminosäuren waren bei MSP1 nicht an der Bildung der eigentlichen Nanodisks beteiligt und somit überhängend (Denisov et al. 2004). Des Weiteren wurde DMPC genutzt, welches gesättigte Fettsäuren besitzt und eine höhere thermische Stabilität aufweist. Die 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von Vpr in MSP1D1-DMPC-Nanodisks wurden in DPC-freiem NMR-Puffer bei 40 °C aufgenommen. Dabei wurde Vpr entweder vor der Assemblierung der Nanodisks zum MSP1D1-DMPC-Gemisch gegeben oder lyophilisiertes Vpr zu assemblierten Nanodisks gegeben (siehe Kap. 3.8.7.2.).

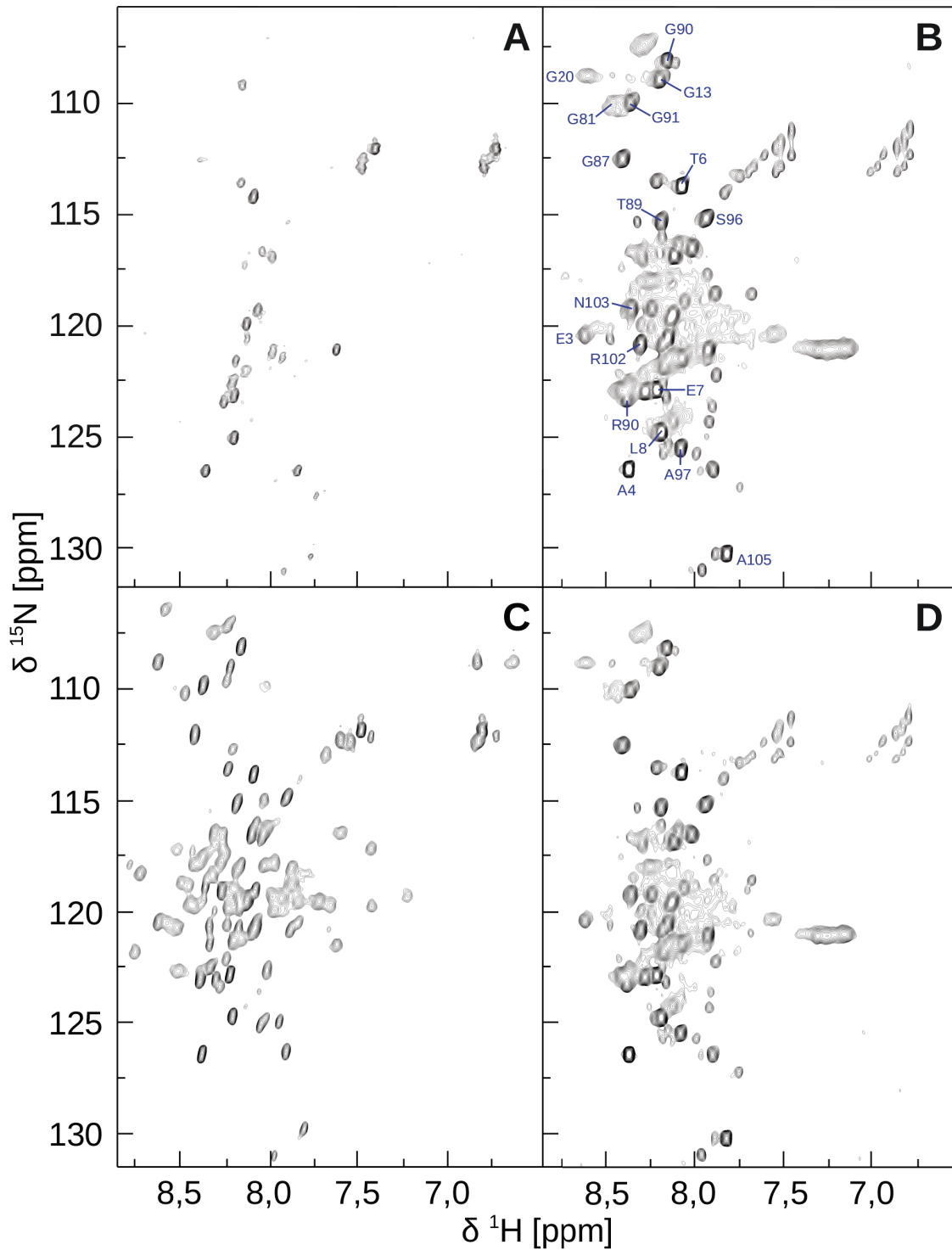


Abbildung 4.20: NMR-Spektren von Vpr in Nanodisks. A) 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum von Vpr in MSP1-POPC-Nanodisks bei pH 7,4 und 25 °C. B/D) 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von Vpr in MSP1D1-DMPC-Nanodisks bei pH 5 und 40 °C. B) Vpr wurde vor der Assemblierung zum MSP1D1-DMPC-Gemisch gegeben. D) Gefriergetrocknetes Vpr wurde zu assemblierten MSP1D1-DMPC-Nanodisks gegeben. C) 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum von Vpr in MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks bei pH 5 und 40 °C.

Die NMR-Spektren dieser Vpr-Nanodisks sind in Abbildung 4.20 (B/D) dargestellt. Beide Spektren waren identisch in Bezug auf die chemischen Verschiebungen und die Anzahl der detektierten Resonanzsignale. Dies deutet an, dass Vpr auch bei Zugabe zu einer bereits assemblierten Nanodisks eine identische Struktur erhält, wie bei Assemblierung der Membran in Anwesenheit von Vpr. In den 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von Vpr in MSP1D1-DMPC-Nanodisk wurden ~60 Resonanzsignale von Proteinrückgrat-HN-Gruppen detektiert. Dadurch fehlen noch immer über 30 Signale, die unter anderem aufgrund der Größe der Nanodisks nicht sichtbar sind. Besonders bei 8 ppm kommt es zu einer starken Überlagerung der Resonanzsignale und schwachen Signalintensitäten, was eine exakte Bestimmung der Anzahl der HN-Korrelationssignale erschwerte. Die Resonanzsignale mit starker Intensität gehörten zu Aminosäuren in den flexiblen Termini des Vpr und konnten teilweise mit Hilfe des Spektrums von Vpr in DPC-Mizellen zugeordnet werden (Abb. 4.20B). Es muss berücksichtigt werden, dass die Zuordnung durch Überlagerung der Spektren von Vpr in Nanodisks und DPC erreicht wurde und nicht experimentell bestimmt wurde.

4.5.8.3. NMR mit Vpr-MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks

Die in dieser Arbeit verwendeten MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks bestanden aus einem MSP1D1 aus dem die Aminosäuren 145 bis 166 bzw. nach Nummerierung von Hagn et al. (2013) die Aminosäuren 121 bis 142 entfernt wurden. Dadurch verringerte sich der hydrodynamische Durchmesser dieser Nanodisks auf ~9,2 nm (Hagn et al. 2013).

Zur Analyse von HIV-2 Vpr in diesen Nanodisks, wurden leere MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks assembliert und gefriergetrocknetes Vpr hinzugegeben (Kap. 3.8.5.). Das NMR-Spektrum wurde in DPC-freiem NMR-Puffer bei 40 °C an 100 μM Vpr-MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks aufgenommen. Das 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum von Vpr ist in Abbildung 4.20C dargestellt. In diesem Spektrum wird deutlich, dass es zu einer besseren Dispersion der Resonanzsignale des Vpr im Vergleich zu den beiden größeren Nanodisks kam. Es konnten mehr als die 94 erwarteten HN-Korrelationssignale gezählt werden, wobei die genaue Anzahl aufgrund von Signalüberlagerungen nicht bestimmt werden konnte. Dies lässt zunächst darauf schließen, dass durch die geringere Größe der verwendeten Nanodisks die Rotationsdiffusion des Vpr-Nanodisks-Komplexes wesentlich höher ist. Somit konnten auch die membraninteragierenden Aminosäurereste des Vpr detektiert werden.

Zur besseren Analyse des Spektrums von Vpr in MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks wurde dieses mit einem Spektrum von Vpr in 50 mM DPC überlagert. Ausserdem wurden mit Hilfe von Gleichung 9 und den chemischen Verschiebungen von Vpr in DPC-Mizellen und MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks

die CSPs der Resonanzsignale von Vpr zwischen DPC- und Nanodisks-Spektrum berechnet. Die Überlagerung und die berechneten CSPs sind in Abbildung 4.21 dargestellt.

Bei der Überlagerung der Spektren ist deutlich zu erkennen, dass es zu keinen großen strukturellen Änderung des Vpr kommt, da die meisten Signale aufeinander liegen. Das Spektrum von Vpr in DPC-Mizellen zeigt geringere Linienbreiten für die Resonanzsignale, was besonders zwischen 8,0 ppm und 8,5 ppm deutlich wird. Im [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum von Vpr in MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks ist zusätzlich zu erkennen, dass es zu der bereits angesprochenen Zunahme von HN-Korrelationssignalen gekommen ist. Ob es sich dabei um Abbauprodukte, cis-trans-Konformationen oder einen anderen Effekt handelt konnte nicht geklärt werden.

Die Analyse der Spektren mit Hilfe der CSPs zeigt, dass am N-Terminus und in α_1 , mit Ausnahme von E18, G20 und A35 kaum eine Änderung der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale auftritt. Die meisten Änderungen liegen unter dem Mittelwert von 0,058 ppm für alle berechneten CSPs. Besonders groß ist der Unterschied der chemischen Verschiebungen dagegen an den Termini von α_2 , da dort die Aminosäurereste R42, L43, L44, L46, Y52, T53 und R54 CSPs größer als den Durchschnittswert zeigen. Ausserdem zeigen die Resonanzsignale der Reste R42 mit 0,139 ppm, L43 mit 0,153 ppm, T53 mit 0,127 ppm und R54 mit 0,142 ppm die größten CSPs aller Resonanzsignale. Lediglich das Signal von A105 am C-Terminus hat mit 0,134 ppm eine ähnlich starke Änderung seiner chemischen Verschiebung. Für die dritte Helix α_3 zeichnet sich ein vergleichbares Bild wie für die erste Helix, da hier lediglich die Resonanzsignale von I66 und H76 eine stärkere Verschiebung als den Mittelwert aufweisen. Im C-Terminus von Vpr sind dagegen wieder viele Aminosäuren von Änderungen größer als der Mittelwert betroffen. So zeigen die Resonanzsignale von R78, A79, G82 bis R85, G87 bis G91, L95, S96 sowie N103 und A105 einen CSP von über 0,058 ppm. Da in diesem Bereich von Vpr viele hydrophobe Aminosäuren auftreten, kann es sich bei der Interaktion von diesen mit DPC bzw. Lipiden, neben einer funktionellen allerdings auch um eine artifizielle Interaktion beispielsweise mit DPC-Monomeren handeln.

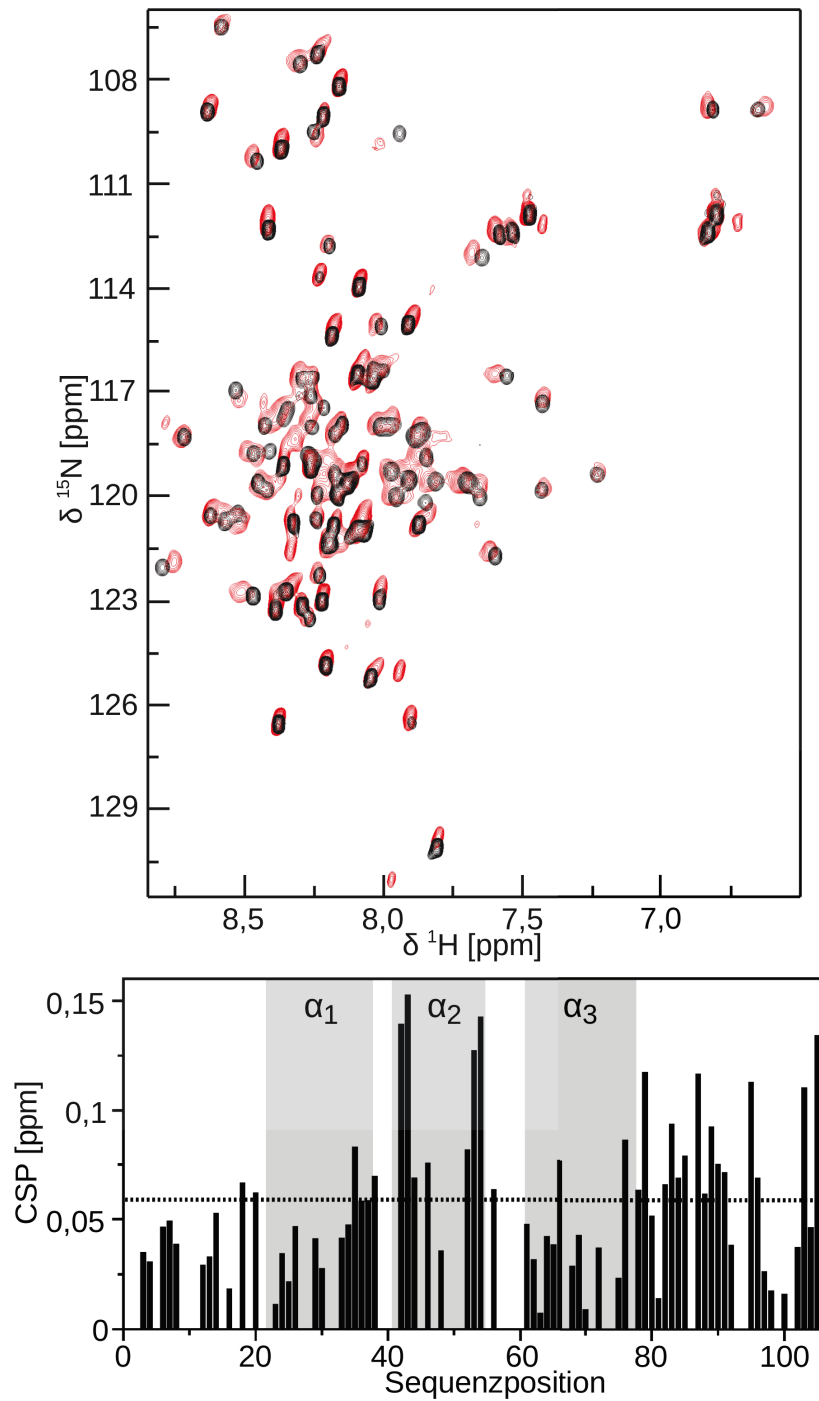


Abbildung 4.21: Vergleich von Vpr in DPC-Mizellen und MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks. Das 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum von Vpr in Nanodisks ist in rot, das Spektrum von Vpr in DPC-Mizellen ist in schwarz dargestellt. Die CSPs wurden mit Hilfe der chemischen Verschiebungen dieser beiden Spektren berechnet. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert (CSP=0,058 ppm) aller genutzten Signale an. Für Aminosäurereste ohne Balken konnte aufgrund von fehlender Zuordnung oder starker Signalüberlagerung keine CSP berechnet werden. Die grauen Rechtecke deuten die Position der drei α -Helices des Vpr an.

Um zu überprüfen, ob während der kompletten NMR-Messung Vpr-MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks vorlagen oder diese während der Messung degradierten, wurde eine SEC mit der NMR-Probe nach Beendigung des NMR-Experiments durchgeführt. Das Chromatogramm der SEC mit einer Superdex 200 10/300 GL ist in Abbildung 4.22 dargestellt. In diesem Chromatogramm ist deutlich erkennbar, dass es zu relativ kleinen Aggregaten von Nanodisks gekommen ist, die zwischen 10 und 12 ml eluieren. Die Fraktion der monomeren Nanodisks stellt allerdings den größten Teil der Nanodisks dar und eluiert bei ~12,7 ml. Dieses Elutionsvolumen von 12,7 ml entspricht einem Molekulargewicht von 127,5 kDa sowie einem hydrodynamischen Durchmesser von 8,4 nm. Somit stimmt der hydrodynamische Durchmesser mit den 9,2 nm von Hagn et al. (2013) in etwa überein. Die Analyse der Elutionsfraktion bei 12,7 ml mittels SDS-PAGE zeigt eine Koelution und somit Interaktion von Vpr mit Nanodisks, da sowohl MSP1D1Δ5 als auch Vpr detektiert werden konnten. Freies Vpr war in der NMR-Probe nicht oder nur in minimalen Mengen vorhanden, da bei etwa 15,5 ml kein weiterer Peak auftritt. Bei diesem Elutionsvolumen eluiert freies Vpr, was durch eine separate SEC mit modellmembranenfreiem Vpr überprüft wurde und als blaues Chromatogramm in Abbildung 4.22 dargestellt ist. Ein Elutionsvolumen von 15,5 ml entspricht einem Molekulargewicht von ca. 37,3 kDa und einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 5,1 nm. Dieser hydrodynamische Durchmesser deutet daraufhin, dass Vpr ohne Modellmembran wahrscheinlich ungefaltet ist oder als Trimer vorliegt.

Anhand der SEC lässt sich also sagen, dass die NMR-Messungen an Vpr in MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks durchgeführt wurden und wahrscheinlich keine artifiziellen Ergebnisse durch freies Vpr aufgetreten sind. Das NMR-Spektrum von Vpr (Abb. 4.20C) entspricht demnach einem Spektrum von HIV-2 Vpr in einer Lipiddoppelschicht.

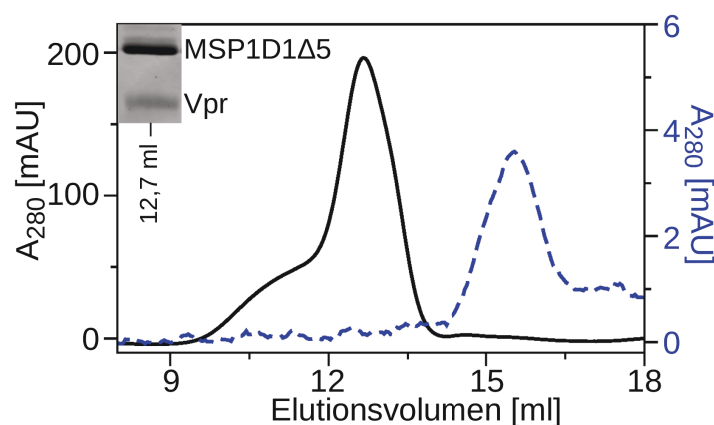


Abbildung 4.22: Größenausschlusschromatogramm von Vpr-MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks nach abgeschlossener NMR-Messung. Das Chromatogramm der Nanodisks ist in schwarz dargestellt. Die Peakfraktion bei 12,7 ml wurde zur Analyse auf eine SDS-PAGE aufgetragen und zeigt eine Koelution von Vpr mit MSP1D1Δ5. In blau ist das Chromatogramm einer separaten SEC mit Vpr in Abwesenheit einer Modellmembran dargestellt. Die Elution von freiem Vpr erfolgt bei ~15,5 ml.

4.5.9. Titration von HIV-2 p6 zu Vpr in DPC-Mizellen

Neben der strukturellen Charakterisierung von HIV-2 Vpr wurde die Interaktion der beiden HIV-2 Proteine Vpr und p6 mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Zur Untersuchung der Interaktion wurden 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von 8 μM ^{15}N -markiertem Vpr in Abwesenheit sowie Anwesenheit von 3 μM , 6 μM , 9,5 μM , 16 μM , 29 μM , 55 μM und 100 μM unmarkiertem p6 in NMR-Puffer bei 40 °C aufgenommen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den beiden nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

4.5.9.1. Bestimmung der Bindestelle von p6 in Vpr

Die 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von Vpr bei verschiedenen p6-Konzentration wurden zur Analyse übereinander gelegt (Abb. 4.23). Einige Resonanzsignale von Vpr zeigen bei Erhöhung der p6-Konzentration eine Änderung ihrer chemischen Verschiebung. Zu diesen gehören neben den exemplarisch dargestellten E18, D21 und G56 auch L16, R17, E22, I24, Y52 und F77. Es wird allerdings auch deutlich, dass es zu keiner großen strukturellen Änderung des Vpr bei Interaktion mit p6 kommt, da die Änderungen der chemischen Verschiebungen sehr gering sind und es kaum Unterschiede zwischen Vpr ohne und mit 100 μM p6 gibt. Des Weiteren tritt keine Sättigung der Änderung der chemischen Verschiebung bei Zugabe bis 100 μM p6 ein.

Da die chemische Verschiebung sehr sensitiv für Änderungen des pH-Werts oder auch DPC-Konzentration ist, wurde nach jeder Zugabe von p6 darauf geachtet, dass der pH-Wert konstant bei pH 5 war und eine konstante DPC-Konzentration von 50 mM vorlag.

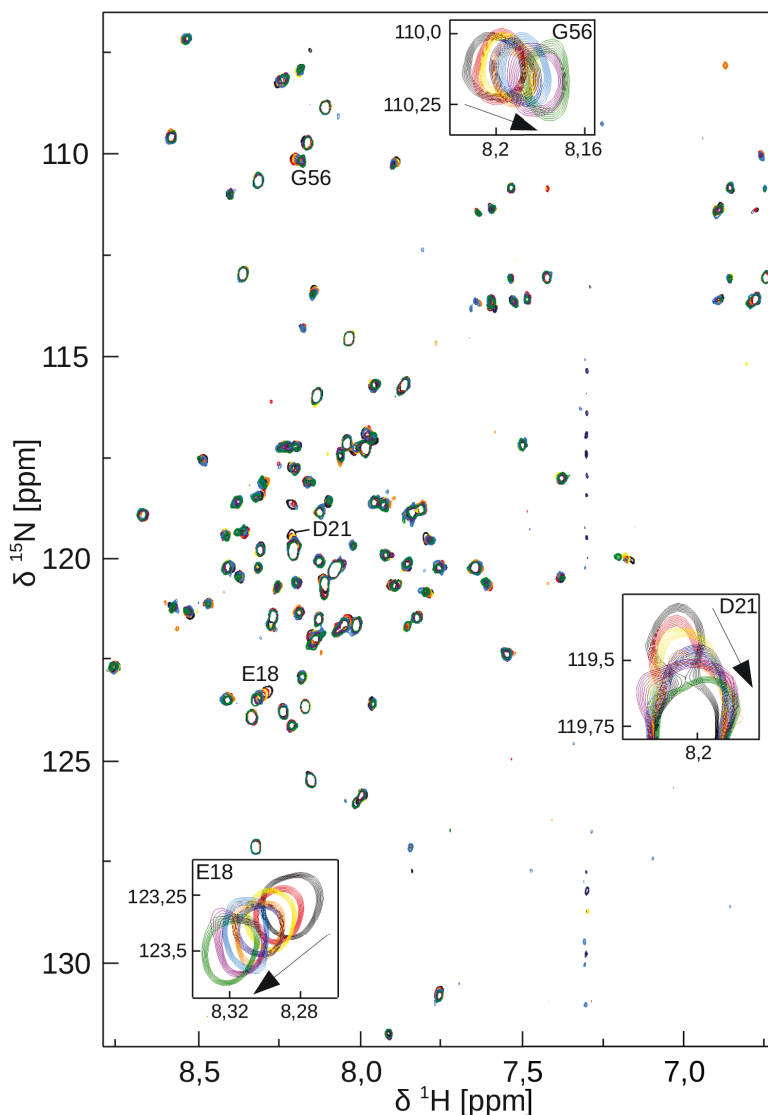


Abbildung 4.23: Überlagerung der 2D [^1H , ^{15}N]-TROSY-Spektren von Vpr in 50 mM DPC bei Titration mit p6. Gezeigt sind die Spektren in Abwesenheit (schwarz) sowie Anwesenheit von 3 μM (rot), 6 μM (gelb), 9,5 μM (dunkelblau), 16 μM (orange), 29 μM (hellblau), 55 μM (magenta) und 100 μM (grün) p6. Exemplarisch sind zusätzlich die Resonanzsignale von E18, D21 und G56 des Vpr vergrößert dargestellt. Der Pfeil gibt die Richtung der Änderung der chemischen Verschiebung bei Erhöhung der p6-Konzentration an.

Mit Hilfe von Gleichung 9 und den chemischen Verschiebungen der Resonanzsignale des Vpr in Abwesenheit und Anwesenheit von 100 μM p6 wurden die CSPs berechnet und gegen die Sequenz des Vpr aufgetragen (Abb. 4.24). Dies diente dazu, die Bindestelle von HIV-2 p6 in HIV-2 Vpr zu lokalisieren. Die größten Änderungen der chemischen Verschiebungen treten für die Resonanzsignale der Aminosäuren L16, R17, E18 und D21 im unstrukturierten N-Terminus von Vpr auf. Alle vier zeigen CSPs von 0,067 ppm bis 0,103 ppm und liegen somit weit über dem

Durchschnittswert von 0,02 ppm. Dabei treten die größten CSPs für E18 mit 0,099 ppm und für D21 mit 0,103 ppm auf. Zu dieser Häufung von Resten kann man noch die Aminosäuren E22, W23, I24 und E26 in α_1 mit Werten von 0,025 ppm bis 0,037 ppm zählen. Eine zweite Häufung mit CSPs über dem Mittelwert aller Resonanzsignale tritt in α_2 und dem zweiten interhelikalen Linker für die Resonanzsignale von Y50 bis R54 und G56 auf. Die größte CSP besitzt hier T53 mit 0,058 ppm. Eine dritte Häufung von Aminosäuren mit CSPs ihrer Resonanzsignale größer als der Mittelwert liegt am C-terminalen Ende der Helix α_3 des Vpr. Diese Häufung erstreckt sich von F74 bis R78, wobei die größte Änderung für F77 mit einer CSP von 0,066 ppm vorliegt.

Basierend auf den CSPs wird die Bindung von p6 an Vpr in DPC-Mizellen hauptsächlich durch die Aminosäuren L16 bis E21 bzw. L16 bis E26 des Vpr vermittelt. Aufgrund von strukturell räumlicher Nähe bzw. dem Vorhandensein von weiteren Bindestellen kann eine Beteiligung der Reste Y50 bis G56 sowie F74 bis R78 an der Interaktion mit p6 nicht ausgeschlossen werden. Dies wird mit Hilfe der globalen Faltung von Vpr in Kapitel 5.5. diskutiert.

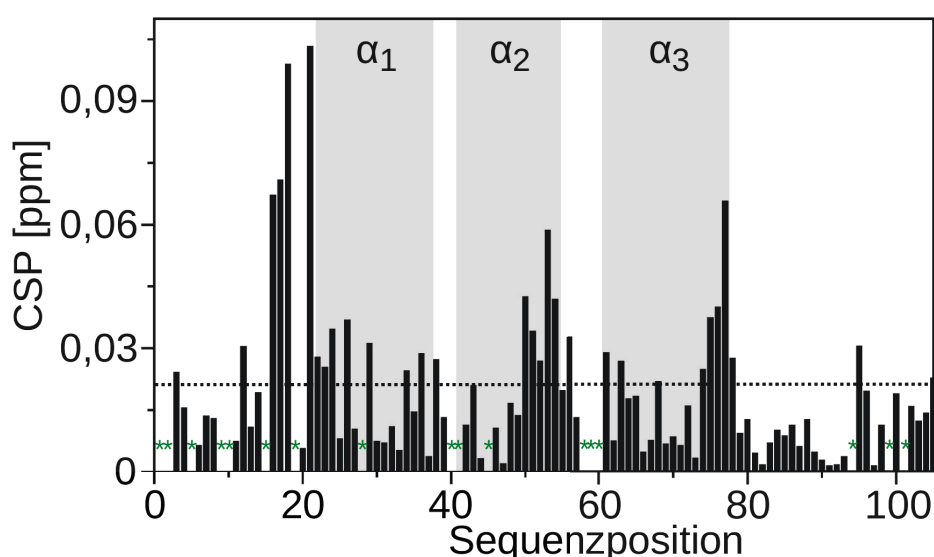


Abbildung 4.24: CSPs der Vpr-Resonanzsignale bei Titration mit p6. Berechnet wurden die CSPs mit Hilfe der chemischen Verschiebungen von Vpr in Abwesenheit und Anwesenheit von 100 μ M p6. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert aller CSPs von 0,02 ppm an. Für Aminosäuren mit einem * konnte kein CSP berechnet werden. Die drei α -Helices von Vpr sind als graue Rechtecke angedeutet.

4.5.9.2. Bestimmung der Dissoziationskonstante zwischen Vpr und p6

Da die Dissoziationskonstante (K_D) ein Maß für die Stärke einer Bindung darstellt, wurde diese für die Vpr-p6-Interaktion bestimmt. Dazu wurden die CSPs der Resonanzsignale von L16, R17, E18 und T53 bei jeder p6-Konzentration mit Hilfe von Gleichung 9 berechnet. Diese CSPs wurden

anschließend zum Fitten des K_D s mit Gleichung 20 genutzt. Die erhaltenen Fits sind in Abbildung 4.25 dargestellt.

Bei der Analyse der Fits ist zu beachten, dass bei keinem Aminosäurerest eine Sättigung der Interaktion zustande gekommen ist. Trotzdem war es möglich eine Dissoziationskonstante für jeden Rest zu bestimmen. Diese liegt für L16 bei $43,6 \mu\text{M}$, für R17 bei $20,7 \mu\text{M}$ und für E18 bei $16,0 \mu\text{M}$. In einer der anderen beiden Häufungen von Aminosäuren mit CSPs über dem Durchschnitt hat T53 einen K_D von $44,8 \mu\text{M}$. Somit liegt der K_D der Vpr-p6-Interaktion unter Berücksichtigung der K_D s von L16, R17, E18 und T53 bei $31,3 \pm 15,1 \mu\text{M}$. Es wurden nur Resonanzsignale zum Fitten der K_D s verwendet, die keine Überlagerung mit anderen Resonanzsignalen des Vpr zeigten.

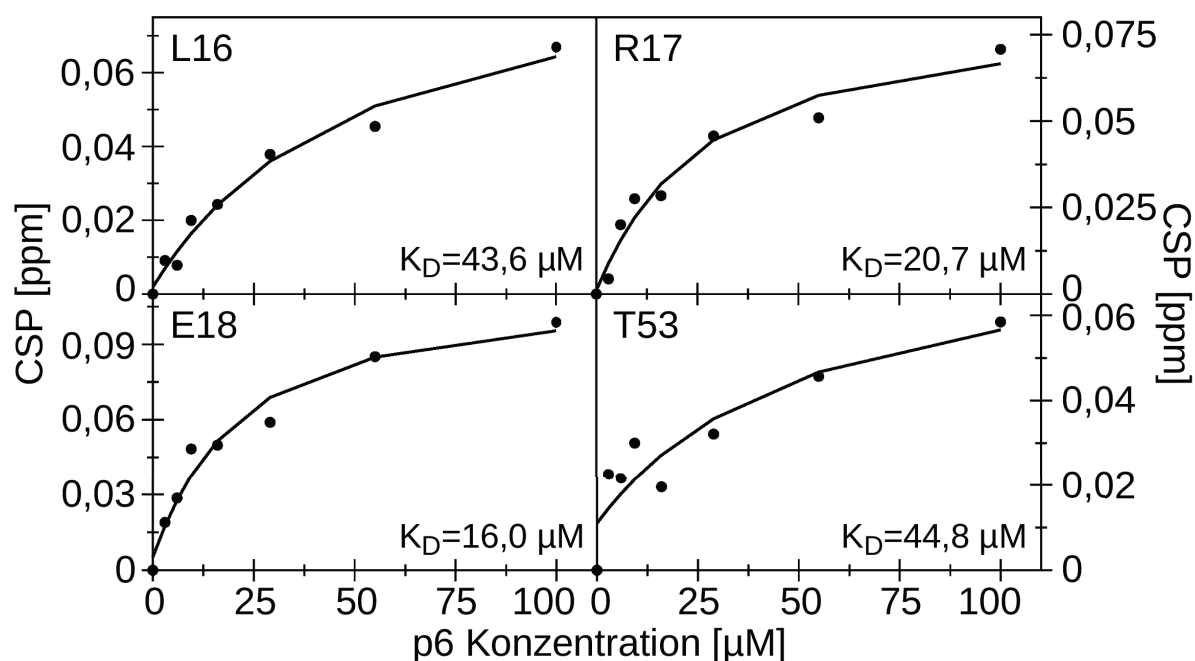


Abbildung 4.25: Dissoziationskonstanten der Vpr-p6-Interaktion. Angegeben sind die gefitteten Aminosäurereste des Vpr sowie die für jeden Aminosäurerest bestimmte Dissoziationskonstante. Die Kreise stellen die gemessenen Datenpunkte dar. Die gefitteten Werte sind als Linien dargestellt.

5. Diskussion

5.1. Rekombinante Expression und Reinigung von Vpr und p6

5.1.1 Das Vpr-Fusionsprotein ermöglicht die Expression und Reinigung von HIV-2 Vpr

Bisherige Versuche Vpr-Proteine rekombinant zu exprimieren und zu reinigen haben gezeigt, dass diese zytotoxisch (Piller et al. 1996; Zhang et al. 1997) und in wässriger Umgebung unlöslich sind (Morellet et al. 2003; Wecker et al. 2002). Mit Hilfe des Vpr-Fusionsproteins, bestehend aus N-/C-terminalen Hexa-His-Tags, dem Maltosebindeprotein, zwei Intein-Spaltstellen, Vpr und dem Cytochrom B5 (Abb. 3.1) konnten diese beiden Probleme minimiert werden. Das Fusionsprotein wird stark überexprimiert und konnte aufgrund seiner hohen Löslichkeit ohne Detergenzien oder denaturierende Agenzien aus den *E. coli* Zellen extrahiert werden. Durch die beiden terminalen Hexa-His-Tags hatte es eine ausreichende Affinität zur Ni^{2+} -NTA-Agarose und konnte mit Imidazol-Konzentrationen von bis zu 40 mM gewaschen werden. Zusätzlich enthielt der erste Waschpuffer 1 % Triton-X 100, da es sonst im weiteren Verlauf der Reinigung zum proteolytischen Abbau des Vpr kam. Vor der autokatalytischen Inteinspaltung wurde das Imidazol mittels Dialyse entfernt, um eine mögliche Störung der Spaltung durch dieses zu verhindern. Wichtig war es, vor der Spaltung DPC zum Fusionsprotein zu geben, um eine Aggregation bzw. Präzipitation des freigesetzten Vpr zu verhindern. Die autokatalytische Inteinspaltung des Vpr-Fusionsproteins wurde gewählt, da diese den Vorteil hatte, keine Protease in die Probe geben zu müssen. Zum einen können Proteasen durch unspezifische Spaltung zu einem Abbau des Zielproteins führen, zum anderen kann durch die Tertiärstruktur des Ziel-Fusionsproteins die Zugänglichkeit der Protease-Schnittstelle eingeschränkt und somit auch die Effizienz der Spaltung verringert sein. Schließlich kann das Entfernen der Protease nach erfolgreicher Spaltung zu Schwierigkeiten und verunreinigten Proben führen. Diese Nachteile treten bei der Inteinspaltung nicht auf, da diese hochspezifisch spaltet, Temperatur und Thiolgruppen induziert ist und dadurch auch eine eingeschränkte Zugänglichkeit der Inteinspaltstelle kein Problem darstellt. Allerdings stellt der sehr lange Spaltungszeitraum von 12 Tagen einen Nachteil der Inteinspaltung dar, da dieser das Risiko eines Abbaus des Zielproteins erhöht.

Da HIV-2 Vpr einen pI von 7,14 besitzt und somit bei einem pH von 7,4 quasi keine Nettoladung aufweist, befand sich das Protein nach der Anionentauscherchromatographie an Q-Sepharose im Durchfluss. Die anderen Bestandteile des Vpr-Fusionproteins besitzen bei diesem pH -Wert eine negative Nettoladung und interagierten mit dem Säulenmaterial. Der letzte Reinigungsschritt mittels Kationentauscherchromatographie an SP-Sepharose diente neben einer abschließenden

Reinigung des Vpr auch dem Konzentrieren des Proteins. Nach der Q-Sepharose lag Vpr meist in Volumina von mehr als 100 ml vor. Durch Ändern des pH-Wertes der Vpr-enthaltenden Lösung auf pH 6,0 erhielt das Vpr eine positive Nettoladung und interagiert mit der SP-Sepharose. Da aufgrund der hohen Bindekapazität von SP-Sepharose nur geringe Mengen Säulenmaterial verwendet werden mussten, konnte Vpr in der Regel mit weniger als 10 ml Elutionspuffer komplett von der Säule eluiert werden. Dadurch wurde das Konzentrieren des Vpr durch Ultrafiltration umgangen, bei dem aufgrund von Proteinpräzipitation oder Interaktion des Zielproteins mit dem Filter des Konzentrators häufig Protein verloren geht. Die gereinigten Vpr-Mengen von bis zu 4 mg/l Expressionskultur reichten für eine strukturelle Charakterisierung des Proteins mittels NMR-Spektroskopie aus.

5.1.2. Die Expression und Reinigung von p6 liefert ausreichende Mengen Protein

Die Expression und Reinigung von HIV-2 p6 wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Aufgrund seiner Löslichkeit konnte das His-p6 ohne Detergenzien oder denaturierende Agenzien aus *E. coli* Zellen lysiert werden. Durch den N-terminalen Hexa-His-Tag konnte das His-p6 an Ni²⁺-NTA-Agarose gebunden werden. Das His-p6 eluierte aufgrund der Kürze des His-Tags bereits bei 50 mM Imidazol. Dies reichte aber aus, um eine hohe Reinheit des His-p6 von >98 % zu erreichen (Abb. 4.2). Die anschließende TEV-Spaltung musste für mindestens 3 bis 6 Tage erfolgen, da sonst eine große Menge von ungespaltenem His-p6 zurück blieb. Eine TEV-Spaltung von 6 Tagen ist relativ lang und ineffizient, wobei dies auf das Prolin am N-Terminus des p6 direkt nach der TEV-Schnittstelle zurückzuführen sein könnte. Es ist bekannt, dass die TEV-Protease nicht spalten kann, wenn an der letzten Position der Schnittstelle ein Prolin vorliegt (Kapust et al. 2002). Im Falle des His-p6 ist die letzte Aminosäure der Schnittstelle ein Serin, allerdings ist die darauffolgende erste Aminosäure des p6 ein Prolin, was zu der angesprochenen Ineffizienz der Spaltung geführt haben könnte. Dies kann jedoch aus den vorliegenden Daten nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die zweite IMAC entfernte die größten Verunreinigungen aus der p6-Probe und nach Einengen des Proteins wurde eine abschließende SEC durchgeführt. Das p6 eluiert bei dieser mit geringerem Elutionsvolumen als üblich für ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 9 kDa. Daraus lässt sich schließen, dass p6 ungefaltet vorliegen könnte. Es könnte allerdings auch zur Ausbildung von Oligomeren des p6 gekommen sein, durch die es zu einer früheren Elution eines p6-Oligomers kommt.

Das p6 weist eine Löslichkeit von bis zu 1 mM in NMR-Puffer auf und konnte mit 8 mg gereinigtes

p6 pro Liter Expressionskultur in ausreichenden Mengen für Titrationsexperimente gereinigt werden.

5.2. Assemblierung von Nanodisks mittels Dialyse ist effizienter als mittels BioBeads

Die Assemblierung aller Nanodisk-Varianten war erfolgreich und führte zu Proben, welche für Untersuchungen des Vpr mittels NMR-Spektroskopie genutzt werden konnten. Allerdings gab es erhebliche Unterschiede bei der Effizienz der beiden Assemblierungsmethoden. Für die Herstellung einer NMR-Probe von 50 bis 120 μ M Nanodisks mittels BioBeads mussten mindestens 10 mg MSP1 eingesetzt werden. Dies führte auch zu einem erheblich höheren Verbrauch von Lipid und HIV-2 Vpr. Bei der Assemblierung mittels Dialyse konnte die Menge von eingesetztem MSP1D1 auf 4 mg für eine NMR-Probe von 50 bis 120 μ M Nanodisks reduziert werden. Dementsprechend konnte auch die Menge an eingesetztem Vpr und Lipid verringert werden. Ausserdem kam es bei der Dialyse-Methode zu weniger Aggregation im Vergleich zur BioBeads-Methode, was anhand der Größenausschlusschromatogramme deutlich wird (Abb. 4.3 und 4.4). So ist in dem Chromatogramm der Dialyse-Methode ein wesentlich kleinerer Aggregationspeak sichtbar als bei der BioBeads-Assemblierung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die BioBeads nicht nur mit dem Detergenz interagieren und dieses entfernen, sondern auch das Lipid und das Zielprotein. Dies würde auch die große Menge an freiem MSP1 (Peak 4 Abb. 4.3) bei der BioBeads-Methode erklären, die als ein Überschuss an MSP1 im Chromatogramm sichtbar ist. Für die Herstellung von NMR-Proben ist somit die Assemblierung mittels Dialyse, wenn möglich, den BioBeads vorzuziehen.

5.3. Resonanzzuordnung, globale Struktur und Dynamiken von Vpr

5.3.1. Proteinrückgratresonanzzuordnung

Die Zuordnung der Proteinrückgratresonanzen zum korrespondierenden Kern im HIV-2 Vpr konnte zu 89,7 % erreicht werden. Kein Resonanzsignal konnte den Proteinrückgratkernen der Aminosäuren P8, D40, T58 und L59 zugeordnet werden. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Proteinrückgratresonanzzuordnung handelt es sich um die erste für HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen. Neben den Resonanzzuordnungen von verschiedenen Fragmenten von HIV-1 Vpr (Schuler et al. 1999; Wecker & Roques, 1999; Engler et al. 2001; Engler et al. 2002) wurde das HIV-1 Vpr voller Länge bisher zweimal zugeordnet (Wecker et al. 2002; Morellet et al. 2003). Aufgrund sequentieller

Unterschiede zwischen HIV-1 und HIV-2 Vpr sowie der Empfindlichkeit der chemischen Verschiebung für die Pufferbedingungen war eine unabhängige Zuordnung der Proteinrückgratresonanzen des HIV-2 Vpr erforderlich.

5.3.2. Die globale Proteinrückgratstruktur von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen

Nach Zuordnung der Proteinrückgratresonanzen konnte mit Hilfe von paramagnetischen Experimenten die globale Faltung des Proteinrückgrats von HIV-2 Vpr bestimmt werden. Die in dieser Arbeit angewendete Methode eignet sich zur Bestimmung von Strukturen ohne Zuordnung der Seitenkettenresonanzsignale (Klammt et al. 2012), wie sie für Strukturrechnungen mittels NOEs nötig ist. Im Vergleich zu NOE-basierten Strukturen können PRE-basierte Strukturen eine geringere Kompaktheit aufweisen, da die Bestimmung von kurzen Distanzen ($<12 \text{ \AA}$) mit PREs nicht möglich ist (Klammt et al. 2012). Trotzdem eignet sich die Methode besonders zur Bestimmung von globalen Proteinstrukturen (Battiste & Wagner, 2000; Gaponenko et al. 2000).

Die globale Struktur von HIV-2 Vpr zeigt (Abb. 4.12, 4.13 und 5.1), dass Vpr in DPC-Mizellen ein nicht globulär gefaltetes Protein ist. So liegen lediglich 45 % des Proteins in α -Helices vor, wohingegen der Rest des Proteins als ungefaltete interhelikale Linker und flexible Termini vorliegt. Die mittels NMR-Spektroskopie bestimmten Anteile an Helices stimmen mit den CD-Daten überein, mit denen ein Anteil von etwa 40 % α -Helices für Vpr berechnet werden konnte (Kap. 4.4.).

Die Übereinstimmung der 10 energetisch günstigsten Strukturen ist mit einem Proteinrückgrat-RMSD von $1,99 \pm 0,87 \text{ \AA}$ für die Kernregion E22 bis F77 des Vpr relativ gering. Dies ist auf die geringe Anzahl von Distanzeinschränkungen zurückzuführen, die für die Berechnung der Strukturen genutzt wurden. So kann nach Clore et al. (1993) die globale Faltung eines Proteins im günstigsten Fall mit 1,4 Distanzeinschränkungen pro Aminosäurerest berechnet werden. Für eine niedrig aufgelöste Struktur sind dagegen mindestens 3 Distanzeinschränkungen pro Aminosäurerest nötig. Die Struktur von HIV-2 Vpr wurde mit 55 maximalen sowie 104 minimalen PRE-basierten Distanzeinschränkungen berechnet. Lässt man die sequentiellen $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^1\text{H}^{\text{N}}$ -NOEs sowie die manuell eingefügten α -Helix-typischen Wasserstoffbrückenbindung ausser Acht, so wurden 1,53 Distanzeinschränkungen pro Aminosäurerest für die Berechnung der Vpr-Struktur verwendet. Damit handelt es sich bei der hier gezeigten Struktur bestenfalls um die globale Faltung des Proteins, was für die Diskussion der weiteren Ergebnisse allerdings ausreichend ist.

Bei der Struktur von HIV-2 Vpr ist auffällig, dass die α -Helices Krümmungen von ca. 144° bis etwa 167° (Abb. 4.13) aufweisen, welche durch die Größe der DPC-Mizelle induziert sein könnte. Auf die Krümmung der α -Helices von HIV-2 Vpr wird in Kapitel 5.2.2. weiter eingegangen.

5.3.3 Vergleich der HIV-2 Vpr Struktur mit den Strukturen von HIV-1 Vpr

Die in dieser Arbeit berechnete globale Struktur von HIV-2 Vpr wurde mit den bekannten Strukturen von HIV-1 Vpr (Wecker et al. 2002; Morellet et al. 2003) verglichen. Die drei Strukturen sind zum Vergleich in Abbildung 5.1 dargestellt.

Beim Betrachten der Strukturen wird deutlich, dass die Struktur des HIV-2 Vpr eine Mischung aus den beiden Strukturen des HIV-1 Vpr darstellt. So ist die Orientierung von α_1 und α_2 von HIV-2 Vpr mit einem Winkel von etwa 79° ähnlich zueinander, wie bei der Struktur von HIV-1 Vpr in 30 % TFE/70 % H_2O . Bei dieser liegt ein Winkel zwischen α_1 und α_2 von ca. 95° vor, wohingegen zwischen α_1 und α_2 der Struktur von HIV-1 Vpr in 30 % AcN/ 70 % H_2O ein Winkel von etwa 146° vorliegt. Die α -Helices α_2 und α_3 von HIV-2 Vpr zeigen mit einem Winkel von etwa 143° dagegen eine Orientierung wie in der Struktur von HIV-1 Vpr in 30 % AcN. In dieser haben α_2 und α_3 eine Orientierung von ca. 157° zueinander, wohingegen in der HIV-1 Vpr Struktur in 30 % TFE eine Orientierung von etwa 68° zwischen α_2 und α_3 vorliegt.

In Bezug auf die Anzahl der an der Bildung der α -Helices beteiligten Aminosäuren von HIV-2 Vpr stimmt die Struktur mehr mit der von HIV-1 Vpr in 30 % AcN überein. So besteht bei HIV-2 Vpr die Helix α_1 aus 16 Aminosäuren, α_2 aus 14 Aminosäuren und α_3 aus 17 Aminosäuren. Bei der HIV-1 Vpr Struktur in 30 % AcN bestehen die α -Helices aus 17 (α_1), 13 (α_2) und 22 (α_3) Aminosäuren, wohingegen die Struktur in 30 % TFE α -Helices besitzt, die aus 17 (α_1), 9 (α_2) und 29 (α_3) Aminosäuren bestehen. Da die globale Struktur von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen aufgeklärt wurde, was einer physiologischeren Umgebung als 30 % AcN bzw. 30 % TFE darstellt, könnte man annehmen, dass die hier berechnete Struktur von HIV-2 Vpr eher der nativen Struktur von Vpr-Proteinen entspricht. Um dies zu klären sind allerdings weitere Untersuchungen erforderlich

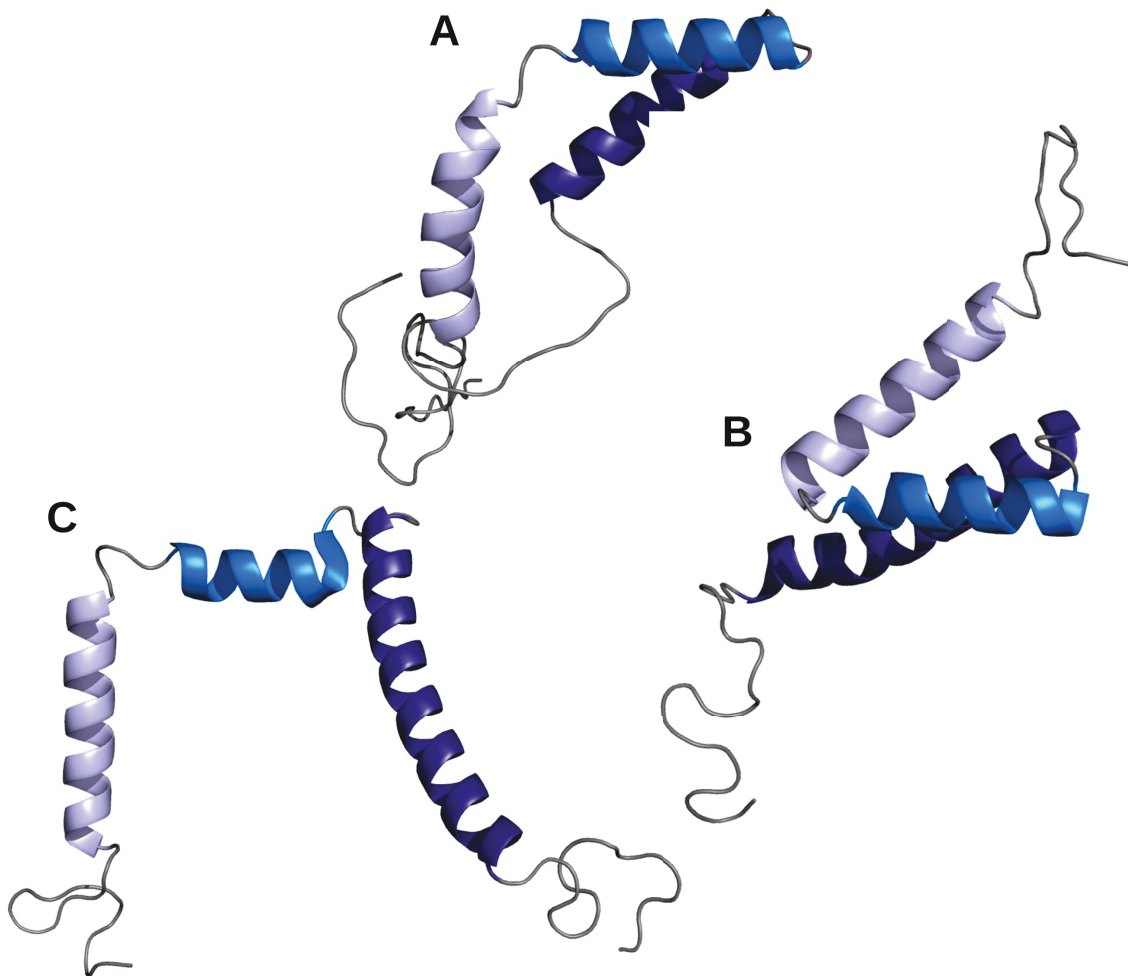


Abbildung 5.1: Vergleich der globalen Struktur von HIV-2 Vpr mit den Strukturen von HIV-1 Vpr. A) Globale Proteinrückgratstruktur von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen. B) Struktur von HIV-1 Vpr in 30 % AcN/70 % H₂O (PBD-Code: 1M8L). C) Struktur von HIV-1 Vpr in 30% TFE/70 % H₂O (PDB-Code: 1ESX). In den drei Strukturen ist in hellblau die erste α-Helix, in marineblau die zweite α-Helix und in dunkelblau die dritte α-Helix dargestellt.

5.3.4. HIV-2 Vpr ist hochflexibel und monomer in DPC-Mizellen

Die Relaxationsmessungen mit HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen (Kap. 4.5.7.) sowie die Analyse dieser Daten mittels Tensor2 (Kap. 4.5.7.1.) und reduziertem spektrale Dichtefunktions-Mapping (Kap. 4.5.7.2.) zeigen, dass es sich bei Vpr um ein sehr dynamisches Protein handelt. Die Termini von Vpr sind hochflexibel mit hetNOE-Verhältnissen bis in den negativen Bereich und S^2 Werten von unter 0,25. Die Kernregion liegt dagegen sehr rigide vor mit durchschnittlichen S^2 Werten von 0,89 bzw. 0,92, sowie hetNOE-Verhältnissen bei 0,65. Diese Rigidität hängt zum einen mit der Strukturierung dieser Region zusammen, aber auch mit der Interaktion der Reste mit der DPC-Mizelle, wodurch die Reste in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt sind. Bei den Termini deuten

neben den niedrigen S^2 und hetNOE Werten auch die hohen internen Korrelationszeiten τ_e und die reduzierte spektrale Dichte auf besonders schnelle Dynamiken hin. In der Kernregion treten dagegen vermehrt langsame Dynamiken mit chemischen Austauschraten R_{ex} auf, welche Hinweise auf konformationelle Änderungen geben könnten. Diese Änderungen könnten durch eine mögliche Assemblierung und Disassemblierung der DPC-Mizelle zustande kommen. Die Zunahme der spektralen Dispersion bei der Titration von DPC (Kap. 4.5.6.1.) lässt auf eine strukturelle Abhängigkeit des Vpr von DPC-Mizellen schließen. Somit würde bei einer Disassemblierung der DPC-Mizelle eine strukturelle Änderung des Vpr auftreten, welche wiederum zur Folge hätte, dass es zu einer Linienverbreiterung und einer R_{ex} für den jeweiligen Rest kommt. Um diese Annahme zu bestätigen müssten weitere Experimente, wie zum Beispiel ^{15}N single-quantum CPMG-Relaxationdispersionsexperimente (Loria et al. 1999; Tollinger et al. 2001) von Vpr in DPC-Mizellen bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen werden.

Neben den Modell-Free-Parametern und den reduzierten spektralen Dichten wurden globale Rotationskorrelationszeiten τ_c für den Vpr-DPC-Mizellen-Komplex erhalten. Diese Zeiten lagen zwischen 10,72 ns und 11,97 ns. Mit diesen wurde der hydrodynamische Radius r_h des Komplexes berechnet, welcher je nach Rotationskorrelationszeit zwischen 2,55 nm und 2,65 nm liegt. Da eine DPC-Mizelle einen r_h von 1,9 nm (Kallick et al. 1995) besitzt, liegt hier wahrscheinlich ein Komplex aus einer einzelnen DPC-Mizelle und einem Vpr-Molekül vor. Ausserdem legt der hydrodynamische Radius r_h des Vpr-Mizellen-Komplexes nahe, dass Vpr bei den genutzten Bedingungen als Monomer vorliegt.

Die Annahme, dass Vpr bei den genutzten Bedingungen als Monomer vorliegt und mit einer DPC-Mizelle interagiert, wird durch einen Vergleich mit der Rotationskorrelationszeit des 45 kDa Komplex aus DPC-Mizelle und OmpA unterstützt (Liang et al. 2010). Dieser Komplex hatte eine Rotationskorrelationszeit von 20,8 ns bei 50 °C. Somit wäre für den etwa 42 kDa Komplex aus zwei Vpr-Molekülen und einer DPC-Mizelle, bzw. dem etwa 50 kDa Komplex aus einem Vpr-Molekül und zwei DPC-Mizellen eine identische bzw. aufgrund der geringeren Temperatur als bei Liang et al. eine noch längere Rotationskorrelationszeit zu erwarten. Um endgültig zu klären, ob HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen als Monomer vorliegt müssen allerdings weitere Versuche durchgeführt werden.

Für HIV-1 Vpr wurde mehrfach berichtet, dass dieses in wässriger Lösung in der Lage ist, Dimere zu bilden. Dieses Dimer wird durch Interaktion der dritten C-terminalen α -Helix von zwei Vpr-Molekülen ausgebildet (Bourbigot et al. 2005; Kamiyama et al. 2013). In Zellkultur-Studien wurde ausserdem nachgewiesen, dass HIV-1 Vpr Homo-Oligomere bilden kann (Singh et al. 2000; Fritz et al. 2008; Fritz et al. 2010). Diese Oligomerisierung beruht auf dem hydrophoben Kern von HIV-1 Vpr, welcher durch die drei α -Helices gebildet wird (Fritz et al. 2008; Fritz et al. 2010). Besonders die Oligomerisierung soll notwendig sein, damit eine Interaktion zwischen HIV-1 Vpr und der

C-terminalen Domäne des Gag-Vorläuferproteins Pr55^{gag} stattfindet (Fritz et al. 2010).

Laut der in dieser Arbeit gesammelten Daten ist eine Dimerisierung von HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen nicht anzunehmen. Ob eine Dimerisierung von HIV-2 Vpr in Abwesenheit von DPC-Mizellen auftreten kann, wurde nicht untersucht. Auch eine Oligomerisierung von HIV-2 Vpr wurde nicht beobachtet, wobei auch diese durch die DPC-Mizelle, welche mit den hydrophoben Resten des Vpr interagiert, behindert worden sein kann. Ob zu Beginn der DPC-Titration spezifische Oligomere von HIV-2 Vpr vorlagen, die durch Zugabe von DPC aufgelöst wurden, kann aus den gesammelten Daten nicht geschlossen werden.

5.4. Die Interaktion von Vpr mit Modellmembranen

Aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit von HIV-2 Vpr in Abwesenheit von Modellmembranen wurde die Interaktion des Proteins mit DPC-Mizellen sowie verschiedenen Nanodisks untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche und eine mögliche biologische Relevanz der Interaktionen werden in den nachfolgenden vier Kapiteln diskutiert.

5.4.1. Die Interaktion von Vpr mit DPC-Mizellen

Neben der Aufklärung der globalen Struktur des HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen, wurde auch die Interaktion des Proteins mit der Mizelle untersucht. Dazu wurde unter anderem DPC zu Vpr titriert, wodurch es zu einer Zunahme der spektralen Dispersion der Proteinrückgrat-HN-Gruppen in der Protonendimension kam (Kap. 4.5.6.1). Generell spricht die Zunahme der spektralen Dispersion für eine Zunahme an Strukturelementen in einem Protein. Die größte Zunahme der Dispersion von Vpr erfolgte bei Erreichen der cmc des DPC. Des Weiteren gehörten die meisten Resonanzsignale mit CSPs größer als der Mittelwert zu Aminosäureresten in einer der drei α -Helices des Vpr. Dies deutet daraufhin, dass unter anderem durch DPC-Mizellen die Faltung des Vpr induziert wird und diese das Protein in Lösung halten. Ob die Aminosäuren in die Mizelle eingebettet sind oder pufferexponiert vorliegen, wurde durch Titration von Mn^{2+} untersucht. Hierbei zeigte sich, dass α_1 pufferzugänglich ist und α_2 sowie α_3 partiell vom Puffer abgeschirmt sind. Es ist davon auszugehen, dass die abgeschirmten Aminosäurereste von α_2 und α_3 in die Mizelle eingebettet sind. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Modell des Vpr in der DPC-Mizelle erstellt, welches in Abbildung 5.2 dargestellt ist.

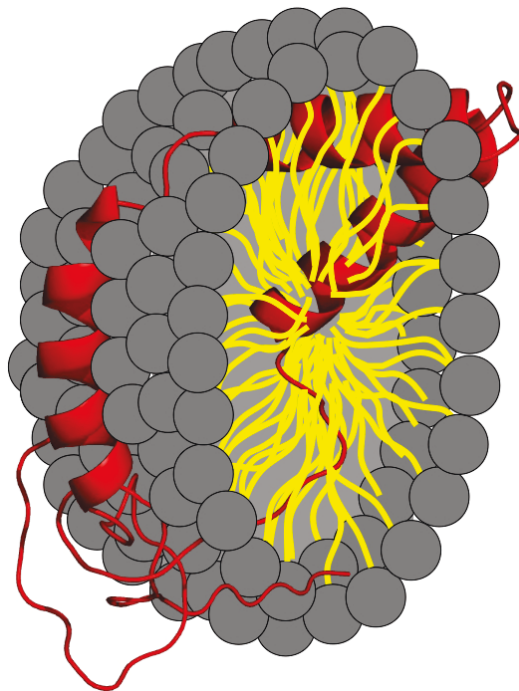


Abbildung 5.2: Schematisches Modell des Vpr-DPC-Mizellen-Komplex. Die hydrophilen Kopfgruppen des DPC sind in grau dargestellt, die hydrophoben Fettsäuren in gelb. Das HIV-2 Vpr ist in rot dargestellt.

Das Modell zeigt, dass α_1 mit der Oberfläche der DPC-Mizelle interagiert. Die Helices α_2 und α_3 sind dagegen partiell eingebettet. Die Assoziation von α_1 an die Oberfläche der DPC-Mizelle wird durch den amphipathischen Charakter dieser α -Helix unterstützt (Abb. 5.3), da sich auf der interagierenden Seite hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren befinden. In α_2 hat der Rest L47 das größte Intensitätsverhältnis bei Titration mit Mn^{2+} und somit die stärkste Abschirmung vom Puffer (vgl. Abb. 4.16). Des Weiteren ist der N-Terminus von α_2 der hydrophobste Bereich des HIV-2 Vpr (Abb. 5.3), was eine Einbettung dieser α -Helix sehr wahrscheinlich macht. Die Helix α_3 ist ebenfalls partiell eingebettet, wobei der N-terminale Abschnitt dieser α -Helix pufferzugänglich ist. Die dritte α -Helix besteht aus 9 hydrophoben Aminosäuren und hat mit Ausnahme der Unterbrechung durch H75 einen amphipathischen Charakter (Abb. 5.3). Ebenfalls in die Mizelle eingebettet sein könnte der C-Terminus von HIV-2 Vpr. Dies kann in dem Modell nicht exakt dargestellt werden, da keine maximalen Distanzeinschränkungen zu den hochflexiblen Termini definiert wurden. Dadurch ist die Orientierung der Termini zu den α -Helices nicht exakt genug für eine genaue Modellierung der Termini in das Vpr-DPC-Mizellen-Modell. Da der C-Terminus hydrophobe Aminosäuren enthält, ist eine Interaktion des C-Terminus mit DPC sehr wahrscheinlich, wobei es sich bei dieser Interaktion auch um eine Bindung von einzelnen DPC-Molekülen an die Reste des C-Terminus handeln könnte.

Auch für HIV-1 Vpr ist eine Interaktion mit Mizellen bekannt, so wurden die Strukturen von zwei Fragmenten des HIV-1 Vpr in DPC-Mizellen aufgeklärt. Diese Fragmente bestanden aus den Aminosäuren 13 bis 33 (Engler et al. 2001) bzw. den Aminosäuren 34 bis 51 (Engler et al. 2002).

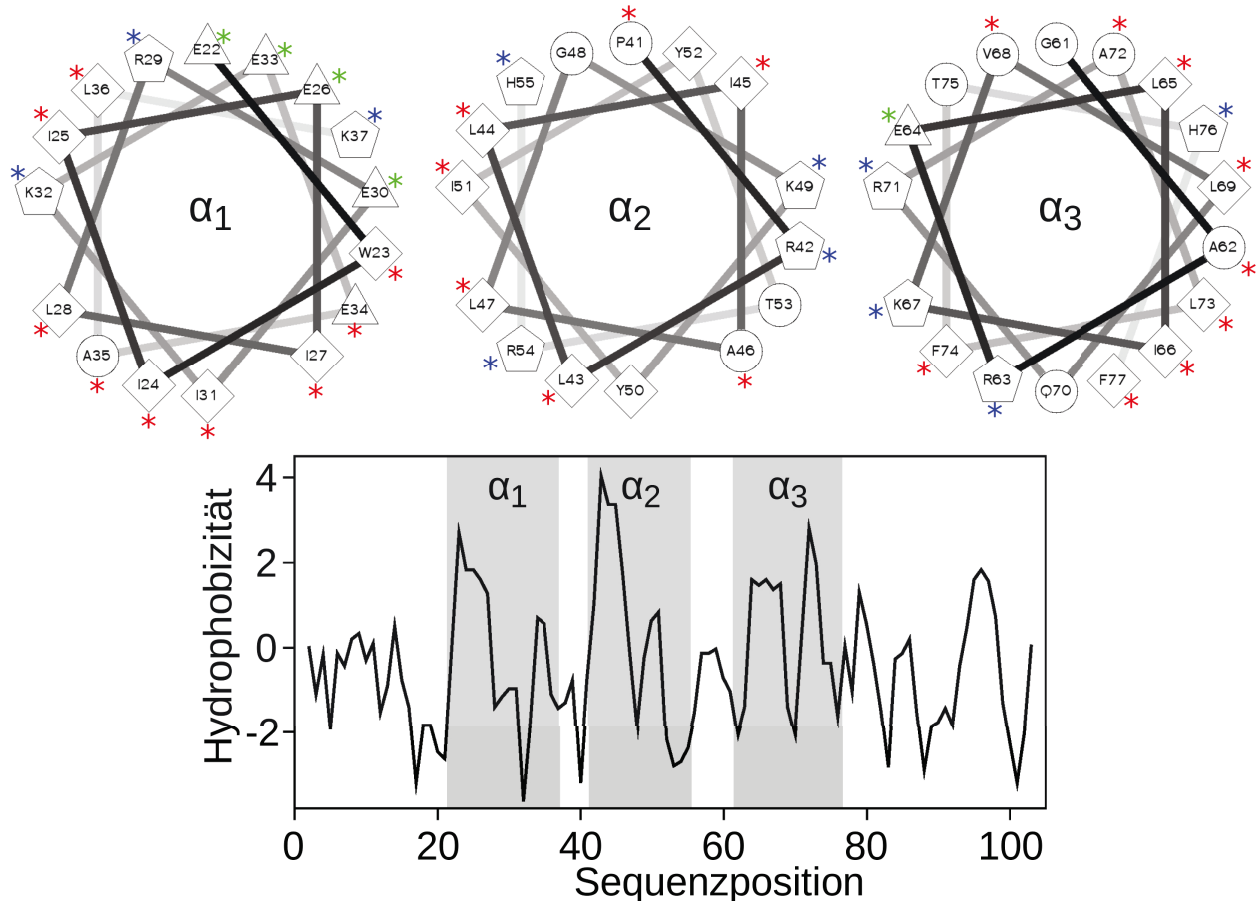


Abbildung 5.3: Helikale Räder und Hydropathie Plot von Vpr. Hydrophobe Reste sind mit einem * markiert, basische mit einem * und saure mit einem *. Hydropathie Plot nach Kyte & Doolittle (1982) von HIV-2 Vpr. Hydrophobe Reste gehen auf der Y-Achse in den positiven Bereich, dabei gilt je hydrophober, desto höher der Wert. Hydrophile Reste haben ein negatives Vorzeichen, auch hier gilt je negativer, desto hydrophiler die Aminosäure. Die drei α-Helices von Vpr sind als graue Rechtecke angedeutet.

5.4.2. Die Krümmung der Helix α_1 könnte durch die Größe der DPC-Mizelle induziert sein

Wie bereits erwähnt weisen die α-Helices von HIV-2 Vpr Krümmungen von etwa 144° (α_1), 167° (α_2) und 165° (α_3) auf. Die starke Krümmung der Helix α_1 könnte unter Umständen auf die Oberflächenkrümmung der DPC-Mizelle zurückzuführen sein. Nach dem Modell der HIV-2 Vpr-Struktur in DPC-Mizellen (Abb.5.2) liegt die amphipathische Helix α_1 an die Mizellenoberfläche

assoziiert vor. Nach Kallick et al. (1995) hat eine DPC-Mizelle einen hydrodynamischen Radius von ca. 1,9 nm. Ein Oberflächensegment einer Kugel mit diesem Radius und der Länge der Helix α_1 weist eine Krümmung von etwa 143° auf, was ideal zur Krümmung von α_1 passen würde. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Oberflächenkrümmung von Mizellen die Krümmung von α -helikalen, oberflächenassoziierten Peptiden beeinflussen kann. Beispielsweise zeigt das α -helikale HIV-1 Env Peptid in DHPC-Mizellen eine starke Krümmung, die in Anwesenheit von Bizellen wesentlich geringer ist (Chou et al. 2002).

Durch Verwendung eines Detergenz mit einer längeren Fettsäurekette, ließe sich die Krümmung der Mizelle verringern und somit unter Umständen auch die Krümmung der α -Helices. Die beiden Strukturen von HIV-1 Vpr wurden nicht in Mizellen aufgeklärt, sondern in organischen Lösungsmittelgemischen. Das nahezu Fehlen von Krümmungen der Helices des HIV-1 Vpr in diesen Strukturen könnte mit der Abwesenheit gekrümmter, polarer Oberflächen, an denen die Helices assoziieren können, zusammenhängen.

5.4.3. Vpr interagiert mit Lipiddoppelschichten in Nanodisks

Experimente mit Nanodisks haben gezeigt, dass Nanodisks geeignet sind, um membran-interagierende Proteine mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie zu untersuchen (Glück et al. 2009; Raschle et al. 2009; Yu et al. 2012). So war es bereits möglich, die Struktur eines β -Fass Proteins in Nanodisks aufzuklären (Hagn et al. 2013). Aus diesem Grund wurden Nanodisks zur Untersuchung der Interaktion von HIV-2 Vpr mit Lipiddoppelschichten verwendet. Dazu wurde Vpr in verschiedenen Nanodisks, in Bezug auf MSP und Lipidzusammensetzung, mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie untersucht.

So ist in den NMR-Spektren von Vpr in Nanodisks deutlich zu erkennen (Abb. 4.20), dass mit Abnahme der Nanodiskgröße sowie Zunahme der Messtemperatur die Anzahl der detektierten Resonanzsignale des Vpr zunimmt. Dies spricht deutlich für eine Interaktion des Vpr mit den Nanodisks, da diese mit 100 bis 160 kDa Molekulargewicht eine starke Linienverbreiterung der Resonanzsignale des Vpr hervorrufen. Dies führt dazu, dass bei Vpr-MSP1-POPC-Nanodisks nur 24 Resonanzsignale des Vpr detektiert werden konnten. Bei den Messungen mit Vpr-MSP1D1-DMPC-Nanodisks nimmt die Anzahl der Signale stark zu, was hauptsächlich auf die Erhöhung der Messtemperatur von 25°C auf 40°C zurückzuführen ist. So haben die Nanodisks bei 40°C eine wesentlich höhere Rotationsdiffusion, wodurch sich die T_2 -Zeit der Kernspins des Vpr verlängert. Dies wiederum führt zu einer steigenden Zahl sichtbarer Vpr-Signale. Ebenfalls einen Einfluss auf die Zunahme der Zahl der Resonanzsignale könnte der pH-Wert von 5 haben. So wurden die Messungen mit Vpr in MSP1D1-DMPC-Nanodisks bei pH 5 durchgeführt, bei dem es zu einem

langsameren Austausch der Amidprotonen mit den Protonen des Lösungsmittels als bei pH 7,4 kommt. Dies könnte wiederum zu mehr sichtbaren Resonanzsignalen im Spektrum von Vpr in MSP1D1-DMPC-Nanodisks geführt haben.

Die aussagekräftigsten Ergebnisse von Vpr in Lipiddoppelschichten wurden mit MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks erzielt. Dies ist auf die Größe der Nanodisks zurückzuführen, da diese mit 9,2 nm (Hagn et al. 2013) bzw. 8,4 nm (Kap. 4.5.8.3.) einen um ~2 nm kleineren hydrodynamischen Durchmesser besitzen als MSP1D1-DMPC-Nanodisks. Dadurch hatte der Vpr-Nanodisks-Komplex eine schnellere Rotationsdiffusion und es wurden mehr HN-Korrelationssignale detektiert. Wie in Abb. 4.20/4.21 zu erkennen ist, sind alle HN-Resonanzsignale des Vpr in diesen Nanodisks sichtbar. So hat sich die Anzahl der Signale sogar leicht erhöht, wobei nicht geklärt werden konnte, woher diese zusätzlichen Signale kommen. Interessanterweise besitzen die Resonanzsignale im HSQC-Spektrum von Vpr in MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks fast identische chemische Verschiebungen wie im HSQC-Spektrum von Vpr in 50 mM DPC (Abb. 4.21). Dies deutet zunächst einmal darauf hin, dass es keine großen strukturellen Unterschiede zwischen den Vpr-Strukturen in Detergenzien und Lipiddoppelschichten gibt. Somit ist davon auszugehen, dass in den beiden Umgebungen im Wesentlichen die gleichen Aminosäuren des Vpr an der Bildung der α -Helices beteiligt sind. Die Berechnung der CSPs zwischen Vpr in DPC-Mizellen und MSP1D1Δ5-DMPC-Nanodisks (Abb. 4.21) verdeutlicht noch einmal, dass es nur sehr geringe Unterschiede zwischen beiden HSQC-Spektren gibt. Die größten Unterschiede treten dabei für Aminosäuren an den Termini von α_2 auf. Ein Grund für diese Änderungen der chemischen Verschiebung könnte die unterschiedliche Dicke der hydrophoben Schicht sein. So besteht die Kohlenwasserstoffkette des DPCs aus 12 C-Atomen, die Fettsäure des DMPCs dagegen aus 14 C-Atomen. Dadurch stellt die DMPC-Lipiddoppelschicht die dickere Modellmembran dar und könnte die Termini von α_2 stärker vom Puffer abschirmen. Dies könnte wiederum die Änderungen der chemischen Verschiebung verursachen.

Der C-Terminus von Vpr zeigt ebenfalls leichte Unterschiede zwischen den beiden Umgebungen. So sind hier besonders viele Reste mit CSPs größer als der Mittelwert (Abb. 4.21) vorzufinden. Diese Änderungen könnten darauf hindeuten, dass dieser Bereich mit DPC-Monomeren interagiert und nicht mit der Mizelle. In der Nanodisk-Probe sind keine monomeren Lipidmoleküle zu erwarten und somit könnte es zu den Unterschieden in den chemischen Verschiebungen dieser Aminosäurereste kommen. Eine zweite Erklärung wäre, dass der C-Terminus sowohl in die Mizelle als auch die Lipidschicht der Nanodisks eingebettet ist. Allerdings könnte hier eine nicht vorhandene bzw. geringere Krümmung der Lipidschicht die Änderungen der chemischen Verschiebung verursachen. Als dritte Möglichkeit muss auch in Betracht gezogen werden, dass der C-Terminus eingebettet ist und die Änderungen aufgrund der größeren Dicke der Lipidschicht im Vergleich zur Mizelle auftreten. Die Frage, was der C-Terminus in Anwesenheit von DPC-Mizellen

bzw. Lipiddoppelschichten macht, kann erst zweifelsfrei geklärt werden, wenn eine hochaufgelöste Struktur des Vpr die Orientierung des C-Terminus zu den Helices bzw. die exakte Position in den Modellmembranen zeigt.

Die beiden Helices α_1 und α_3 zeigen kaum Unterschiede zwischen den Spektren in Nanodisks und DPC-Mizellen, obwohl dies gerade für α_1 aufgrund der starken, vermutlich mizelleninduzierten Krümmung zu erwarten gewesen wäre. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Lipidschicht der Nanodisk eine gewisse Krümmung besitzt. Eine Assoziation von α_1 an die Membran der Nanodisks ist trotz alledem sehr wahrscheinlich, da es sich um eine amphipathische α -Helix handelt und die hydrophoben Aminosäuren mit einer hydrophoben Umgebung interagieren müssen.

Ein Modell, wie es für Vpr in der DPC-Mizelle erstellt wurde, ist für Vpr in Nanodisks aufgrund des Mangels an experimentellen Daten noch nicht möglich. Um das Modell zu erstellen, müssen weitere Experimente, wie zum Beispiel die Titration von Mn^{2+} zu Vpr in MSP1D1 Δ 5-DMPC-Nanodisks durchgeführt werden oder eine hochaufgelöste Struktur von HIV-2 Vpr in Nanodisks aufgeklärt werden.

5.4.4. Der biologische Hintergrund der Interaktion von Vpr mit Membranen

Daten zur Interaktion von HIV-2 Vpr mit Membranen existieren in der Literatur nicht, so dass nur von den bekannten Interaktionen des HIV-1 Vpr mit Membranen auf die Interaktion des HIV-2 Vpr mit Membranen geschlossen werden kann.

Bereits eine Fraktionierung des Zelllysats von HIV-1 infizierten MT2-Zellen in eine Zellkernfraktion, eine Zytosolfraktion sowie eine Membranfraktion konnte zeigen, dass HIV-1 Vpr an Membranen lokalisiert ist (Sato et al. 1990).

Mittlerweile wurde nachgewiesen, dass HIV-1 Vpr eine Ionenkanalaktivität besitzt (Piller et al. 1996; Piller et al. 1998; Piller et al. 1999; Chen et al. 2010), welche auch auf HIV-2 Vpr zutreffen könnte. Piller et al. (1999) haben gezeigt, dass die ersten 40 N-terminalen Aminosäuren von HIV-1 Vpr für die Bildung eines Kationenkanals verantwortlich sind. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von HIV-1 und HIV-2 Vpr (Abb. 5.4) so fällt auf, dass dieser Bereich den Aminosäuren T6 bis I45 von HIV-2 Vpr entspricht. Innerhalb dieser Sequenz sind 17 Aminosäuren zwischen HIV-1 und HIV-2 Vpr identisch, sechs weitere besitzen ähnliche Eigenschaften. Besonders im Bereich der ersten α -Helix von HIV-2 Vpr sind 13 von 16 (81,2 %) Aminosäuren bzw. Aminosäureeigenschaften zwischen beiden Vpr-Proteinen konserviert. Somit könnte die Funktion einen Kationenkanal zu bilden auch für HIV-2 Vpr zutreffen und die Interaktion mit Membranen

erklären. Als mögliches Modell, könnte ein Homo-Oligomer aus HIV-2 Vpr eine Pore mit den amphipathischen Helices α_1 bilden, indem die hydrophoben Seiten dieser α -Helices mit den Fettsäureketten der Membran interagieren. Der hydrophile Bereich der Helices würde dann die eigentliche Pore bilden, welche dann aus vier negativ geladenen und drei positiv geladenen Aminosäuren pro beteiligter α_1 bestehen würde. Aufgrund der überwiegend negativen Ladungen könnte diese Pore einen kationenselektiven Ionenkanal darstellen.

Was die genaue Funktion dieses Kanals bei HIV-1 Vpr ist, wurde bisher nicht eindeutig geklärt. Es ist lediglich gezeigt worden, dass durch die Bildung des Kanals eine Depolarisation des Plasmalemmas von neuronalen Zellen entsteht und der Tod dieser Zellen eintritt (Piller et al. 1998; Piller et al. 1999).

Chen et al. (2010) dagegen berichten, dass die Ionenkanalaktivität auf die Aminosäuren 55 bis 83 des HIV-1 Vpr zurückzuführen ist. Es konnte mit Patch-Clamp Versuchen eine erhöhte Leitfähigkeit gezeigt werden, die eine Abhängigkeit von der Membrankrümmung besitzt. So ist die Aktivität des Kanals in flachen Membranen größer als in gekrümmten. In HIV-2 Vpr sind die homologen Aminosäuren zu HIV-1 Vpr₅₅₋₈₃ die Aminosäuren E60 bis Q88 (Abb. 5.4). Innerhalb dieser Sequenzen von HIV-1 und HIV-2 Vpr sind 17 Aminosäuren identisch (58,6 %) und weitere 2 mit gleichen Eigenschaften (6,9 %), was eine ähnliche Aktivität für diesen Bereich des HIV-2 Vpr wie für HIV-1 Vpr möglich macht. Ob HIV-2 Vpr eine Ionenkanalaktivität besitzt und welcher Bereich dafür verantwortlich sein könnte, kann anhand der hier gesammelten Daten nicht gesagt werden.

Eine weitere Funktion von HIV-1 Vpr ist die Fähigkeit, Membranen zu destabilisieren und zu überwinden. Greiner et al. (2011) haben gezeigt, dass der C-terminale Bereich von Aminosäure 52 bis 96 des HIV-1 Vpr die Lipiddoppelschichten von Liposomen bereits bei Vorhandensein von mikromolaren Vpr-Konzentrationen destabilisiert.

Die Fähigkeit Membranen zu überwinden wird dem H(S/F)RIG-Motiv am C-Terminus von HIV-1 Vpr zugeschrieben, wodurch es bei extrazellulärer Zugabe von HIV-1 Vpr zum Absterben der inkubierten Zellen kommen kann (Macreadie et al. 1996; Arunagiri et al. 1997). Besonders Arunagiri et al. (1997) konnten zeigen, dass für das Eindringen in Membranen die konservierte Sequenz H₇₁FRIGCRHSRIG₈₂ des HIV-1 Vpr relevant ist. Die extrazelluläre Zugabe von HIV-1 Vpr mit dieser Domäne führte zu einer Permeabilisierung von CD4-positiven Lymphozyten, einer folgenden Dysfunktion der Mitochondrien dieser Zellen und schließlich zur Apoptose der Lymphozyten. Das genannte Motiv ist leicht abgewandelt auch in HIV-2 Vpr als H₇₆FRAGCGHSRIG₈₇ enthalten (Abb. 5.4). Die Titration von Mn²⁺ zu HIV-2 Vpr in DPC-Mizellen hat gezeigt, dass dieser Bereich in die Mizelle eingebettet ist. Die Konservierung des Motivs in HIV-2 Vpr und die offensichtliche Interaktion dieser Region des HIV-2 Vpr mit DPC-Mizellen lässt auch für HIV-2 Vpr eine zellpenetrierende Funktion dieses Motivs wie für HIV-1 Vpr vermuten.

Neben der Induktion von Apoptose in Lymphozyten durch den C-Terminus wurde gezeigt, dass die

Aminosäuren 55 bis 82 von HIV-1 Vpr in der Lage sind, Zellen zu transfizieren (Coeytaux et al. 2003), was eine Interaktion mit und ein Überwinden von Membranen durch Vpr voraussetzt. Dieser Bereich von HIV-1 Vpr entspricht den Aminosäuren E60 bis G87 des HIV-2 Vpr. Wie bereits erwähnt, liegt für diesen Bereich eine starke Konservierung der Aminosäuren bzw. Aminosäureeigenschaften zwischen HIV-1 und HIV-2 Vpr vor. Dadurch könnte die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion von HIV-2 Vpr mit Membranen ihren funktionellen Hintergrund ebenfalls in dem Transport von DNA über Zellmembranen haben.

Welche der hier genannten Funktionen mit den detektierten Interaktionen von HIV-2 Vpr mit DPC-Mizellen in Zusammenhang stehen, kann mit den gesammelten Daten nicht gesagt werden. Allerdings ist es aufgrund der Konservierung der Aminosäuren sowie der wahrscheinlichen Interaktion dieser mit Membranen möglich, dass alle diese Funktionen auch von HIV-2 Vpr während des viralen Lebenszyklus von HIV-2 durchgeführt werden.

Es soll hier aber auch erwähnt werden, dass beispielsweise SIV Vpx auch in Abwesenheit von Membranen strukturiert vorliegen und Funktionen erfüllen kann. So konnte ein Komplex aus der C-terminalen Region des SAMHD1, Vpx und der C-terminalen Domäne des DCAF1 (SAMHD1-CtD-Vpx-DCAF1-CtD) kristallisiert werden (Schwefel et al. 2013). Durch diesen Komplex kommt es zu einem Abbau des SAMHD1, welches unter anderem die Replikation von HIV-1 in humanen Zellen inhibiert. Für die Ubiquitinierung durch die DDB1-CUL4A-ROC1 Ubiquitin Ligase und den folgenden Abbau des SAMHD1 wird das DCAF1 benötigt und dafür von Vpx rekrutiert. Die Struktur des SIV Vpx in diesem Komplex zeigt ein Helixbündel wie für die HIV-1 Vpr Struktur in 30 % AcN von Morellet et al. (2003). In der Struktur des Vpx wurde auch gezeigt, dass die räumliche Nähe der C-Termini von Helix 1 und Helix 3 durch die Koordination eines Zink-Atoms durch die Aminosäurereste H39, H82, C87 und C89 stabilisiert wird (Schwefel et al. 2013). Eine mögliche Interaktion von HIV-2 Vpr mit Zink wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und könnte auch die Struktur von HIV-2 Vpr in Abwesenheit von Modellmembranen stabilisieren.

HIV-1 Vpr	1	----	MEQAPEDQGPQREPYNDWTLELLEELKNEAVRHFPRIWLHSLGQHIYETYGDTWTG														
HIV-2 Vpr	2	AEAPTE	LPVVDGTPLPREPGDEWIIETLREIKKEEALKHFDPRLLIALGKYIYTRHGD	TLEG													
Konsensus-Sequenz	2		E	P	D	P	REP	dw	LEL	EIK	EAvrHF		L	LG	IY	GDT	G

HIV-1 Vpr	57	VEALIRILQQLLFIFHFRIGCRHSRIG	I	IQRRTRNG	ASKS----						
HIV-2 Vpr	62	ARELIKVLQRALFTHFRAGCGHSRIG	Q	TRGGNPLSA	IPTPRNMA						
Konsensus-Sequenz	62	LIRILQ	LF	HFR	GC	HSRIG		g			

Abbildung 5.4: Vergleich der Aminosäuresequenzen von HIV-1 und HIV-2 Vpr. Die Sequenz des HIV-1 Vpr entspricht der des HIV-1 aus Gruppe M, Subtyp B, Stamm 89.6. Schwarz hinterlegt sind identische Aminosäuren. Grau hinterlegt sind Aminosäuren mit gleichen Eigenschaften.

5.5. Die Interaktion der HIV-2 Proteine Vpr und p6

Die Interaktion der beiden HIV-2 Proteine Vpr und der C-terminalen Domäne des Gag-Polyproteins, p6, wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystems nachgewiesen und zeigte eine deutliche Interaktion der beiden Proteine (Selig et al. 1999). Weitere Daten wurden mit diesen beiden Proteinen bisher nicht gesammelt, ganz im Gegenteil zur Interaktion zwischen HIV-1 Vpr und p6. Die Interaktion dieser Proteine wurde mehrfach mit verschiedenen Methoden charakterisiert (Bachand et al. 1999; Jenkins et al. 2001; Salgado et al. 2009). So konnte auch gezeigt werden, dass Vpr sowohl mit dem p6 alleine als auch mit p6 innerhalb des Gag-Polyproteins interagiert.

Die in dieser Arbeit mittels NMR-Spektroskopie gezeigte Interaktion der HIV-2 Proteine Vpr und p6 stellt die erste biophysikalische Charakterisierung dieser Interaktion dar.

5.5.1. Die mittelstarke Bindung von Vpr an p6 findet vorwiegend über den N-Terminus des Vpr statt

In Kapitel 4.5.9. ist die Interaktion der beiden HIV-2 Proteine Vpr und p6 beschrieben. Die Resonanzsignale des Vpr zeigen aufgrund der kontinuierlichen Änderung der chemischen Verschiebung bei Erhöhung der p6-Konzentration (Abb. 4.23) einen schnellen Austausch zwischen p6-freier und p6-gebundener Form des Vpr. Ein schneller Austausch deutet meist auf eine mittelstarke bis schwache Bindungsstärke zwischen den beiden Interaktionspartnern hin. Diese mittelstarke Bindung zwischen HIV-2 Vpr und p6 zeigt sich auch bei den Fits der K_D -Werte (Abb. 4.25), welche bei den vorliegenden Bedingungen einen K_D -Wert von $31,3 \pm 15,1 \mu\text{M}$ ergeben. Diese Dissoziationskonstante konnten mit den Fits der Aminosäurereste L16, R17, E18 und T53 bestimmt werden. Zu Vergleichszwecken ist anzumerken, dass der K_D der Interaktion von HIV-1 Vpr mit HIV-1 p6 mit $18 \mu\text{M}$ bis $75 \mu\text{M}$ bestimmt wurde (Jenkins et al. 2001) und somit ähnlich stark ist wie die in dieser Arbeit gemessene Interaktion zwischen HIV-2 Vpr und HIV-2 p6.

Die angesprochene fehlende Sättigung der CSPs der Resonanzsignale des HIV-2 Vpr könnte unter anderem auf das DPC zurückzuführen. So können monomere DPC-Moleküle mit hydrophoben Resten des Vpr interagieren und die Interaktion der beiden Proteine stören. Ausserdem wurde bei der Titration das HIV-2 p6 nur bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ zu HIV-2 Vpr gegeben. Es besteht natürlich die Möglichkeit, dass diese p6-Konzentration nicht ausreicht, um eine Sättigung zu erreichen.

Die Bindestelle des HIV-2 p6 in HIV-2 Vpr besteht hauptsächlich aus den Aminosäureresten L16 bis D21 bzw. E22 bis E26 im flexiblen N-Terminus bzw. in Helix α_1 von Vpr. Durch die faltungsbedingte räumliche Nähe der Region von F74 bis R78 zum N-Terminus von α_1 (Abb. 5.5)

ist es möglich, dass diese Region ebenfalls an der Bindung von Vpr an p6 beteiligt ist. Diese räumliche Nähe lässt sich durch die Abstände einzelner Aminosäuren in den Bereichen L16 bis D21 zu den Aminosäuren der Region F74 bis R78 verdeutlichen. So ist in der energetisch günstigsten Struktur von HIV-2 Vpr das $^{13}\text{C}^\alpha$ des Aminosäurerests F77 17,9 Å vom $^{13}\text{C}^\alpha$ des R17, 20,5 Å vom $^{13}\text{C}^\alpha$ des E18 und 20,3 Å vom $^{13}\text{C}^\alpha$ des D21 entfernt. Ob der Bereich Y50 bis G56 in α_2 und dem zweiten interhelikalen Linker als weitere Bindestelle an der Interaktion beteiligt ist oder ob es sich um einen Messfehler handelt, kann mit den hier vorliegenden Daten nicht gesagt werden. Damit dieser Bereich des Vpr eine zweite Bindestelle darstellen kann, müsste in HIV-2 p6 wahrscheinlich ebenfalls eine zweite Bindestelle zum HIV-2 Vpr vorliegen. Dies wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Durch Mutation der Aminosäurereste E25 und A30 in HIV-1 Vpr konnte gezeigt werden, dass besonders die erste α -Helix von HIV-1 Vpr für die Interaktion mit HIV-1 p6 notwendig ist (Bachand et al. 1999). Keiner der Reste L16 bis E26 des HIV-2 Vpr entspricht den homologen Aminosäuren von E25 und A30 des HIV-1 Vpr. Diese Aminosäuren liegen aber alle im N-terminalen Bereich bzw. in α_1 von HIV-2 Vpr. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Hauptbindestelle von HIV-2 p6 am N-Terminus und in α_1 von HIV-2 Vpr liegt.

Die exakte Bindestelle des HIV-2 Vpr in HIV-2 p6 ist nicht bekannt, im Gegensatz zur Bindestelle des HIV-1 Vpr in HIV-1 p6. Allerdings sind in der Literatur mehrere mögliche Bindestellen angegeben. In HIV-1 soll zum einen das Motiv LX(S/X)LFG am C-Terminus von HIV-1 p6 für die Interaktion mit HIV-1 Vpr verantwortlich sein (Bachand et al. 1999; Jenkins et al. 2001). Als LNSLFG-Motiv kommt dieses in dem verwendeten HIV-2 p6 an den Sequenzpositionen 69 bis 74 vor. Nach Zhu et al. (2004) ist dagegen das Aminosäure-Motiv F₁₅RFG₁₈ in HIV-1 p6 essentiell für die Interaktion mit HIV-1 Vpr. Dieses Aminosäuremotiv kommt in HIV-2 p6 dagegen nicht vor. Als dritte mögliche Vpr-Bindestelle in HIV-1 p6 werden die Aminosäuren E34, L35 und Y36 vermutet (Salgado et al. 2009), welche aber ebenfalls nicht in HIV-2 p6 vorkommen. Für die Interaktion der SIV_{mac}/SIV_{sm} Homologen von Vpr und p6 ist ein DXAXLL-Motiv in p6 nötig (Accola et al. 1999). Dieses Motiv existiert als D₁₇PAVDLL₂₃-Motiv in dem verwendeten HIV-2 p6. Auch wenn SIV_{sm} eine große Ähnlichkeit mit HIV-2 hat (de Silva et al. 2008), kann anhand der hier vorliegenden Daten nicht gesagt werden, ob das DPAVDLL-Motiv oder das LNSLFG-Motiv in HIV-2 p6 für die Interaktion mit HIV-2 Vpr verantwortlich ist. Es muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass beide Motive des HIV-2 p6 an der Interaktion mit HIV-2 Vpr beteiligt sind.

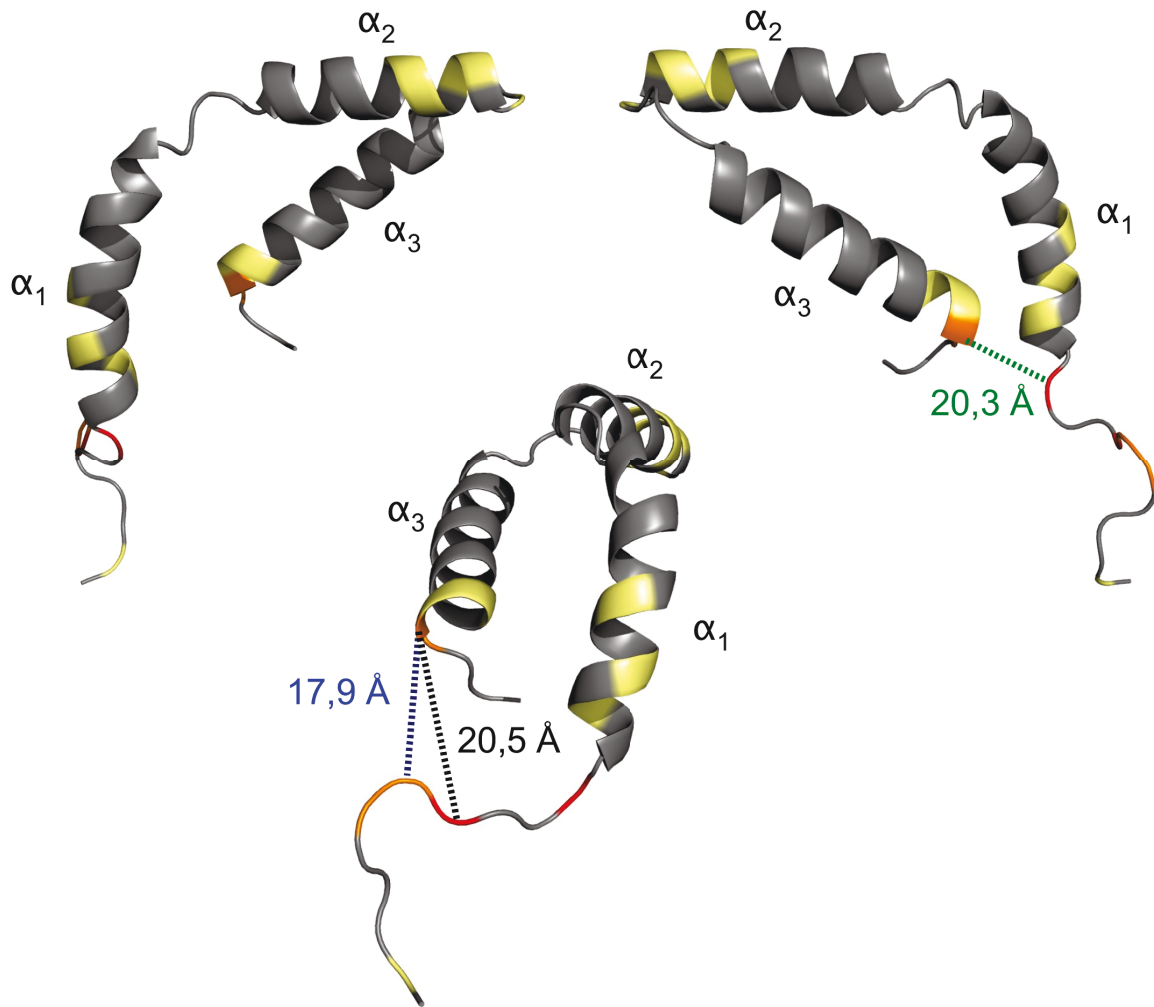


Abbildung 5.5: Abbildung der p6-interagierenden Aminosäuren in der Struktur des Vpr. Grau: CSP < 0,03 ppm; gelb: CSP 0,03 bis 0,06 ppm; orange: CSP 0,06 bis 0,09 ppm; rot: CSP > 0,09 ppm. Gemessen wurden die Abstände zwischen den $^{13}\text{C}^\alpha$ von F77 und R17 (17,8 Å), zwischen den $^{13}\text{C}^\alpha$ von F77 und E18 (20,5 Å) sowie zwischen den $^{13}\text{C}^\alpha$ von F77 und D21 (20,3 Å). Dargestellt sind die Aminosäuren 12 bis 79 des HIV-2 Vpr. Die Aminosäurereste 2 bis 12 bzw. 80 bis 104 in den flexiblen Termini wurden zur besseren Darstellung entfernt, da diese mit Ausnahme von S95 nur noch Reste mit CSPs < 0,03 ppm enthielten. Die drei α -Helices von Vpr sind mit α_1 bis α_3 beschriftet. Die drei Strukturen zeigen drei verschiedene Blickwinkel auf HIV-2 Vpr.

Bei Betrachten der an der Bindung des HIV-2 Vpr an das p6 beteiligten Aminosäuren wird deutlich, dass die Interaktion durch ionische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten der beiden Proteine zustande kommen könnte. In den beiden Sequenzen (L16-E26; F74-R78) kommen drei positiv geladene Aminosäuren (R17, H76, R78), vier negativ geladene Aminosäuren (E18, D21, E22, E26) und sechs hydrophobe Aminosäuren (L16, W23, I24, I25, F74, F77) vor. Sollte allerdings nur das LNSLFG-Motiv in HIV-2 p6 für die Interaktion mit HIV-2 Vpr

verantwortlich sein, so ist aufgrund der Aminosäureeigenschaften dieses Motivs eher von einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen HIV-2 Vpr und p6 auszugehen. Das DPAVDLL-Motiv des p6 enthält neben den fünf hydrophoben Aminosäuren auch die beiden negativ geladenen Aspartate, die eine ionische Wechselwirkung mit positiv geladene Aminosäuren des HIV-2 Vpr eingehen könnten. Welches der beiden Motive oder ob beide Motive an der Bindung zwischen HIV-2 Vpr und HIV-2 p6 beteiligt sind, kann anhand der hier vorliegenden Daten nicht gesagt werden. Um die exakte Bindestelle von HIV-2 Vpr in HIV-2 p6 zu lokalisieren muss das Proteinrückgrat von HIV-2 p6 zugeordnet werden und zu diesem unmarkiertes HIV-2 Vpr titriert werden. Dadurch könnte auch geklärt werden, auf welcher Art von Wechselwirkung die Interaktion beruht.

5.5.2. Biologischer Hintergrund der Interaktion zwischen Vpr und p6

Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass die Interaktion von HIV-1 Vpr mit HIV-1 p6 für die Inkorporation von Vpr in Virionen verantwortlich ist (Kondo et al. 1995; Kondo et al. 1996; Bachand et al. 1999). Mit Hilfe von Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass in assemblierten Virionen kein HIV-1 Vpr eingebaut wird, wenn p6 oder das LXXLFG-Motiv in p6 nicht vorhanden sind. Bachand et al. (1999) konnten zusätzlich zeigen, dass eine Mutation der Aminosäuren E25 und A30 des HIV-1 Vpr ebenfalls zu einem Nichteinbau von HIV-1 Vpr in Virionen führte.

Da auch HIV-2 Vpr mit 40 bis 50 Proteinen pro Partikel in dem HI-Virus vorkommt (Kewalramani et al. 1996), könnte auch die Interaktion von HIV-2 Vpr mit HIV-2 p6 dem Einbau des Vpr ins Virion dienen. Durch Unterdrücken der Interaktion zwischen den HIV-2 Proteinen Vpr und p6 würde somit der Einbau des Vpr in das Virion verhindert werden. Dies wiederum hätte einen großen Einfluss auf den Lebenszyklus des Virus. So interagiert das Vpr des eng mit dem HIV-2 verwandten SIV_{sm} mit dem Reverse Transkriptase-Komplex des SI-Virus (Fletcher III. et al. 1996). Dieser Komplex ist besonders bei der Neuinfektion von Zellen aktiv, bevor es zur Synthese von viralen Proteinen durch die infizierte Zelle kommt. Des Weiteren wird vermutet, dass virioninkorporiertes Vpr als Stimulator für die Transkription von viraler mRNA dient (Kino & Pavlakis, 2004), da HIV-1 Vpr beispielsweise als Aktivator der Long Terminal Repeats fungiert (Cohen et al. 1990). Diese beiden Funktionen von Vpr Proteinen zeigen die Bedeutung des Einbaus von Vpr in das Virion und den Nutzen, den eine Unterdrückung der p6-Vpr-Interaktion für eine therapeutische Anwendung hätte. Auf der Basis der vollständigen Charakterisierung der Interaktion zwischen HIV-2 Vpr und p6 könnte beispielsweise eine Therapie entwickelt werden, die durch einen höher affinen Liganden die Interaktion unterdrückt. Dies hätte den angesprochenen Nichteinbau des Vpr in das Virion zur Folge, was wiederum einen negativen Einfluss auf die oben genannten Prozesse bei der Infektion

neuer Zellen hätte und die Infektiosität des Virus herabsetzen könnte.

5.6 Ausblick

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Daten wurde die globale Faltung des Proteinrückgrats von Vpr in Anwesenheit von DPC-Mizellen bestimmt. Des Weiteren wurde die Interaktion von HIV-2 Vpr mit DPC-Mizellen und Lipiddoppelschichten in Nanodisks untersucht. Die Experimente mit DPC-Mizellen haben ergeben, dass α_1 an die Mizellenoberfläche assoziiert ist, die Helices α_2 und α_3 dagegen partiell in der Mizelle eingebettet vorliegen. Ebenfalls mit dem hydrophoben Bereich der DPC-Mizelle könnte der C-Terminus von HIV-2 Vpr interagieren. Interessanterweise gibt es keinen großen strukturellen Unterschied zwischen Vpr in DPC-Mizellen und DMPC-Nanodisks.

Zur weiteren Charakterisierung des HIV-2 Vpr könnten hochaufgelöste Strukturen des Proteins in DPC-Mizellen und DMPC-Nanodisks bestimmt werden. Dadurch könnte neben der exakten Faltung des Vpr auch die Interaktion des C-Terminus mit Modellmembranen aufgeklärt werden. Auch die Funktion der Interaktion von HIV-2 Vpr mit Membranen ist noch weitgehend unbekannt und muss weiter untersucht werden. Des Weiteren könnte die Charakterisierung von HIV-2 Vpr in Abwesenheit von Modellmembranen durchgeführt werden, da sowohl HIV-1 Vpr als auch SIV Vpx Funktionen besitzen, die eine Interaktion mit Membranen nicht voraussetzen.

Durch Untersuchung der Interaktion der HIV-2 Proteine Vpr und p6 konnte die Bindestelle des p6 in Vpr lokalisiert werden. Ausserdem wurde die Dissoziationskonstante der Interaktion ermittelt. Da anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig geklärt ist, ob es für die Interaktion nur eine oder mehrere Bindestellen pro Protein gibt müssen auch hier weitere Experimente durchgeführt werden. So sollten die Proteinrückgratresonanzen des HIV-2 p6 zugeordnet werden und unmarkiertes Vpr zu diesem titriert werden. Dies würde zum einen die exakte Bindestelle des Vpr in p6 lokalisieren und zum anderen weitere Hinweise über die Anzahl der Bindestellen geben, die für diese Interaktion nötig sind. Ausserdem könnten so bessere Rückschlüsse über die Art der Wechselwirkung getroffen werden. Um eine physiologischere Umgebung für die Interaktion zu erhalten, sollten die Titrationsexperimente ausserdem mit HIV-2 Vpr in DMPC-Nanodisks durchgeführt werden.

Chemische Verschiebungen von HIV-2 Vpr

Tabelle A.1: Chemische Verschiebungen der Kerne von HIV-2 Vpr. Die Messungen erfolgten in 10 mM Natriumazetatpuffer (pH 5) mit 50 mM NaCl, 5 mM β -ME und 50 mM DPC bei 40 °C. Die Nomenklatur der Atomkerne entspricht der des Programms TALOS-N. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabenkode angegeben.

Sequenzposition	Aminosäure	Atomkern	chem. Verschiebung [ppm]
2	A	C	173,575
2	A	CA	51,886
2	A	CB	19,315
2	A	HA	4,063
2	A	HB	1,482
3	E	C	175,545
3	E	CA	56,213
3	E	CB	30,294
3	E	HN	8,61
3	E	HA	4,301
3	E	HB2	2,01
3	E	HB1	1,873
3	E	N	120,519
4	A	CA	50,431
4	A	CB	18,298
4	A	HN	8,37
4	A	N	126,515
5	P	C	177
5	P	CA	63,167
5	P	CB	32,081
5	P	HA	4,453
5	P	HB2	1,902
5	P	HB1	2,27
6	T	C	174,344
6	T	CA	61,961

6	T	CB	69,785
6	T	HN	8,074
6	T	HA	4,219
6	T	HB	4,147
6	T	N	113,898
7	E	C	175,641
7	E	CA	55,985
7	E	CB	30,29
7	E	HN	8,208
7	E	HA	4,31
7	E	HB2	1,999
7	E	HB1	1,868
7	E	N	122,932
8	L	CA	52,884
8	L	CB	41,806
8	L	HN	8,193
8	L	N	124,753
10	P	C	177,14
10	P	CA	63,033
10	P	CB	31,877
10	P	HA	4,509
10	P	HB2	2,267
11	V	C	175,941
11	V	CA	62,302
11	V	CB	32,801
11	V	HN	8,215
11	V	HA	4,05
11	V	HB	2,034
11	V	N	119,995
12	D	C	176,364
12	D	CA	54,16

12	D	CB	41,1
12	D	HN	8,285
12	D	HA	4,609
12	D	HB1	2,636
12	D	N	123,061
13	G	C	174,024
13	G	CA	45,328
13	G	HN	8,209
13	G	HA1	3,918
13	G	N	109,029
14	T	CA	60,456
14	T	CB	69,677
14	T	HN	8,022
14	T	N	116,59
15	P	C	176,505
15	P	CA	63,277
15	P	CB	32,07
15	P	HA	4,387
15	P	HB2	1,82
15	P	HB1	2,239
16	L	C	176,83
16	L	CA	55,369
16	L	CB	42,223
16	L	HN	8,17
16	L	HA	4,231
16	L	HB2	1,525
16	L	HB1	1,597
16	L	N	121,227
17	R	C	175,704
17	R	CA	55,539
17	R	CB	31,153

17	R	HN	8,078
17	R	HA	4,33
17	R	HB2	1,805
17	R	HB1	1,691
17	R	N	120,852
18	E	CA	54,126
18	E	CB	29,338
18	E	HN	8,312
18	E	N	122,548
19	P	C	177,654
19	P	CA	63,833
19	P	CB	32,13
19	P	HA	4,385
19	P	HB2	2,262
19	P	HB1	1,949
20	G	C	174,467
20	G	CA	45,849
20	G	HN	8,616
20	G	HA2	3,948
20	G	HA1	4,007
20	G	N	108,86
21	D	C	176,617
21	D	CA	54,427
21	D	CB	39,868
21	D	HN	8,268
21	D	HA	4,662
21	D	HB1	2,709
21	D	N	118,568
22	E	C	177,868
22	E	CA	59,097
22	E	CB	28,696

22	E	HN	8,541
22	E	HA	4,04
22	E	N	120,753
23	W	C	177,487
23	W	CA	60,128
23	W	HN	8,175
23	W	HE1	10,684
23	W	N	119,829
23	W	NE1	131,359
24	I	C	176,995
24	I	CA	63,854
24	I	HN	7,203
24	I	N	119,32
25	I	C	177,675
25	I	CA	64,143
25	I	CB	36,838
25	I	HN	7,427
25	I	N	119,775
26	E	C	179,02
26	E	CA	59,175
26	E	CB	28,461
26	E	HN	7,848
26	E	N	118,791
27	I	CA	64,39
27	I	CB	37,265
27	I	HN	7,702
27	I	N	119,587
28	L	C	178,722
28	L	CA	58,483
28	L	CB	41,128
28	L	HA	3,962

29	R	C	178,67
29	R	CA	60,378
29	R	CB	30,062
29	R	HN	8,467
29	R	HA	3,923
29	R	N	118,726
30	E	C	178,975
30	E	CA	59,187
30	E	CB	28,167
30	E	HN	7,959
30	E	N	119,262
31	I	C	177,087
31	I	CA	65,874
31	I	HN	8,409
31	I	N	119,752
32	K	C	177,358
32	K	CA	60,558
32	K	HN	8,227
32	K	HA	4,27
32	K	N	119,851
33	E	C	179,593
33	E	CA	59,345
33	E	HN	8,242
33	E	HA	3,958
33	E	N	116,595
34	E	C	179,077
34	E	CA	58,397
34	E	CB	28,906
34	E	HN	8,224
34	E	N	117,425
35	A	C	179,198

35	A	CA	55,771
35	A	CB	18,26
35	A	HN	8,767
35	A	HA	4,013
35	A	N	121,982
36	L	C	178,857
36	L	CA	57,234
36	L	CB	41,526
36	L	HN	8,002
36	L	HA	4,142
36	L	N	115,036
37	K	C	177,53
37	K	CA	58,205
37	K	CB	33,071
37	K	HN	7,566
37	K	N	116,504
38	H	C	173,243
38	H	CA	55,799
38	H	HN	7,644
38	H	HA	4,014
38	H	N	113,077
39	F	CA	58,211
39	F	HN	7,868
39	F	N	118,505
41	P	C	177,707
41	P	CA	65,002
41	P	CB	32,155
41	P	HA	4,068
42	R	C	179,672
42	R	CA	59,564
42	R	HN	8,527

42	R	N	116,965
43	L	C	178,313
43	L	CA	57,412
43	L	CB	42,056
43	L	HN	7,852
43	L	N	120,101
44	L	CA	57,817
44	L	CB	41,554
44	L	HN	7,416
44	L	N	117,294
45	I	C	177,559
45	I	CA	64,94
46	A	C	180,669
46	A	CA	55,321
46	A	CB	18,166
46	A	HN	7,586
46	A	HA	4,118
46	A	N	121,643
47	L	C	178,555
47	L	CA	58,037
47	L	HN	8,224
47	L	HA	4,688
47	L	N	118,919
48	G	C	174,765
48	G	CA	48,002
48	G	HN	8,569
48	G	HA1	3,682
48	G	N	106,459
49	K	C	178,846
49	K	CA	60,221
49	K	CB	34,776

49	K	HN	8,522
49	K	HA	3,767
49	K	N	120,454
50	Y	C	177,415
50	Y	CA	61,657
50	Y	CB	38,679
50	Y	HN	8,109
50	Y	HA	4,271
50	Y	N	121,025
51	I	C	177,331
51	I	CA	64,781
51	I	HN	8,345
51	I	HA	4,33
51	I	HB	1,867
51	I	N	117,766
52	Y	C	176,789
52	Y	CA	61,325
52	Y	CB	39,5
52	Y	HN	8,393
52	Y	N	118,681
53	T	C	175,709
53	T	CA	63,93
53	T	HN	7,93
53	T	HA	4,265
53	T	N	109,482
54	R	C	176,461
54	R	CA	56,177
54	R	HN	7,643
54	R	HA	4,233
54	R	N	120,062
55	H	C	174,995

55	H	CA	55,459
55	H	CB	29,029
55	H	HN	8,053
55	H	HA	4,758
55	H	N	116,626
56	G	C	174,252
56	G	CA	46,538
56	G	HN	8,252
56	G	HA1	3,846
56	G	N	109,43
57	D	CA	55,114
57	D	HN	8,421
57	D	N	119,637
60	E	C	178,852
60	E	CA	59,073
61	G	C	175,611
61	G	CA	46,839
61	G	HN	8,305
61	G	HA1	3,865
61	G	N	107,572
62	A	C	178,617
62	A	CA	55,056
62	A	CB	18,465
62	A	HN	8,261
62	A	HA	3,916
62	A	N	123,474
63	R	C	178,687
63	R	CA	60,15
63	R	CB	30,181
63	R	HN	8,259
63	R	N	117,087

64	E	C	178,757
64	E	CA	58,982
64	E	CB	28,731
64	E	HN	8,011
64	E	HA	4,068
64	E	N	118,017
65	L	C	178,634
65	L	CA	57,952
65	L	CB	41,634
65	L	HN	7,96
65	L	N	119,994
66	I	C	177,448
66	I	CA	64,88
66	I	CB	37,089
66	I	HN	8,162
66	I	N	118,168
67	K	C	179,519
67	K	CA	59,837
67	K	CB	32,025
67	K	HN	7,697
67	K	HA	4,079
67	K	N	119,606
68	V	C	178,594
68	V	CA	66,342
68	V	HN	7,815
68	V	HA	3,699
68	V	N	119,525
69	L	C	178,31
69	L	CA	58,147
69	L	CB	41,784
69	L	HN	8,233

69	L	HA	4,006
69	L	N	120,65
70	Q	C	177,62
70	Q	CA	60,071
70	Q	CB	28,641
70	Q	HN	8,708
70	Q	HA	3,76
70	Q	N	118,269
71	R	C	179,002
71	R	CA	59,345
71	R	HN	7,853
71	R	HA	4,263
71	R	N	118,142
72	A	C	179,885
72	A	CA	54,969
72	A	CB	18,588
72	A	HN	8,225
72	A	HA	3,919
72	A	N	122,205
73	L	C	178,372
73	L	CA	58,092
73	L	CB	42,342
73	L	HN	8,411
73	L	HA	4,232
73	L	N	117,907
74	F	C	177,808
74	F	CA	60,682
74	F	CB	38,625
74	F	HN	8,342
74	F	N	117,493
75	T	C	175,875

75	T	CA	65,376
75	T	HN	8,188
75	T	HA	3,994
75	T	N	112,758
76	H	C	175,21
76	H	CA	58,162
76	H	HN	7,975
76	H	HA	4,384
76	H	N	117,942
77	F	C	175,599
77	F	CA	58,941
77	F	CB	39,566
77	F	HN	7,993
77	F	HA	4,537
77	F	N	116,385
78	R	C	176,141
78	R	CA	56,733
78	R	CB	30,363
78	R	HN	7,9
78	R	HA	4,206
78	R	HB2	1,724
78	R	HB1	1,804
78	R	N	119,534
79	A	C	178,304
79	A	CA	52,903
79	A	CB	19,29
79	A	HN	8,009
79	A	HA	4,241
79	A	N	123,02
79	A	HB#	1,341
80	G	C	174,301

80	G	CA	45,453
80	G	HN	8,233
80	G	HA1	3,918
80	G	N	107,291
81	C	C	175,068
81	C	CA	58,783
81	C	CB	28,186
81	C	HN	8,139
81	C	HA	4,457
81	C	HB2	2,874
81	C	HB1	2,878
81	C	N	117,948
82	G	C	173,913
82	G	CA	45,532
82	G	HN	8,442
82	G	HA1	3,874
82	G	N	110,334
83	H	C	174,557
83	H	CA	55,405
83	H	CB	29,36
83	H	HN	8,258
83	H	HA	4,696
83	H	HB2	3,239
83	H	HB1	3,107
83	H	N	117,965
84	S	C	174,476
84	S	CA	58,53
84	S	CB	63,982
84	S	HN	8,292
84	S	HA	4,416
84	S	HB1	3,811

84	S	N	116,649
85	R	C	176,279
85	R	CA	56,318
85	R	CB	30,766
85	R	HN	8,472
85	R	HA	4,337
85	R	HB2	1,847
85	R	HB1	1,732
85	R	N	122,888
86	I	C	176,555
86	I	CA	61,486
86	I	CB	38,605
86	I	HN	8,062
86	I	HA	4,102
86	I	HB	1,819
86	I	N	120,953
87	G	C	173,994
87	G	CA	45,34
87	G	HN	8,403
87	G	HA1	3,905
87	G	N	112,298
88	Q	C	176,259
88	Q	CA	55,882
88	Q	CB	29,734
88	Q	HN	8,123
88	Q	HA	4,373
88	Q	HB2	2,084
88	Q	HB1	1,942
88	Q	N	119,653
89	T	C	174,57
89	T	CA	61,975

89	T	CB	69,89
89	T	HN	8,175
89	T	HA	4,307
89	T	HB	4,168
89	T	N	115,345
90	R	C	176,613
90	R	CA	56,302
90	R	CB	30,764
90	R	HN	8,38
90	R	HA	4,336
90	R	HB2	1,817
90	R	HB1	1,751
90	R	N	123,259
91	G	C	174,345
91	G	CA	45,259
91	G	HN	8,358
91	G	HA2	3,973
91	G	HA1	3,92
91	G	N	109,967
92	G	C	173,413
92	G	CA	45,032
92	G	HN	8,152
92	G	HA1	3,889
92	G	N	108,179
93	N	CA	51,19
93	N	CB	39,013
93	N	HN	8,256
93	N	N	119,16
94	P	C	178,09
94	P	CA	63,743
94	P	CB	32,132

94	P	HA	4,386
94	P	HB2	1,882
94	P	HB1	2,257
95	L	C	177,471
95	L	CA	55,461
95	L	CB	41,815
95	L	HN	8,153
95	L	HA	4,262
95	L	HB2	1,641
95	L	HB1	1,556
95	L	N	119,668
96	S	C	173,997
96	S	CA	58,576
96	S	CB	63,899
96	S	HN	7,889
96	S	HA	4,327
96	S	HB2	3,837
96	S	HB1	3,831
96	S	N	114,914
97	A	C	177,044
97	A	CA	52,298
97	A	CB	19,491
97	A	HN	8,014
97	A	HA	4,308
97	A	N	124,981
97	A	HB#	1,321
98	I	CA	58,724
98	I	CB	38,631
98	I	HN	7,83
98	I	N	120,583
99	P	C	176,26

99	P	CA	63,064
99	P	CB	31,969
99	P	HA	4,446
99	P	HB2	1,879
99	P	HB1	2,214
100	T	CA	59,726
100	T	CB	69,815
100	T	HN	8,065
100	T	N	116,15
101	P	C	176,769
101	P	CA	63,349
101	P	CB	32,031
101	P	HA	4,382
101	P	HB2	1,872
101	P	HB1	2,233
102	R	C	175,997
102	R	CA	56,301
102	R	CB	30,915
102	R	HN	8,322
102	R	HA	4,239
102	R	HB2	1,799
102	R	HB1	1,717
102	R	N	120,654
103	N	C	174,885
103	N	CA	53,419
103	N	CB	38,761
103	N	HN	8,346
103	N	HA	4,673
103	N	HB2	2,723
103	N	HB1	2,794
103	N	N	118,943

104	M	C	174,635
104	M	CA	55,469
104	M	CB	33,214
104	M	HN	8,161
104	M	HA	4,427
104	M	HB2	1,91
104	M	HB1	2,09
104	M	N	120,72
105	A	CA	53,718
105	A	CB	20,238
105	A	HN	7,791
105	A	N	129,803

Literaturverzeichnis

Accola, M.A., Bukovsky, A.A., Jones, M.S. & Göttlinger, H.G., 1999: A conserved dileucine-containing motif in p6^{gag} governs the partiel association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV_{mac} and SIV_{agm}. J. Virol. 73, 9992-9999.

Arunagiri, C., Macreadie, I, Hewish, D. & Azad, A., 1997: A c-terminal domain of HIV-1 accessory protein Vpr is involved in penetration, mitochondrial dysfunction and apoptosis of CD4⁺ lymphocytes. Apoptosis 2, 69-76.

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

Bachand, F., Yao, X.-J., Hrimech, M., Rougeau, N. & Cohen, E.A., 1999: Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires direct interaction with the p6 domain of the p55 Gag precursor. J. Biol. Chem. 274, 9083-9091.

Battiste J.L. & Wagner, G., 2000: Utilization of site-directed spin labeling and high-resolution heteronuclear nuclear magnetic resonance for global fold determination of large proteins with limited nuclear overhauser effect data. Biochemistry 39, 5355-5365.

Bayburt, T.H., Carlson, J.W. & Sligar, S.G., 1998: Reconstitution and imaging of a membrane protein in a nanometer-size phospholipid bilayer. J. Struct. Biol. 123, 37-44.

Bayburt, T.H., Grinkova, Y.V. & Sligar, S.G., 2002: Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. Nano Letters 2, 853-856.

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

Bobby, R., Medini, K., Neudecker, P., Lee, T.V., Brimble, M.A., McDonald, F.J., Lott, J.S. & Dingley, A.J., 2013: Structure and dynamics of human Nedd4-1 WW3 in complex with the αENaC PY motif. Biochim. Biophys. Acta 1834, 1632-1641.

Bourbigot, S., Beltz, H., Denis, J., Morellet, N., Roques, B.P., Mely, Y. & Bouaziz, S., 2005: The C-terminal domain of HIV-1 regulatory protein Vpr adopts an antiparallel dimer structure in solution via its leucine-zipper-like domain. Biochem. J. 387, 333-341.

Bowie, J.U., 2001: Stabilizing membrane Proteins. *Current opinion in structural Biology* 11, 397-402.

Campbell-Yesufu, O.T. & Gandhi, R.T., 2011: Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin. Infect. Dis.* 52, 780-787.

Chen, C.-P., Kremer, C., Henklein, P., Schubert, U., Fink, R.H.A. & Fischer, W.B., 2010: Modulating the activity of the channel-forming segment of Vpr protein from HIV-1. *Eur. Biophys. J.* 39, 1089-1095.

Chou, J.J., Kaufmann, J.D., Stahl, S.J., Wingfield, P.T. & Bax, A., 2002: Micelle-induced curvature in a water-insoluble HIV-1 Env peptide revealed by NMR dipolar coupling measurement in stretched polyacrylamide gel. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 2450-2451.

Clore, G.M., Robien, M.A. & Gronenborn, A.M., 1993: Exploring the limits of precision and accuracy of protein structures determined by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 231, 82-102.

Coeytaux, E., Coulaud, D., Le Cam, E., Danos, O. & Kichler, A., 2003: The cationic amphipathic α -helix of HIV-1 viral protein R (Vpr) binds to nucleic acids, permeabilizes membranes, and efficiently transfects cells. *J. Biol. Chem.* 278, 18110-18116.

Coffin, J.M., Hughes, S.H. & Varmus, H.E., 1997: *Retroviruses*. ISBN 0-87969-571-4.

Cohen, E.A., Terwilliger, E.F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J.G. & Haseltine, W.A., 1990: Identification of HIV-1 *vpr* product and functions. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 3, 11-18.

Cohen, E.A., Terwilliger, E.F., Sodroski, J.G. & Haseltine, W.A., 1988: Identification of a protein encoded by the *vpu* gene of HIV-1. *Nature* 334, 532-534.

Conticello, S.G., Harris, R.S. & Neuberger, M.S., 2003: The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Current Biology* 13, 2009-2013.

Damberg, P., Jarvet, J. & Graslund, A., 2001: Micellar systems as solvents in peptide and protein structure determination. *Methods Enzymol.* 339, 271-285.

Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H. & Beaumelle, B., 2012: The ins and outs of HIV-1 tat. *Traffic* 13, 355-363.

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

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., & Bax, A., 1995: NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6, 277-93.

Denisov, I.G., Grinkova, Y.V., Lazaridis, A.A. & Sligar, S.G., 2004: Directed self-assembly of monodispers phospholipid bilayer nanodisks with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3477-3487.

de Oliveira, T., Engelbrecht, S., van Rensburg, E.J., Gordon, M., Bishop, K., zur Megede, J., Barnett, S.W. and Cassol, S., 2003: Variability at human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease cleavage sites: an indication of viral fitness?. *J. Virol.* 77, 9422-9430.

de Silva, T.I., Cotten, M. & Rowland-Jones, S.L., 2008: HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends in Microbiology* 16, 588-595.

Dosset, P., Hus, J.-C., Blackledge, M. & Marion, D., 2000: Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J. Biomol. NMR* 16, 23-28.

Engler, A., Stangler, T. & Willbold, D., 2001: Solution structure of human immunodeficiency virus type 1 Vpr (13-33) peptide in micelles. *Eur. J. Biochem.* 268, 389-395.

Engler, A., Stangler, T. & Willbold, D., 2002: Structure of human immunodeficiency virus type 1 Vpr (34-51) peptide in micelle containing aqueous solution. *Eur. J. Biochem.* 269, 3264-3269.

Esipov, R.S., Stepanenko, V.N., Chupova, L.A., Boyarskikh, U.A., Filipenko, M.L. & Miroshnikov, A.I., 2008: Production of recombinant human epidermal growth factor using Ssp dnaB mini-intein system. *Protein Expression and Purification* 61, 1-6.

Fairbrother, W.J., Liu, J., Pisacane, P.I., Sliwkowski, M.X. & Palmer III, A.G., 1998: Backbone dynamics of the EGF-like domain of Heregulin- α . *J. Mol. Biol.* 279, 1149-1161.

Farrow, N.A., Muhandiram, R., Singer, A.U., Pascal, S.M., Kay, C.M., Gish, G., Shoelsen, S.E., Pawson, T., Forman-Kay, J.D. & Kay, L.E., 1994: Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. *Biochemistry* 33, 5984-6003.

Farrow, N.A., Zhang, O., Szabo, A., Torchia, D.A. & Kay, L.E., 1995: Spectral density function mapping using ^{15}N relaxation data exclusively. *J. Biomol. NMR* 6, 153-162.

Fletcher III., T.M., Brichacek, B., Sharova, N., Newman, M.A., Stivathis, G., Sharp, P.M., Emerman, M., Hahn, B.H. & Stevenson, M., 1996: Nuclear import and cell cycle arrest functions of HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV_{SM}. *The EMBO Journal* 15, 6155-6165.

Fossen, T., Wray, V., Bruns, K., Rachmat, J., Henklein, P., Tessmer, U., Maczurek, A., Klinger, P. & Schubert, U., 2005: Solution structure of the human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *J. Biol. Chem.* 280, 42515-42527.

Fritz, J.V., Didier, P., Clamme, J.-P., Schaub, E., Murinaux, D., Cabanne, C., Morellet, N., Bouaziz, S., Darlix, J.-L., Mely, Y. & de Rocquigny, H., 2008: Direct Vpr-Vpr interaction in cells monitored by two photon fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence lifetime imaging. *Retrovirology* 5:81.

Fritz, J.V., Dujardin, D., Godet, J., Didier, P., De Mey, J., Darlix, J.-L., Mely, Y. & de Rocquigny, H., 2010: HIV-1 Vpr Oligomerization but not that of gag directs the interaction between Vpr and gag. *J. Virol.* 84, 1585-1596.

Gabudza, D., Olshevsky, U., Bertani, P., Haseltine, W.A. & Sodroski, 1991: Identification of membrane anchorage domains of the HIV-1 gp160 envelope glycoprotein precursor. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 4, 34-40.

Gaponenko, V., Howarth, J.W., Columbus, L., Gasmi-Seabrook, G., Yuan, J., Hubbel, W.L. & Rosecear, P.R., 2000: Protein global fold determination using site-directed spin and isotope labeling. *Protein Science* 9, 302-309.

Gerlach, W. & Stern, O., 1922a: Der experimentelle Nachweis der Richtungsquantelung im Magnetfeld. *Zeitschrift für Physik* 9, 349-352.

Gerlach, W. & Stern, O., 1922b: Das magnetische Moment des Silberatoms. *Zeitschrift für Physik* 9, 353-355.

Glück, J.M., Wittlich, M., Feuerstein, S., Hoffmann, S., Willbold, D. & Koenig, B.W., 2009: Integral membrane proteins in nanodiscs can be studied by solution NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 12060-12061.

Greiner, V.J., Shvadchak, V., Fritz, J., Arntz, Y., Didier, P., Frisch, B., Boudier, C., Mely, Y. & de Rocquigny, H., 2011: Characterization of the mechanism of HIV-1 Vpr(52-96) internalization in cells. *Biochimie* 93, 1647-1658.

Grinkova, Y.V., Denisov, I.G. & Sligar, S.G., 2010: Engineering extended membrane scaffold proteins for self-assembly of soluble nanoscale lipid bilayers. *Protein Engineering, Design & Selection* 23, 843-848.

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

Grzesiek, S. & Bax, A., 1993: Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J. Biomol. NMR* 3, 185-204.

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.

Güntert, P., 2004: Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.* 278, 353-378.

Guyader, M., Emerman, M., Montagnier, L. & Peden, K., 1989: VPX mutants in HIV-2 are infectious in established cell lines but display a severe defect in peripheral blood lymphocytes. *The EMBO Journal* 8, 1169-1175.

Hagn, F., Etzkorn, M., Raschle, T. & Wagner, G., 2013: Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 1919-1925.

Hänel, K., Möckel, L., Brummel, M., Peiris, K., Hartmann, R., Dingley, A.J., Willbold, D. & Loidl-Stahlhofen, A., 2014: Expression and purification of soluble HIV-2 viral protein R (Vpr) using sandwich-fusion protein strategy. *Protein Expression and Purification* 95, 156-161.

Hattori, N., Michaels, F., Fargnoli, K., Marcon, L., Gallo, R.C. & Franchini, G., 1990: The human immunodeficiency virus type 2 *vpr* gene is essential for the productive infection of human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8080-8084.

Herrmann, T., Güntert, P. & Wüthrich, K., 2002: Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* 319, 209-227.

Ikura, M., Kay, L.E. & Bax, A., 1990: A novel approach for sequential assignment ^1H , ^{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. *Nucleic Acids Res.* 9, 2989-2998.

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

Jenkins, Y., Pornillos, O., Rich, R.L., Myszka, D.G., Sundquist, W.I. & Malim, M.H., 2001: Biochemical analyses of the interaction between human immunodeficiency virus type 1 Vpr and p6^{Gag}. *J. Virol.* 75, 10537-10542.

Johnson, B.A. & Blevins, R.A., 1994: NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* 4, 603-614.

Kallick, D.A., Tessmer, M.R., Watts, C.R. & Li, C.-Y., 1995: The use of dodecylphosphocholine micelles in solution NMR. *J. Magn. Resonance Series B* 109, 60-65.

Kamiyama, T., Miura T. & T., Takeuchi, H., 2013: His-Trp cation- π interaction and its structural role in α -helical dimer of HIV-1 Vpr protein. *Biophysical Chemistry* 173-174, 8-14.

Kapust, R.B., Töszer, J., Copeland, T.D. & Waugh, D.S., 2002: The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294, 949-955.

Kay, L.E., Torchia, D.A. & Bax, A., 1989: Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: Application of Staphylococcal Nuclease. *Biochemistry* 28, 8972-8979.

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

Kewalramani, V.N., Park, C.S., Gallombardo, P.A. & Emerman, M., 1996: Protein stability influences human immunodeficiency virus type 2 Vpr virion incorporation and cell cycle effect. *Virology* 218, 326-334.

Kelly, S.M., Jess, T.J. & Price, N.C., 2005: How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751, 119-139.

Khamsri, B., Murao, F., Yoshida, A., Sakurai, A., Uchiyama, T., Shirai, H., Matsuo, Y., Fujita, M. & Adachi, A., 2006: Comparative study on the structure and cytopathogenic activity of HIV Vpr/Vpx proteins. *Microbes and Infections* 8, 10-15.

Kino, T. & Pavlakis, G.N., 2004: Partner molecules of accessory protein Vpr of the human immunodeficiency virus type 1. *DNA and Cell Biology* 23, 193-205.

Klammt, C., Maslennikov, I., Bayrhuber, M., Eichmann, C., Vajpai, N., Chiu, E.J.C., Blain, K.Y., Esquivies, L., Kwon, J.H.J., Balana, B., Pieper, U., Sali, A., Slesinger, P.A., Kwiatkowski, W., Riek, R. & Choe, S., 2012: Facile backbone structure determination of human membrane proteins by NMR spectroscopy. *Nature Methods*, 9, 834-839.

Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E.A. & Göttlinger, H.G., 1995: The p6^{gag} domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particle. *J. Virol.* 69, 2759-2764.

Kondo, E. & Göttlinger, H.G., 1996: A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6^{gag} required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 70, 159-164.

Korzhnev, D.M., Skrynnikov, N.R., Millet, O., Torchia, D.A. & Kay, L.E., 2002: An NMR experiment for the accurate measurement of heteronuclear spin-lock relaxation rates. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 10743-10753.

Kyte, J. & Doolittle, R. F., 1982: A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol* 157, 105-132.

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

Laguette, N., Bregnard, C., Benichou, S. & Basmaciogullari, S., 2010: Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Molecular Aspects of Medicine* 31, 418-433.

Laskowski, R.A., Rullmann, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R. & Thornton, J.M., 1996: AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* 8, 477-486.

Liang, B., Arora, A. & Tamm, L.K., 2010: Fast-time scale dynamics of outer membrane protein A by extended model-free analysis of NMR relaxation data. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 68-76.

Lipari, G. & Szabo, A., 1982: Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4546-4559.

Loria, J.P., Rance, M. & Palmer, A.G., 1999: A relaxation-compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence for characterizing exchange NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 2331-2332.

Lusso, P., 2006: Hiv and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J* 25, 447–56.

Macreadie, I.G., Arunagiri, C.K., Hewish, D.R., White, J.F. & Azad, A.A., 1996: Extracellular addition of a domain of HIV-1 Vpr containing the amino acid sequence motif H(S/F)RIG causes cell membrane permeabilization and death. *Molecular Microbiology* 19, 1185-1192.

Mootz, H.D., 2007: Protein-Spleißen durch Inteine – Fundgrube für proteinchemische Anwendungen. *Biospektrum* 13. Jahrgang, 02.07, 165-167.

Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P. & Roques, B.P., 2003: NMR structure of the HIV-1 regulatory protein Vpr. *J. Mol. Biol.* 327, 215-227.

Nath, A., Atkins, W.M. & Sligar, S.G., 2007: Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry* 46, 2059-2069.

Neudecker, P., Robustelli, P., Cavalli, A., Walsh, P., Lundström, P., Zarrine-Afsar, A., Sharpe, S., Vendruscolo, M. & Kay, L.E., 2012: Structure of an intermediate state in protein folding and aggregation. *Science* 336, 362-366.

Nilges, M., Clore, G.M. & Gronenborn, A.M., 1988: Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from random array of atoms. Circumventing problems associated with folding. *FEBS Lett.* 239, 129-136.

Noren, C.J., Wang, J. & Perler, F.B., 2000: Dissecting the chemistry of protein splicing and its applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 450-466.

Ohashi, R., Mu, H., Wang, X., Yao, Q. & Chen, C., 2005: Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM* 98, 845-856.

Perler, F.B., Davis, E.O., Dean, G.E., Gimble, F.S., Jack, W.E., Neff, N., Noren, C.J., Thorner, J. and Belfort, M., 1994: Protein splicing elements: inteins and exteins – a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Research* 22, 1125-1127.

Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. & Wüthrich, K., 1997: Attenuated T_2 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. USA* 94, 12366-12371.

Piller, S.C.; Ewart, G.D., Premkumar, A., Cox, G.B. & Gage, P.W., 1996: Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels in planar lipid bilayers. *Proc. Acad. Sci USA* 93, 111-115.

Piller, S.C., Jans, P., Gage, P.W. & Jans, D.A., 1998: Extracellular HIV-1 virus protein R causes a large inward current and cell death in cultured hippocampal neurons: Implications for AIDS pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4595-4600.

Piller, S.C., Ewart, G.D., Jans, D.A., Gage, P.W. & Cox, G.B., 1999: The amino-terminal region of Vpr from human immunodeficiency virus type 1 forms ion channels and kills neurons. *J. Virol.* 73, 4230-4238.

Piroozmand, A., Khamsri, B., Fujita, M., Adachi, A. & Uchiyama, T., 2006: Morphological study on the biological distinct vpr/vpr mutants of HIV-2. *The Journal of Medical Investigation* 53, 271-276.

Porath, J., Carlsson, J. Olsson, J. & Belfrage, G., 1975: Metal chelate affinity chromatographie, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.

Purcell, E., Torrey, H. & Pound, R., 1946: Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solids. *Phys. Rev.* 69, 37-38.

Raschle, T., Hiller, S., Yu, T.-Y., Rice, A.J., Walz, T. & Wagner, G., 2009: Structural and functional characterization of integral membrane protein VDAC-1 in lipid bilayer nanodiscs. *J. Am. Chem. Soc. USA* 131, 17777-17779.

RKI – Internetseite des Robert Koch Instituts – Ratgeber für Ärzte, März 2014: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HIV_AIDS.html

Salgado, G.F., Maraquant, R., Vogel, A., Alves, I.D., Feller, S.E., Morellet, N. & Bouaziz, S., 2009: Structural studies of HIV-1 gag p6ct and its interaction with Vpr determined by solution nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 48, 2355-2367.

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

- Sato, A., Igarashi, H., Adachi, A. & Hayami, M., 1990: Identification and localization of *vpr* gene product of human immunodeficiency virus type 1. *Virus Genes* 4, 303-312.
- Sattentau, Q.J. & Weiss, R.A., 1988: The CD4 antigen: physiologic ligand and HIV receptor. *Cell* 52, 631-633.
- Schuker, S., Hajduk, P., Meadows, R. & Fesik, S., 1996: Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* 274, 1531-1534.
- Schuler, W., Wecker, K., de Rocquigny, H., Baudat, Y., Sire, J. & Roques, B.P., 1999: NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions. *J. Mol. Biol.* 285, 2105-2117.
- Schwefel, D., Groom, H.C.T., Boucherit, V.C., Christodoulou, E., Walker, P.A., Stoye, J.P., Bishop, K.N. & Taylor, I.A., 2013: Structural basis of lentiviral subversion of a cellular protein degradation pathway. *Nature* 505, 234-238.
- Seddon, A.M., Curnow, P. & Booth, P.J., 2004: Membrane proteins, lipids and detergents: not just soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666, 105-117.
- Selig, L., Pages, J.-C., Tanchou, V., Preveral, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L.X., Darlix, J.-L., Benarous, R. & Benichou, S., 1999: Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins of primate lentiviruses. *J. Virol.* 73, 592-600.
- Shen, Y. & Bax, A., 2013: Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial networks. *J. Biomol. NMR* 56, 227-241.
- Singh, K.S., Möckel, L., Thiagarajan-Rosenkranz, P., Wittlich, M., Willbold, D. & Koenig, B.W., 2012: Mapping the interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 viral protein U and human CD4 with NMR spectroscopy. *FEBS journal* 279, 3705-3714.
- Singh, S.P., Tomkowicz, B., Lai, D., Cartas, M., Mahalingam, S., Kalyanaraman, S.V., Murali, R. & Srinivasan, A., 2000: Functional role of residues corresponding to helical domain II (amino acids 35 to 46) of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 74, 10650-10657.

- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. & Göttinger, H.G., 2003: AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689-699.
- Strebel, K., 2003: Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat and Rev. *AIDS* 17, 25-34.
- Strebel, K., Klimkait, T., Maldarelli, F. & Marint, M.A., 1989: Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *J. Virol.* 63, 3784-3791.
- Telenti, A., Southworth, M., Alcaide, F., Daugelat, S., Jacobs, W.R. Jr. and Perler, F.B., 1997: The microbacterium *xenopi* GyrA protein splicing element. *J. Bacteriol.* 179, 6378-6382.
- Thielmann, Y., Mohrlüder, J., Koenig, B.W., Stangler, T., Hartmann, R., Becker, K., Hölte, H.D. & Willbold, D., 2008: An indol-binding site is a major determinant of the ligand specificity of the GABA type A receptor-associated protein GABARAP. *ChemBioChem* 9, 1767-1775.
- Tjandra, N., Wingfield, P., Stahl, S. & Bax, A., 1996: Anisotropic rotational diffusion of predeuterated HIV protease from ^{15}N NMR relaxation measurements at two magnetic fields. *J. Biomol. NMR* 8, 273-284.
- Tollinger, M., Skrynnikov, N.R., Mulder, F.A., Forman-Kay, J.D. & Kay, L.E., 2001: Slow dynamics in folded and unfolded states of SH3 domain. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 11341-11352.
- Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A., Petrik, J. & Hill, F., 1990: Origin of Vpx in lentiviruses. *Nature* 347, 341-342.
- Trono, D., 1995: HIV accessory proteins: Leading roles for the supporting cast. *Cell* 82, 189-192.
- Ueno, F., Shiota, H., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Koyama, A.H., Akari, H., Adachi, A. & Fujita, M., 2003: Vpx and Vpr of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microbes and Infections* 5, 387-395.
- Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., & Laue, E. D., 2005: The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59, 687-96.

Wallin, E. & von Heijne, G., 1998: Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaen and eucaryotic organism. *Protein Sci.* 7, 1029-1038.

Wang, H., Meng, X.I., Xu, J.P., Wang, J., Wang, H. & Ma, C.W., 2012: Production, purification and characterization of cecropin from *Plutella xylostella* pxCCEA1, using intein-induced self-cleavable system in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1031-1039.

Warschawski, D.E., Arnold, A.A., Beaugrand, M., Gravel, A., Chartrand, E. & Marcotte, I., 2011: Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 1808, 1957-1974.

Wecker, K., Morellet, N., Bouaziz, S. & Roques, B.P., 2002: NMR structure of the HIV-1 regulatory protein Vpr in H₂O/trifluoroethanol. *Eur. J. Biochem.* 269, 3779-3788.

Wecker, K. & Roques, B.P., 1999: NMR structure of the (1-51) N-terminal domain of HIV-1 regulatory protein Vpr. *Eur. J. Biochem.* 266, 359-369.

Whitmore, L. & Wallace, B.A., 2004: DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy data. *Nucleic Acids Res.* 32, 667-668.

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

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

Wittlich, M., Koenig, B.W., Stoldt, M., Schmidt, H. & Willbold, D., 2009: NMR structural characterization of HIV-1 virus protein U cytoplasmic domain in the presence of dodecylphosphocholine micelles. *FEBS journal* 276, 6560-6575.

Wittlich, M., Thiagarajan, P., Koenig, B.W., Hartmann, R. & Willbold, D., 2010: NMR structure of the transmembrane and cytoplasmic domains of human CD4 in micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 122-127.

Yu, T.-Y., Raschle, T., Hiller, S. & Wagner, G., 2012: Solution NMR spectroscopic characterization of human VDAC-2 in detergent micelles and lipid bilayer nanodiscs. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1562-1569.

Zhang, C., Rasmussen, L.J. & Chang, L.J., 1997: Cell cycle inhibitory effects of HIV and SIV Vpr and Vpx in yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 230, 103-112.

Zhu, H., Jian, H. & Zhao, L.-J., 2004: Identification of the ¹⁵FRFG domain in HIV-1 Gag p6 essential for Vpr packaging into virion. *Retrovirology* 1, 26-30.

Zuiderweg, E.R.P., 2002: Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 41, 1-7.

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D, 3D	Ein-, Zwei-, Dreidimensional
A	Absorption
AcN-d ₃	deutiertes Acetonitril
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome (Erworbenes Immunschwächesyndrom)
APS	Ammoniumpersulfat
β -ME	β -Mercaptoethanol
B ₀	statisches Magnetfeld
B ₁	magnetisches Wechselfeld
CCR5	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CD4	human cluster determinant
cmc	critical micelle concentration (kritische Mizellekonzentration)
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CSP	Chemical Shift Perturbation
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DCAF1-CtD	C-terminale WD40 Domäne des DCAF1
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DPC	Dodecylphosphocholin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
gp	Glykoprotein
HDL	High density lipoprotein
HIV	human immunodeficiency virus (humanes Immundefizienz Virus)
HSQC	heteronuclear single quantum coherence (heteronukleare Einquantenkohärenz)
IMAC	immobilized-metal affinity chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K _D	Dissoziationskonstante
LB	lysogeny broth
M9-Medium	künstliches Minimalmedium zur Isotopenmarkierung von Protein
MTSL	(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- Δ 3-pyrroline-3-methyl) methanethiosulfonate
MWCO	molecular weight cutoff
MSP	membrane scaffold protein
MSP1D1	MSP mit komplett entfernter erster α -Helix
MSP1D1 Δ 5	MSP1D1 mit entfernter fünfter α -Helix

NaAc	Natrumacetat
NaPi	Natriumphosphat
Nef	negative factor (negativ Faktor)
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernmagnetische Resonanz)
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
p	Protein
PAGE	Polyacrylamidegelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PEG	Polyethylglycol
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine
ppm	parts per million
PRE	paramagnetic relaxation enhancement (paramagnetische Relaxationsverstärkung)
Rev	regulator of virion (Regulator der Expression viraler Proteine)
RT	Raumtemperatur
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
SAMHD1-CtD	C-terminaler Bereich des SAMDH1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
SL	Spin-Label
SV	Säulenvolumen
T	Tesla
Tat	transactivator of transcription (Trans-Aktivator der Transkription)
TEV	Tobacco Etch Virus
TFE	Trifluoroethanol
Tris	((N-(3-{2-[2-(3-Amino-propoxy)-ethoxy-]ethoxy}propyl)-succinamic acid
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
UV	Ultraviolett
Vif	viral infectivity factor (viraler Infektiösitätsfaktor)
Vpr	viral protein R (virales Protein R)
Vpr_C81S_	Einzel-Cystein-Variante von Vpr mit einem Serin an Sequenzposition 81 und einem
F39C	Phenylalanin and Sequenzposition 39
Vpx	viral protein X (virales Protein X)
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

ω_0

Lamorfrequenz

Publikationen und Posterpräsentation

Publikationen

1. Hänel, K.[#], **Möckel, L.**[#], Brummel, M., Peiris, K., Hartmann, R., Dingley, A.J., Willbold, D. & Loidl-Stahlhofen, A., 2014: Expression and purification of soluble HIV-2 viral protein R (Vpr) using a sandwich-fusion protein strategy. *Protein Expression and Purification* 95, 156-161.

[#] These authors contributed equally to this work.

2. Pavlidou, M., Hänel, K., **Möckel, L.** & Willbold, D., 2013: Nanodiscs allow phage display selection for ligands to non-linear epitopes on membrane proteins. *PLoS One* 9, e72272.

3. Do, H.Q., Wittlich, M., Glück, J.M., **Möckel, L.**, Willbold, D., Koenig, B.W. & Heise, H., 2013: Full-length Vpu und human CD4(372-433) in phospholipid bilayers as seen by magic angle spinning NMR. *Biol. Chem.* 394, 1453-1463.

4. Singh, K.S., **Möckel, L.**, Thiagarajan-Rosenkranz, P., Wittlich, M., Willbold, D. & Koenig, B.W., 2012: Mapping the interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 viral protein U and human CD4 with NMR spectroscopy. *FEBS journal* 279, 3705-3714.

Posterpräsentation

Möckel, L., Pavlidou, M., Thiagarajan-Rosenkranz, P., Stoldt, M., Hänel, K. & Willbold, D.: Structural characterisation of HIV-2 Viral Protein R.

54th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (ENC), April 14-19, 2013, Pacific Grove, USA.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Ausserdem danke ich ihm, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Auch für seine motivierende Art und seine Betreuung möchte ich mich bei ihm bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Karen Hänel die immer äusserst engagiert war und versuchte mir so gut wie möglich unter die Arme zu greifen. Sie war immer zur Stelle um etwaige Fragen und Probleme zu klären, wofür ich ihr auch danken möchte.

Dr. Bernd W. König gilt mein Dank für die Begutachtung meiner Dissertation und die immer offene Tür, um meine biophysikalischen Fragen zu beantworten.

Ausserdem gilt mein Dank Dr. Matthias Stoldt, der mir vor allem zu Beginn meiner Promotion bei der Aufnahme von NMR-Spektren half und mich in die NMR-Spektroskopie einweihte.

Ich möchte ganz besonders Christina Möller für ihre Geduld mit mir danken und ihre ausgesprochen große Hilfe bei den ganz nerdigen Angelegenheiten.

Thanks to Sameer K. Singh for all the drinking, which will continue every May...

Ich danke auch den Damen Alexandra Boeske, Claudia Börger und besonders Marina Pavlidou, sowie in wechselnder Besetzung Laura Kukuk und Silke Dornieden für die Kaffeepausen und vor allem für all diesen molekularbiologischen Kram!

Trotz der kurzen Zeit möchte ich meinem jetzigen Bürokollegen Kerstin Reiß und Justin Lecher für das Asyl danken.

Ausserdem danke ich Tuschi! Einfach weil er eben Tuschi ist!

Ich danke allen weiteren Mitarbeitern des ICS-6 für die schöne und angenehme Zeit im Labor.

Zuletzt möchte ich allen bisher nicht erwähnten für ihre Unterstützung danke, die das Gelingen dieser Arbeit erst möglich gemacht hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Datum, Ort

Unterschrift