

Strukturelle Untersuchung der Interaktion des humanen BST2 mit dem HIV-1 Virus-Protein-U

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung eines Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

CLAAS ROES

aus Bremerhaven

27. Januar 2015

Gedruckt mit der Genehmigung

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Koreferent: PD Dr. Bernd W. König

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2015

*Meinen Eltern,
meinen Freunden
und allen Wegbegleitern*

"... an die Stelle der Gottesliebe die Menschenliebe als einzige, wahre Religion, an Stelle des Gottesglaubens den Glauben des Menschen an sich, an seine Kraft, den Glauben, dass das Schicksal der Menschheit nicht von einem Wesen außer oder über ihr, sondern von sich selbst abhängt, dass der einzige Teufel des Menschen der Mensch, der böse, abergläubische, selbstsüchtige Mensch, dass aber auch der einzige Gott des Menschen der Mensch selbst ist."

Ludwig Feuerbach

Summary

The protein BST2 is part of the intrinsic immune defense of the human cell. It is localized at the cell membrane. It restricts the budding of retroviruses from infected cells. The protein tethers the virus particles to the cell membrane, thus preventing infection of other cells. BST2 is an important component of the human immune response against enveloped viruses. The human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) can circumvent this mechanism by using its Virus protein U (VpU). VpU binds BST2 and down regulates it from the cell surface.

The aim of this work is the structural characterization of the interaction between BST2 and VpU on a molecular level by using liquid-state NMR spectroscopy. VpU consists of an N-terminal transmembrane helix and a cytoplasmic domain. BST2 contains a short cytoplasmic region, a transmembrane helix, a helical extracellular domain and a C-terminal GPI-anchor. Full-length VpU and the N-terminal region of BST2 containing the cytoplasmic and the transmembrane domain (BST2_{tmcyt}) were used in the interaction study. An *E. coli*-based system for cell-free protein synthesis was established in the course of this work. This technique allows very efficient production and purification of the two membrane proteins in the presence of mild detergents. Isotope labeled amino acid mixtures ($U\text{-}^{15}\text{N}$, $U\text{-}^{13}\text{C}$ and/or $U\text{-}^2\text{H}$) were employed in the protein synthesis as needed. Different labeling patterns were used. Both membrane proteins were incorporated into dodecylphosphocholine (DPC) micelles in order to keep them in solution during the NMR measurements.

An almost complete backbone ^{13}C , ^{15}N and ^1H resonance assignment of BST2_{tmcyt} in DPC micelles was accomplished by using multi-dimensional NMR experiments. More than 70% of the backbone resonances were assigned for VpU. Secondary structure and backbone order parameters of both proteins in DPC micelles were derived from the experimental chemical shifts. Amino acids of both proteins involved with the interaction between VpU and BST2 were determined by titrating ^{15}N -labeled protein with the non-labeled interaction partner. In contrast to previous studies, discrete interaction sites

IV

were found not only in the transmembrane helices but also in the cytoplasmic domains of both proteins.

Zusammenfassung

Das humane BST2 ist ein Protein der intrinsischen Immunabwehr der Zelle und in der Zellmembran lokalisiert. BST2 verhindert die Freisetzung von Retroviren aus bereits infizierten Zellen. Neu gebildete Viruspartikel verbleiben an der Zelloberfläche, können keine weiteren Zellen infizieren und werden schließlich abgebaut. BST2 ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität des Menschen gegen behüllte Viren. Das Humane Immundefizienz-Virus Typ-1 (HIV-1) kann den BST2-basierten Schutzmechanismus umgehen. Verantwortlich dafür ist das HIV-1 Virus-Protein-U (VpU). VpU bindet BST2 und reguliert es von der Zelloberfläche herunter.

Das Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung der molekularen Wechselwirkung der Membranproteine BST2 und VpU mit Lösungs-NMR-Spektroskopie. VpU besteht aus einer N-terminalen Transmembranhelix und einer zytoplasmatischen Domäne. BST2 enthält einen kurzen zytoplasmatischen Bereich, eine Transmembranhelix, eine helikale extrazelluläre Region und einen C-terminalen GPI-Anker. Für die Interaktionsstudie wurde VpU voller Länge sowie der N-terminale Bereich des BST2 aus zytoplasmatischer und Transmembrandomäne (BST2tmcyt) rekombinant hergestellt. Dazu wurde im Zuge dieser Arbeit die *E. coli*-basierte zellfreie Proteinsynthese etabliert. Damit ließen sich die beiden Membranproteine sehr effizient in Anwesenheit milder Detergentien herstellen und reinigen. Die Synthese erfolgte bei Bedarf mit isotope markierten ($U\text{-}^{15}\text{N}$, $U\text{-}^{13}\text{C}$ bzw. $U\text{-}^2\text{H}$) Aminosäuren. Es wurden unterschiedliche Markierungsmuster der Zielproteine realisiert. Für die NMR Untersuchungen wurden die beiden Membranproteine in membransimulierende Mizellen aus dem zwitterionischen Detergens Dodecylphosphocholin (DPC) eingebracht und so in Lösung gehalten.

Mit Hilfe mehrdimensionaler NMR-Experimente erfolgte eine nahezu vollständige Zuordnung der ^{13}C , ^{15}N , und ^1H -Resonanzen des Proteinerückgrats von BST2tmcyt. Im Falle des VpU konnten mehr als 70% der entsprechenden Rückgratome zugeordnet werden. Auf Basis der experimentel-

len chemischen Verschiebungen wurde die Sekundärstruktur und Rückgrat-Ordnungsparameter beider Proteine in DPC-Mizellen ermittelt. Die an der VpU-BST2 Interaktion beteiligten Aminosäuren der beiden Proteine wurden in zwei Titrationen bestimmt, wobei jeweils ein ^{15}N -markiertes Protein mit dem unmarkierten Interaktionspartner titriert wurde. Diskrete Bindungsstellen wurden im Gegensatz zu früheren Arbeiten nicht nur in den Transmembranhelices, sondern auch in den zytoplasmatischen Domänen beider Proteine lokalisiert.

Inhaltsverzeichnis

Summary	III
Zusammenfassung	V
Inhaltsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Intrinsische Virusabwehr humaner Zellen	3
1.1.2 Das humane BST2	4
1.2 Das Humane Immundefizienz-Virus Typ-1	5
1.2.1 Aufbau des HIV-1	6
1.2.2 HIV-1 und dessen Auswirkung auf das Immunsystem	9
1.2.3 Therapieoptionen bei einer Infektion mit HIV	10
1.2.4 Das akzessorische Virus-Protein-U	11
1.3 Membranproteine	12
1.4 Strukturaufklärung von Proteinen	13
1.4.1 Methoden der Strukturaufklärung	13
1.4.2 NMR-Spektroskopie	15
1.4.2.1 Kerndrehimpuls und magnetisches Moment .	17
1.4.2.2 Kerne in einem statischen Magnetfeld	18
1.4.2.3 In der NMR-Spektroskopie verwendete Isotope	19
1.4.2.4 Grundlagen der NMR-Messung	20

1.4.2.5	Fourier-Transformation-NMR	21
1.4.2.6	Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie	22
1.4.3	NMR-Untersuchungen mittels Modellmembranen	24
1.5	Ziele dieser Arbeit	26
2	Material	29
2.1	Bakterienstämme	29
2.2	Plasmide	30
2.3	Oligonukleotide	31
2.4	Biochemikalien, Chemikalien und Kits	31
2.5	Enzyme, Proteine und Antikörper	33
2.6	Aminosäuren	34
2.7	Größenmarker	35
2.8	Geräte	36
2.9	Verbrauchsmaterial	37
2.10	Computerprogramme	38
3	Methoden	39
3.1	Plasmidisolierung	39
3.2	Sequenzierung	39
3.3	Bestimmung von DNA-, Detergenz- und Proteinkonzentrationen	40
3.3.1	UV-Vis-Spektroskopie	40
3.3.1.1	DNA-Konzentrationsbestimmung	40
3.3.1.2	Protein-Konzentrationsbestimmung	40
3.3.2	Infrarot-Spektroskopie	41
3.3.2.1	Detergens-Konzentrationsbestimmung	43
3.3.2.2	Protein-Konzentrationsbestimmung	43
3.4	DNA-Gelelektrophorese	43
3.5	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	45
3.6	Polymerasekettenreaktion	45
3.6.1	Kolonie-PCR	46
3.7	Klonierungstechniken	48
3.7.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	48

3.7.2	Ligation von DNA	49
3.8	Bakterienkultur	50
3.8.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	50
3.8.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	50
3.8.3	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	51
3.9	SDS-PAGE nach Laemmli	52
3.9.1	Gelelektrophorese	52
3.9.2	Herstellung von SDS-Gelen	54
3.9.3	Fixierung von SDS-Gelen	55
3.9.4	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	55
3.9.5	Silberfärbung	56
3.9.6	Western Blot	56
3.10	Proteinreinigungsverfahren	58
3.10.1	Affinitätschromatografie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	58
3.10.2	Größenausschlusschromatographie	59
3.10.3	Anionenaustauschchromatografie	59
3.11	Dünnschichtchromatografie	59
3.12	Expression von rekombinanten Proteinen	61
3.13	Zellfreie Synthese rekombinanter Proteine	62
3.13.1	<i>E. coli</i> basierte zellfreie Proteinsynthese	62
3.13.2	Aufbau der Reaktionskammern	63
3.13.3	Herstellung von S30-Zellextrakt	65
3.13.4	Herstellung von T7-RNA-Polymerase	67
3.13.5	Besonderheiten der Synthese von deuterierten Proteinen	70
3.14	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie	71
3.14.1	Präparation der NMR-Proben	71
3.14.2	Aufnahme und Prozessierung der NMR-Spektren	71
3.14.3	Resonanzzuordnung	74
3.14.4	Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen	75
3.14.5	Ableitung der Sekundärstruktur mit TALOS-N	77

4	Experimente und Ergebnisse	81
4.1	Das humane BST2tmcyt	82
4.1.1	Synthese und Reinigung des rekombinanten Proteins HIS-BST2tmcyt	82
4.1.1.1	Zellfreie Synthese des HIS-BST2tmcyt	82
4.1.1.2	Reinigung des HIS-BST2tmcyt	83
4.1.2	NMR-Spektroskopie an HIS-BST2tmcyt in DPC-Mizellen	87
4.1.2.1	2D NMR-Spektroskopie an HIS-BST2tmcyt	87
4.1.2.2	Sequenzielle Resonanzzuordnung	87
4.1.2.3	Sekundärstrukturanalyse mittels chemischer Verschiebungen	89
4.1.2.4	Sekundärstrukturanalyse mittels NOE	92
4.2	Das HIV-1 VpU	93
4.2.1	Synthese und Reinigung des rekombinanten Proteins VpU-HIS	93
4.2.1.1	Zellfreie Synthese des VpU-HIS	93
4.2.1.2	Reinigung des VpU-HIS	94
4.2.2	NMR-Spektroskopie VpU-HIS in DPC-Mizellen	97
4.2.2.1	Vergleich von deuteriertem mit protoniertem VpU-HIS	97
4.2.2.2	Sequenzielle Resonanzzuordnung	98
4.2.2.3	Sekundärstrukturanalyse mittels chemischer Verschiebungen	100
4.2.2.4	Abhängigkeit der chemischen Verschiebun- gen von der DPC-Konzentration	103
4.3	Interaktion von VpU-HIS mit HIS-BST2tmcyt	104
4.3.1	Lokalisierung der Bindestelle auf HIS-BST2tmcyt	106
4.3.2	Lokalisierung der Bindestelle auf VpU-HIS	106
4.3.3	Fusionsprotein BST2tmcyt-VpU-Rho	111
4.4	Nanodiscs mit geladenen Lipiden	113
4.4.1	Herstellung des Gerüstproteins MSP1D1	114

4.4.1.1	Expression im 1 l Kolben	115
4.4.1.2	Expression im 40 l Fermenter	115
4.4.1.3	Reinigung des MSP1D1	117
4.4.2	Herstellung der HIS-TEV-Protease	119
4.4.2.1	Expression der TEV-Protease in <i>E. coli</i>	119
4.4.2.2	Reinigung der TEV-Protease	120
4.4.2.3	Abspalten des His-Tags des MSP1D1	120
4.4.3	Herstellung von Nanodiscs	122
4.4.4	Untersuchung der Lipidzusammensetzung der geladenen Nanodiscs	126
4.4.4.1	Lipidisolierung aus Nanodiscs	126
4.4.4.2	Verifizierung der Lipidkomposition mittels Dünnschichtchromatographie	127
5	Diskussion	129
5.1	Das humane BST2tmyc	129
5.1.1	NMR-spektroskopische Experimente ermöglichten nahezu vollständige Zuordnung der Proteinrückgratresonanzen	130
5.1.2	Die Transmembrandomäne von BST2 konnte lokalisiert werden	130
5.2	Das HIV-1 VpU-HIS	132
5.2.1	Zellfreie Synthese von VpU-HIS lieferte ausreichende Proteinmengen für NMR-Messungen	132
5.2.2	Mehr als 70% der Proteinrückgratresonanzen des VpU-HIS wurden zugeordnet	133
5.2.3	Die NMR-Daten sind mit einer postulierten Transmembranhelix sowie einem strukturierten zytoplasmatischen Bereich des VpU im Einklang	134
5.3	Interaktion von HIS-BST2tmyc und VpU-HIS	138
5.3.1	Zytoplasmatische Domänen von VpU und BST2 sind an der Interaktion der beiden Proteine beteiligt	138

5.3.2	Fusionsprotein aus BST2tmcyt und VpU wurde entworfen und konnte synthetisiert werden.	140
5.4	Elektrostatisch geladene Nanodiscs	143
5.4.1	Erfolgreiche Herstellung elektrostatisch geladener Nanodiscs	143
5.5	Ausblick	143
6	Anhang	147
	Abkürzungsverzeichnis	149
	Abbildungsverzeichnis	153
	Tabellenverzeichnis	155
	Literaturverzeichnis	157
	Liste der chemischen Verschiebungen	175
6.1	BST2tmcyt	176
6.2	VpU	177
	Vektorkarten	180
	Danksagung	183
	Eidesstattliche Erklärung	185

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem dient zur Abwehr von äußeren als auch inneren Einflüssen, die im Körper Krankheiten auslösen können. Zu diesen Einflüssen gehören Mikroorganismen, Viren, Pilze als auch eukaryote Parasiten. Aber auch Krebszellen zählen dazu. Bei der Immunantwort unterscheidet man zwischen angeborener (adaptiver) Immunantwort und erworbener (spezifischer) Immunantwort. Die spezifische Immunantwort wird durch individuellen Kontakt mit Pathogenen im Laufe des Lebens erworben und kann in einigen Fällen dauerhaft sein. Das Immunsystem besteht u.a. aus einer Vielzahl verschiedener Immunzellen. Diese Immunzellen werden im Knochenmark aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Aus diesen entwickeln sich zunächst Vorläuferzellen mit eingeschränktem Potential. Die für das Immunsystem wichtigen Zellen sind die myeloide Vorläuferzelle und die allgemeine lymphatische Vorläuferzelle.

Aus den myeloiden Vorläuferzellen gehen die Zellen der adaptiven Immunität hervor. Hierzu gehören die Monozyten und die Granulozyten. Die Monozyten zirkulieren im Blut. Dabei differenzieren sie sich zu Makrophagen, welche ins Gewebe einwandern können. Dort sind sie in der Lage,

Mikroorganismen oder auch apoptotische Zellen aufzunehmen und intrazellulär zu verdauen. Dabei unterscheiden sie nicht zwischen ihnen bereits bekannten und unbekanntem Mikroorganismen. Wenn Makrophagen Mikroorganismen aufnehmen, setzen sie Zytokine frei, die zur Gefäßerweiterung führen. Dadurch können andere Immunzellen in das von z.B. Bakterien befallene Gewebe eindringen. Die Gefäßerweiterung verursacht aber auch eine lokale Schwellung und Entzündung. Von den Granulozyten gibt es drei Arten: Die eosinophilen Zellen spielen bei der Abwehr von Parasiten eine wichtige Rolle. Die basophilen Zellen dienen zum Schutz der Schleimhäute. Die neutrophilen Zellen sind neben den Makrophagen eine weitere phagozytische Zellform. Aus allgemeinen lymphatischen Vorläuferzellen gehen die Lymphozyten hervor. Die beiden Hauptgruppen der Lymphozyten sind die B-Lymphozyten und die T-Lymphozyten. B-Lymphozyten nehmen Antigene durch Endozytose auf, die über den B-Zell-Rezeptor vermittelt wird. So aufgenommene Antigene werden über den MHC (engl.: major histocompatibility complex)-Klasse-II-Rezeptor auf der Oberfläche des B-Lymphozyten präsentiert. T-Lymphozyten, die den Rezeptor CD4 (engl.: cluster of differentiation 4) tragen, können den MHC-Klasse-II-Rezeptor mit Hilfe des T-Zellrezeptors erkennen. Durch die Ausschüttung von Zytokinen aktiviert der T-Lymphozyt den B-Lymphozyten. Aktivierte B-Lymphozyten vermehren sich und bilden entweder B-Gedächtniszellen oder B-Plasmazellen. B-Gedächtniszellen sind sehr langlebig und sorgen bei einer erneuten Infektion des Erregers für eine schnelle Immunantwort. Eine B-Plasmazelle wird Antikörper in die Umgebung sezernieren, die das Antigen binden, welches zuvor präsentiert wurde. Die durch den T-Lymphozyten ausgeschütteten Zytokine locken außerdem zytotoxische T-Lymphozyten an. T-Lymphozyten, die den Rezeptor CD8 (engl.: cluster of differentiation 8) tragen, dienen als solche zytotoxischen Zellen. Diese können die von den infizierten Körperzellen mittels des MHC-Klasse-I-Rezeptor präsentierten Antigene erkennen und leiten in diesen Zellen den programmierten Zelltod ein.

1.1.1 Intrinsische Virusabwehr humaner Zellen

Kommt es bei einer Zelle zu einer Infektion durch ein Virus, so verfügt sie über Abwehrmechanismen, um dieser Infektion entgegenzuwirken. Diese können entweder die Vermehrung des Virus verhindern und so die Infektion weiterer Zellen vermeiden, oder auch das Virus gänzlich entfernen. Zu diesen Mechanismen gehört die Autophagie [65]. Dabei wird ein Virion dem lysosomalen Abbau zugeführt, indem es im Zytoplasma von einem Vesikel umschlossen und zum Lysosom geleitet wird. Allerdings sind einige Viren dazu fähig, diesen Prozess zu umgehen. Dies gilt u.a. für das Herpesvirus (HSV-1) [94] und für HIV-1 (Humanes Immundefizienz-Virus Typ-1) [158]. Ein Mechanismus, um einen Virus an der Replikation zu hindern, basiert auf kleinen RNA-Fragmenten. Diese können in den Prozess der Transkription eingreifen und sind unter der Bezeichnung siRNAs (engl.: small interfering RNA; kleine eingreifende RNA) bekannt [75]. Dabei wird virale dsRNA insbesondere durch die zelleigene RNase Typ III Dicer zerlegt und bindet zusammen mit einem Enzymkomplex (RISC; engl.: RNA-induced silencing complex) an komplementäre virale mRNA. Die mRNA wird durch diesen zerlegt und kann somit nicht mehr abgelesen werden [35].

Die Proteine der APOBEC3 (engl.: apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3) Gruppe bilden einen dritten Mechanismus und setzen innerhalb des Virions direkt am Genom von Retroviren an. Sie werden bei der Assemblierung des Virus in der Wirtszelle mit in das Virion geschleust. Dort mutierten sie das virale Genom, wodurch sich das Virus unter Umständen nicht mehr vermehren kann. So dient z.B. das Protein APOBEC3G zur Abwehr von HIV und SIV [117]. Bei APOBEC3G handelt es sich um eine Cytidineaminase. Diese mutiert Cytidine des HIV-Genoms zu Uracil [47, 76]. APOBEC3G wird u.a. in Leukozyten und T-Lymphozyten expremiert [117]. Das Protein TRIM5 α (engl.: tripartite motif-containing protein 5 alpha) setzt hingegen am Kapsid von Retroviren an und verhindert die Freisetzung der Virusproteine in das Zytoplasma. Dadurch kann die reverse Transkriptase das RNA-Genom der Viren nicht in DNA umschreiben, wodurch eine Replikation dieser Viren unterbunden wird [133]. Das Kapsid wird stattdes-

sen zerstört und degradiert [134]. Das Protein SAMHD1 (engl.: sterile alpha motif- and HD-domain containing protein 1) hat einen indirekten antiviralen Effekt [51]. Es reduziert die intrazelluläre Nukleotidkonzentration und inhibiert so die reverse Transkription des RNA-Genoms der Retroviren [68]. Ein weiteres Protein der intrinsischen Virusabwehr von humanen Zellen ist das BST2 (Kapitel 1.1.2).

1.1.2 Das humane BST2

Das BST2 (Tetherin, CD317, HM1.24) ist ein antiviraler Restriktionsfaktor in humanen Zellen. Es hat eine molare Masse von etwa 19.8 kDa bei 180 Aminosäuren. Es besteht aus einem zytoplasmatischen Teil von 21 Aminosäuren, einer Transmembranhelix aus ca. 25 Aminosäuren und einem extrazellulären Teil aus 134 Aminosäuren, welcher eine Helix ausbildet. Zusätzlich wird das Protein posttranslational mit einem Glykosylphosphatidylinositol- (GPI) Anker versehen [90] (Abb.: 1.1). Die Produktion des BST2 wird es über Interferone (INF) des Typ-1 induziert. [90, 139]. Dieser Vorgang wird z.B. bei einer HIV-Infektion durch das Binden des Virions an den CD4-Rezeptor und die anschließende Endozytose ausgelöst. Die Virus-RNA bindet an die Toll-ähnlichen Rezeptoren 7 und 9, was die Produktion von INF- α und INF- β induziert. Das INF wird von der Zelle ausgeschüttet und löst in Zellen über den JAK/STAT-Signalweg die Produktion von BST2 aus. Über den Golgi-Apparat gelangt BST2 in die Membran der Zelle. Hier ist es dazu in der Lage, umhüllte Viren, wie Retroviren [38, 45, 90], Filoviren [56, 107] und Herpesviren [77], am Knospen von der Zelloberfläche zu hindern [136]. Dies könnte durch gleichzeitiges Verankern je einer Transmembrandomäne (der Transmembranhelix bzw. des GIP-Ankers) des BST2 in der Zellmembran und in der Virusmembran realisiert werden [46]. Es gibt Befunde die zeigen, dass BST2 auf diese Weise auch Virionen aneinanderketten kann [46]. Dies impliziert, dass es unwichtig ist, welche der Transmembrandomänen (Transmembranhelix oder GPI-Anker) in der Membran des Virus bzw. der Zellmembran verankert ist. An der Zellmembran festgehaltene Viren können

keine weiteren Zellen infizieren. Sie werden von der Zelle durch Endozytose internalisiert und lysosomal degradiert [28, 53, 111]. Homologe des BST2 aus Primaten [55, 83], Mäusen und Ratten [39] sind hierzu ebenfalls fähig. Einige Viren sind dazu in der Lage, diesen Mechanismus zu umgehen. So ist es dem HIV-1 mittels seines Proteins Virus-Protein-U (VpU) und dem Humanen Herpesvirus Typ-8 (HHV-8) mittels seines Proteins K5 möglich, den Abbau des BST2 einzuleiten und dieses so von der Zelloberfläche herunterzuregulieren [77, 90, 96].



Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des humanen BST2. Die Aminosäuren 1-21 befinden sich innerhalb der Zelle im Zytoplasma. In grün dargestellt ist die Transmembranhelix bestehend aus den Aminosäuren 22-47. Im extrazellulären Bereich, Aminosäuren 47 bis 179, befindet sich eine ausgedehnte Helix. In rot dargestellt ist der posttranslational angebrachte GPI-Anker.

1.2 Das Humane Immundefizienz-Virus Typ-1

Das HI-Virus löst die Krankheit AIDS (engl.: acquired immunodeficiency syndrome; erworbenes Immunschwäche-Syndrom) aus. Wobei hierbei zwischen der Infektion mit HIV und dem Ausbruch von AIDS unterschieden werden muss. Im Juni des Jahres 1981 berichtete Michael Gottlieb von der University of California Los Angeles als erster von einem ungewöhnlichen Krankheitsbild bei fünf jungen, sonst scheinbar gesunden, schwulen Männern. Es traten Pilzinfektionen und Lungenentzündungen auf, die auf einen Zusammenbruch des Immunsystems hinwiesen. Nach dieser ersten Beschreibung der Krankheit wurde diese im Jahr 1983 gleichzeitig von der Arbeitsgruppe Luc Montagnier vom Pasteur-Institut in Paris und von Robert Gallo, dem Leiter des Tumor-Labors am NIH (Nationale Institute für Gesundheitsforschung der USA; engl.: National Institutes of Health), als virale Infektion identifi-

ziert. Da das Virus zuerst aus humanen T-Zellen isoliert, wurde das Virus HTLV III (engl.: human T-cell leukemia virus; Humanes T-Zell-Leukämie-Virus) genannt. Später deuteten jedoch signifikante Sequenzunterschiede zu anderen HTLV-Typen darauf hin, dass es sich um eine neue Spezies handelte. Dies führte zur Umbenennung in HIV. Im Jahr 1988 wurde in Afrika eine weitere Variante des HI-Virus entdeckt und HIV-2 genannt. Der Ursprung des Virus wird in Afrika vermutet. Das dort seit Jahrtausenden in Affen vorkommende SIV (Simiane Immundefizienz-Virus) gilt als Ursprung des HIV. Wobei HIV-1 und HIV-2 jeweils von zwei verschiedenen Arten des SIV abstammen. Als wahrscheinlichste Übertragungsart gilt der Verzehr von so genanntem Bushmeat, also dem Fleisch von erjagten Affen, und dem Kontakt mit deren Blut. Die auch heute noch unheilbare Krankheit AIDS ist, trotz großer Fortschritte im Bereich Vorbeugung und Behandlung, vor allem in Schwarzafrika und Osteuropa auf dem Vormarsch. Übertragen wird das Virus bei dem Kontakt mit Körperflüssigkeiten infizierter Personen. Dazu zählen Blut, Sperma, Vaginalsekret und Muttermilch. Eindringen kann das HI-Virus durch Schleimhäute wie Bindehaut, Mund-, Nasen-, Vaginal- und Analschleimhaut [48, 108]. Aber auch offene Wunden bieten eine Möglichkeit der Übertragung. Der ungeschützte Geschlechtsverkehr ist der häufigste Übertragungsweg. Daher ist, neben Armut und Unwissenheit der Bevölkerung, vor allem die Ablehnung von Kondomen, die den Kontakt mit Sperma minimieren würden, ein Grund für die fortschreitende Verbreitung von HIV-1. Diese Ablehnung von Kondomen beruht zum einen auf religiösen und zum anderen auf persönlichen Gründen. Auch die Angst vor Stigmatisierung und Ausgrenzung, welche HIV-Infizierte daran hindert sich in Behandlung zu begeben, führt zu weiteren Ansteckungen.

1.2.1 Aufbau des HIV-1

Das HIV gehört zur Familie der Retroviridae (Retroviren), der Unterfamilie Orthoretrovirinae und der Gattung Lentiviren. Diese Gattung definiert sich durch ein (+)ssRNA-Genom und eine Virushülle, welche aus der Zellmem-

bran der Wirtszelle hervorgegangen ist. Lentiviren sind in der Lage, nicht teilungsaktive Zellen zu infizieren. Dies unterscheidet sie von anderen Retroviren. Sie verfügen alle über die drei Hauptgene *gag*, *pol* und *env*, welche in der Reihenfolge 3'-*gag-pol-env*-5' angeordnet sind. Das Genom des HIV-1 ist in Abbildung 1.3 zu sehen. Auf dem *gag* ist das Matrixprotein p17, das Protein p24, aus dem sich das Kapsid aufbaut, und das Protein p7 des Nukleokapsids kodiert. Auf dem *pol* ist die Protease p11, die reverse Transkriptase p66/p51 und die Integrase p31 kodiert. *env* beinhaltet das Oberflächen-Glykoprotein gp120 und das Transmembran-Glykoprotein gp41. Zusätzlich verfügt das HIV-1 noch über die akzessorischen Gene *tat*, *rev*, *vpu*, *vif*, *vpr* und *nef*. Das Gen *tat* (engl.: trans-aktivator of transcription) kodiert für das Protein Tat, welches die Phosphorylierung verschiedener Proteine der Wirtszelle koordiniert und dadurch die Transkription von HIV Genen erhöht [63]. Das durch das Gen *rev* (engl.: regulator of expression of virion proteins) kodierte Protein reichert sich im Zellkern an, und sorgt durch eine Bindung an virale Boten-RNA (mRNA; engl.: messenger RNA) dafür, dass diese bevorzugt aus dem Zellkern geschleust wird. Dies sorgt für eine erhöhte Produktion von viralen Proteinen [130]. Das Gen *vpu* kodiert für ein Protein, welches den Eintritt des Virions in die sowie seinen Austritt aus der Wirtszelle positiv beeinflusst. Auf die genauen Mechanismen wird in Kapitel 1.2.4 eingegangen. Das *vif* Gen (engl.: viral infectivity factor) kodiert für das Virusprotein Vif. In der Wirtszelle bindet es an die Cullin5 E3 Ubiquitin Ligase [127]. Mit dieser leitet Vif den Abbau von APOBEC3G ein. [117]. Das Virus-Protein R, das auf dem Gen *vpr* kodiert ist, hat verschiedene Aufgaben. Das Protein unterstützt die reverse Transkriptase bei der korrekten Übersetzung des Virus-RNA-Genoms in DNA. Es unterstützt den Präintegrationskomplex beim Eindringen in den Zellkern der Wirtszelle, greift in den Zellzyklus bis hin zur Apoptose ein und reguliert sowohl die Transaktivierung der LTRs (engl.: long terminal repeat) als auch verschiedene Wirtsgene [69]. Bei einem LTR handelt es sich um eine DNA-Wiederholungseinheit, die bestimmte Gene flankiert und sie dazu befähigt, aus dem Genom herausgeschnitten und wieder reintegriert zu werden. Dieser Vorgang wird als Transposition bezeichnet. Das Protein Nef,

welches durch das Gen *nef* (engl.: negative factor) kodiert wird, sorgt nach erfolgter Infektion einer Wirtszelle dafür, dass CD4 herabreguliert wird, um eine Superinfektion durch HI-Viren zu verhindern. Eine solche Superinfektion wäre für das Virus kontraproduktiv, da eine gegebene Zahl von Viren in diesem Fall potentiell weniger Zellen infizieren würden [20].

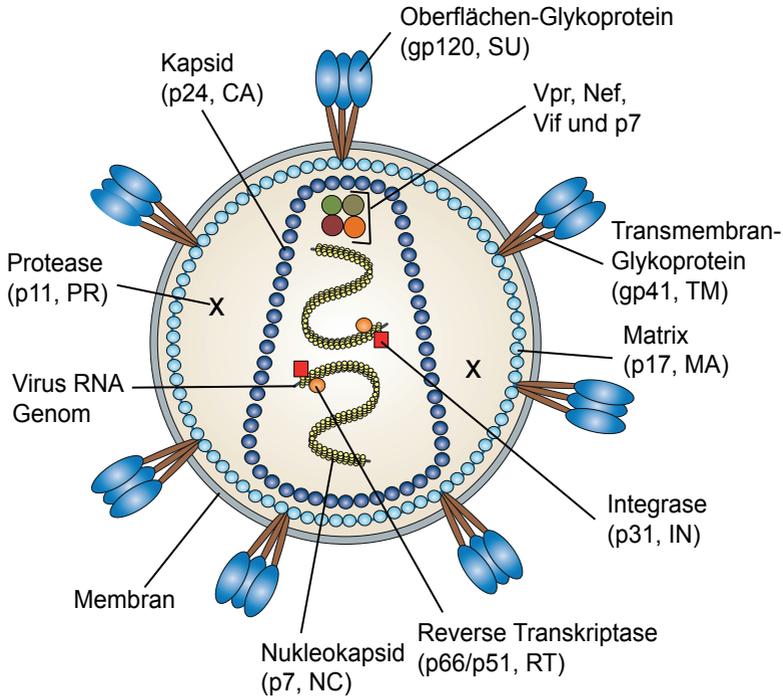


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines HIV-1 Virions. Die Hülle besteht aus dem Oberflächen-Glykoprotein gp120 und dem Transmembran-Glykoprotein gp41 in einer Membran, welche von der Wirtszelle stammt in der das Virion gebildet wurde. Diese Membranhülle des Virus wird an der Innenseite von den Matrixproteinen p17 gestützt. In doppelter Kopie liegt das (+)ssRNA-Genom des Virus im Nukleokapsid vor. Zusammen mit Integrase, reverser Transkriptase, Vpr, Vif, Nef und p7 liegt das Nukleokapsid innerhalb des Kapsids. Zusätzlich findet sich die virale Protease im Bereich zwischen Kapsid und Matrix. (Verändert nach Karlsson Hedestam et al. (2002) [59])

Das freie Virion selbst ist von einer Membranhülle umgeben und hat einen

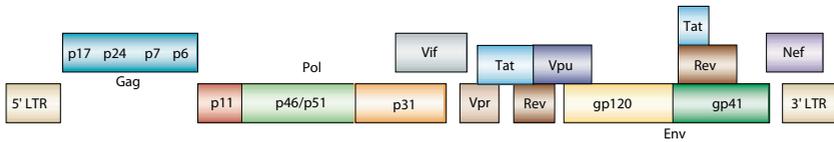


Abbildung 1.3: Diese schematische Abbildung stellt das Genom des HIV-1 dar. Es zeigt die neun offenen Leseraster für die Proteine Gag, Env, Pol, Tat, Rev, Vif, Vpr, VpU und Nef. Zudem sind drei verschiedene, sich überlappende Leseraster angedeutet. Auch die für Viren typischen LTRs am 5'- und 3'-Ende sind gezeigt. Diese dienen zur Integration der viralen-DNA in das Wirtsgenom. Zusätzlich haben sie regulatorische Aufgaben. (Verändert nach Robinson et al. (2002) [105])

Durchmesser von ca. 120 nm (Abb.: 1.2). Durchbrochen wird diese Membranhülle von Proteinstrukturen, die aus gp120 und gp41 bestehen, welche die äußeren Charakteristika des HIV-1 Virions bestimmen [59]. Gleich unter dieser Membran liegt die Matrix des Partikels. Diese besteht aus dem Protein p17. Innerhalb der Matrix liegt das Kapsid, welches seinerseits aus dem Protein p24 aufgebaut ist. Innerhalb des Kapsids befinden sich die Proteine Vpr, Vif, Nef, p7, Integrase und die reverse Transkriptase. Zusätzlich befinden sich zwei Kopien des (+)ssRNA Genom des Virus innerhalb des Kapsids. Das Genom wird zusätzlich durch das Nukleokapsid umhüllt, das aus dem Protein p7 besteht.

1.2.2 HIV-1 und dessen Auswirkung auf das Immunsystem

Das HI-Virus infiziert Zellen, die an ihrer Oberfläche den Rezeptor CD4 tragen. Hierzu gehören vorrangig die T-Lymphozyten, aber auch andere Zellen des Immunsystem wie Makrophagen. Dabei bindet das Virusprotein gp120 an den CD4-Rezeptor. Das gp120 unterläuft anschließend eine Konformationsänderung, wodurch es zu einer weiteren, für den Eintritt des Virus in die Zelle notwendigen, Bindung an einen der beiden Korezeptoren CCR5 (CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5) [1] oder CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4) [33] kommt. Die Bindung des Korezeptors löst eine zweite Änderung der Konformation des gp120 aus. Hierdurch wird es dem

gp41 ermöglicht, die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran zu veranlassen [16]. Nach dem Verschmelzen des Virus mit der Zelle wird das (+)ssRNA-Genom durch die reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Diese DNA wird über die enthaltenden LTRs mittels der viralen Integrase in das humane Genom eingebaut. Ein Teil der infizierten Zellen werden durch das sich darin vermehrende HIV zerstört. Bei einem weiteren Teil der infizierten Zellen wird der programmierte Zelltod, die Apoptose, ausgelöst. Zudem töten CD8-T-Lymphozyten die infizierten CD4-T-Lymphozyten. Sinkt die Anzahl der CD4-T-Lymphozyten unter einen kritischen Wert, so versagt die Immunabwehr und es kommt zur Infektion mit opportunistischen Erregern. Ab diesem Zeitpunkt spricht man von AIDS. Diese Krankheitsphase wird nach durchschnittlich zehn Jahren erreicht. Sie kann heutzutage jedoch durch medikamentöse Behandlung auf unbestimmte Zeit aufgeschoben werden. Typische Erkrankungen sind dabei die Gürtelrose, ausgelöst durch Herpes zoster [3], B-Zell-Lymphomen ausgelöst durch das Epstein-Barr-Virus (HHV4) [7], das Kaposi-Sarkom, welches häufig bei immungeschwächten Patienten durch das Humane Herpesvirus 8 (HHV8) ausgelöst wird [88] und Lungenentzündung [3], ausgelöst durch *Pneumocystis carinii*. Auch Tumore, die von einem gesunden Immunsystem durch die CD4-T-Lymphozyten inhibiert werden können, treten bei AIDS Patienten verstärkt auf. Es kommt nicht bei jedem Patienten zu den gleichen Erkrankungen. Opportunistische Infektionen führen jedoch in der Regel zum Tod der Infizierten.

1.2.3 Therapieoptionen bei einer Infektion mit HIV

Die Heilung von HIV-Patienten ist derzeit noch nicht möglich. Das HI-Virus kann bisher nur unter Kontrolle gehalten werden. Die Behandlung besteht aus einer Kombinationstherapie. Diese Kombinationstherapie soll virale Prozesse stören und die intrinsischen Abwehrmechanismen wieder aktivieren und unterstützen. Zu den eingesetzten Medikamenten gehören Eintrittsinhibitoren, welche den Rezeptor CD4 und die Korezeptoren CCR5 und CXCR4 blockieren und so gp120 daran hindern, an die Wirtszelle zu binden.

Außerdem kommen NRTI (Nukleosidische bzw. Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren) zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um Nukleotide bzw. Nukleoside, die den humanen ähneln, jedoch bei Einbau in die neu synthetisierte virale DNA durch die reverse Transkriptase p66/p51 zum Abbruch der Transkription führen. Die Aktivität der reversen Transkriptase kann auch direkt durch den Einsatz von NNRTI (nicht-Nukleosidale Reverse-Transkriptase-Inhibitoren) gehemmt werden. Zudem lässt sich die Integrase p31 hemmen, um den Einbau der viralen DNA in das humane Genom zu verhindern. Ebenso kann die Protease p11 gehemmt werden, um das Schneiden der Virusproteine zu verhindern, damit sich keine neuen Virionen entwickeln können.

Trotz aller Fortschritte bei der Behandlung der HIV-Infektion kann das Virus, wenn es einmal in das Genom eines Menschen eingebaut ist, gegenwärtig nicht wieder vollständig aus dem Patienten entfernt werden. Infizierte Immunzellen die sich im Blut befinden, können mit Medikamenten beeinflusst werden. Ruhende CD4-T-Lymphozyten stellen jedoch ein Reservoir für HIV dar [14], aus dem das Virus immer wieder erneut reaktiviert werden kann, sobald die Therapie unterbrochen wird.

1.2.4 Das akzessorische Virus-Protein-U

Das HIV-1 VpU ist ein, je nach HIV-1 Isolat, um die 81 Aminosäuren langes Typ-1 Membranprotein [97]. Es verfügt über eine Transmembranhelix und je nach Veröffentlichung über zwei [78] oder drei [146] kleine α -Helices in der zytoplasmatischen Domäne (Abb.: 1.4) . VpU wird als akzessorisch bezeichnet, da es in der Zellkultur nicht notwendig für die Kultivierung von HIV-1 ist [138]. Dennoch ist es im Genom des HIV-1 hoch konserviert [12]. Eine Funktion des VpU ist die Herabregulierung von CD4. Die Bindung von CD4 an das Virusprotein gp120 ist für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle entscheidend. Um eine erneute Infektion der Wirtszelle mit HIV-1 zu verhindern, wird die Nachführung von CD4 zur Plasmamembran durch das VpU verhindert. Eine zusätzliche Funktion des VpU ist die Unterbindung der Bin-

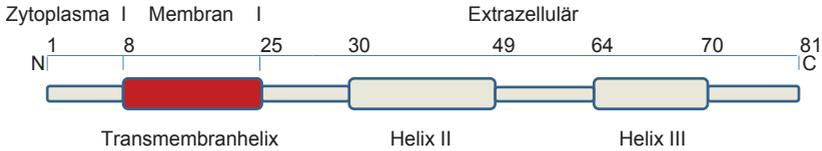


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des HIV-1 VpU. Das VpU hat einen 7 Aminosäuren großen extrazellulären Abschnitt. Aminosäuren 8-24 bilden eine, hier rot eingefärbte, Transmembranhelix. Der zytosplasmatische Bereich des Proteins besteht aus Aminosäure 25-81 [97,98]. Dieser Teil beinhaltet in Dodecylphosphocholin (DPC)-Mizellen zwei α -Helices von Aminosäure 30-48 und von Aminosäure 64-69 [151].

derung des CD4 an das gp160 Protein im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Das Glykoprotein gp160 ist der Vorläufer des gp120 und des gp41. Die proteasomale Degradation des CD4 wird bereits im ER durch die Bindung des VpU an CD4 initiiert [147]. Dadurch wird der Transport von gp120 an die Zelloberfläche ermöglicht. Eine weitere wichtige Funktion kommt dem VpU bei der Freisetzung von Virionen aus der Wirtszelle zu. In Anwesenheit von VpU wird die Virusproduktion von HIV-1 in der Zelle verstärkt [131,132,137]. Hierbei spielt die Interaktion von VpU mit dem humanen Protein BST2 eine wichtige Rolle. Das Typ-II Membranprotein BST2 wird von VpU mittels Helix-Helix Interaktion in der Membran gebunden [5, 123] und dem lysosomalen Abbau zugeführt [2]. Hierdurch können die Virionen die Wirtszelle ungehindert verlassen. In Abwesenheit von VpU konnte gezeigt werden, dass BST2 die Virionen an der Zelle festhält und diese sich daher dort anreichern, was zum Tod der Wirtszelle führen kann. Abschließend ist eine vermutete Ionenkanal-Aktivität des VpU zu erwähnen [29, 113].

1.3 Membranproteine

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Proteinen handelt es sich um Membranproteine. Membranproteine übernehmen verschiedenste Aufgaben. Transportproteine transportieren Stoffe, die die Membran nicht von sich aus passieren können, von einer Seite der Membran auf die andere. Andere Membran-

proteine verankern Makromoleküle an der Membran. Wieder andere dienen als Rezeptoren bzw. geben chemische und physikalische Signale aus der extrazellulären Umgebung an das Zellinnere weiter. Ebenso können Membranproteine eine Enzymaktivität besitzen [71]. Basierend auf genomischen Daten repräsentieren Membranproteine 25% der im Genom höherer Tiere kodierten Proteine [144]. Verschiedene Arten von Membranen haben unterschiedliche Membranproteinzusammensetzungen. Diese variiert je nach Aufgabe der Membran in der Zelle. Membranproteine können auf unterschiedliche Art in der Membran verankert sein (Abb.: 1.5). Transmembranproteine durchdringen die Membran ein- oder mehrfach. Bei diesen Transmembrandomänen handelt es sich zumeist um eine α -Helix. β -Faltblatt-Strukturen, meist in Form eines β -Fasses angeordnet, sind jedoch auch möglich. Membranproteine besitzen hydrophile als auch hydrophobe Bereiche. Hydrophobe Bereiche liegen zumeist innerhalb der Membran, hydrophile Bereiche außerhalb. Andere Membranproteine durchdringen die Membran nicht. Diese sind entweder durch eine amphipathische α -Helix oder durch kovalent an das Membranprotein gebundene Fettsäureketten oder GPI-Anker in der Membran verankert. Letztgenannte Verankerungen können auch in Kombination mit einer Transmembrandomäne vorkommen.

1.4 Strukturaufklärung von Proteinen

1.4.1 Methoden der Strukturaufklärung

Bei der Aufklärung der dreidimensionalen (3D)-Strukturen von Proteinen kommen verschiedene Methoden zur Anwendung. Die drei dabei hauptsächlich benutzten Methoden sind die Röntgenkristallographie, die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR, engl.: nuclear magnetic resonance) und die 3D-Kryo-Elektronenmikroskopie. Bei der Röntgenkristallographie wird mit Hilfe von Röntgenstrahlung und deren Wechselwirkung mit den Elektronen im Proteinkristall eine Karte der Verteilung der Elektronendichte berechnet. Anhand dieser Daten kann die räumliche Struktur des Proteins mit

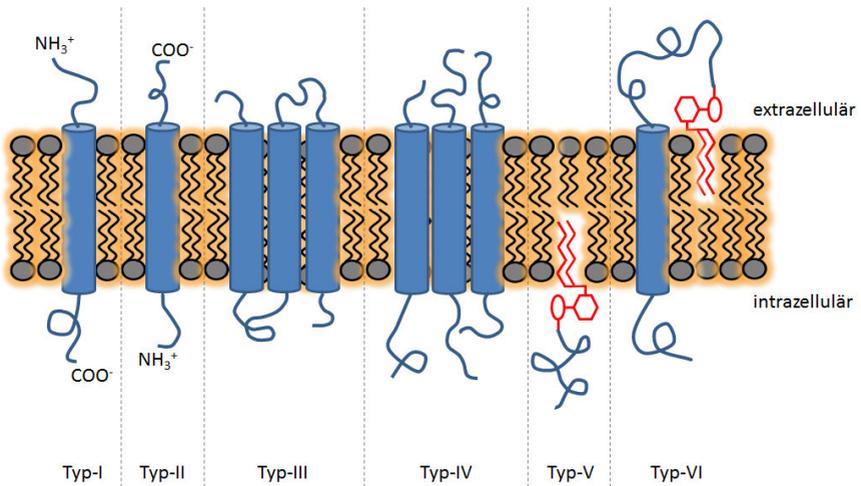


Abbildung 1.5: Die Abbildung zeigt die sechs verschiedenen Arten von Transmembranproteinen. Als **Typ-I** und **Typ-II** werden Proteine beschrieben, die eine einzelne Transmembranhelix besitzen. Die beiden Typen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Ausrichtung. Bei Typ-I liegt der N-Terminus extrazellulär und bei Typ-II der C-Terminus. **Typ-III** beschreibt ein Transmembranprotein mit mehreren Transmembrandomänen. Ein Proteinkomplex, der aus mehreren kleinen Transmembranproteinen zusammengesetzt ist, wird als **Typ-IV** bezeichnet. Der **Typ-V** ist mit einem Lipid-Anker (z.B. GPI, hier in rot) in der Membran verankert. Proteine die sowohl Transmembrandomänen als auch Lipid-Anker besitzen gehören zum **Typ-VI** (Verändert nach [110]).

atomarer Auflösung rekonstruiert werden [40]. Für die Aufnahme von Diffraktogrammen ist es nötig, dass die Proteine in einem regulärem Gitter (Kristall) vorliegen. Die NMR-Spektroskopie beruht auf den quantenmechanischen magnetischen Eigenschaften des Atomkerns. Sie eignet sich besonders für lösliche Proteine (Flüssigphasen-NMR-Spektroskopie) [135]. Aber auch die Strukturen membranständiger Proteine können mittels NMR aufgeklärt werden, meist mit Festphasen-NMR-Spektroskopie [25, 140]. Neben den beiden genannten Methoden wird auch die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, engl.: small angle x-ray scattering) zur Aufklärung von Proteinstrukturen verwendet. Mit SAXS lassen sich Aussagen über die mittlere Teilchengröße und deren Form machen. Auch Aussagen zur Elektronendichteverteilung in den gelösten Proteinen sind unter günstigen Umständen möglich [23]. SAXS beruht auf der Beugung von Röntgenstrahlen unter kleinen Winkeln. Die dritte wichtige Methode ist die 3D-Kryo-Elektronenmikroskopie. Hierbei werden Proteine oder Proteinkomplexe unter möglichst physiologischen Pufferbedingungen präpariert und dann in flüssigem Ethan (ca. $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$) schockgefroren. Von den so fixierten Molekülen werden mit einem Elektronenmikroskop mehrere hunderttausend Einzelbilder angefertigt. Diese Bilder entsprechen einer 2D-Projektion der Elektronendichte der untersuchten Moleküle. Aus den aufgenommenen 2D-Bildern wird eine 3D-Rekonstruktion der Struktur des Proteins bzw. des Komplexes berechnet. Diese Methode eignet sich vor allem für die Untersuchung von makromolekularen Komplexen mit zehn oder mehr Komponenten [30, 103], die aufgrund ihrer Größe und Flexibilität den oben erwähnten Methoden nicht zugänglich sind.

1.4.2 NMR-Spektroskopie

Die Entdeckung des Kerndrehimpulses durch Pauli [99], wie auch die sich daraus ergebende Möglichkeit, das magnetische Moment eines Atomkerns zu messen [102], waren erste Schritte in Richtung der NMR-Spektroskopie. Im Jahr 1946 gelang den Arbeitsgruppen Purcell, Torrey und Pound [101] sowie Bloch, Hansen und Packard [13] erstmals und unabhängig voneinander

der Nachweis von Kernresonanzsignalen fester und flüssiger Substanzen. Seither hat sich die NMR-Spektroskopie durch stetigen Wandel und eine Reihe bahnbrechender Neuerungen weiterentwickelt. Man unterscheidet heute zwei Hauptmethoden der NMR-Spektroskopie. Das ist zum einen die NMR-Spektroskopie unter semiphysiologischen Lösungsbedingungen [152] und zum anderen die Festkörper-NMR-Spektroskopie. Erstere Methode, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, eignet sich besonders für lösliche Proteine. Diese liegen unter nahezu physiologischen Bedingungen in Lösung vor, oder können für die Messung in Lösung gebracht werden, so dass im Idealfall die native und biologisch aktive 3D-Struktur dieser Proteine untersucht werden kann. Um Membranproteine mit Flüssig-NMR-Spektroskopie zu studieren, werden diese häufig durch artifizielle Modellmembranen (Kapitel: 1.4.3) in Lösung gehalten. Jedoch ist die Größe der zu untersuchenden Moleküle nach oben hin beschränkt. Diese Grenze liegt bei $[U-^{15}N, U-^{13}C]$ markierten löslichen Proteinen die mittels J-korrelierter 3D-Spektren gemessen werden bei bis zu 30 kDa. Durch zusätzliche partielle oder vollständige Deuterierung können Proteine von bis zu 60 kDa gemessen werden [62]. Unter günstigen Umständen können Proteine bis zu mehreren 100 kDa mit TROSY (engl.: transverse relaxation optimized spectroscopy)-Techniken untersucht werden. Hochaufgelöste Flüssig-NMR-Spektren erhält man nur dann, wenn die anisotropen Wechselwirkungen der Kernspins durch nahezu isotrope Bewegungen der Proteine weitgehend ausgemittelt werden. Die Eigenbewegung der Proteine wird durch die Rotationskorrelationszeit τ_C beschrieben. Diese charakterisiert die thermische Bewegung eines Proteins und steigt mit dem Molekulargewicht des Proteins oder Proteinkomplexes an. Je größer das Protein ist, desto langsamer rotiert es in der Probe. Mit zunehmender Rotationskorrelationszeit steigt die Linienbreite der NMR-Signale. Das bedeutet einen Verlust an spektraler Auflösung bis hin zum gänzlichen Verlust der NMR-Signale. Proteine, die für die NMR-Spektroskopie unter semiphysiologischen Lösungsbedingungen zu groß sind oder nicht in Lösung gehalten werden können, lassen sich mithilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie untersuchen.

Die NMR-Spektroskopie gestattet Aussagen zur atomar aufgelösten 3D-Struktur biologischer Makromoleküle, wie z.B. Proteine, Nukleinsäuren und Lipide. Zudem ist es möglich, Aussagen über dynamische Eigenschaften dieser Moleküle über einen weiten Bereich charakteristischer Zeiten, die von Pikosekunden zu Sekunden reichen, zu treffen. Schließlich kann die NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung der Wechselwirkung von Proteinen [37, 61, 95] und von Proteinen mit Liganden [122], wie auch zum Studium von Proteinfaltungsprozessen [26, 91] verwendet werden.

1.4.2.1 Kerndrehimpuls und magnetisches Moment

Ein Atomkern, bei dem es sich um ein quantenmechanisches Teilchen handelt, besitzt neben Masse und Ladung einen Drehimpuls (\vec{P}). Dieser wird auch Kernspin genannt und ist gequantelt. Der Betrag des Kerndrehimpulses (P) wird durch die Kernspinquantenzahl (I) bestimmt. Dabei tritt das Plancksche Wirkungsquantum (h) bzw. das reduzierte Plancksche Wirkungsquantum $\hbar = h/2\pi$ als Proportionalitätsfaktor in Erscheinung. Die Kernspinquantenzahl I kann nur halbzahlige oder ganzzahlige, nicht negative Werte annehmen:

$$P = \sqrt{I(I+1)} \cdot \hbar, \quad I \in \{0, 1/2, 1, 3/2, \dots\} \quad (1.1)$$

Der Kerndrehimpuls ist mit einer rotierenden elektrischen Ladung assoziiert, welche ein magnetisches Moment ($\vec{\mu}$) besitzt. Der Vektor des magnetischen Momentes ist mit dem Drehimpulsvektor über eine isotopenspezifische Proportionalitätskonstante, das gyromagnetische Verhältnis (γ), verknüpft:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{P} \quad (1.2)$$

Das gyromagnetische Verhältnis eines Kerns steht mit dessen Nachweisempfindlichkeit bei der NMR-Spektroskopie in Zusammenhang. Je größer der

Betrag von γ , desto empfindlicher der Atomkern und umgekehrt. Atomkerne mit der Kernspinquantenzahl $I = 0$ verfügen über keinen Drehimpuls. Daher besitzen sie auch kein magnetisches Moment und können in der NMR-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden.

1.4.2.2 Kerne in einem statischen Magnetfeld

Wirkt ein Magnetfeld (\vec{B}_0) in z-Richtung des ortsfesten kartesischen Koordinatensystems auf einen Kern mit dem Drehimpuls \vec{P} und einem magnetischen Moment $\vec{\mu}$, so ist die Komponente des Drehimpulses in der Feldrichtung (P_z) gequantelt:

$$P_z = m \cdot \hbar, \quad m = -I, -I + 1, \dots, I \quad (1.3)$$

Für die magnetische Quantenzahl (m) ergeben sich $2I + 1$ mögliche Werte und damit ebenso viele Orientierungsmöglichkeiten von Drehimpuls bzw. magnetischem Moment relativ zu \vec{B}_0 . Das bedeutet, für ein Proton mit einer Kernspinquantenzahl von $I = 1/2$ ergeben sich die magnetischen Quantenzahlen $m = +1/2$ und $m = -1/2$ und folglich zwei Orientierungsmöglichkeiten des magnetischen Dipolmomentes $\vec{\mu}$ mit $\mu_z = \pm \frac{1}{2} \gamma \hbar$. Im Magnetfeld \vec{B}_0 wirkt auf das magnetische Dipolmoment $\vec{\mu}$ das Drehmoment \vec{M} mit:

$$\vec{M} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad (1.4)$$

Dieses Drehmoment verursacht eine Präzessionsbewegung des magnetischen Momentes $\vec{\mu}$, um die Magnetfeldrichtung mit der Larmorfrequenz ν_L :

$$\nu_L = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_0 \quad (1.5)$$

Durch die Wechselwirkung des gequantelten magnetisches Dipolmomentes $\vec{\mu}_z$ mit dem Magnetfeld \vec{B}_0 ergeben sich diskrete Energieniveaus des Kernspins:

$$E = -\mu_z \cdot B_0 \quad (1.6)$$

Somit ergeben sich für einen Atomkern mit $2I+1$ Orientierungsmöglichkeiten des Drehimpulses auch $2I+1$ Energieniveaus. Folglich erhält man z.B. für ein Proton mit den magnetischen Quantenzahlen $m = +1/2$ und $m = -1/2$ zwei Energieniveaus. Die z-Komponente des magnetischen Momentes des Protons steht dabei entweder parallel (Zustand α , energetisch günstig) oder antiparallel (Zustand β , energetisch ungünstig) zum Magnetfeld \vec{B}_0 . Im thermodynamischen Gleichgewichtszustand verteilen sich die Kerne auf die beiden möglichen Energieniveaus $E(\alpha)$ und $E(\beta)$. Die Besetzungszahlen der beiden Energieniveaus (N_α und N_β) hängen von der Temperatur (T) ab und können durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben werden:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/k_B T} \quad (1.7)$$

Im Vergleich zu dem Energieunterschied $\Delta E = E(\beta) - E(\alpha)$ der beiden Zustände ist die Energie der Wärmebewegung der Atome $k_B T$ sehr groß. Dies führt dazu, dass die Besetzungszahlen der beiden Energieniveaus nahezu identisch sind. Es gibt lediglich einen geringfügigen Besetzungsüberschuss auf dem energetisch günstigeren Niveau α , der zu einer messbaren Magnetisierung (\vec{M}_0) in Feldrichtung führt.

1.4.2.3 In der NMR-Spektroskopie verwendete Isotope

Die am häufigsten in biologischen Molekülen vorkommenden Elemente sind Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Stickstoff (N), Sauerstoff (O) und Phosphor

(P). Die dominierenden Isotope von Kohlenstoff (^{12}C , natürliche Häufigkeit 98,9%) und Sauerstoff (^{16}O , natürliche Häufigkeit 99,8%) haben eine Kernspinquantenzahl von $I = 0$ und sind mit NMR-Spektroskopie nicht messbar. Der leichte Wasserstoff (^1H , natürliche Häufigkeit 99,98%) und ^{31}P (natürliche Häufigkeit 100%) zeichnen sich durch eine Kernspinquantenzahl $I = 1/2$ aus und lassen sich mittels NMR-Spektroskopie untersuchen. Das Stickstoffisotop (^{14}N , natürliche Häufigkeit 99,6%) hat eine Kernspinquantenzahl von 1. Bei diesem Isotop handelt es sich um einen Quadrupolkern, der eine sehr schnelle Relaxation aufweist und daher breite Signale liefert. Für biologisch motivierte NMR-Messungen an Kohlenstoff und Stickstoff nutzt man häufig die selteneren Isotope mit einer Kernspinquantenzahl von $I = 1/2$. Diese Isotope weisen eine relativ langsame Relaxation auf und liefern daher starke Signale im NMR-Spektrum. Das betrifft ^{13}C (natürliche Häufigkeit 1,1%) und ^{15}N (natürliche Häufigkeit 0,37%). Da diese Isotope nur eine geringe natürliche Häufigkeit aufweisen, müssen sie in den zu messenden Proteinen angereichert werden. Dies wird erreicht, indem den Bakterien, welche das Protein herstellen, ^{13}C -markierte Glukose und ^{15}N -markiertes Ammoniumchlorid als einzige Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle zur Verfügung gestellt wird. Werden die Proteine synthetisiert und nicht durch Bakterien hergestellt, so müssen entsprechend mit Isotopen angereicherte Aminosäuren verwendet werden. Ist das Protein oder der Proteinkomplex zu groß und liefert im Spektrum daher zu breite Signale, so kann man einen Teil der Protonen (^1H) in den Proteinen durch Deuterium (^2H) ersetzen [62].

1.4.2.4 Grundlagen der NMR-Messung

Das magnetische Moment $\vec{\mu}$ eines Spin $\frac{1}{2}$ Kerns präzediert im Magnetfeld \vec{B}_0 auf einem von zwei erlaubten Kegelmänteln (Zustand α bzw. β) um die Magnetfeldrichtung (z-Achse des ortsfesten Koordinatensystems). Ein willkürlich herausgegriffener und in NMR-Experimenten beobachteter Spin $\frac{1}{2}$ Kern existiert in einer typischen NMR-Probe (Konzentration ca. 1 mM, Volumen ca. 200 μl) in ca. 10^{17} Kopien. Diese 10^{17} magnetischen Momente präzedieren im Gleichgewicht unabhängig voneinander (d.h. ohne Phasenkorrelation) auf

einem der beiden erlaubten Kegelmäntel. Durch den geringfügigen Besetzungsüberschuss im Zustand α ergibt die Summation über die magnetischen Momente aller 10^{17} gleichartigen Kerne im Gleichgewicht eine Nettomagnetisierung \vec{M}_0 entlang der z-Achse. Für die anschließende Beschreibung des einfachen NMR-Experiments verwendet man häufig ein um die z-Achse mit der Larmorfrequenz ν_L rotierendes Koordinatensystem (x' , y' , z').

Durch geeignete Einstrahlung einer elektrischen Leistung in Form einer elektromagnetischen Welle im Radiofrequenz (RF)-Bereich, deren Frequenz exakt der Larmorfrequenz des untersuchten Kernspins entspricht, kann man ein zusätzliches Magnetfeld B_1 erzeugen, welches im rotierenden Koordinatensystem stationär ist und z.B. in Richtung der x' -Achse zeigt. Dieses B_1 -Feld bewirkt eine Rotation der anfänglich in z' -Richtung zeigenden Nettomagnetisierung \vec{M} in der $y'z'$ -Ebene um die x' -Achse. Schaltet man das RF-Feld wieder aus sobald \vec{M} einen Winkel von 90° (\vec{M} zeigt dann in $-y'$ -Richtung) bzw. 180° (\vec{M} zeigt dann in $-z'$ -Richtung) durchlaufen hat, so spricht man von einem 90° bzw. 180° RF-Puls. Nach einem 90° Puls rotiert der \vec{M} -Vektor mit der Larmorfrequenz in der xy -Ebene um die z-Achse des stationären Koordinatensystems. Der rotierende Vektor \vec{M} erzeugt in der Empfängerspule einen Wechselstrom, der als Funktion der Zeit detektiert wird. Durch Wechselwirkungen der Spin untereinander dephasiert die Magnetisierung in der $x'y'$ -Ebene des rotierenden Koordinatensystems (T_2 - oder transversale Relaxation). Durch Wechselwirkung der Kernspins mit der Umgebung wird der ursprüngliche Besetzungsunterschied der Zustände α und β allmählich wieder hergestellt (T_1 - oder longitudinale Relaxation). In der Summe führen beide Arten von Relaxation zu einer Abnahme der Amplitude des detektierten Wechselstromsignals über die Zeit, man spricht vom „freien Induktionsabfall“ (engl.: FID, free induction decay).

1.4.2.5 Fourier-Transformation-NMR

RF-Pulse hoher Leistung können einen breiten Spektralbereich gleichzeitig anregen (z.B. des gesamte ^1H -Spektrum). Der detektierte FID ist dann eine Überlagerung von Schwingungen mit den Larmorfrequenzen aller Kerne,

deren Magnetisierungsvektoren während der Detektionsphase in der x,y -Ebene präzedierten. Um das gewünschte NMR-Frequenzspektrum zu erhalten, muss das in der Zeitdomäne detektierte Signal (FID) über eine Fourier-Transformation (FT) in die Frequenzdomäne übertragen werden. Die Einführung der FT-NMR hat die NMR-Spektroskopie revolutioniert [4]. Im Vergleich zur sequenziellen Abtastung des Frequenzspektrums bei der vorher üblichen CW-NMR-Spektroskopie wird für die Aufnahme eines Spektrums nur noch ein Bruchteil der vorher üblichen Zeit benötigt. Durch mehrmalige Wiederholung des FT-NMR-Experiments in Verbindung mit Signalakkumulation kann das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht werden.

1.4.2.6 Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Bei der 1D NMR-Spektroskopie wird das Spinsystem zunächst in der Präparationsphase mit einer Serie von RF-Pulsen und Wartezeiten in einen definierten Zustand gebracht. Anschließend wird in der Detektionsphase ein FID registriert, der Informationen über die Larmorfrequenzen aller Magnetisierungsvektoren enthält, welche in dieser Zeit in der xy -Ebene präzidieren. Das 1D NMR-Spektrum zeigt die Intensitäten der registrierten NMR-Signale als Funktion der Larmorfrequenz (in der Regel in der relativen Einheit ppm dargestellt). Misst man ein 1D ^1H -Spektrum eines Proteins, so gruppieren sich die Signale von Kernen mit ähnlicher chemischer Umgebung in bestimmten Bereichen des Frequenzspektrums (Abb.: 1.6). In 1D Spektren größerer Moleküle kommt es oft zu Signalüberlagerungen, die eine Interpretation schwerer oder unmöglich machen. Durch Aufnahme einer Serie von 1D NMR-Experimenten, deren Pulssequenz sich lediglich durch die Länge einer inkrementierten Wartezeit unterscheidet, kann man eine zweite, indirekte Zeitdomäne generieren. Nach zwei Fourier-Transformationen erhält man ein 2D NMR-Spektrum mit zwei Frequenzachsen. In Abhängigkeit von der Pulssequenz können beide Achsen ^1H -Resonanzen oder Resonanzen von Heterokernen (^{13}C , ^{15}N) widerspiegeln. Die Art der im 2D Spektrum beobachteten Korrelationssignale (Kreuzpeaks, definiert durch zwei Resonanzfrequenzen und die Signalintensität) hängt ebenfalls von der Pulssequenz ab. Da die

NMR-Signale jetzt nicht mehr nur entlang einer Dimension sondern in einer Ebene verteilt sind, ist die Signalüberlagerung stark reduziert und die Dispersion erhöht. Durch Einführung weiterer inkrementierter Wartezeiten lassen sich nach dem gleichen Schema 3D bzw. nD NMR-Experimente aufbauen. Damit lässt sich die Signalüberlagerung weiter reduzieren wodurch die detaillierte Charakterisierung von Proteinen mittels NMR erst möglich wurde. Mit der Einführung der 2D NMR-Spektroskopie im Jahr 1971 [54] und dem Konzept der FT-NMR-Spektroskopie [4] wurde es erstmals möglich eine sequenzspezifische Zuordnung eines Proteins durchzuführen [143].

Die Herstellung von uniform ^{13}C und ^{15}N markierten Proteinen durch die Überexpression in Bakterien [70,82] erleichtert die Beobachtung von Korrelationen zwischen Protonen und den Heterokernen in 3D Experimenten enorm, was das Spektrum an Pulssequenzen deutlich erweiterte. Bei ^{13}C und ^{15}N handelt es sich im Vergleich zu ^1H wegen ihres geringeren gyromagnetischen Verhältnis γ um relativ unempfindliche Kerne. Die Empfindlichkeit dieser Kerne lässt sich steigern, indem die Magnetisierung vom empfindlichen ^1H Kern auf einen unempfindlichen, meist über eine heteronukleare J -Kopplung, übertragen wird. Eine solche Transfermöglichkeit wird über INEPT (engl.: insensitive nuclei enhanced by polarisation transfer) realisiert. Dieser Transfer beruht auf Korrelation zweier Kerne durch deren skalare Kopplung. Auch ein Magnetisierungstransfer zwischen Protonen, welche nicht durch J -Kopplung aneinander gekoppelt sind ist möglich. Der Kern-Overhauser-Effekt (engl.: Nuclear Overhauser Enhancement, NOE) beruht auf der Kreuzrelaxation räumlich benachbarter Kerne durch dipolare Kopplungen. Nach der gezielten Sättigung eines ausgewählten NMR-Signals kann sich die Intensität eines anderen Signals infolge des NOEs ändern, was Rückschlüsse auf die räumliche Nähe dieser Kerne zulässt [79, 160]. NMR-Experimente die auf diesem Effekt aufbauen, sind unabhängig von der J -Kopplung zwischen den interagierenden Kernen und sind lediglich von der räumlichen Nähe der beiden Kerne abhängig. Je geringer die räumliche Entfernung zweier Protonen ist, desto stärker der NOE. Der Effekt ist jedoch auf Protonen innerhalb eines Radius von 5 \AA begrenzt [49]. Ein Experiment um

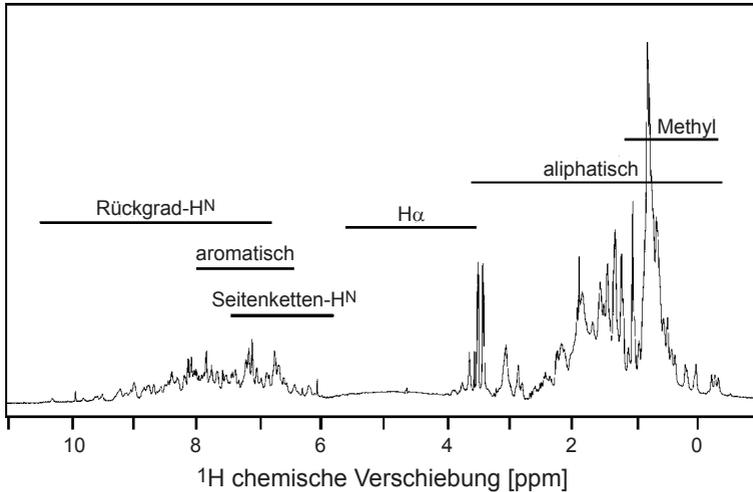


Abbildung 1.6: ^1H NMR-Spektrum eines kleinen Proteins. Typische Frequenzbereiche unterschiedlicher Protonen in Proteinen sind angegeben. (Verändert nach Stangler et al. (2006) [126])

NOEs biologischer Makromoleküle mittels NMR zu messen ist das mehrdimensionale NOESY-Experiment (engl.: nuclear overhauser enhancement spectroscopy experiment) [157].

1.4.3 NMR-Untersuchungen mittels Modellmembranen

In dieser Arbeit wurden NMR-Messungen an membranständigen Proteinen durchgeführt. Bei einer biologischen Membran handelt es sich um eine Lipiddoppelschicht aus amphipatischen Lipiden die aus einer hydrophoben Schwanzgruppe und einer polaren Kopfgruppe bestehen und Membranproteine enthalten können. Die Kopfgruppen orientieren sich dabei zum Wasser hin. Die hydrophoben Schwanzgruppen hingegen von Wasser weg. Dadurch bildet sich im Inneren der Membran ein hydrophober Bereich aus. Membranproteine verfügen ihrerseits über hydrophobe Bereiche, mit denen sie sich in der Membran verankern, um diese vom Wasser abzuschirmen. Wenn keine Membran vorhanden ist, fallen diese Proteine in polaren Lösungen aufgrund

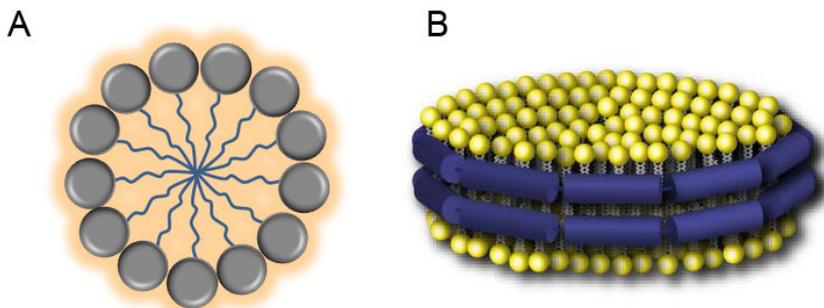


Abbildung 1.7: Darstellung der Modellmembranen Mizelle und Nanodisc. Detergenzien bzw. Lipide haben eine hydrophile Kopfgruppe (runde Kreise) und sind mit ein oder zwei hydrophoben Schwänzen (gewellte Linien) ausgestattet. **A** Mizellen bestehen aus Detergenzien bzw. Lipiden die eine kugelförmige Struktur bilden, indem sie die hydrophile Köpfe zum Wasser orientiert sind und so ihre hydrophoben Schwänze abschirmen. **B** Die Nanodisc besteht aus einer Lipid-Doppelmembran (gelb) und 2 amphipatischen Polypeptiden (blau) die den hydrophoben Membranrand umschließen und diesen so vom Wasser abschirmen.

ihrer hydrophoben Bereiche aus. Um solche Proteine mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie messen zu können, müssen diese jedoch in Lösung gehalten werden. Membranproteine in der Membran einer biologischen Zelle zeigen jedoch eine viel zu große Rotationskorrelationszeit, als dass sie mit Flüssig-NMR-Spektroskopie untersucht werden könnten. Stattdessen kann ein weniger polares Lösungsmittel wie z.B. Trifluoroethanol (TFE) in Wasser [32, 106] verwendet werden, um Membranproteine in Lösung zu halten. Dies kommt einer Membran jedoch nicht sehr nahe. Alternativ wird auf Modellmembranen zurückgegriffen, die eine Umgebung mit polaren und weniger polaren Bereichen und eine Geometrie die der natürlichen Zellmembran sehr nahe kommt bieten. Die Modellmembran, die der Zellmembran am nächsten kommt ist das Liposom. Aufgrund seiner Größe ist es jedoch für die Flüssig-NMR ungeeignet. Es wird aber in der Festkörper-NMR verwendet [25, 156]. Mizellen (Abb.: 1.7) hingegen können aufgrund ihrer vergleichsweise geringeren Größe in der Flüssig-NMR-Spektroskopie verwendet werden [145].

Mizellen bestehen aus amphipathischen Detergenzmolekülen, können aber auch Lipide enthalten. Mizellen bilden sich, sobald eine kritische Konzentration (cmc, engl.: critical micelle concentration) dieser Stoffe in der Lösung überschritten wird. Die Mizelle ist ein flexibles Gebilde in dessen Inneren ein hydrophober Bereich ausgebildet wird. Hier können hydrophobe Bereiche der Membranproteine eingelagert werden. Die Geometrie der Mizelle weicht jedoch von der Geometrie der Zellmembran ab. Zudem befinden sich noch einzelne Detergenzmoleküle in der Lösung. Bizellen [109] sind eine weitere Modellmembran mit hinreichend kurzen Rotationskorrelationszeiten, so dass Flüssig-NMR-Untersuchungen an eingebauten Membranproteinen möglich sind. Bizellen bieten eine Geometrie, die der Geometrie der natürlichen Zellmembran ähnlich ist. Bei der Bizelle bilden Lipide eine Lipiddoppelschicht aus. Deren hydrophober Rand wird durch Detergenzien vom polaren Lösungsmittel abgeschirmt. Jedoch ist die Auswahl an geeigneten Lipiden und Detergenzien begrenzt. Zudem befinden sich auch hierbei noch einzelne Detergenzmoleküle in der Lösung. Falls Detergenzmoleküle in der Lösung nicht toleriert werden können, stellen Nanodiscs [24, 89] (Abb.: 1.7) eine vorteilhafte Alternative dar. Sie bestehen aus einem Lipiddoppelschichtfragment, dessen hydrophober Rand durch ein amphipathisches Polypeptid (MSP; engl.: membrane scaffold protein) von der polaren Lösung abgeschirmt wird. Nanodiscs sind sehr variabel in ihrer Größe. Je nach verwendeter MSP-Variante und Zahl der enthaltenden Lipidmoleküle variiert ihre Größe von ca. 5 bis 20 nm. Zudem lassen sich in Nanodiscs eine Vielzahl von verschiedenen Lipiden einbauen. Die Proteine können während der Assemblierung eingefügt werden, oder direkt in die Nanodiscs hinein synthetisiert werden. Diese Proteine können dann in der Flüssig-NMR-Spektroskopie untersucht werden [44].

1.5 Ziele dieser Arbeit

Das humane BST2 ist ein Protein der intrinsischen Virusabwehr der Zellen. Es besteht aus einer α -helikalen extrazellulären Domäne, die C-terminal durch

einen GPI-Anker und N-terminal durch eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert ist. Zudem verfügt das Protein über eine N-terminale zytoplasmatische Domäne [90]. Beim Knospen von umhüllten Viren von einer infizierten Zelle, ist das BST2 mit seinen zwei Membranankern vermutlich in der Lage, gleichzeitig in der Zellmembran als auch in der Virusmembran verankert zu sein. Hierdurch werden Viruspartikel an der Membranoberfläche festgehalten und können keine weiteren Wirtszellen infizieren [46].

Das VpU ist ein akzessorisches Protein des HIV-1 [138]. Es besteht aus einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Untersuchungen zeigen, dass VpU das BST2 über eine Interaktion der Transmembrandomänen beider Proteine bindet [5, 123]. In der Folge wird das BST2 von der Oberfläche herabreguliert [2] und das HIV-1 kann ungehindert von der Zelloberfläche knospen und andere Zellen infizieren.

Der genaue Ablauf dieser Interaktion ist von entscheidender Bedeutung für das Verständnis einer HIV-Infektion auf struktureller Ebene und für die Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen.

Das Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung der Bindung von BST2 und VpU. Die Charakterisierung erfolgte unter Verwendung NMR-spektroskopischer Methoden. Da es sich bei BST2 wie auch bei VpU um membranständige Proteine handelt, mussten die Messungen in Anwesenheit eines Modellmembransystems (DPC-Mizellen) durchgeführt werden. Bei der Charakterisierung der Bindung wurde besonderes Augenmerk auf die Beteiligung der zytoplasmatischen Domänen beider Proteine gelegt. Dazu wurden Genkonstrukte hergestellt, die die Transmembrandomäne als auch die zytoplasmatische Domäne des jeweiligen Proteins beinhalten. Die Herstellung von membranständigen Proteinen stellt immer eine Herausforderung dar. Dies gilt insbesondere bei zytotoxischen Proteinen wie dem BST2. Die Herstellung ausreichender Proteinmengen für eine NMR-Messung erforderte ein speziell angepasstes Herstellungs- und Reinigungsprotokoll. Daher wurde ein auf *E. coli* basiertes zellfreies Synthesystem etabliert und ein Standardreinigungsprotokoll für derart hergestellte Proteine entwickelt.

Nach der erfolgreichen Charakterisierung der Sekundärstruktur des BST2

und des VpU bestand ein weiteres Ziel darin, die Bindestellen für das jeweils andere Protein zu lokalisieren. Dies erfolgte ebenfalls durch NMR-spektroskopische Methoden.

Schließlich sollten die Grundlagen für das Studium der Bindung von BST2 und VpU unter Verwendung von Fusionskonstrukten erarbeitet werden. Dazu wurde ein Fusionskonstrukt aus BST2 und VpU entworfen, und die effiziente Herstellung elektrostatisch geladener Nanodiscs, einem geeigneten Modellmembransystem für Studien am Fusionskonstrukt, etabliert.

Von besonderem Interesse bei der Charakterisierung der Bindung von BST2 und VpU war dabei die eventuelle Beteiligung der zytoplasmatischen Domänen, da diese bei vorangegangenen strukturellen Untersuchungen nicht in Betracht gezogen worden waren. Für ein Gesamtverständnis der Interaktion ist die eventuelle Beteiligung dieser Domänen jedoch von großem Interesse.

Kapitel 2

Material

2.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> A19	Hfr(PO21), rna-19, gdhA2, his-95?, relA1, spoT1, metB1	Clark, A.J. (1963) [18]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)T1 ^R	F-, ompT, hsdSB(rB-mB-), gal, dcm, λ(DE3), tonA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>E. coli</i> BL21(DE3)RIL	F-, ompT, hsdS, (rB- mB-), dcm+, Tetr, gal, l (DE3), endA, Hte [argU ileY leuW Camr]	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>E. coli</i> C43(DE3)	F-, ompT, hsdSB, (rB- mB-), gal, dcm, (DE3)	Miroux, B. (1996) [85]
<i>E. coli</i> Mach1 T1 ^R	F-, φ80lacZΔM15, ΔlacX74, hsdR(rK-, mK+), ΔrecA1398, endA1, tonA	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.2 Plasmide

Tabelle 2.2: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Name	Resistenz	Eigenschaft	Quelle
pAR1219	Ampicillin	Expressionsvektor mit T7RNAP Überexpression	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
pET22b_deltaLac_BST2tmcyt	Ampicillin	integriertes Gen kodiert für humanes BST2tmcyt mit N-term. His ₁₀ -Tag und TEV-Schnittstelle	diese Arbeit
pET22b_deltaLac_BST2tmcyt-VpU-Rho	Ampicillin	integriertes Gen kodiert für ein Fusionsprotein aus HIV-1 VpU und humanem BST2tmcyt (verbunden mit einem (GS) ₅ Linker) und C-term. Rho-Tag [50,92]	diese Arbeit
pET22b_deltaLac_GFP	Ampicillin	integriertes Gen, kodiert für GFP	Institut für biophysikalische Chemie, Universität Frankfurt
pET22b_deltaLac_VpU-HIS	Ampicillin	integriertes Gen kodiert für HIV-1 VpU und C-term. His ₆ -Tag	diese Arbeit
pET28a_MSP1D1	Kanamycin	integriertes Gen kodiert für MSP1D1 und N-term. His ₆ -Tag	(Addgene plasmid 20061) [24]
pRK793_TEV	Ampicillin	integriertes Gen kodiert für die TEV-Protease und N-term. His ₆ -Tag	(Addgene plasmid 8830) [58]

Vektorkarten der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide befinden sich im Anhang.

2.3 Oligonukleotide

Tabelle 2.3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz
T7-Promotor	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
T7-Terminator	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

2.4 Biochemikalien, Chemikalien und Kits

Tabelle 2.4: Die verwendeten Biochemikalien, Chemikalien und Kits

Material	Bezugsquelle
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
2-Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt
Aluminiumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniak	VWR, Radnor, PE, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	AMRESCO, Solon, OH, USA
Adenosin 5'-triphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Antifoam Y-30 Emulsion	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Biotin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Brij 35	AppliChem, Darmstadt
Brij 58	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromophenolblau	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Ca-Phanthotenat	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau G250	Merck, Darmstadt
Cytosin 5'-triphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cyanocobalamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Deuteriumoxid	Euriso-Top, Saarbrücken
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dodecylphosphocholin	Cube Biotech, Mohnheim
Dodecylphosphocholin (D38, 98%)	Euriso-Top, Saarbrücken

Tabelle 2.5: Die verwendeten Biochemikalien, Chemikalien und Kits (Fortsetzung I)

Material	Bezugsquelle
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Eisen(II)-sulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	VWR, Radnor, USA
Folinsäure Calciumsalz Pentahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Guanosin 5'-triphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kalium-lithium-acetyl-phosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumacetat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)-chlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-sulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumcholat	AppliChem, Darmstadt
Natrumacid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ni ²⁺ -NTA Agarose	QIAGEN, Hilden
Nicotinsäure	Carl Roth, Karlsruhe
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit	Macherey-Nagel, Düren
Phosphoenolpyruvat Monokalium Salz	AppliChem, Darmstadt
Polyethylenglycol 8000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protease Inhibitor EDTA-frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Pyridoxin-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
Q-Sepharose	General Electric, Brisbane, CT, USA

Tabelle 2.6: Die verwendeten Biochemikalien, Chemikalien und Kits (Fortsetzung II)

Material	Bezugsquelle
Riboflavin	Carl Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SuperSignal WestPico Kit	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
TEMED	AppliChem, Darmstadt
Thiamin	Carl Roth, Karlsruhe
Tromethamin	AppliChem, Darmstadt
Triton-X-100	AppliChem, Darmstadt
tRNA from <i>E.coli</i> MRE 600	Roche Diagnostics, Mannheim
Tryptone	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
Uracil 5'-triphosphate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zinksulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Zyklohexan	AppliChem, Darmstadt

2.5 Enzyme, Proteine und Antikörper

Tabelle 2.7: Die verwendeten Enzyme, Proteine und Antikörper

Material	Bezugsquelle
DNase A	AppliChem, Darmstadt
Immunopure Goat anti-Mouse IgG (H+L), Peroxidase conjugatet	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
NdeI	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
Penta-His™ Antibody BSA-free	QIAGEN, Hilden
Mouse monoclonal IgG ₁	
Pyruvatkinase	Roche Diagnostics, Mannheim
RiboLock RNase Inhibitor	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
T4 DNA Ligase	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
Taq Polymerase	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
XhoI	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA

2.6 Aminosäuren

Tabelle 2.8: Die verwendeten Aminosäuren und Aminosäuremischungen

Aminosäure	Bezugsquelle
Algal amino acid mixture (16AA) (U- ¹⁵ N, 98%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Algal amino acid mixture (16AA) (U- ¹³ C, 98%; U- ¹⁵ N, 98%; U- ² H, 97%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
„Cell free“ amino acid mix (20AA) (U- ¹³ C, 97-99%; U- ¹⁵ N, 97-99%)	Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Alanin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Asparagin (U- ¹³ C, 98%; U- ¹⁵ N, 98%; U- ² H, 98%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Arginin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Asparaginsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Cystein	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin (U- ¹³ C, 98%; U- ¹⁵ N, 99%; U- ² H, 98%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Histidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Leucin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Methionin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Prolin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Serin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Threonin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Tryptophan (U- ¹³ C, 98%; U- ¹⁵ N, 98%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Valin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.7 Größenmarker

Tabelle 2.9: Die verwendeten Größenstandards

Material	Bezugsquelle
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

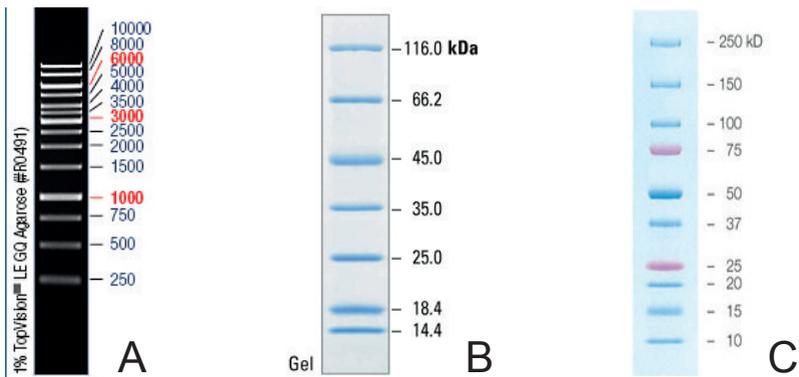


Abbildung 2.1: Die Abbildung zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards. **(A)** GeneRuler 1 kb DNA Ladder; **(B)** Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker; **(C)** Precision Plus Protein Dual Color Standard

2.8 Geräte

Tabelle 2.10: Die verwendeten Geräte

Gerät	Bezugsquelle
AB54 Feinwaage	Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA
ÄKTApurifizier 900 Chromatografieanlage	General Electric, Brisbane, CT, USA
Alpha 1-4 Lyophilys	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz
Alugram SIL G/UV TLC-Platte	MACHEREY-NAGEL, Düren
Amicon200 Konzentrator	Merck Millipore, Darmstadt
Avanti J-20 XP Zentrifuge	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Bruker Avance III HD NMR-Spektrometer	Bruker, Karlsruhe
CECF-Maxi-Reaktor	diese Arbeit
CECF-Mini-Reaktor	diese Arbeit
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
ChemieDocC MP Geldokumentationssystem	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Direct Detect IR Spectrometer	Merck Millipore, Darmstadt
EPS 1001 Power Supply	General Electric, Brisbane, CT, USA
HERAsafe KS Abzug	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
HPLC Chromatografieanlage	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Kältethermostat DC10-K10	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
Lamda 25 UV/VIS Spektrometer	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
M-110P Microfluidizer	Microfluidics, Westwood, MA, USA
MINI-Rocker MR-1 Kippschüttler	Kisker Biotech, Steinfurt
MP220 pH-Meter	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
MR 3001 Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
NanoPhotometer P-200	Implen, München
PRIM Spektralphotometer	SCHOTT Instruments, Mainz
SE260 Mighty Small II Elektroforesekammer	Heofer, Holliston, MA, USA
Sonifier 250	BRANSON Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA
Superdex 200 10/300 GL Säule	General Electric, Brisbane, CT, USA
Techfors 40 l Fermenter	Infors, Bottmingen, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 2.11: Die verwendeten Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Bezugsquelle
Trans-Blot Turbo Western-Blot Kammer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Unitron Inkubationsschüttler	Infors, Basel, Schweiz
Varian VNMRS 800 MHz NMR-Spektrometer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Varian VNMRS 900 MHz NMR-Spektrometer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Vortex-Genie 2 Vortexer	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

2.9 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.12: Die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Immobilon-PS ^Q PVDF-Membran	Merck Millipore, Darmstadt
Omnifix-F Spritze	B. Braun, Melsungen
Slide-A-Lyzer 10K Dialyse-Kassetten	ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA
Spectra/Por 4 (MWCO 12-14 kD) Dialyseschlauch	Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA
Spectra/Por 7 (MWCO 3,5 kD) Dialyseschlauch	Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA
Sterican Kanüle	B. Braun, Melsungen
Vivaspin 2 (MWCO 3 kD) Konzentrator	General Electric, Brisbane, CT, USA
Vivaspin 20 (MWCO 3 kD) Konzentrator	General Electric, Brisbane, CT, USA
Vivaspin 6 (MWCO 30 kD) Konzentrator	General Electric, Brisbane, CT, USA
Whatmanpapier 3 MM Chr.	General Electric, Brisbane, CT, USA
Zellkulturplatten (24 well)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

2.10 Computerprogramme

Tabelle 2.13: Die verwendeten Computerprogramme

Programm	Quelle
Image Lab Version 4.0.1 build 6	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
SketchEl Version 1.60	Molecular Materials Informatics, Montréal, Canada.
GraphPad Prism 5	Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA
CcpNmr Analysis	http://www.ccpn.ac.uk/software/analysis [142]
NMRPipe	http://spin.niddk.nih.gov/NMRPipe/ [22]
Microsoft Office 2011	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
TALOS-N	http://spin.niddk.nih.gov/bax/software/TALOS-N/ [119]
TopSpin 3.2	Bruker, Karlsruhe
VnmrJ 4.0	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
VnmrJ 2.3A	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

Kapitel 3

Methoden

3.1 Plasmidisolierung

Die Isolierung von bis zu 20 **ug!** Plasmid-DNA wird mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Hierzu werden 5 ml *E. coli* Übernachtskultur verwendet. Die Isolierung erfolgt gemäß Herstellerprotokoll, basierend auf der alkalischen Lyse [52].

Die Isolierung von bis zu 100 **ug!** Plasmid-DNA wird mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Hierzu werden 25 - 50 ml *E. coli* Übernachtskultur verwendet. Die Isolierung erfolgt gemäß Herstellerprotokoll.

Die Isolierung von bis zu 500 **ug!** Plasmid-DNA wird mittels QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Hierzu werden 3 l *E. coli* Übernachtskultur verwendet. Die Isolierung erfolgt gemäß Herstellerprotokoll.

3.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgt mittels Fluoreszenz-Farbstoff-basierter Sequenzierung durch die Firma SEQLAB, Göttingen. Dazu werden 600 - 700 **ng!**

Plasmid-DNA mit 20 **pmol**! Primer (T7-Promotor oder T7-Terminator) vermischt und auf 7 **ul**! mit ddH₂O aufgefüllt. Jeder Reaktionsansatz wird in einem 200 **ul**! Reaktionsgefäß an SEQLAB versendet.

3.3 Bestimmung von DNA-, Detergenz- und Proteinkonzentrationen

3.3.1 UV-Vis-Spektroskopie

Die Bestimmung der Konzentration erfolgt mittels photometrischer Messungen und dem Lambert-Beerschen Gesetz [41]. Hierzu wird die Absorption bei 260 **nm**! (DNA) und 280 nm (Proteine) bestimmt.

3.3.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die dsDNA-Konzentration (c_{DNA}) in ng/ μ l entspricht der gemessenen Absorption bei 260 nm multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Multiplikationsfaktor für dsDNA von 50. Benutzt wird eine Quarzküvette mit 10 mm optischer Weglänge. Die Küvette ist für Licht der Wellenlänge 260 nm durchlässig. Vom UV-Spektrum der dsDNA-Lösung wird zunächst das mit der gleichen Küvette gemessene UV-Spektrum des Puffers subtrahiert, um dann die bei 260 nm gemessene Absorption (A_{260}) der dsDNA ablesen zu können.

$$c_{DNA} \left[\frac{ng}{\mu l} \right] = A_{260} \cdot V \cdot 50 \quad (3.1)$$

3.3.1.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration (c_{prot}) wird unter Verwendung der gemessenen Absorption der Proteinlösung bei 280 nm (A_{280}) auf der Basis des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet. Dabei ist das UV-Spektrum zunächst durch

3.3. BESTIMMUNG VON DNA-, DETERGENZ- UND PROTEINKONZENTRATIONEN

Subtraktion des Pufferspektrums zu korrigieren. Der Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm (ϵ_{280}) wird mit Hilfe des Webtools Protparam¹ aus der Aminosäuresequenz des Proteins abgeleitet. Die optische Weglänge der Küvette wird mit d bezeichnet [41].

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad (3.2)$$

Bei 280 nm zeigen lediglich die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin eine nennenswerte Absorption. Daher eignet sich Gleichung 3.2 nur zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen, die mindestens eine dieser Aminosäuren enthalten.

3.3.2 Infrarot-Spektroskopie

Mit Hilfe der Infrarot-Spektroskopie kann die Konzentration von Proteinen unabhängig von den Seitenketten der Aminosäuren bestimmt werden. Im Direkt Detect IR-Spektrometer der Firma Merck Millipore wird die Absorption elektromagnetischer Strahlung durch Proteine im Wellenzahlbereich 1600 – 1690 cm^{-1} (Amide I Bande, diese widerspiegelt hauptsächlich die C=O- (ca. 80%) und die C-N- (ca. 20%) Valenzschwingungen im Proteinrückgrat) genutzt, um die Proteinmenge auf einem weitgehend IR-transparenten Polymerfilm (Trägermaterial) zu quantifizieren (Abb.: 3.1). Durch sorgfältiges Trocknen des Proteinfilmes vor der Messung kann eine Störung der Proteinquantifizierung durch die IR-Absorption von Wasser (Deformationsschwingung bei 1596 cm^{-1}) weitgehend vermieden werden. Das Direct Detect IR-Spektrometer kann ebenfalls zur Bestimmung der Lipid- oder Detergenkonzentration in der Probe genutzt werden. Dies ist oft unabhängig von bzw. zusätzlich zur Proteinquantifizierung möglich. In Abhängigkeit vom interessierenden Lipid bzw. Detergens können häufig isolierte und spezifische IR-Banden von Valenzschwingungen aliphatischer Gruppen des Analyten im

¹<http://web.expasy.org/protparam/>

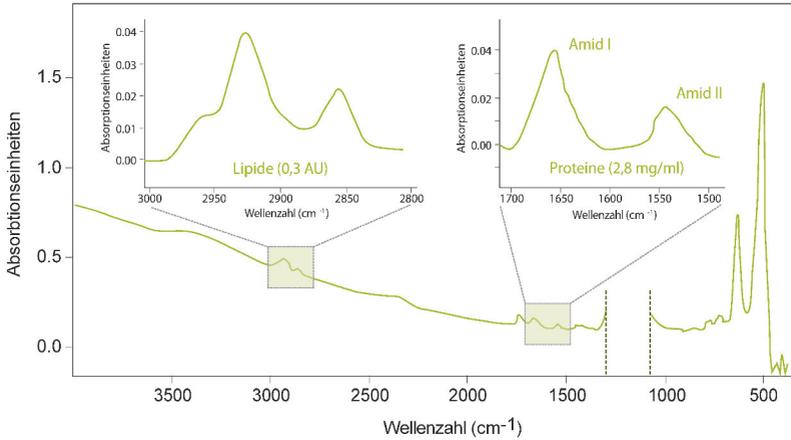


Abbildung 3.1: Beispielspektrum für eine Messung mit dem Direct Detect IR-Spektrometer. Zu sehen ist das komplette Infrarotspektrum und die vergrößerten Bereiche für die Lipide- (links) bzw. Proteinanalyse mit dem Amid I und Amid II Bande (rechts). Die gemessene Probe enthielt 2,8 mg/ml Protein und eine unbekannte Menge Lipid. Verändert nach Direct Detect Spektrometer Benutzerhandbuch.

Wellenzahlbereich von 3000 bis 2800 cm^{-1} identifiziert werden, die zur Quantifizierung geeignet sind (Abb.: 3.1). Die zur Konzentrationsbestimmung genutzten IR-Banden des Proteins, Lipids oder Detergens sind unter idealen Bedingungen nicht überlagert. Nach der Subtraktion des IR-Spektrum der auf dem gleichen Trägermaterial nach dem Trocknen verbleibenden Pufferbestandteile vom eigentlichen IR-Spektrum des Proteins/Lipids/Detergens (in Puffer gelöst, auf den Träger aufgebracht und sorgfältig getrocknet), wird die Intensität der interessierenden IR-Banden durch Integration des IR-Spektrums über einen geeigneten Wellenzahlbereich bestimmt. Mit Hilfe einer im Vorfeld, idealerweise unter Verwendung des Zielmoleküls, erstellten Standardkurve kann die integrale IR-Absorption der ausgewählten IR-Bande der untersuchten Probe zur Bestimmung der Konzentration des Zielmoleküls (Protein, Lipid, Detergens) in der Probe genutzt werden.

3.3.2.1 Detergens-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Lipid- bzw. Detergenkonzentration wird zunächst mit Hilfe des Direct Detect IR-Spektrometers eine Standardreihe des zu charakterisierenden Moleküls erstellt. Hierbei ist zu beachten, dass diese im gleichen Puffer angesetzt werden muss wie die zu messende Probe. Auch ist darauf zu achten, dass die maximale Konzentration so gewählt wird, dass die Probe auf dem Probenkärtchen vollständig trocknen kann und keine wachsähnliche Schicht zurückbleibt. Bei Dodecylphosphocholin (DPC) entspricht dies einer maximalen Konzentration von 50 mM. Die minimale Konzentration wird so gewählt, dass sie noch reproduzierbare Messergebnisse ergibt und die IR-Bande nicht vom Hintergrundrauschen überlagert wird. Bei DPC entspricht dies 5 mM. Die zu messende Probe wird vor der Messung so weit verdünnt, dass die Lipid- bzw. Detergenkonzentration innerhalb dieses Bereiches liegt. Das Messergebnis wird anschließend mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

3.3.2.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von Proteinmengen mittels Direct Detect IR-Spektrometer ist abhängig von Pufferbedingungen, dem Helixgehalt des Proteins und der Isotopenmarkierung des Proteins. Unter Beachtung dieser Faktoren wird eine Standardreihe mit einem Protein erstellt, dessen Konzentration mit einer unabhängigen Methode (UV-Vis-Spektroskopie (Kapitel: 3.3.1)) ermittelt werden kann. Die Standardkurve sollte den Proteinkonzentrationsbereich von 0,25 bis 5 mg/ml umfassen. Die zu messende Probe wird soweit verdünnt, dass ihre Konzentration in diesem Bereich liegt. Das Messergebnis wird anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

3.4 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese dient dazu, DNA-Fragmente nach der Größe aufzutrennen. Dabei macht man sich das Prinzip zu nutze, dass geladene

Teilchen in einem elektrischen Feld driften. Negativ geladene Teilchen driften zur Anode, positiv geladene Teilchen zur Kathode. Die durch ihr Phosphatrückgrat hauptsächlich negativ geladene DNA driftet somit zur Anode. Die Driftgeschwindigkeit wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Dazu zählt insbesondere die Porengröße des Agarosegels. Diese lässt sich beeinflussen, indem die Agarosekonzentration im Gel variiert wird. Die Agarose bildet im Gel eine Netzstruktur aus. Je mehr Agarose im Gel, desto kleiner die Poren in dieser Struktur, desto langsamer driften die DNA-Fragmente durch diese. Hierbei driften kleinere Fragmente schneller durch das Gel als große Fragmente. Durch diesen Effekt wird eine Auftrennung nach der Größe möglich. Die Driftgeschwindigkeit und damit die Dauer des Trennungslaufes lässt sich durch die Veränderung der elektrischen Feldstärke regulieren. Je stärker das Feld, desto schneller wandern die DNA-Fragmente im Gel. Jedoch nimmt mit steigender Driftgeschwindigkeit die Trennschärfe ab. Zudem haben Faktoren wie der pH-Wert und die Temperatur ebenfalls Einfluss auf die Driftgeschwindigkeit der einzelnen Fragmente im Agarosegel. In dieser Arbeit wird die Gelelektrophorese in Horizontalelektrophorese-Geräten durchgeführt. Die verwendeten Gele bestehen aus Agarose und Ethidiumbromid in TAE-Puffer (Tab.: 3.1). Zur Herstellung wird die Agarose bei 60 °C im TAE-Puffer im Verhältnis 1:100 (w/v) gelöst und dann in eine Form gegossen. Etwa 1 cm vor dem Ende des Gels wird ein Kamm gesteckt, der nach Entfernen im ausgehärteten Gel Taschen hinterlässt. In das leicht abgekühlte, aber noch nicht feste, Gel werden 0,02% (v/v) Ethidiumbromid gegeben und gleichmäßig verteilt. Die klare Lösung härtet zu einem semitransparenten Gel aus. Vor dem Einbringen der DNA-Probe in die Gel-Taschen wird diese mit 5-fach Auftragspuffer (Tab.: 3.1) im Verhältnis 1/5 (v/v) versetzt. Der Lauf findet in einem TAE-Puffer-Bad bei 80 V und 300 A statt. Er dauert 20 min. Die Auswertung findet unter UV-Licht mit Hilfe der GelDoc 2000 (Tab.: 2.10) statt. Hierbei zeigt das, während des Laufs zwischen die DNA-Basen interkalierte, fluoreszierende Ethidiumbromid durch ein violettes Leuchten die Position der einzelnen DNA-Banden an.

Tabelle 3.1: Puffer für die DNA-Gelelektrophorese

TAE-Puffer	100 ml Agaroselösung	5-fach Auftragspuffer
40 mM Tris-acetat, pH 8,0	1% (w/v) Agarose	50 mM EDTA
1 mM EDTA	0,1 mg Ethidiumbromid	50% (w/v) Glycerin
	100 ml TAE-Puffer	0,15% (w/v)
		Bromophenolblau
		0,15% (w/v) Xylencyanol

3.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus einzelnen DNA-Banden aus einem Agarosegel erfolgt unter Verwendung des Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren). Hierzu werden die DNA-Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Aus diesen Gelfragmenten wird nach Herstellerprotokoll die DNA isoliert.

3.6 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) [87] ist eine in-vitro-Technik, welche zur Vervielfachung eines genau in Länge und Sequenz definierten DNA-Bereichs dient. Hierbei kann dieser Bereich um einen Faktor von 10^6 bis zu 10^8 vervielfacht werden, in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionszyklen. Ein solcher Zyklus besteht aus drei Phasen, welche sich anhand ihrer Temperatur unterscheiden. Die erste Phase dient der Denaturierung, wobei der dsDNA-Strang in zwei ssDNA-Stränge zerfällt. Die Temperatur beträgt hier 95°C . Die zweite Phase dient der Hybridisierung der Oligonukleotide (Primer). Hiervon werden zwei verschiedene benötigt, deren Sequenz komplementär zum Anfang bzw. zum Ende der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz gewählt wird. Die Temperatur dieser Phase ist von den gewählten Primern abhängig und liegt zumeist zwischen 50°C und 65°C . Die dritte Phase dient der Elongation. In ihr ergänzt eine DNA-Polymerase bei 72°C , vom Primer

ausgehend, die beiden ssDNA-Stränge zu zwei dsDNA-Strängen. In dieser Arbeit wird die Taq-Polymerase benutzt, welche vom *Thermophilus Aquaticus* stammt, und daher auch bei hohen Temperaturen noch sehr stabil ist. Allerdings besitzt diese Polymerase keine Korrekturlesefunktion. Daher ist immer eine Sequenzierung zur Kontrolle der DNA-Sequenz nötig. Für die Elongation wird zusätzlich eine Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)-Mischung benötigt, welche dem Reaktionsgemisch in ausreichender Menge beigelegt wird.

3.6.1 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Variante der normalen PCR, bei der *E. coli* Zellen direkt eingesetzt werden können. So können z.B. neu eingebrachte Plasmide auf die Richtigkeit des auf ihnen liegenden Gens überprüft werden, ohne die Plasmide zuvor zeitaufwändig zu isolieren. Die Ergebnisse geben die Größe des Gens wieder. Sie sagen jedoch nichts über die Nukleotidsequenz aus. Die Größe ergibt sich durch den Abstand der Primer-Bindestellen auf dem Plasmid, zwischen die das zu kontrollierende Gen kloniert wurde. Für die Durchführung einer Kolonie-PCR werden einige Zellen einer einzelnen *E. coli* Kolonie in ein 200 μ l Reaktionsgefäß überführt, z.B. mit einem sterilem Zahnstocher oder einer Pipettenspitze, und mit 20 μ l Kolonie-PCR Mix (Tab.: 3.2) aufgefüllt. Die PCR-Reaktion erfolgt nach dem in Tabelle 3.3 dargestellten Schema. Das Ergebnis wird mittels DNA-Gelelektrophorese (Kapitel 3.4) ausgewertet. Weicht die beobachtete Größe des DNA-Fragmentes von der erwarteten ab, so hat die Klonierung des Plasmids nicht funktioniert und die *E. coli*-Kolonie wird verworfen. Stimmt die beobachtete Größe mit der erwarteten Größe überein, so wird das Plasmid aus der *E. coli*-Kolonie isoliert und zur Überprüfung der Gensequenz sequenziert.

Tabelle 3.2: Kolonie-PCR Mix für die Durchführung einer Reaktion

Kolonie-PCR Mix	
2 μ l	10x Taq Puffer mit KCl
2 μ l	25 mM $MgCl_2$
0,5 μ l	10 mM NTP-Mix
0,25 μ l	50 pmol/ μ l T7 Promotor
0,25 μ l	50 pmol/ μ l T7 Terminator
1 μ l	Taq Polymerase
14 μ l	H_2O

Tabelle 3.3: PCR Schema für Kolonie-PCR

	Dauer (min!)	Temperatur (gC!)
1 x	5	95
	1	95
25 x	1	52
	2	72
1 x	∞	4

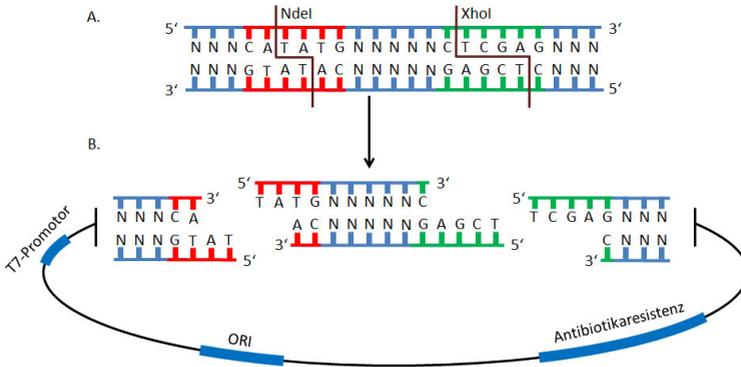


Abbildung 3.2: Das Schneiden eines DNA-Stranges mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* (A). Ligation in ein neues Plasmid (B). Die Abbildung stellt den grundlegenden Ablauf einer DNA-Klonierung dar.

3.7 Klonierungstechniken

Zur Herstellung rekombinanter Proteine müssen verschiedene proteinkodierende dsDNA Sequenzen aus Plasmiden geschnitten und in andere Plasmide eingesetzt werden (Abb.: 3.2). Dies ist unter anderem nötig, um gekaufte Genkonstrukte, welche für die zellfreie Proteinsynthese bestimmt sind, aus dem Standardvektor pMA-T der Firma Geneart, in den Vektor pET22b_deltaLac zu klonieren.

3.7.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Um dsDNA zu linearisieren oder ein Genfragment aus ihr zu entnehmen, wird die dsDNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut. Dies geschieht mittels käuflich erworbener „FastDigest“ (FD) Enzyme der Firma Thermo Fisher Scientific, welche nach Herstellerangaben verwendet werden. Dabei ist zu beachten, dass 1 μ l Restriktionsenzym 1 μ g dsDNA in 15 min schneiden kann. Spaltansätze werden nach den Angaben in Tabelle hergestellt 3.4. Dabei können unter Umständen auch mehrere verschiedene Restriktionsenzyme gleichzeitig eingesetzt werden, deren Volumen dann mit dem

Tabelle 3.4: 20 μ l Spaltansatz mit „FastDigest“(FD) Enzymen.

Spaltansatz
10 μ l dsDNA Lösung (2 μ g dsDNA)
2 μ l FD Restriktionsenzym
2 μ l 10x FD Puffer
6 μ l H ₂ O

Wasservolumen verrechnet wird. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C ist die überwiegende Mehrheit der dsDNA geschnitten. Diese kann nun mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.4) separiert und **ggf.!** zur weiteren Verarbeitung extrahiert (Kapitel 3.4) werden.

3.7.2 Ligation von DNA

Soll ein DNA-Fragment in ein, zuvor mit Hilfe von Restriktionsenzymen linearisiertes, Plasmid eingebracht werden, so kann dies mit Hilfe der Ligase des T4-Bakteriophagen geschehen. Hierbei ist zu beachten, dass die 3'-Schnittstelle des Plasmides mit der 5'-Schnittstelle des DNA-Fragmentes und die 5'-Schnittstelle des Plasmides mit der 3'-Schnittstelle des DNA-Fragmentes übereinstimmt. Die aus Agarosegelen extrahierten (Kapitel 3.5) linearisierten Plasmide und DNA-Fragmente können ohne weitere Behandlung verwendet werden. Der Ligations-Ansatz (Tab.: 3.5) wird für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend kann der Ansatz zur Transformation von *E. coli* (Kapitel 3.8.3) verwendet werden.

Tabelle 3.5: 20 μ l Ligationsansatz

Ligationsansatz
10 μ l DNA-Fragment Lösung
5 μ l linearisiertes Plasmid Lösung
2 μ l T4-DNA-Ligase
2 μ l 10x T4-DNA-Ligase Puffer
1 μ l H ₂ O

3.8 Bakterienkultur

3.8.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Zur Vervielfältigung der Genkonstrukte wird der *E. coli*-Stamm Mach1 T1^R verwendet. Für die Genexpression werden die *E. coli*-Stämme BL21(DE3)T1^R, BL21(DE3)RIL oder C43(DE3) verwendet. Zur Gewinnung von Zellextrakt für die zellfreie Proteinsynthese dient der *E. coli*-Stamm A19. Die Kultivierung erfolgt, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB-Medium (Tab.: 3.6) mit 50 μ g/ml des jeweiligen Antibiotikums unter Schütteln bei 200 rpm im Inkubationsschüttler Unitron. Zelldichten werden durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) ermittelt.

3.8.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Mach1 T1^R Zellen werden diese zunächst auf einer Agarose-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie dieser Platte wird in 500 ml LB-Medium überführt. Die Zellen werden darin bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 - 0,7 herangezogen. Anschließend werden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 g pelletiert. Das Pellet wird in 125 ml eiskaltem 100 mM MgCl₂ aufgenommen und erneut für 10 min bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert. Die Zellen werden nun zunächst in 25 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und anschließend mit 100 mM CaCl₂ auf 250 ml aufgefüllt. Diese Zellsuspension wird 20 min bei 4 °C inkubiert und anschließend bei

Tabelle 3.6: LB (engl.: Lysogeny broth) -Medium zur Kultivierung von *E. coli* [11]

1 l LB-Medium
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 l H ₂ O

4 °C und 4000 g für 10 min zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wird in 10 ml 85 mM CaCl₂ + 15% (v/v) Glycerol aufgenommen. Daraus hergestellte 200 µl Aliquots werden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei –80 °C gelagert.

Bei Verwendung der *E. coli*-Stämme BL21(DE3)T1^R, BL21(DE3)RIL oder C43(DE3) werden zunächst einzelne Kolonien in 5 ml SOC-Medium (Tab.: 3.7) überführt. Die Bakterien werden über Nacht angezogen. Am nächsten Tag werden aus diesen Kulturen neue 100 ml Kulturen mit einer anfänglichen optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,05 angeimpft. Diese werden bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 - 0,7 herangezogen. Um ein Weiterwachsen zu verhindern, werden die Zellen möglichst schnell auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4 °C und 3000 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 20 ml TFB-I Puffer (Tab.: 3.7) resuspendiert und für 10 min unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Nach einem weiterem Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 3000 g von 15 min wird das Pellet in 4 ml TFB-II Puffer (Tab.: 3.7) aufgenommen. Die Zellen werden zunächst in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei –80 °C gelagert.

3.8.3 Transformation von *E. coli* Zellen

Um ein Plasmid in *E. coli* einzubringen, wird ein 200 µl Aliquot von chemisch kompetenten Zellen des gewünschten Stammes verwendet. Dieses wird auf Eis aufgetaut und anschließend mit 200 µg der Plasmid-DNA versetzt. Mit Hilfe eines 1-minütigen Hitzeschocks bei 42 °C, gefolgt von einer 2-minütigen Inkubation bei 4 °C, wird das Plasmid in die Zelle eingebracht. Durch die Zu-

Tabelle 3.7: Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen

SOC-Medium	TFB-I Puffer	TFB-II Puffer
0,5% (w/v) Hefeextrakt	30 mM Natriumacetat	10 mM MOPS
2% (w/v) Trypton	50 mM MgCl ₂	75 mM CaCl ₂
10 mM NaCl	100 mM NaCl	10 mM NaCl
2,5 mM KCl	10 mM CaCl ₂	15% (v/v) Glycerin
10 mM MgCl ₂	15% (v/v) Glycerin	pH 7,0
10 mM MgSO ₄	pH 6,0	
20 mM Glukose		

gabe von 800 µl LB-Medium (Tab.: 3.6) und eine einstündige Inkubation bei 37°C sind die Zellen, welche erfolgreich transformiert wurden, in der Lage Resistenzen gegen das Antibiotikum aufzubauen, für das das eingebrachte Plasmid ein Resistenzgen besitzt. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet erneut in 200 µl LB-Medium aufgenommen. Diese Suspension wird auf einer LB-Agar-Platte ausplattiert. Es wird eine Patte gewählt, welche mit dem Antibiotikum versetzt ist, für das das eingebrachte Plasmid ein Resistenzgen besitzt. Somit sind nur die erfolgreich transformierten Zellen in der Lage, während der nun folgenden 12-stündigen Inkubation bei 37°C, Kolonien zu bilden.

3.9 SDS-PAGE nach Laemmli

3.9.1 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt in dieser Arbeit mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese, auch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE, engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) genannt [21]. Sie wird nach Laemmli [67] durchgeführt. Hierzu wird ein Acrylamid-Gel mit zwei Phasen gegossen, die sich in pH-Wert und Dichte unterscheiden. Die erste Phase, Sammelgel genannt, hat einen pH-Wert von 6,8 und eine Acrylamidkonzentration von 6%. Die zwei-

te, darunter liegende Phase, Trenngel genannt, hat einen pH-Wert von 8,8 und eine Acrylamidkonzentration von 10- bis 15%. Im Sammelgel befinden sich zusätzlich nach oben offene Taschen, die zum Beladen des Gels mit den zu trennenden Proteinen dienen. Vor dem Befüllen der Taschen mit Proteinlösung muss diese im Verhältnis 1:3 mit 4x Laemmli-Puffer (Tab.: 3.8) [67] versetzt werden. Anschließend werden die darin enthaltenden Proteine für 5 min bei 95 °C inkubiert. In diesem Schritt werden die Proteine durch die Hitze denaturiert, die Disulfidbrücken durch das 2-Mercaptoethanol aufgebrochen und die SDS-Moleküle an die Proteine angelagert. Hierdurch werden alle Proteine denaturiert und erhalten eine negative Ladung. Mindestens eine Tasche des Gels wird mit einem Größenstandard (Kapitel: 2.7) befüllt. Anschließend erfolgt die Elektrophorese bei max. 500 V und 45 mA für 45 min. Im, als erstes von den Proteinen zu passierenden, Sammelgel driften die negativ geladenen Chloridionen mit relativ hoher Geschwindigkeit in Richtung des positiven Pols. Diese nennt man Leitonen. Das bei einem pH-Wert von 6,8 als Zwitterion vorliegende Glycerin drifftet entsprechend langsamer und wird Folgeion genannt. Zwischen Leit- und Folgeion drifftet das, durch das SDS negativ geladene, Protein ebenfalls zum positiven Pol. Durch den Spannungsgradienten, welcher sich zwischen Leit- und Folgeion ausbildet, werden langsamer driftende Proteine beschleunigt und schneller driftende Proteine abgebremst. Hierdurch werden die Proteine zu einer schmalen Bande vereinigt und kommen als solche im Trenngel an. Im Trenngel, bei einem pH-Wert von 8,8, liegt das Glycerin vollständig dissoziiert vor und überholt die Proteine. Dadurch entfällt der Spannungsgradient. Ab diesem Punkt erfolgt die Auftrennung aufgrund des Molekulargewichtes der Proteine. Hierbei wirkt das Acrylamidgel wie ein Sieb, in dem kleinere Proteine einen geringeren Widerstand durch Reibung erfahren und schneller driften können als größere Proteine.

Tabelle 3.8: Rezepte für Laemmli- und Laufpuffer

Laemmli-Puffer	Laufpuffer
50 mM Tris-HCl, pH 6,8	25 mM Tris-HCl, pH 8,3
2% (w/v) SDS	250 mM Glycin
0,1% (w/v) Bromophenolblau	0,1% (w/v) SDS
10% (v/v) Glycerin	
5% (v/v) 2-Mercaptoethanol	

3.9.2 Herstellung von SDS-Gelen

Die Herstellung der SDS-Gele erfolgt maximal eine Woche vor Gebrauch. Dazu wird zunächst das Trenngel (Tab.: 3.9) zwischen eine Glasscheibe (10 x 15 cm) und eine Aluminiumplatte selber Größe gegossen. Dabei wird der Gehalt an Acrylamid je nach Größe des interessierenden Proteins variiert. So wird für Proteine über 50 kDa das 10%ige und für kleinere als 50 kDa das 15%ige Gel gewählt. Über das noch flüssige Gel wird eine dünne Schicht aus Isopropanol aufgebracht. Dadurch wird eine plane Oberfläche nach dem Aushärten erreicht. Ist das Gel ausgehärtet wird das Isopropanol sorgfältig entfernt. Anschließend wird das Sammelgel (Tab.: 3.9) auf das Trenngel gegossen. In das noch flüssige Sammelgel wird ein Teflonkamm gesteckt. Dessen Zähne verdrängen das Sammelgel, wodurch nach dem Aushärten und dem Entfernen des Kamms mehrere Taschen zurückbleiben. Die Anzahl und Größe der Taschen kann je nach gewähltem Kamm variieren. Bis zur Verwendung wird das Gel in ein feuchtes Tuch gewickelt und in einer verschlossenen Plastiktüte bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.9: Rezepte für SDS-Gele

6% Sammelgel	10% Trenngel	15% Trenngel
6% (w/v) Acrylamid	10% (w/v) Acrylamid	15% (w/v) Acrylamid
125 mM Tris-HCl, pH 6,8	375 mM Tris-HCl, pH 8,8	375 mM Tris-HCl, pH 8,8
0,1% (w/v) SDS	0,1% (w/v) SDS	0,1% (w/v) SDS
0,1% (w/v) APS	0,1% (w/v) APS	0,1% (w/v) APS
0,1% (w/v) TEMED	0,1% (w/v) TEMED	0,1% (w/v) TEMED
0,003% (w/v) Coomassie Blau		

3.9.3 Fixierung von SDS-Gelen

Sollen Proteine kleiner als 20 kDa im Gel angefärbt werden, wird eine Silberfärbung durchgeführt. Dazu muss das Gel im Anschluss an die Gelelektrophorese fixiert werden. Hierzu wird das Gel für mindestens 1 h in Fixierlösung (Tab.: 3.10) inkubiert. Dabei wird dem Gel ein großer Anteil des enthaltenden Wassers entzogen. Dies führt zu einem Schrumpfen des Gels.

Tabelle 3.10: Rezept der Fixierlösung für SDS-Gele.

Fixierlösung
50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

3.9.4 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Bei der Coomassie-Färbung wird das SDS-Gel nach der Gelelektrophorese für etwa 30 min bei 60 °C schüttelnd in Coomassie-Färbelösung (Tab.: 3.11) inkubiert. Im Anschluss wird das nun komplett blau gefärbte Gel in Wasser gegeben und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Hierbei entfärbten sich proteinfreie Bereiche des Gels. Nur die Proteinbanden bleiben gefärbt. Zum gründlichen Entfärben des Hintergrundes wird das Gel über Nacht zusammen mit Papiertüchern in heißem Wasser auf einem Schüttler gelagert. Die

Dokumentation des Gels erfolgt mit dem Geldokumentationssystem Chemie-DocC MP (Tab.: 2.10) mit dem Programm Image Lab (Tab.: 2.13).

Tabelle 3.11: Rezept der Coomassie-Färbelösung.

Coomassie-Färbelösung
25% (v/v) Isopropanol
10% (v/v) Essigsäure
0,5 g/l Coomassie Blau

3.9.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine Methode, die auch geringe Mengen von 0,1 ng bis 1 ng Protein zuverlässig färben kann. Sie ist somit sensitiver als die Coomassie-Färbung, eignet sich jedoch nicht zur quantitativen Abschätzung von Proteinmengen. Nach der erfolgten Gelelektrophorese wird dem Gel das Wasser entzogen, indem es 1 h in Fixierlösung inkubiert wird (Kapitel: 3.9.3). Durch zweimaliges Waschen für 5 min mit SDS-Entferner (Tab.: 3.12) wird das SDS aus dem Gel entfernt. Im Anschluss werden die Proteine mittels Farmer's Reagenz (Tab.: 3.12) reduziert, welches immer frisch angesetzt wird. Dieser Schritt dauert maximal 1 min. Um das Farmer's Reagenz wieder zu entfernen, wird das Gel im Anschluss 3-mal für 30 s! mit ddH₂O gewaschen. Durch eine 20-minütige Inkubation in 0,012 M AgNO₃ werden Silberionen an die Proteine angelagert. Das AgNO₃ wird durch 3-maliges Waschen mit ddH₂O für jeweils 30 s entfernt. Sichtbar werden die Proteine durch das Entwickeln des Geles in Entwicklerlösung (Tab.: 3.12). Die Inkubationsdauer hängt hierbei von der gewünschten Intensität der Proteinbanden ab.

3.9.6 Western Blot

Der Western-Blot ist eine Methode zur indirekten Detektion von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Hierzu wird zunächst eine Gelelektrophorese wie beschrieben durchgeführt. Die nun aufgetrennten, sich aber noch im Gel

Tabelle 3.12: Puffer für die Silberfärbung

SDS-Entferner	Farmer's Reagenz	Entwickler
10% (v/v) Methanol	0,012 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,28 M Na_2CO_3
5% (v/v) Essigsäure	0,005 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,005 M Na_2CO_3	0,05% (v/v) Formaldehyd

befindlichen, Proteine werden mittels der Semidry-Blot Kammer (Trans-Blot Turbo) auf eine Polyvinylidene difluoride (PVDF) Membran (Immobilon-P^{SQ}) überführt. Hierzu werden auf die Anode des Geräts zunächst drei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1 (Tab.: 3.13), aufgebracht. Auf diese werden drei weitere Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 2 (Tab.: 3.13) gelegt. Auf die Whatman-Papiere wird die PVDF-Membran gelegt, welche zuvor für 30 s in Methanol aktiviert, für 5 min in Wasser gewaschen und für 5 min in Kathodenpuffer 2 inkubiert wird. Danach wird das Gel oben auf die Membran gelegt. Anschließend folgen drei weitere Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer (Tab.: 3.13). Abschließend folgt die Kathode selbst. Dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen befinden, um den Lauf der Proteine nicht zu behindern. Mit dem Anschalten der Blottingkammer wird ein elektrisches Feld angelegt (10 V!, 0,1 A). Die Proteine driften dadurch zur Anode und werden so vom Gel auf die Membran übertragen. Bei 15%igen Gelen dauert der Vorgang ca. 35 min. Bei höherprozentigen Gelen wird **ca.!** 10 min mehr Zeit benötigt. Sind die Proteine auf die Membran überführt, wird diese für 1 h in Tris-gepufferte Salzlösung (TBS, engl.: tris buffert saline) mit 0,2% Tween (TBS-T) (Tab.: 3.13) und mit 2% (w/v) Magermilchpulver bei Raumtemperatur inkubiert. Dies dient dazu, alle freien Stellen auf der Membran mit Protein zu sättigen. Diese und alle weiteren Inkubationen erfolgen auf einem Kippschüttler (MINI-Rocker MR-1). Anschließend folgt eine Inkubation mit Penta-His Antikörper in der Verdünnung 1:1000 in TBS-T bei 7 °C über Nacht. Dieser Antikörper bindet an das His-Tag der Proteine. Am nächsten Tag wird die Membran 3-mal für 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend für 3 h mit Immu-

Tabelle 3.13: Puffer für den Western Blot

Anodenpuffer 1	Anodenpuffer 2	Kathodenpuffer
300 mM Tris-HCl pH 10,4 10 % (v/v) Methanol	25 mM Tris-HCl pH 10,4 10 % (v/v) Methanol	25 mM Tris-HCl pH 9,4 40 mM Glycin
TBS	TBS-T	
7,7 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl	7,7 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,2 % (v/v) Tween 20	

nopure Goat anti-Mouse Antikörper in der Verdünnung 1:10000 in TBS-T bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper bindet an die nicht variable Domäne des primären Antikörper und trägt eine Meerrettichperoxidase. Anschließend wird erneut 3-mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Nach einer abschließenden Inkubation in 2 ml des SuperSignal WestPico Kits können die auf der Membran befindlichen Proteine, die ein His-Tag besitzen, sichtbar gemacht werden. Dabei katalysiert die Meerrettichperoxidase des sekundären Antikörper die Umsetzung der im Kit enthaltenen Dioxetane in ihre oxidierte Form, deren Lumineszenz mit einem Geldokumentationssystem detektiert werden kann.

3.10 Proteinreinigungsverfahren

3.10.1 Affinitätschromatografie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Die Reinigung von Proteinen mittels Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure (NTA; engl.: nitrilotriacetic acid)-Agarose beruht auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen (IMAC; engl.: immobilized-metal affinity chromatography) [100]. Eine mit Metallionen beladene, chelatbildende Matrix, in diesem Fall eine Ni²⁺-beladene Ni²⁺-NTA, bindet dabei das His-Tag eines Proteins. Über einen Imidazolgradienten können gebundene Proteine von der Matrix eluiert werden.

3.10.2 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie erfolgt die Trennung der Proteine in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius. Dabei sind die Trennsäulen mit einem Polymer gefüllt, welches über eine poröse Struktur verfügt. In diese Poren können Pufferbestandteile und Proteine mit kleinerem hydrodynamischen Radius mit höherer Wahrscheinlichkeit eindringen als größere Proteine. Diese größeren Proteine müssen somit den kürzeren Weg um das Polymer herum nehmen. Somit ist die Verweildauer eines Proteins auf der Säule bzw. sein Elutionsvolumen umgekehrt proportional zum hydrodynamischen Radius des Proteine. Der Größentrennungsbereich der Säule hängt somit maßgeblich von der Porengröße ab.

3.10.3 Anionenaustauschchromatografie

Die Anionenaustauschchromatographie ist eine Methode zur Trennung von anionischen Molekülen, wie Proteinen, Peptiden und Aminosäuren. Dabei findet eine Bindung dieser Moleküle an eine positiv geladene Matrix durch den Austausch von Anionen statt. In dieser Arbeit wurde als Matrix Q-Sepharose gewählt. Hier sind quaternäre Ammoniumverbindungen kovalent an die Sepharose gebunden, an denen der Austausch der Anionen stattfindet. Über einen Ionenstärkegradienten, z.B. einen NaCl-Gradienten, können unterschiedlich stark geladene Moleküle zu unterschiedlichen Zeiten von der Matrix eluiert werden.

3.11 Dünnschichtchromatografie

Die Driftgeschwindigkeit eines Lipidmoleküls hängt bei der Dünnschichtchromatographie (TLC, engl.: thin layer chromatography) u.a. von seiner Polarität und Ladung, der gewählten stationären Phase und der Zusammensetzung des Laufpuffers ab [17]. In der hier verwendeten und unten beschriebenen Konstellation driftet negativ geladenes POPG schneller als

Tabelle 3.14: Rezept des Laufpuffers und der Färbelösung für die Dünnschichtchromatografie.

TLC-Laufpuffer	Färbelösung
13 Teile Chloroform	0,02% (w/v) Kaliumhydroxid
4 Teile Methanol	0,02% (w/v) Bromophenolblau
1 Teil 25%ige Ammoniaklösung	

zwitterionisches POPC. Die TLC dient in der vorliegenden Arbeit zur Analyse von Lipidmischungen aus POPC und POPG. Hierzu wird eine nach oben offene Kammer (20 cm hoch, 21 cm breit, 10 cm tief) von innen zu allen Seiten mit Whatmanpapier ausgekleidet. In diese Kammer wird anschließend bis zu einer Höhe von ca. 1 cm TLC-Laufpuffer (Tab.: 3.14) gefüllt. Die Kammer wird mit einer Glasplatte abgedeckt. Binnen einer Stunde saugt sich die Verkleidung aus Whatmanpapier mit dem Puffer voll, wodurch in der Kammer eine gesättigte Atmosphäre entsteht. In der Zwischenzeit wird eine mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatte (Alugram SIL G/UV) bei 80 °C für 30 min aktiviert. Auf die aktivierte Platte werden die Proben mit einer Glaskapillare aufgetragen und an der Luft getrocknet. Diese Proben bestehen aus in Chloroform gelösten Lipiden. Die Platte wird in die Kammer gestellt und diese anschließend verschlossen. Der Laufpuffer dient nun als mobile Phase und wird durch Kapillarkraft die, als stationäre Phase dienende, Kieselgelschicht hinauf gezogen. Dabei werden die aufgetragenen Lipide mitgenommen. Verschiedene Lipide driften unterschiedlich schnell, wodurch die Probe aufgetrennt wird. Wenn die Lauffront des Laufpuffers das obere Ende der Platte erreicht, wird die Platte aus der Kammer entnommen. Nach einer 1-stündigen Trocknung bei 80 °C wird die Kieselgelschicht gleichmäßig mit Färbelösung (Tab.: 3.14) besprüht. Die Lipide heben sich danach farblich von der Platte ab.

Tabelle 3.15: Phosphat-gepufferte Salzlösung

PBS
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na ₂ HPO ₄
2 mM KH ₂ PO ₄

3.12 Expression von rekombinanten Proteinen

In dieser Arbeit werden verschiedene Proteine durch Überexpression in *E. coli* hergestellt. Hierzu werden *E. coli* Zellen mit den jeweiligen Plasmiden transformiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem mit Schikanen versehenen Erlenmeyerkolben unter Schütteln bei 200 rpm im Schüttelinkubator (Unitron). Dies geschieht immer in einem LB-Medium (Tab.: 3.6) mit Antibiotika. Zunächst wird eine Vorkultur, deren Volumen 1/40 der späteren Expressionskultur entspricht, über Nacht (16-18 h) herangezogen. Diese wird genutzt, um die Expressionskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 anzuimpfen. Sobald die Expressionskultur eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 erreicht hat, wird die Expression der rekombinanten Proteine durch Zugabe von **1 mM!** Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. 3 bis 4 h nach der Induktion werden die Zellen mittels Pelletieren (5000 g, 20 min, 11 °C) in der Avanti J-20 XP Zentrifuge geerntet. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in Phosphat-gepuffertes Salzlösung (PBS; engl.: phosphate buffered saline) (Tab.: 3.15) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der neue Überstand wird ebenfalls verworfen und das Pellet bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Um den Erfolg der Überexpression zu kontrollieren, werden Aliquots, welche vor der Induktion und vor dem Ernten entnommen werden, mittels SDS-PAGE analysiert.

3.13 Zellfreie Synthese rekombinanter Proteine

Bei vielen der Proteine, die in dieser Arbeit verwendet werden, handelt es sich um Membranproteine. Diese Proteine sind stark hydrophob und nur sehr schwer oder gar nicht in *E. coli* herzustellen bzw. aus dem Zellpellet zu reinigen. Einige der verwendeten Proteine wirken zelltoxisch. Diese Probleme können durch Verwendung eines zellfreien Synthesystems vermieden werden [93, 121, 153]. Zudem ermöglicht ein solches Synthesystem die einfache Herstellung von selektiv markierten Proteinen, speziell für funktionelle und strukturbiochemische Experimente [57, 129, 141]. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit ein auf *E. coli* basierendes und ursprünglich an der Goethe Universität Frankfurt entwickeltes [104, 114] zellfreies Synthesystem (CECF; engl.: continuous-exchange cell-free synthesis), in unserem Labor etabliert.

3.13.1 *E. coli* basierte zellfreie Proteinsynthese

Das *E. coli* basierte zellfreie Synthesystem beruht darauf, dass die für die Proteinsynthese erforderlichen Bestandteile dem *E. coli* Bakterium entnommen und anschließend in einer *in vitro* Reaktion eingesetzt werden. Auf diese Weise wird die Produktion von rekombinanten Proteinen von der lebenden Zelle unabhängig. Dadurch fällt eine etwaige Zelltoxizität des Zielproteins nicht mehr ins Gewicht. Zu den erforderlichen Zellbestandteilen gehört vor allem das Ribosom und die T7-RNA-Polymerase. Bietet man diesen molekularen Maschinen alle für die Proteinsynthese wichtigen Komponenten wie u.a. die DNA, tRNA, Aminosäuren und Energieträger an, so sind diese unter optimalen Bedingungen auch ohne die lebende Zelle in der Lage, über einen begrenzten Zeitraum hinweg Proteine herzustellen. Diese Synthese findet im Reaktionsmedium (Tab.: 3.16) statt, welches alle für die Synthese erforderlichen Komponenten in der richtigen Konzentration enthält. Da die Aminosäuren schneller aufgebraucht würden, als die Funktionalität der Ribosomen andauert, werden der Synthese kontinuierlich zusätzliche Aminosäuren zugeführt. Dazu dient das Fütterungsmedium (Tab.: 3.16). Das Reaktionsmedium ist durch eine Membran mit einem MWCO von 10000 Da vom Fütterungsme-

dium getrennt. Dies erlaubt eine Zufuhr von Aminosäuren, verhindert aber gleichzeitig eine Verdünnung des Reaktionsmediums, wodurch die Synthese zum Stillstand kommen würde. Das Volumenverhältnis von Reaktionsmedium zu Fütterungsmedium ist 1:17. In dieser Arbeit handelt es sich bei den zu synthetisierenden Proteinen um Membranproteine, die nicht wasserlöslich sind und somit bereits während der Synthese ausfallen würden. Um dies zu verhindern, können dem System zusätzlich Detergenzien wie Brij35, Brij58 oder 1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DHPC) bzw. Nanodiscs hinzugefügt werden. Die Synthese erfolgt immer bei 30 °C auf einem Schüttler mit ca. 200 rpm für 18 h. Die detaillierte Beschreibung der Syntheseprotokolle für die Herstellung der Zielproteine mittels CECF ist in Kapitel 4 zu finden.

3.13.2 Aufbau der Reaktionskammern

Die Herstellung der Reaktionskammern erfolgte nach Reckel et al. (2010) [104]. Es wurden eine Maxi-Reaktionskammer mit 3 ml Reaktionsvolumen und 10 Mini-Reaktionskammern mit jeweils 60 µl Reaktionsvolumen in der hauseigenen mechanischen Werkstatt angefertigt (Abb.: 3.3). Sie bestehen aus Polymethylmethacrylat. Die Maxi-Reaktionskammer dient zur präparativen, die Mini-Reaktionskammern für die analytische Proteinsynthese. Die Maxi-Reaktionskammer ist so gestaltet, dass in sie eine 3 ml Dialysekammer (Slide-A-Lyzer 10K Dialysekassette) eingebracht werden kann. Auf diese Weise wird das Reaktionsmedium, im Inneren der Dialysekammer, vom Fütterungsmedium getrennt. Bei den Mini-Reaktionskammern lässt sich die untere Öffnung mit Hilfe eines Teflonringes und einer Dialysemembran verschließen. Für die Synthese wird die Kammer in einer 24-Well Zellkulturplatte platziert. Im Inneren der Reaktionskammer befindet sich das Reaktionsmedium und in der Zellkulturplatte das Fütterungsmedium, voneinander getrennt durch die Dialysemembran mit einem MWCO von 12 - 14 kDa.

Tabelle 3.16: Medien für die zellfreie Proteinsynthese

Aminosäuremix	RCWMDE-Mix	NTP-Mix
4 mM Alanin	16,7 mM Arginin	90 mM ATP
4 mM Arginin	16,7 mM Asparaginsäure	60 mM CTP
4 mM Asparagin	16,7 mM Cystein	60 mM GTP
4 mM Asparaginsäure	16,7 mM Glutaminsäure	60 mM UTP
4 mM Cystein	16,7 mM Methionin	
4 mM Glycin	16,7 mM Tryptophan	
4 mM Glutaminsäure		
4 mM Glutamin		
4 mM Histidin		
4 mM Isoleucin		
4 mM Leucin		
4 mM Lysin		
4 mM Methionin		
4 mM Phenylalanin		
4 mM Prolin		
4 mM Serin		
4 mM Threonin		
4 mM Tryptophan		
4 mM Tyrosin		
4 mM Valin		

Reaktionsmedium	Fütterungsmedium
0,15x RCWMDE-Mix	0,15x RCWMDE-Mix
0,15x Aminosäuremix, pH 7,4	0,15x Aminosäuremix, pH 7,4
20 mM AcP, pH 7,0	20 mM AcP, pH 7,0
30 mM PEP, pH 7,0	30 mM PEP, pH 7,0
1x NTP-Mix, pH 7,0	1x NTP-Mix, pH 7,0
2 mM DTT	2 mM DTT
0,1 mg/ml Folsäure	0,1 mg/ml Folsäure
1x Proteaseinhibitor	1x Proteaseinhibitor
100 mM HEPES pH 8,0	100 mM HEPES, pH 8,0
ca. 12,5 mM Magnesiumacetat	ca. 12,5 mM Magnesiumacetat
ca. 73,73 mM Kaliumacetat	ca. 73,73 mM Kaliumacetat
2% PEG8000	2% PEG8000
0,05% NaN ₃	0,05% NaN ₃
0,04 mg/ml Pyruvatkinase	0,35x S30-C Puffer, pH 8,2
0,5 mg/ml tRNA	
0,04 mg/ml T7-RNA-Polymerase	
0,3 U/μl Ribolock RNase-Inhibitor	
0,015 mg/ml Plasmid	
0,35x S30 Zelleextrakt	

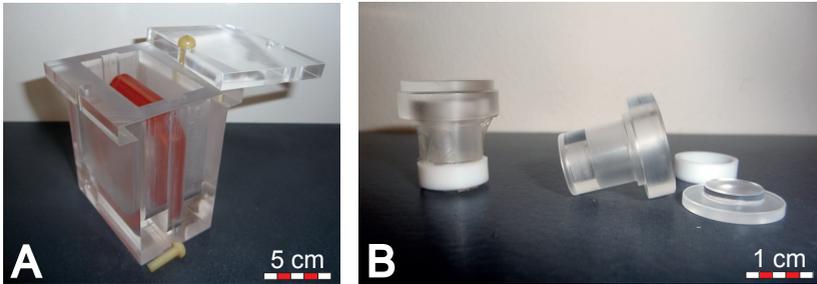


Abbildung 3.3: Dargestellt sind die für die zellfreie Proteinsynthese verwendeten Reaktionskammern. (A) Maxi-Reaktionskammer für ein Reaktionsvolumen von 0,5 bis 3 ml. (B) Mini-Reaktionskammern für analytische Reaktionen mit Reaktionsvolumina von jeweils 60 µl.

3.13.3 Herstellung von S30-Zellextrakt

Die Herstellung des S30-Zellextraktes erfolgt verändert nach Schwarz et al. (2007) [114]. Die Veränderung bezieht sich insbesondere auf die Kultivierung der Zellen. Diese findet in dieser Arbeit im 1 l Kolben statt und nicht wie bei Schwarz et al. beschrieben im Fermenter. Am Tag 1 wird eine 200 ml Übernachtskultur angesetzt. Diese besteht aus 200 ml Terrific Broth Medium (TB-Medium) (Tab.: 3.17), *E. coli* A19 Zellen und Antifoam. Sie wird über Nacht bei 37 °C in einem, mit Schikanen versehenen, Erlenmeyerkolben unter Schütteln bei 200 rpm im Inkubationsschüttler (Unitron) inkubiert. Am Tag 2 wird aus der Übernachtskultur eine 200 ml Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Diese besteht aus 200 ml TB-Medium, ca. 2 ml Übernachtskultur und Antifoam. Sie wird für weitere 3 h bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Der Einschub dieser Vorkultur zwischen Übernachts- und Hauptkultur resultiert in einer höheren Anzahl an aktiven Ribosomen. Aus dieser Vorkultur wird anschließend 12-mal 500 ml Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Eine Hauptkultur besteht aus 500 ml TB-Medium, ca. 15 ml Vorkultur und Antifoam. Die Kulturen werden daraufhin bei 37 °C und 200 rpm so lange inkubiert, bis die OD₆₀₀ zwischen 3,0 und 4,0 liegt. Diese optische Dichte entspricht der Mitte der, zuvor für diese Kulturbedingungen ermittelten, logarithmischen Wachstumsphase der *E. coli* A19 Zellen. Zu diesem Zeitpunkt

sind die Ribosomen der Zellen am vitalsten und somit maximal aktiv. Je vitaler und aktiver die Ribosomen, desto höher die spätere Proteinausbeute während der zellfreien Synthese. Die Kulturen werden innerhalb von 15 min auf unter 15 °C abgekühlt. Dies geschieht, unter kontinuierlichem Rühren, in einem 10 l Becherglas in einer Wanne mit einer Kältemischung aus Eis und NaCl (ca. 1 kg NaCl auf 20 kg Eis). Dadurch wird das Wachstum der Zellen unterbrochen und somit die Überschreitung der mittleren logarithmischen Wachstumsphase verhindert. Anschließend werden die Zellen bei 5000 g und 4 °C 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Ab diesem Schritt werden alle weiteren Schritte bei 4 °C durchgeführt. Die Pellets werden in insgesamt 300 ml S30-A Puffer (Tab.: 3.17) resuspendiert und vereint. Nach einem erneutem Zentrifugationsschritt bei 5000 g und 4 °C für 15 min wird der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wird noch 2-mal in 300 ml S30-A Puffer resuspendiert und nach jedem Mal zentrifugiert. Die letzte Zentrifugation wird auf 30 min verlängert. Anschließend wird das Pellet in 110% (v/w) S30-B Puffer (Tab.: 3.17) resuspendiert. Mit dem M-110P Microfluidizer werden die Zellen aufgeschlossen. Das daraus resultierende Lysat wird bei 30000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die klaren oberen 3/4 des Überstandes werden in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert. Erneut werden die klaren oberen 3/4 des Überstandes in ein 15 ml Falcon überführt. Die NaCl Konzentration wird auf 400 mM eingestellt. Hierzu dient eine 5 M NaCl Stammlösung, um die im Lysat enthaltenen Ribosomen nicht unnötig stark zu verdünnen. Durch einen 45-minütigen Hitzeschock bei 42 °C werden mRNA Fragmente aus den Ribosomen entfernt und viele der für die Synthese unnötigen, im Lysat enthaltenen Proteine gefällt. Das nun trübe Lysat wird in einem Dialyseschlach mit einem MWCO von 12-14 kDa gegen 4 l S30-C Puffer (Tab.: 3.17) für 3 h bei 7 °C dialysiert. Anschließend wird erneut gegen 4 l frischen S30-C Puffer für 10 h dialysiert. Am Tag 3 wird das Lysat bei 30000 g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Die oberen klaren 4/5 des Überstandes werden vorsichtig abgenommen, zu 300 µl bzw. 1100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Typischer Weise erhält man

Tabelle 3.17: Puffer und Medium für die Herstellung des Zellextraktes

1 l TB-Medium	S30-A Puffer
12 g Tryptone	10 mM Tris-Acetat, pH 8,2
24 g Hefeextrakt	14 mM Magnesiumacetat
4 ml Glycerin	60 mM KCl
17 mM KH ₂ PO ₄	6 mM β-Mercaptoethanol
72 mM K ₂ HPO ₄	
S30-B Puffer	S30-C Puffer
10 mM Tris-Acetat, pH 8,2	10 mM Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat	14 mM Magnesiumacetat
60 mM KCl	60 mM KCl
1 mM DTT	1 mM DTT
1 mM PMSF	

30 ml Zellextrakt aus 10 l Kulturmedium.

3.13.4 Herstellung von T7-RNA-Polymerase

Die Herstellung der T7-RNA-Polymerase erfolgt verändert nach Schwarz et al. (2007) [114]. Die T7-RNA-Polymerase wird in *E. coli* BL21(DE3)T1 pAR1219 expremiert. Dies erfolgt in 1000 ml LB-Kulturen mit 50 µg/ml Ampicillin bei 37°C. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ = 2 werden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 5000g und 4°C für 20 min geerntet. Das Zellpellet wird nach dem Ernten in 30 ml T7-Puffer (Tab.: 3.18) pro 1 l Expressionskultur resuspendiert und ggf. für maximal 4 Wochen bei –80°C gelagert. Zur Reinigung der T7-RNA-Polymerase werden die Zellen mit dem Branson Sonifier 250 aufgeschlossen. Das so entstandene Lysat wird bei 20000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Behältnis überführt. Aus einer 10% (w/v) Stammlösung wird tropfenweise Streptomycinsulfat zum Überstand hinzugegeben. Dies erfolgt unter ständigem Rühren und bis zu einer finalen Konzentration von 2% Streptomycinsulfat. Die hierdurch gefällte DNA wird anschließend durch eine Zentrifugation bei 30000 g und 4°C für 30 min pelletiert. Die Reinigung

Tabelle 3.18: Der T7-Puffer und T7-Lagerungspuffer für die Herstellung von T7-RNA-Polymerase.

T7-Puffer	T7-Lagerungspuffer
30 mM Tris-HCl, pH 8,0	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA	1 mM EDTA
50 mM NaCl	10 mM NaCl
10 mM β -Mercaptoethanol	1 mM DTT
5 % (v/v) Glycerin	10 % (v/v) Glycerin

der T7-RNA-Polymerase erfolgt mit Anionenaustauschchromatographie am Säulenchromatographen (ÄKTApurifier 900). Der Überstand der DNA Fällungsreaktion wird mit einer Flussrate von 5 ml/min auf eine, mit T7-Puffer equilibrierte, Q-Sepharose Säule (HL 16/10) geladen. Die Säule wird zunächst mit 2 Säulenvolumen (CV, engl.: column volume) 50 mM NaCl gewaschen. Anschließend wird die Säule mit einem NaCl-Gradienten von 50 bis 500 mM über 15 CV von der Säule eluiert und in 4 ml Aliquots aufgefangen. Die T7-RNA-Polymerase wird bei einer NaCl Konzentration von 130 bis 260 mM von der Säule gewaschen (Abb.: 3.5). Die Reinheit beträgt in etwa 50%. Dies ist ausreichend für die zellfreie Synthese, da die übrigen 50% aus *E. coli* Proteinen bestehen, die ebenfalls im Zellextrakt enthalten sind und die Proteinausbeute bei der zellfreien Synthese nicht verringern. Die T7-RNA-Polymerase enthaltenden Fraktionen werden vereint und für 18 h bei 4 °C gegen 4 l T7-Lagerungspuffer (Tab.: 3.18) in einem Dialyseschlauch mit einem MWCO von 24 kDa dialysiert. Anschließend wird die Proteinlösung mit einem Proteinkonzentrator (Vivaspin6) mit einem MWCO von 30 kDa bei 6000 g und 4 °C auf eine Proteinkonzentration von ca. 8 mg/ml eingestellt. Die Glycerinkonzentration wird auf 50% eingestellt. Die Lagerung erfolgt in 70 μ l und 240 μ l Aliquots bei 4 °C.

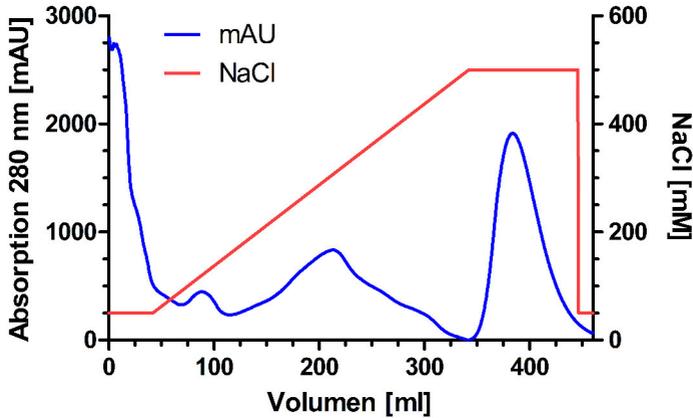


Abbildung 3.4: Chromatogramm der Reinigung der T7-RNA-Polymerase über Anionenaustausch an Q-Sepharose. Die rote Kurve zeigt die NaCl Konzentration im Puffer an. Die blaue Kurve reflektiert die von der Säule eluierte Proteinmenge. Die ersten 50 ml dienen dazu, alle nicht an der Säule gebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend werden, mit ansteigender NaCl Konzentration, die gebundenen Proteine eluiert. Ein separater Peak von der T7-RNA-Polymerase kann nicht identifiziert werden. Dies ist der ca. 50%igen Reinheit geschuldet. Daher wird eine SDS-PAGE mit den einzelnen Fraktionen durchgeführt (Abb.: 3.5), um die T7-RNA-Polymerase zu lokalisieren.

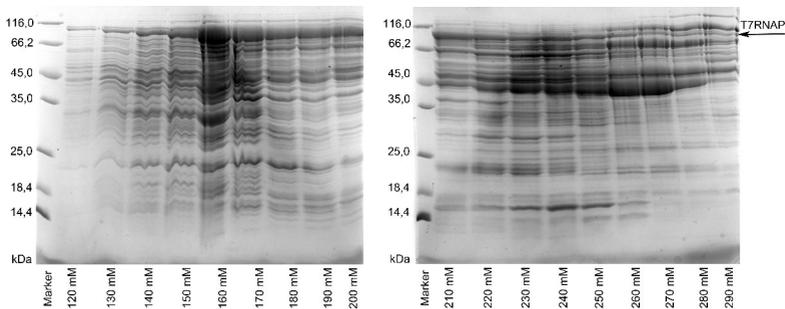


Abbildung 3.5: 15% SDS-PAGE der FPLC Fraktionen mit NaCl Konzentrationen von (**links**) 120 bis 200 mM NaCl und (**rechts**) 210 bis 290 mM NaCl (Abb.: 3.4). Die bei 110 kDa laufende T7-RNA-Polymerase findet sich in den Fraktionen mit 130 bis 260 mM NaCl. Wie erwartet zeigte das Protein eine Reinheit von ca. 50%.

3.13.5 Besonderheiten der Synthese von deuterierten Proteinen

Die Herstellung von deuterierten Proteinen erfolgt verändert nach Etezadi-Esfarjani et al. (2007) [27]. Dazu müssen die meisten Lösungen für die zellfreie Proteinsynthese auf Basis von D_2O anstatt von H_2O hergestellt werden. Die Chemikalien Phosphoenolpyruvat Monokalium Salz, Folsäure, Proteaseinhibitor, DTT, Kalium-lithium-acetyl-phosphat, Natriumacid, Magnesiumacetat, Kaliumacetat und PEG8000 werden in D_2O gelöst. Die Puffer HEPES und S30-C werden in D_2O hergestellt. Biochemikalien wie tRNA und NTPs werden ebenfalls mit D_2O angesetzt. Der Aminosäuremix wird mit $[U-^2H, U-^{13}C, U-^{15}N]$ gelabelten Algen-Aminosäure-Mix in D_2O angesetzt der jedoch die Aminosäuren Glutamin, Asparagin, Tryptophan und Cystein nicht enthält. Daher werden dem Aminosäuremix zusätzlich 100 mM $[U-^2H, U-^{13}C, U-^{15}N]$ Glutamin und 100 mM $[U-^2H, U-^{13}C, U-^{15}N]$ Asparagin als auch 100 mM $[U-^{13}C, U-^{15}N]$ Tryptophan hinzugefügt. Cystein kommt in der Aminosäuresequenz der in dieser Arbeit synthetisierten Proteine nicht vor, und wurde daher weggelassen. Die Plasmid-DNA wird nach der Reinigung anstatt in H_2O in D_2O aufgenommen. Der S30-Zellextrakt wird, bevor dieser am Ende der Präparation zur Lagerung eingefroren wird, durch mehrmaliges Einkonzentrieren und Wiederauffüllen mit D_2O -S30C Puffer, in einer 250 ml Amicon-Kammer, umgepuffert. Mit dieser Vorgehensweise wird eine Deuteriumkonzentration von 85% (v/v) im Puffer des Zellextrakts erreicht, ohne dessen Aktivität zu beeinträchtigen. Die T7-RNA-Polymerase Lösung wird auf H_2O Basis verwendet, da die hier verwendeten Mengen den Aufwand einer Umpufferung in D_2O nicht rechtfertigten. Chemikalien, die bereits als wässrige Lösung geliefert wurden, werden in dieser belassen. Dies sind Ribolock RNase-Inhibitor und Pyruvatkinase. Dies ergibt rechnerisch eine D_2O Konzentration von 99% (v/v) in der Synthesereaktion. Die Rechnung beinhaltet jedoch nicht das Hydratwasser, welches an die Chemikalien gebunden war.

3.14 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie

3.14.1 Präparation der NMR-Proben

Alle in dieser Arbeit für die NMR-Messungen verwendeten Proteine werden durch zellfreie Proteinsynthese hergestellt. Je nach dabei verwendeten Aminosäuren sind die Proteine unterschiedlich mit Isotopen markiert. Zum einen wird ein nahezu vollständig ^{15}N -markierter Algenextrakt benutzt, welcher nur 16 verschiedene Aminosäuren beinhaltet. Die darin fehlenden Aminosäuren Asparagin, Tryptophan, Cystein und Glutamin werden in unmarkierter Form ergänzt ([U- ^{15}N ;NA-NWCQ]). Zweitens kommt ein Aminosäuremix zum Einsatz, in dem alle 20 Aminosäuren sowohl ^{15}N - als auch ^{13}C -markiert sind ([U- ^{13}C ,U- ^{15}N]). Drittens wird eine kommerzielle Mischung aus 16 dreifach [U- ^2H ,U- ^{13}C ,U- ^{15}N] markierten Aminosäuren (es fehlen Asparagin, Cystein, Glutamin und Tryptophan) verwendet. Dreifach markiertes Asparagin und Glutamin sowie doppelt [U- ^{13}C ,U- ^{15}N] markiertes Tryptophan werden zugesetzt. Cystein kommt in der Sequenz des damit synthetisierten Zielproteins nicht vor. Das synthetisierte Protein wird in zwei Schritten über eine Affinitätschromatographie und eine Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die konzentrierten Proteinlösungen werden für die Messung in 5 mm Rundröhrchen der Firma Shigemi gegeben. Der jeweilige Probenpuffer enthält immer etwa 10% D_2O , 20 mM NaPi (pH 7,0), 100 mM NaCl, 3 mM EDTA und 3 mM DTT. Wenn nichts anderes angegeben ist, enthält der Puffer zusätzlich 500 mM DPC. Die Proben werden immer bei 4 °C gelagert und vor jeder Messung durch ein 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektrum auf Proteinintegrität überprüft.

3.14.2 Aufnahme und Prozessierung der NMR-Spektren

Die Proben temperatur wird durch Referenzierung mit Methanol- d_4 [34] auf 40,0 °C eingestellt. Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgt an verschiedenen Spektrometern. Die 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektren, das 2D [^1H - ^{15}N]-HSQC-Spektrum, das 3D HNCA-Spektrum, die 3D TROSY-HNCA-Spektren,

das 3D TROSY-HNCACB-Spektrum und das 3D [^1H - ^{15}N]-NOESY-TROSY-Spektrum werden am Varian VNMR5 900 MHz (21,1 T) aufgenommen. Dieses Gerät ist mit einem HCN-Tripelresonanz ColdProbe Probenkopf ausgestattet und läuft mit der Software VnmrJ 4.0. Die 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektren für die Titration von VpU-HIS gegen DPC werden am Varian VNMR5 800 MHz (18,8 T) gemessen. Dieses Gerät ist mit einem HCN-Tripelresonanz ColdProbe Probenkopf ausgestattet und läuft mit der VnmrJ 2.3A Software. Das 3D TROSY-HN(CA)CO-Spektrum, das 3D TROSY-HN(CO)CACB-Spektrum, das 3D-TROSY-HN(CO)CA-Spektrum, das 3D-TROSY-HNCO-Spektrum, das 3D HNCO-Spektrum, das 3D CBCA(CO)NH-Spektrum und das 3D HBHA(CO)NH-Spektrum werden wegen der günstigeren Relaxationseigenschaften von ^{13}C O bei niedrigen Feldstärken am Bruker Avance III HD 600 MHz (14,1 T) gemessen. Dieses ist mit einem TCI CryoProbe Probenkopf ausgestattet und läuft unter der TopSpin 3.2 Software. Die Unterdrückung der $^1\text{H}_2\text{O}$ -Resonanz erfolgt durch Kohärenzselektion mit gepulsten Feldgradienten [60, 112] und mit Water Flip-Back [43], zur Quadraturdetektion dient dementsprechend die Echo/Antiecho-Technik [60, 112] in der indirekten Dimension bzw. die States-TPPI-Methode [80, 128] in der anderen indirekten Dimension. Zur ^{15}N -Entkopplung während der Aufnahme wird die WALTZ-16-Sequenz [115] eingesetzt.

Die NMR-Spektren werden mit dem Softwarepaket NMRPipe [22] prozessiert. Zur Verbesserung der Auflösung wird der FID in der ^{15}N -Dimension und teilweise auch in der ^{13}C -Dimension durch Linear Prediction [6] auf maximal die doppelte Länge extrapoliert. Nach Apodisierung durch Multiplikation mit einer um 60° bis 90° verschobenen Sinusquadratfunktion wird der FID in allen Dimensionen durch einfaches bis doppeltes Zero-Filling [15] verlängert, fouriertransformiert und phasenkorrigiert. Schließlich wird die Basislinie in der direkten Dimension mit dem modellfreien Median-Algorithmus [36] korrigiert. Die chemischen Verschiebungen der ^1H -Kerne sind über die $^1\text{H}_2\text{O}$ -Resonanz von 4,630 ppm bei $40,0^\circ\text{C}$ relativ zu 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS) in D_2O als externem Standard referenziert, die der anderen Kerne indirekt über die relativen Nullpunkts-

Tabelle 3.19: Aufnahme- und Prozessierungsparameter der verwendeten NMR-Experimente für VpU-HIS (obere Tabelle) und HIS-BST2tmcyt (untere Tabelle). sw₁ bis sw₃: aufgenommene spektrale Weite in der jeweiligen Dimension, t₁ bis t₃: aufgenommene komplexe Punkte in der jeweiligen Dimension, nt: Anzahl der Wiederholung der Experimente, d1: Delayzeit zwischen zwei Experimenten, mix: Mischzeit in NOESY-Experimenten, ¹⁵N/¹³C: Trägerfrequenz für den jeweiligen Kern, ω₁ bis ω₃: Anzahl der komplexen Datenpunkte nach Prozessierung in der jeweiligen Dimension.

Experimente	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
VpU-HIS	[ppm]	[Pkt]	[ppm]	[Pkt]	[ppm]	[Pkt]		[s]	[ms]	[ppm]	[ppm]	[Pkt]	[Pkt]	[Pkt]
2D [¹ H- ¹⁵ N]-TROSY	29,0	128	(¹⁵ N) 16,0	1536	(¹ H) -	-	32	2,0	-	118,0	-	512	4096	-
2D [¹ H- ¹⁵ N]-TROSY	29,0	128	(¹⁵ N) 16,0	1536	(¹ H) -	-	64	1,25	-	116,5	-	512	4096	-
3D TROSY-HNCA	25,0	72	(¹³ C) 26,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 8	2,2	-	119,6	56,5	256	128	2048
3D TROSY-HNCACB	54,0	64	(¹³ C) 26,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 16	2,0	-	119,5	43,0	256	128	2048
3D TROSY-HNCO	12,0	32	(¹³ C) 26,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 8	2,0	-	119,2	176,0	128	128	2048
3D TROSY-HN(CO)CA	26,0	42	(¹³ C) 26,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 16	2,0	-	119,2	56,8	256	128	2048
3D TROSY-HN(CO)CACB	52,0	64	(¹³ C) 26,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 16	2,0	-	119,3	42,2	256	128	2048
3D TROSY-HN(CA)CO	12,0	32	(¹³ C) 26,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 24	2,0	-	119,3	176,0	128	128	2048
Experimente	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
HIS-BST2tmcyt	[ppm]	[Pkt]	[ppm]	[Pkt]	[ppm]	[Pkt]		[s]	[ms]	[ppm]	[ppm]	[Pkt]	[Pkt]	[Pkt]
2D [¹ H- ¹⁵ N]-HSQC	29,0	128	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) -	-	64	1,25	-	117,9	-	512	4096	-
2D [¹ H- ¹⁵ N]-TROSY	29,0	128	(¹⁵ N) 16,0	1536	(¹ H) -	-	64	1,25	-	117,4	-	512	4096	-
3D [¹ H- ¹⁵ N]-NOESY-TROSY	12,0	128	(¹ H) 25,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1536	(¹ H) 16	1,05	120	116,5	-	256	128	4096
3D CBCA(CO)NH	59,0	48	(¹³ C) 25,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 32	1,0	-	116,5	46,5	128	128	2048
3D HBHA(CO)NH	6,0	60	(¹ H) 25,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 32	1,0	-	116,5	-	128	128	2048
3D HNCA	24,0	64	(¹³ C) 25,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 24	1,0	-	116,5	56,0	128	128	2048
3D BEST-TROSY-HNCACB	58,0	60	(¹³ C) 25,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1536	(¹ H) 48	0,4	-	116,0	46,0	128	128	4096
3D HNCO	15,0	40	(¹³ C) 25,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 16	1,0	-	116,5	176,0	128	128	2048
3D TROSY-HNCA	24,0	64	(¹³ C) 25,0	32	(¹⁵ N) 16,0	1024	(¹ H) 24	1,0	-	116,5	58,0	128	128	2048

frequenzen 0,251449530 für ^{13}C -Kerne bzw. 0,101329118 für ^{15}N -Kerne [81]. Die Aufnahme- und Prozessierungsparameter der verwendeten NMR-Experimente sind der Tabelle 3.19 zu entnehmen.

3.14.3 Resonanzzuordnung

Für die Bestimmung der räumlichen Strukturen und dynamischen Eigenschaften des gemessenen Proteins muss eine Zuordnung der einzelnen Resonanzen unter Verwendung der NMR-Spektren zu den dazugehörigen Atomen erfolgen. 3D Experimente erlauben es, die H^{N} und N Resonanzfrequenzen eines $\text{H}^{\text{N}}\text{N}$ -Korrelationspeaks einer Rückgratamidgruppe den Resonanzen weiterer Kerne der gleichen oder einer sequenziell benachbarten Aminosäure in wohldefinierter Weise zuzuordnen. So erhält man durch die Kombination geeigneter 3D Experimente Resonanzsätze für einzelne Aminosäuren sowie Informationen zur sequenziellen Verknüpfung mit benachbarten Aminosäuren. Zunächst wird ein 2D [^1H - ^{15}N]-HSQC-Spektrum [157] bzw. ein 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektrum [19] aufgenommen. Diese Spektren zeigen die $\text{H}^{\text{N}}\text{N}$ -Korrelationspeaks der Aminosäuren im Protein. Unter Verwendung dieser Korrelationspeaks können die Aminosäuren über verschiedene 3D NMR-Experimente zugeordnet werden. Mit dem 3D HNCA- [42] bzw. 3D TROSY-HNCA-Spektrum [155] können die Amidresonanzen H^{N} und N mit den Resonanzen des C^{α} Atoms der betrachteten Aminosäure ($\text{H}_i^{\text{N}}/\text{N}_i \leftrightarrow \text{C}_i^{\alpha}$) als auch der vorhergehenden Aminosäure ($\text{H}_i^{\text{N}}/\text{N}_i \leftrightarrow \text{C}_{i-1}^{\alpha}$) korreliert werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Kopplung zur vorhergehenden Aminosäure schwächer ist und somit in der Regel zu einem Korrelationspeak von geringerer Intensität führt im Vergleich zum Signal des C^{α} der betrachteten Aminosäure. Im 3D TROSY-HNCACB- [155] bzw. 3D BEST-TROSY-HNCACB-Spektrum [31,125] werden die Amidresonanzen H^{N} und N mit den C^{α} - und C^{β} -Resonanzen der betrachteten Aminosäure ($\text{H}_i^{\text{N}}/\text{N}_i \leftrightarrow \text{C}_i^{\alpha}/\text{C}_i^{\beta}$) als auch der vorherigen Aminosäure ($\text{H}_i^{\text{N}}/\text{N}_i \leftrightarrow \text{C}_{i-1}^{\alpha}/\text{C}_{i-1}^{\beta}$) korreliert. Die C^{α} -Korrelationssignale unterscheiden sich hierbei von den C^{β} -Korrelationssignalen durch das entgegengesetzte Vorzeichen. Auch hier

unterschieden sich die Korrelationssignale der vorhergehenden Aminosäure in der Regel durch ihre geringere Intensität von denen der betrachteten Aminosäure. Das 3D CBCA(CO)NH-Spektrum [43, 86] zeigt die C_{i-1}^{α} und C_{i-1}^{β} Korrelationssignale zur vorhergehenden Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_{i-1}^{\alpha}/C_{i-1}^{\beta}$) an. Das 3D TROSY-HN(CO)CA-Spektrum [155] zeigt die C_{i-1}^{α} Korrelationssignale zur vorhergehenden Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_{i-1}^{\alpha}$). Das 3D TROSY-HN(CO)CACB-Spektrum [155] wird dominiert durch die C_{i-1}^{β} Korrelationssignale zur vorhergehenden Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow C_{i-1}^{\beta}$). Die Zuordnung der Carbonylkohlenstoff-Resonanzen CO_{i-1} der vorhergehenden Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow CO_{i-1}$) erfolgt unter Verwendung eines 3D HNCO- [42] bzw. 3D TROSY-HNCO-Spektrum [154]. Die CO_i -Resonanzen der betrachteten Aminosäure ($H_i^N/N_i \leftrightarrow CO_i$) werden durch ein 3D TROSY-HN(CA)CO-Spektrum [155] zugeordnet. Zusätzlich zeigt dieses Spektrum auch intensitätsschwache CO_{i-1} Korrelationen ($H_i^N/N_i \leftrightarrow CO_{i-1}$). Über ein 3D HBHA(CO)CA-Spektrum [43, 86] werden die H_{i-1}^{α} und H_{i-1}^{β} Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure zugeordnet ($H_i^N/N_i \leftrightarrow H_{i-1}^{\alpha}/H_{i-1}^{\beta}$). Das 3D [$^1H, ^{15}N$]-NOESY-TROSY-Spektrum [19, 157] verknüpft die H^N N-Korrelationspeaks der Rückgratamidgruppe mit allen Wasserstoffen in ihrer Nähe, deren Abstand vom H^N ca. 5 Å nicht überschreitet. Die Intensität der NOESY-Kreuzpeaks ist proportional zu r^{-6} , wobei r der Abstand der beiden Protonen ist, welche Anlass für den Kreuzpeak geben.

3.14.4 Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen

Die Interaktion von Proteinen miteinander kann mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden. Es ist möglich, die Bindestellen zu identifizieren, an denen die Proteine miteinander interagieren [159]. Zudem lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob es sich bei der Bindung um einen langsamen, schnellen oder intermediären Austausch bezüglich der jeweiligen NMR-Zeitskala handelt. Für die Messung wird zunächst ein 2D [$^1H, ^{15}N$]-TROSY-Spektrum des mindestens $^1H\text{-}^{15}N$ -markierten Zielproteins aufgenommen. Anschließend wird schrittweise ein, im identischen Puffer wie das Zielprotein befindli-

ches, nicht markiertes Ligand-Protein hinzutitriert. Nach jedem Schritt wird erneut ein 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektrum aufgenommen. Durch die Bindung des Liganden ändert sich die chemische Umgebung und damit die chemische Verschiebung von Kernen der Aminosäuren des Zielproteins, die an der Bindung beteiligt sind. Handelt es sich bei der Interaktion der beiden Proteine um einen langsamen Austausch, so kommt es im Zuge der Titration zu einer Abnahme der Intensität der Korrelationspeaks jener Aminosäuren der freien, ungebundenen Variante des markierten Proteins, die sich in der Nähe der Bindestelle des Liganden befinden. Gleichzeitig erscheinen neue Kreuzsignale für die gleichen Aminosäuren, die jedoch der gebundenen Variante zuzuordnen sind. Je höher die Ligandkonzentration, desto schwächer wird die Intensität der Signale der freien Variante und desto stärker werden die Signale der gebundenen Variante. Bei Sättigung der Bindung ist das Signal der freien Variante dann gänzlich verschwunden. Handelt es sich bei der Interaktion des Proteins und des Ligands um einen schnellen Austausch, so ändert sich die chemische Verschiebung der Resonanzsignale von Kernen die sich in räumlicher Nähe der Bindestelle befinden mit jedem Titrations-schritt bis die Sättigung der Bindung erreicht ist. Die Austauschrate k der beobachteten Protein-Ligand Wechselwirkung ist beim schnellen Austausch viel größer und beim langsamen Austausch viel kleiner als die Differenz (in Hz) der Resonanzfrequenzen der an der Bindung beteiligten Kerne im gebundenen im Vergleich zum freien Zustand. Beim intermediären Austausch beobachtet man im Zuge der Titration für die an der Bindung beteiligten Kerne eine Mischung aus Resonanzfrequenzänderung und Signalverbreiterung, eventuell auch das Verschwinden der Signale. In diesem Fall liegt die Austauschrate k in der Nähe der Differenzen (in Hz) der Resonanzfrequenzen der an der Bindung beteiligten Kerne im freien bzw. gebundenen Zustand. Die Änderung der chemischen Verschiebung (CSP, engl.: chemical shift perturbation) der ^1HN - und ^{15}N -Kerne von Proteinrückgratamidgruppen infolge einer Ligandenbindung wird häufig durch folgende empirische Formel [124] ausgedrückt:

$$CSP = \sqrt{(\Delta\sigma \text{ } ^1\text{H}^N)^2 + \frac{1}{5} (\Delta\sigma \text{ } ^{15}\text{N})^2} \quad (3.3)$$

In die Berechnung gehen die Differenzen $\Delta\sigma$ der chemischen Verschiebungen der ^1HN - und ^{15}N -Kerne der gleichen Aminosäure des Zielproteins im freien und im Ligand-gebundenen Zustand ein. Die Aminosäuren des Zielproteins mit den größten CSP-Werten befinden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in räumlicher Nähe der Ligandenbindestelle. Allerdings können Konformationsänderungen des Proteins infolge der Ligandenbindung auch zu signifikanten CSP-Werten abseits der Bindestelle führen.

3.14.5 Ableitung der Sekundärstruktur mit TALOS-N

In dieser Arbeit wird die Sekundärstruktur der untersuchten Proteine unter Berücksichtigung der isotropen chemischen Verschiebung ihrer $^{13}\text{C}^\alpha$, ^{13}CO , $^{13}\text{C}^\beta$, $^1\text{H}^N$, ^{15}N und $^1\text{H}^\alpha$ Kerne abgeleitet. Hierbei wird genutzt, dass $^{13}\text{C}^\beta$ Resonanzfrequenzen in α -helikalen Bereichen, im Vergleich zu unstrukturierten Bereichen, tendenziell hochfeldverschoben (niedrigere ppm), in β -Faltblatt Strukturen hingegen tendenziell tiefeldverschoben (höhere ppm) sind. Bei $^{13}\text{C}^\alpha$ und ^{13}CO Resonanzfrequenzen findet man entgegengesetzte Tendenzen [149]. Für die Auswertung wird das Programm TALOS-N [118] verwendet. Dieses Programm sagt die Rückgrattorsionswinkel ϕ und ψ des untersuchten Proteins mit Hilfe der gemessenen chemischen Verschiebungen und eines neuronalen Netzwerkes, welches unter Verwendung von NMR- und Strukturdaten von 580 Proteinen trainiert wurde, vorher. Dabei wird zunächst für alle betrachteten Kerne einer gegebenen Aminosäure die Differenz ($\Delta\delta = \delta - \delta_{rc}$) der gemessenen chemischen Verschiebung (δ) und der entsprechenden archivierten Verschiebung (δ_{rc}), die typisch für unstrukturierte Bereiche ist, berechnet [148]. Die Differenz wird dann benutzt, um durch das neuronale Netzwerk auf Basis von Datenbanken, die insgesamt ca. 10000 Proteine umfassen, die Torsionswinkel ϕ und ψ abzuleiten. Un-

ter Berücksichtigung der Art und der gemessenen chemischen Verschiebungen der benachbarten Aminosäuren wird schließlich die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer α -Helix bzw. eines β -Faltblattes auf einer Skala von -1 bis 1 für jede Aminosäure angegeben [118]. Werte im Bereich von 0,5 bis 1 definieren Aminosäuren in α -Helices, Werte von -0,5 bis -1 solche in β -Faltblättern. Aminosäuren mit Werten zwischen -0,5 und 0,5 werden als unstrukturiert angesehen. Für diese unstrukturierten Bereiche wird die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer α -Helix bzw. eines β -Faltblattes manuell auf den Wert 0 gesetzt. Bei Vorliegen experimenteller chemischer Verschiebungen sagt TALOS-N für mehr als 90% aller analysierten Aminosäuren Torsionswinkel ϕ und ψ vorher, und zwar mit einer Fehlerquote von weniger als 3,5% [118]. TALOS-N kann unter Umständen auch für Proteinbereiche ohne experimentelle chemische Verschiebungen eine Sekundärstrukturvorhersage treffen. Dies geschieht über ein weiteres implementiertes neuronales Netzwerk, welches auf eine Datenbank mit experimentell bestimmten Torsionswinkeln für Oligopeptide zugreift. In diesem Fall liegt die statistische Zuverlässigkeit der getroffenen Sekundärstrukturvorhersagen bei 81% [118].

Gleichzeitig gibt das Programm TALOS-N einen Rückgrat-Ordnungsparameter aus, der angibt wie flexibel die einzelnen Aminosäuren sind. Hierzu wird zunächst der RCI (engl.: random coil index) berechnet [9].

$$\text{RCI} = \left(A|\Delta\delta_{C\alpha}| + B|\Delta\delta_{CO}| + C|\Delta\delta_{C\beta}| + D|\Delta\delta_N| + E|\Delta\delta_{H^N}| + F|\Delta\delta_{H\alpha}| \right)^{-1} \quad (3.4)$$

Hierbei handelt es sich um die inverse gewichtete Summe der Differenzen der beobachteten chemischen Verschiebungen der $^{13}\text{C}\alpha$, ^{13}CO , $^{13}\text{C}\beta$, $^1\text{H}^N$, ^{15}N und $^1\text{H}\alpha$ Kerne, im Vergleich zu den statistischen Durchschnittswerten der chemischen Verschiebungen des jeweiligen Aminosäuretyps in unstrukturierten Proteinbereichen. Die Gewichtungsfaktoren A, B, C, D, E und F variieren je nach verwendeten chemischen Verschiebungen und können der RCI Online Hilfe² entnommen werden. Aus diesem Wert wird der Ordnungsparameter

²<http://randomcoilindex.com/rci/talbe1.html>

RCI-S² errechnet [9].

$$\text{RCI-S}^2 = 1 - 0,5 \ln(1 + 10,0 \text{ RCI}) \quad (3.5)$$

Die ausgegebenen Werte liegen im Bereich zwischen 0 und 1. Die Aminosäuren für die ein RCI-S² unter 0,85 berechnet wird, werden als flexibel angesehen [10].

Kapitel 4

Experimente und Ergebnisse

Das folgende Kapitel „Experimente und Ergebnisse“ beschreibt die Herstellung und Reinigung der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne des humanen BST2 (HIS-BST2tmcyt, Kap.: 4.1) und des Volllängen-Proteins HIV-1 VpU (VpU-HIS, Kap.: 4.2). Zudem werden die strukturellen Studien, welche in dieser Arbeit durchgeführt worden sind, vorgestellt. Darüber hinaus zeigt es die Ergebnisse der, auf NMR-spektroskopischen Messungen beruhenden, Bindungsstudien dieser beiden Proteine (Kap.: 4.3). Abschließend wird die Herstellung von elektrostatisch geladenen Nanodiscs beschrieben (Kap.: 4.4).

Für die Herstellung von HIS-BST2tmcyt und VpU-HIS wurde im Zuge dieser Arbeit die *E. coli*-basierte zellfreie Proteinsynthese in unserem Labor etabliert. Dies war nötig, da es sich bei beiden Proteinen um in *E. coli* schwer zu exprimierende Proteine handelt. Die zellfrei hergestellten Proteine wurden in ständiger Anwesenheit von DPC-Mizellen über Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die ständige Anwesenheit von Mizellen stellte sicher, dass die Proteine naturnah gefaltet vorliegen und verhinderte, dass die Proteine präzipitieren. Die gereinigten Proteine wurden unter Verwendung von NMR-spektroskopischen Untersuchungen strukturell charakterisiert. Auch die Wechselwirkung zwischen HIS-BST2tmcyt und VpU-HIS wurde mit NMR-Spektroskopie charakteri-

siert. Zudem wird gezeigt, dass die Sekundärstruktur der zytoplasmatischen Domäne des VpU-HIS abhängig von der Mizellenkonzentration im Puffer ist. Abschließend wird die Etablierung der Herstellung von elektrostatischen geladenen Nanodiscs beschrieben, welche bei weiterführenden Experimenten die in dieser Arbeit verwendete Mizelle als Membranmodell ersetzen könnten.

4.1 Das humane BST2mcyt

4.1.1 Synthese und Reinigung des rekombinanten Proteins HIS-BST2mcyt

4.1.1.1 Zellfreie Synthese des HIS-BST2mcyt

Für die Synthese des HIS-BST2mcyt Proteins mit Hilfe der *E. coli*-basierten zellfreien Proteinsynthese wurde ein Konstrukt aus Transmembran- und zytoplasmatischer Domäne des BST2 konzipiert. Die in der Originalamino-säuresequenz enthaltenen zwei Cysteine (C9 und C20) wurden durch Serine ersetzt. N-terminal enthält das Konstrukt eine Schnittstelle für die Protease des Tobacco Etch Virus (TEV-Protease) und einen His-Tag für die spätere Reinigung über eine Affinitätschromatographie. Das so erhaltene Protein wird im Folgenden HIS-BST2mcyt genannt (Abb.: 4.1). Über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* wurde die für das Konstrukt kodierende DNA-Sequenz in den pET22b_deltaLac Vektor kloniert.

Um die Präzipitation dieses Membranproteins zu verhindern, war die Gegenwart von Detergenzien während der zellfreien Synthese erforderlich. Zur Ermittlung des Detergens mit der optimalen Proteinausbeute in Relation zu den anfallenden Kosten wurden 60 µl Reaktionsansätze verwendet. Getestet wurden 0,1% Brij35, 1,5% Brij-58, 1% DPC und 1% DHPC. Das Ergebnis der Synthese wurde mittels Western-Blot ausgewertet (Abb.: 4.2). Dabei stellte sich 1,5% Brij58 als optimal heraus. Die Proteinausbeute war hier zwar vierfach geringer als beim DHPC, jedoch ist Brij58 in der Anschaffung ca. 575-mal günstiger (1 g Brij58 = 0,06 €, 1 g DHPC = 345 €). Die Mehrkosten durch das

		1	14
MGHHHHHHHHH	HHDYDIPTTE	NLYFQ MAST	SYDYSR VPME
10	20	30	40
24	34	44	51
DGDKRSK LLLL	GIGILV LLII	VILGV PLIIF	TIK ANSE
50	60	70	77

Abbildung 4.1: Aminosäuresequenz des HIS-BST2tmcyt Proteins im Einbuchstaben-Aminosäure-Kode, welches auf dem Plasmid pET22b_deltaLac_BST2tmcyt kodiert ist. Es enthält einen His₁₀-Tag (AS: 3-12, blau) und eine TEV-Schnittstelle (AS: 20-26, rot). Die Sequenz der zytoplasmatischen und der Transmembran-Domäne des BST2 (AS: 27-77) ist fettgedruckt dargestellt. Dieser Proteinabschnitt wird im folgenden BST2tmcyt genannt. Die fettgedruckten Zahlen oberhalb der Sequenz geben die Position der Aminosäuren im Protein BST2 an.

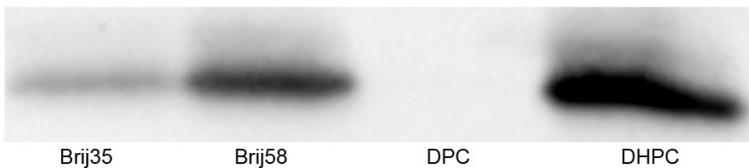


Abbildung 4.2: Western-Blot des Detergens-Vergleichs für die Synthese von HIS-BST2tmcyt. Von den Brij-Varianten war Brij-58 die mit der höheren Proteinausbeute. DPC verhinderte die Synthese. DHPC hatte die höchste Proteinausbeute.

DHPC hätten sich durch die Ersparnisse durch die vergleichsweise höhere Ausbeute an Protein nicht amortisiert. Die Herstellung des Proteins fand im 3 ml Reaktionsansatz bei 30 °C für 18 h statt.

4.1.1.2 Reinigung des HIS-BST2tmcyt

Die Reinigung des HIS-BST2tmcyt wurde in zwei Schritten durchgeführt. Der erste Schritt bestand aus einer Affinitätschromatografie über eine Ni²⁺NTA-Säule. Der zweite Schritt war eine Größenausschlusschromatografie über eine SD200 10/300 GL Säule. Bei diesen Schritten wurde das Brij58, das dazu diente, das Protein während der Synthese in Lösung zu halten, durch intensive Waschschriffe mit DPC-haltigem Puffer entfernt und gegen DPC

ausgetauscht. Durch die mechanische Belastung der inneren Reaktionskammer während der Synthese, wurde diese in ca. 10% der Reaktionen undicht. Dadurch gelangte Protein aus dem inneren Reaktionsmedium (RM) ins äußere Fütterungsmedium (FM). Um dieses Protein nicht zu verlieren, wurde als erstes das Fütterungsmedium auf eine 2 ml Ni²⁺NTA-Säule gegeben. Der Durchfluss (FMD) wurde aufgefangen. Nach einem anschließenden Waschschritt (FMW) mit 20 ml Puffer I (Tab.: 4.1) wurde das eventuell vorhandene Protein mit 10 ml Puffer I + 500 mM Imidazol vom Säulenmaterial eluiert (FME). Das Säulenmaterial wurde anschließend durch Waschen mit 20 ml Puffer I regeneriert. War dies geschehen, konnte das Reaktionsmedium auf die Säule gegeben werden. Der Durchfluss (RMD) wurde aufgefangen. Nach einem intensiven Waschschritt (RMW) mit 20 ml Puffer I wurde das auf der Säule verbliebene Protein mit 10 ml Puffer I + 500 mM Imidazol eluiert (RME). Zur Kontrolle der Affinitätschromatografie wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung durchgeführt (Abb.: 4.3). Verwendet wurden 10 µl Aliquots vom FM, FMD, FMW, FME, RM, RMD, RMW und RME. Dabei wurden RM und RMD in einer Verdünnung von 1:100 und RMW in einer Verünnung von 1:10 verwendet. Bei funktionierender Reinigung befand sich das Protein im RME. War Protein bei der Synthese in das FM gelangt, so befand sich ebenfalls Protein im FME. Für den zweiten Reinigungsschritt, die Größenausschlusschromatografie, wurden die proteinhaltigen Fraktionen, RME und ggf. FME, vereint und unter Verwendung eines Vivaspin20 Konzentrators mit einem MWCO von 3 kDa auf 1 ml reduziert. Diese konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine zuvor mit Puffer II (Tab.: 4.1) equilibrierte SD200 10/300 GL Säule gegeben. Die Trennung der verschiedenen Proteine erfolgte unter einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 500 ml/min. Der Durchfluss wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Da das HIS-BST2tmyc keine Tryptophane beinhaltet, zeigt es kaum Absorption bei 280 nm und somit nur einen vergleichsweise kleinen Peak im Chromatogramm (Abb.: 4.4). Darum musste eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung von den einzelnen Fraktionen der Größenausschlusschromatografie durchführt werden. Benutzt wurden 10 µl Aliquots der proteinhaltigen 1 ml Fraktio-

nen von 11,5 ml bis 18,5 ml. HIS-BST2tmcyt war in den Fraktionen 14,5 ml und 15,5 ml vorhanden. Diese Fraktionen wurden vereint und mittels eines Vivaspin2 Konzentrators mit einem MWCO von 3 kDa von 2 ml auf 200 μ l eingengt. Zur Bestimmung des DPC- und Proteingehaltes wurden 2 μ l einer 1:5 Verdünnung im Direct Detect IR Spektrometer gemessen. Die DPC-Konzentration lag hierbei meist zwischen 80 und 100 mM. Um die für die NMR-Messung optimale DPC-Konzentration von 500 mM zu erreichen, wurde deuteriertes DPC aus einer 1 M Stammlösung in NMR-Puffer mit 30% (v/v) D₂O hinzugegeben. Die so entstandene Probe konnte ohne weitere Behandlung für Messungen am NMR-Spektrometer verwendet werden. Für die NMR-Experimente wurde doppelmarkiertes [U-¹⁵N;U-¹³C] HIS-BST2tmcyt verwendet, einzige Ausnahme war die Titration des markierten VpU-HIS mit unmarkiertem HIS-BST2tmcyt (Kap.: 4.3.2).

Tabelle 4.1: Puffer zur Reinigung von synthetisierten Proteinen

Puffer I	Puffer II
20 mM NaPi, pH 7	20 mM NaPi, pH 7
100 mM NaCl	100 mM NaCl
3 mM DPC	3 mM DPC
	3 mM EDTA

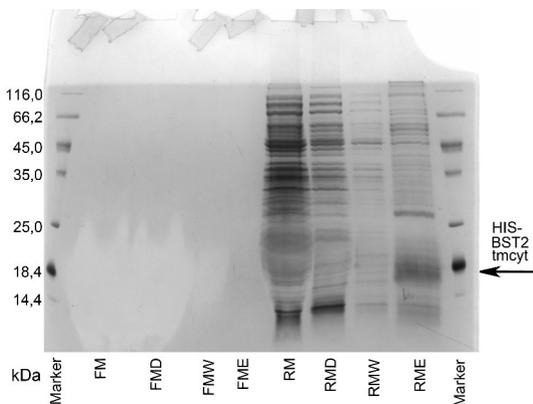


Abbildung 4.3: Ein durch Silberfärbung gefärbtes Gel der Ni²⁺-NTA-Fractionen. In diesem Fall enthielt das FM kein HIS-BST2tmcyt. Das durch den Pfeil markierte HIS-BST2tmcyt lief bei 17 kDa und befand sich im Eluat des Reaktionsmediums (RME).

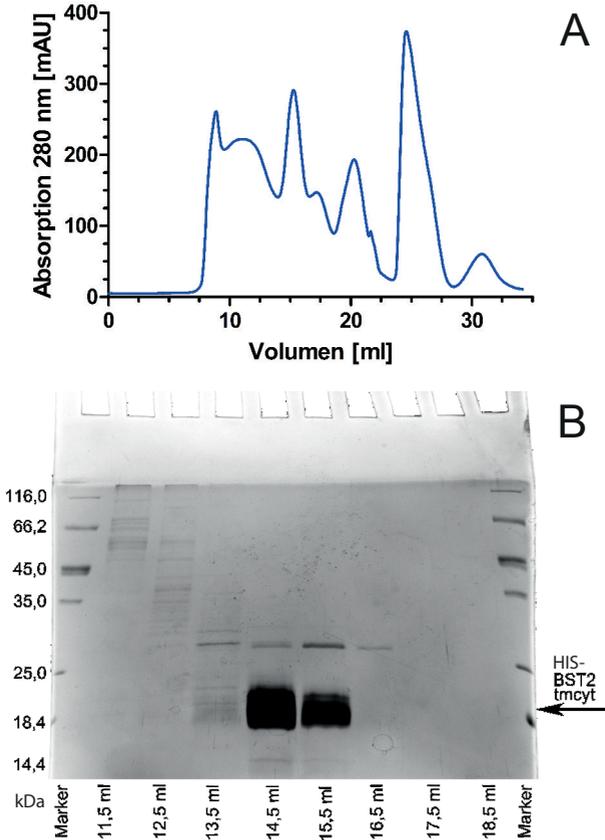


Abbildung 4.4: **A:** Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatografie des HIS-BST2tmyc. Bei 20 ml befindet sich der Peak des überschüssigen DPC, bei 25 ml der des Imidazols. Das HIS-BST2tmyc hatte, aufgrund des Nichtvorhandenseins eines Tryptophans, bei einer Wellenlänge von 280 nm kaum Signal. **B:** Silberfärbung der proteinhaltigen Fraktionen. Die Fraktionen 14,5 ml und 15,5 ml enthielten das HIS-BST2tmyc, welches auf der Abbildung mit einem Pfeil markiert wurde.

4.1.2 NMR-Spektroskopie an HIS-BST2tmcyt in DPC-Mizellen

4.1.2.1 2D NMR-Spektroskopie an HIS-BST2tmcyt

Als erstes wurde zur Charakterisierung des BST2tmcyt ein 2D [^1H - ^{15}N]-HSQC-Spektrum aufgenommen (Abb.: 4.5). Ausgehend von den 77 Aminosäuren in der Proteinsequenz (Abb.: 4.1) sind 63 [^1H - ^{15}N]-Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen im HSQC-Spektrum zu erwarten (77 Aminosäuren abzüglich der drei Proline, die kein Amidproton besitzen, den 10 Histidinen des His-Tags, die bei pH 7,0 nicht zu sehen sind, und der N-terminalen Aminosäure, die aufgrund von chemischem Austausch nicht sichtbar ist). Zu erkennen sind 65 Rückgratkorrelationssignale, was auf ein zusätzliches Konformer hinweist.

4.1.2.2 Sequenzielle Resonanzzuordnung

Anhand der NMR-Messungen wurden die chemischen Verschiebungen der H^{N} , N, CO, C^{α} , C^{β} , H^{α} und H^{β} Resonanzen der einzelnen Aminosäuren des HIS-BST2tmcyt bestimmt. (Kap.: 3.14.3). Dies geschah unter Verwendung des Programmes CcpNmr. Zunächst erfolgte eine Zuordnung der im 2D [^1H - ^{15}N]-HSQC-Spektrum zu sehenden H^{N} N-Korrelationspeaks der Rückgratamidgruppen zu den Aminosäuren des HIS-BST2tmcyt. Dies gelang unter Verwendung eines 3D HNCA-, eines 3D HNCACB-, eines 3D CBCA(CO)NH- und eines 3D BEST-TROSY-HNCACB-Spektrums (Abb.: 4.6). Von den 65 vorhandenen Korrelationspeaks der Rückgratamidgruppen im 2D HSQC-Spektrum konnten 50 Signale der Aminosäuresequenz des BST2tmcyt zugeordnet werden. Dabei liegen das N49 und S50 doppelt vor. Außer den naturgemäß fehlenden Signalen der Proline P12 und P40 ließ sich auch das Arginin R19 im HSQC nicht zuordnen. Somit wurden 48 (94,1%) der 51 Aminosäuren des BST2tmcyt im 2D [^1H - ^{15}N]-HSQC-Spektrum identifiziert (Abb.: 4.7). Die restlichen 15 Signale im 2D [^1H - ^{15}N]-HSQC-Spektrum konnten dem N-terminalen Überhang (Abb.: 4.1) zugeordnet werden. Diese Aminosäuren werden bei den weiteren Angaben nicht berücksichtigt. Die folgenden Werte beziehen sich ausschließlich auf den zytoplasmatischen Teil

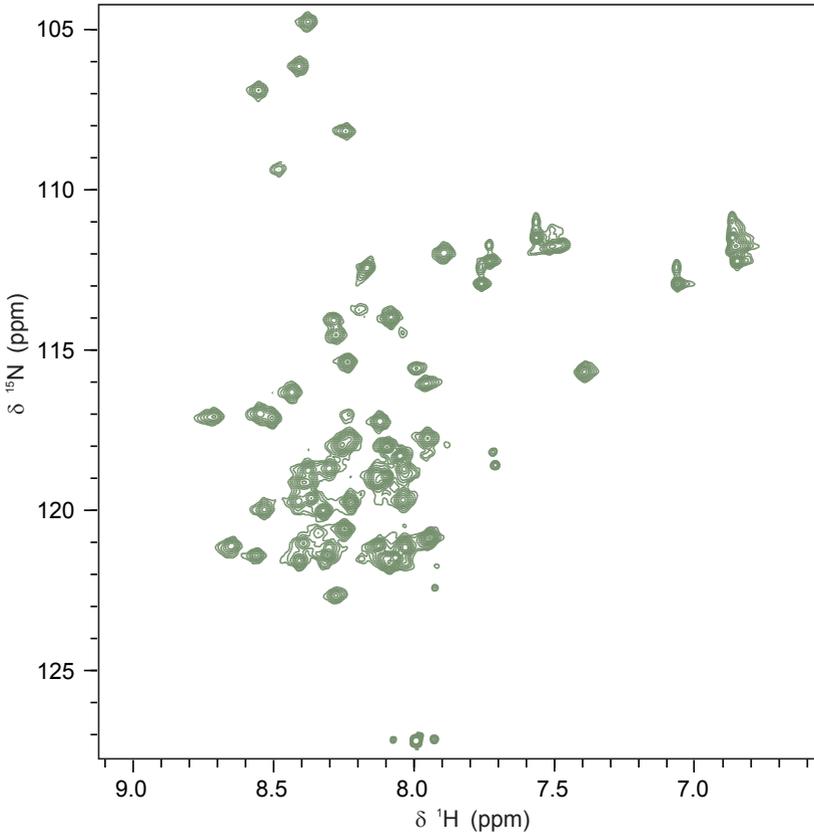


Abbildung 4.5: 2D [^1H - ^{15}N]-HSQC-Spektrum des [^{15}N ; ^{13}C]-HIS-BST2mcyt in DPC-Mizellen. Gemessen bei 40°C und 21,1 T. Puffer: 20 mM NaPi (pH=7,0), 100 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM DTT und 500 mM DPC.

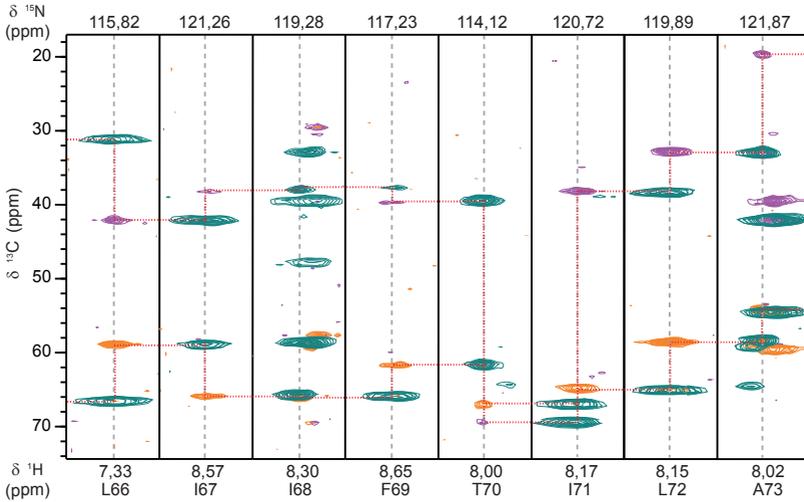


Abbildung 4.6: Sequenzspezifische Zuordnung des Proteinrückgrats des BST2tmcyt mit den Spektren 3D HNCACB (orange und magenta) und 3D CBCA(CO)NH (grün). Es ist der Abschnitt von Leucin 66 bis zum Alanin 73 dargestellt. Die orangen C^α - und die magenta C^β -Korrelationssignale unterscheiden sich durch das Vorzeichen. Die grünen Korrelationssignale zeigen die C^α_{i-1} - und C^β_{i-1} -Atome. Die Konnektivitäten sind durch eine rote gestrichelte Linie verbunden. Die typische Tieffeldverschiebung des Threonin 70 und die Hochfeldverschiebung des Alanin 73, bezüglich derer C^β -Korrelationssignale, sind zu erkennen.

und die Transmembrandomäne des BST2 (BST2tmcyt). Es konnten 48 von 49 erwarteten (98,0%) H^N -Resonanzen und 48 von 51 (94,1%) N-Resonanzen zugeordnet werden. Des Weiteren konnten 50 (98,0%) von 51 C^α - und 45 (95,7%) von 47 C^β -Resonanzen den jeweiligen Aminosäuren zugeordnet werden. Unter Verwendung eines 3D HNCOC-Spektroms konnten 47 (92,2%) der 51 CO-Resonanzen zugeordnet werden. Mittels eines NOESY- und eines 3D HBHA(CO)NH-Spektroms konnten 45 (84,9%) von 53 der H^α - und 43 (58,1%) von 74 H^β -Resonanzen den Aminosäuren zugeordnet werden.

4.1.2.3 Sekundärstrukturanalyse mittels chemischer Verschiebungen

Unter Verwendung des Programmes TALOS-N wurde die Sekundärstruktur des BST2tmcyt abgeleitet (Kap.: 3.14.5). Diese Ableitung beruhte auf den che-

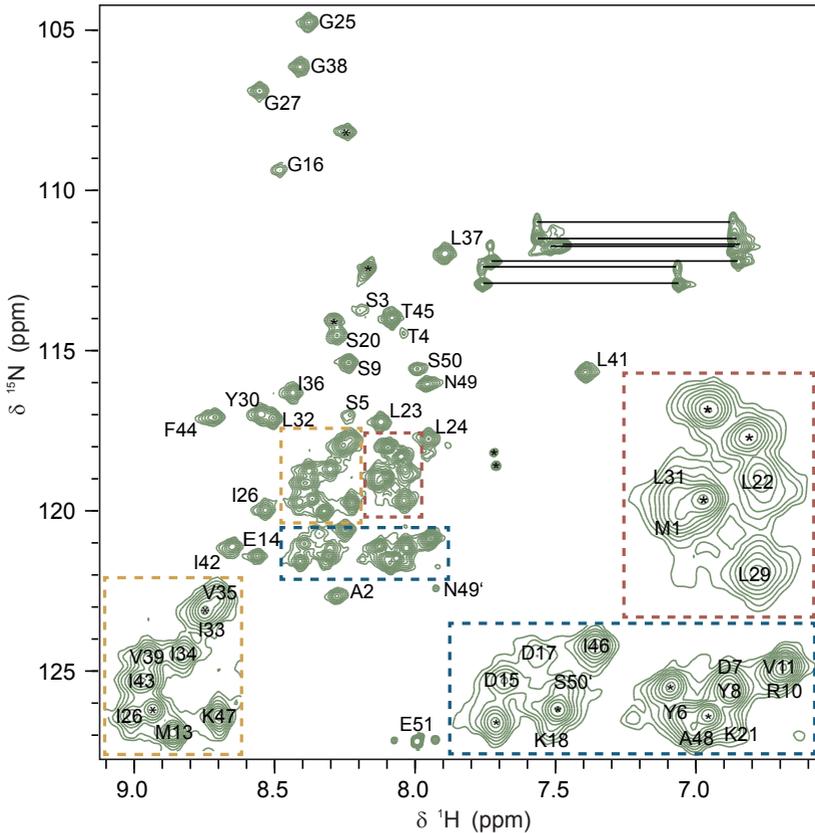


Abbildung 4.7: 2D [^1H - ^{15}N]-HSQC-Spektrum des [^{15}N ; ^{13}C]-HIS-BST2mcyt in DPC-Mizellen. Gemessen bei 40°C und 21,1 T. Die ^1H - ^{15}N -Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen des BST2mcyt wurden zugeordnet und im Einbuchstaben-Aminosäure-Kode beschriftet. Korrelationssignale der Amidogruppen in Seitenketten wurden mit einer durchgezogenen Linie verbunden. ^1H - ^{15}N -Korrelationssignale, die zum N-terminalen Überhang (Abb.: 4.1) gehören, wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Jene die zu den alternativen Aminosäuren des C-Terminus N49' und S50' gehören wurden mit einem (') gekennzeichnet.

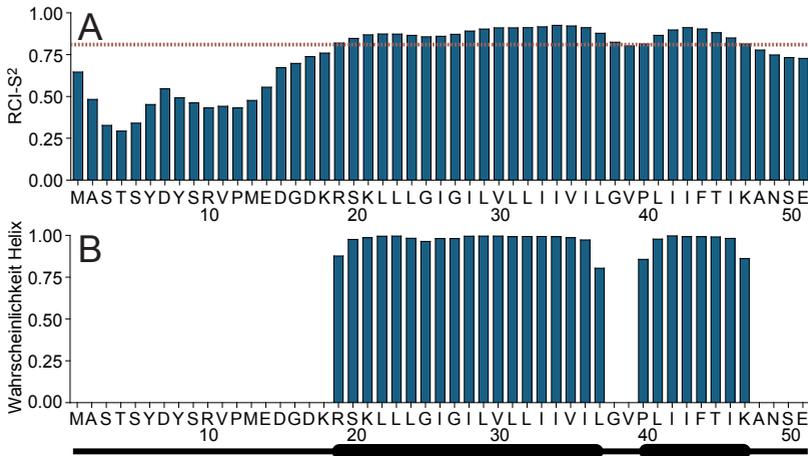


Abbildung 4.8: Mit TALOS-N abgeleitete Sekundärstruktur und Dynamik des BST2tmcyt, unter Verwendung der gemessenen chemischen Verschiebungen. Graph A zeigt den Ordnungsparameter $RCI-S^2$. Aminosäuren mit einem $RCI-S^2$ größer als 0,85 (rote gepunktete Linie) werden als unflexibel angesehen. Graph B zeigt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine betrachtete Aminosäure in einem α -helikalen Bereich liegt. Alle Werte unter 0,5 werden durch das Programm auf 0 herabgesetzt.

mischen Verschiebungen, die durch die NMR-spektroskopischen Messungen ermittelt werden konnten (Kap.: 4.1.2.2). Die durch das Programm berechneten Werte sind in Abbildung 4.8 zu sehen. Wie in Graph A zu erkennen, wurden die Aminosäuren im Bereich vom R19 bis zum G38 als auch im Bereich vom L41 bis zum K47 als unflexibel berechnet. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine Aminosäure Teil einer α Helix ist, ist in Graph B zu sehen. Es werden zwei Bereiche mit Aminosäuren in α -helikaler Strukturanordnung vorhergesagt. Der erste, 19 Aminosäuren lange Bereich reicht vom R19 bis zum L37. Der zweite, acht Aminosäuren lange Bereich reicht vom P40 bis zum K47. Alle übrigen Aminosäuren wurden als unstrukturiert eingestuft. Es wurden keine β -Faltblätter identifiziert.



Abbildung 4.9: Die Abbildung zeigt die Proton-Proton NOE-Korrelationen des BST2tmcyt. Bei $d_{NN}(d_{N\delta}, d_{\delta N})$, $d_{\alpha N}(d_{\alpha\delta})$ und $d_{\beta N}(d_{\beta\delta})$ spiegelt die Stärke der Balken die Intensität der beobachteten NOE-Kreuzpeaks wieder. Bei $d_{\alpha N}(i, i+2)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$ und $d_{\alpha N}(i, i+4)$ verbinden die Balken die jeweils an den NOE-Korrelationen beteiligten Aminosäuren.

4.1.2.4 Sekundärstrukturanalyse mittels NOE

Durch die Auswertung von sekundärstrukturtypischen NOE-Korrelationen lässt sich auf die Sekundärstruktur des Proteins schließen. So lassen starke Korrelationen zwischen sequenziell benachbarten Amidprotonen ($d_{NN}(d_{N\delta}, d_{\delta N})$) auf einen α -helikalen Bereich schließen. Korrelationen zwischen H^α ($d_{\alpha N}(d_{\alpha\delta})$) und H^β ($d_{\beta N}(d_{\beta\delta})$) einer Aminosäure mit dem Amidproton der darauffolgenden Aminosäure werden unabhängig von der Sekundärstruktur sehr häufig beobachtet. Dagegen sind Korrelationen zwischen dem H^α -Atom einer Aminosäure und den H^N -Atomen der weiteren drei folgenden Aminosäuren ($d_{\alpha N}(i, i+2)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$ und $d_{\alpha N}(i, i+4)$) typisch für helikale Bereiche. Abbildung 4.9 zeigt die ermittelten NOE-Korrelationen für das BST2tmcyt. Diese wurden unter Verwendung des Programms CcpNmr ermittelt. Hierzu wurde ein 3D (1H - 1H - ^{15}N)-TROSY-NOESY und ein 3D HBHA(CO)NH-Spektrum verwendet. Korrelationen zwischen benachbarten Amidprotonen ($d_{NN}(d_{N\delta}, d_{\delta N})$) konnten von Aminosäure K21 bis G38 und von Aminosäure L41 bis K47 ermittelt werden. Dies weist auf eine α -Helix in diesem Bereich hin. Zusätzlich treten eine Reihe Helix typischer NOEs zwischen dem H^α der betrachteten Aminosäure und dem H^N der Aminosäure zwei Positionen weiter ($d_{\alpha N}(i, i+2)$), drei Positionen weiter ($d_{\alpha N}(i, i+3)$) und vier Positionen weiter ($d_{\alpha N}(i, i+4)$) im Bereich von Aminosäure S20 bis G38 auf.

4.2 Das HIV-1 VpU

4.2.1 Synthese und Reinigung des rekombinanten Proteins VpU-HIS

4.2.1.1 Zellfreie Synthese des VpU-HIS

Zur Herstellung des HIV-1 VpU unter Verwendung der zellfreien Proteinsynthese wurde ein Plasmid verwendet, welches für das Volllängen-Protein VpU (Isolat SF162) und einen C-terminalen His-Tag kodiert (Abb.: 4.10). Ein entsprechendes Oligonukleotid wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den pET22b_deltaLac-Vektor hineinkloniert.

	10	20	30	40
MQPLQILAIV	ALVVAIIIAI	VVWTIVYIEY	RKILRQKID	
50	60	70	80	
RLIDRITERA	EDSGNESEGD	QEELSALVER	GHLAPWDVDD	
81	89			
LLE	HHHHHH			

Abbildung 4.10: Aminosäuresequenz des VpU-HIS Proteins, welches auf dem pET22b_deltaLac_VpU-HIS Plasmid kodiert ist. Es besteht aus der Sequenz des VpU Proteins (AS: 1-81, **fett**) und einem C-terminalen Überhang, welcher ein His-Tag (AS: 84-89, **blau**) enthält.

Da es sich bei dem VpU-HIS Protein um ein Membranprotein handelt, war die Präsenz eines Detergens nötig, um es während der Synthese nicht ausfallen zu lassen. Um ein geeignetes Detergens zu finden, wurde eine Versuchsreihe mit verschiedenen Detergenzien durchgeführt. Getestet wurden 0,1% Brij35, 1,5% Brij-58, 1% DPC und 1% DHPC. Genutzt wurde hier ein Syntheseansatz mit einem Reaktionsvolumen von 60 µl. Die Ansätze wurden anschließend mittels Western-Blot analysiert (Abb.: 4.11). Die Verwendung von DHPC ergab die größte Proteinausbeute. Von den Brij Varianten eignete sich Brij35, da in dessen Gegenwart 5-mal mehr Protein synthetisiert wurde als in Gegenwart von Brij58. DPC eignete sich nicht für die Synthese des VpU-

HIS, da hier kein Protein synthetisiert wurde. Anhand dieses Ergebnisses wurde Brij35 ausgewählt, da es eine vergleichsweise große Proteinausbeute lieferte und im Vergleich zu DHPC in der Anschaffung ca. 900-mal günstiger ist (1 g Brij35 = 0,04 €, 1 g DHPC = 345 €). Für die präparative Synthese wurde ein Syntheseansatz mit 3 ml Reaktionsvolumen gewählt. Sie fand bei 30 °C statt und dauerte 18 Stunden.

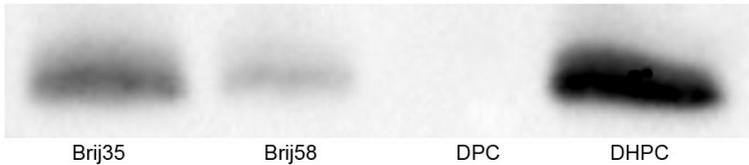


Abbildung 4.11: Western-Blot des Detergenz-Vergleichs für die Synthese von VpU-HIS. Von den Brij-Varianten war Brij-35 die mit der höchsten Proteinausbeute. DPC verhinderte die Synthese. DHPC ergab die vergleichsweise größte Menge an VpU-HIS.

4.2.1.2 Reinigung des VpU-HIS

Auf eine in Puffer I (Tab.: 4.1) equilibrierte 1,5 ml Ni²⁺-NTA Säule wurden zunächst die 50 ml Fütterungsmedium (FM) der Proteinsynthese gegeben. Der Durchfluss (FMD) wurde aufgefangen. Die Säule wurde anschließend mit 20 ml Puffer I gewaschen. Dieser intensive Waschschritt diente sowohl zur Entfernung von nicht gebundenen Proteinen, als auch zum Austausch des Brij-35 gegen DPC. Die Waschfraktion wurde aufgefangen (FMW). Das gebundene Protein wurde anschließend mit 10 ml Puffer I + 500 mM Imidazol eluiert und aufgefangen (FME). Bevor das Reaktionsmedium (RM) auf die Säule gegeben wurde, musste das Imidazol von dieser entfernt werden. Dazu wurde erneut mit 20 ml Puffer I regeneriert. War dies passiert, wurde das Reaktionsmedium (RM) auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen (RMD). Erneut wurden nicht gebundene Proteine entfernt und das Brij-35 gegen DPC ausgetauscht, indem mit 20 ml Puffer I gewaschen wurde (RMWI). Ein weiterer Waschschritt mit Puffer I + 10 mM Imidazol (RMWII) diente dazu, an die Säule gebundene Proteinverunreinigungen zu

entfernen. Im letzten Schritt wurde das VpU-HIS mit 10 ml Puffer I + 500 mM Imidazol von der Säule eluiert (RME). Zur Kontrolle diente eine SDS-PAGE (Kapitel: 3.9.1) der proteinhaltigen Fraktionen und die im Gel enthaltenen Proteine wurden durch eine Silberfärbung (Kapitel: 3.9.5) sichtbar gemacht (Abb.: 4.12). Um letzte Verunreinigungen zu entfernen, wurde ein weiterer

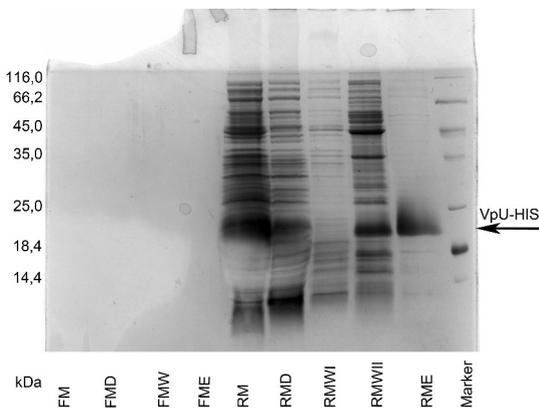


Abbildung 4.12: Ein durch Silberfärbung gefärbtes Gel der Ni^{2+} -NTA-Fractionen. In diesem Fall enthielt das Fütterungsmedium (FM) keine Proteine. Daher waren im Durchfluss (FMD), in der Wasch- (FMW) und Elutionsfraktionen (FME) ebenfalls keine Proteine enthalten. Das Reaktionsmedium (RM) enthielt alle Proteine. Nach der Reinigung befand sich das VpU-HIS in der zweiten Wasch- (RMWII) und in der Elutionsfraktion (RME).

Reinigungsschritt durchgeführt. Dieser war eine Größenausschlusschromatographie über eine Superdex 200 10/300 GL Säule an der ÄKTApurifier 900 Chromatografieanlage. Hierzu wurden die VpU-HIS enthaltenden Fraktionen aus der Ni^{2+} -NTA Reinigung um den Faktor 10 konzentriert. Benutzt wurden Vivaspin20 Konzentratoren mit einem MWCO von 3 kDa. Das Konzentrat wurde in Volumina von maximal 1 ml auf die in Puffer II (Tab.: 4.1) equilibrierte Säule gegeben. Unter einem konstanten Fluss von 500 ml/min wurde diese anschließend mit 35 ml Puffer II gewaschen. Hierdurch wurde das VpU-HIS von Proteinverunreinigungen, überschüssigem DPC sowie Imidazol getrennt. Der Durchfluss wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Zur Kontrolle diente eine SDS-PAGE (Kapitel: 3.9.1) der proteinhaltigen Fraktionen mit anschließender Silberfärbung (Kapitel: 3.9.5) (Abb.: 4.13).

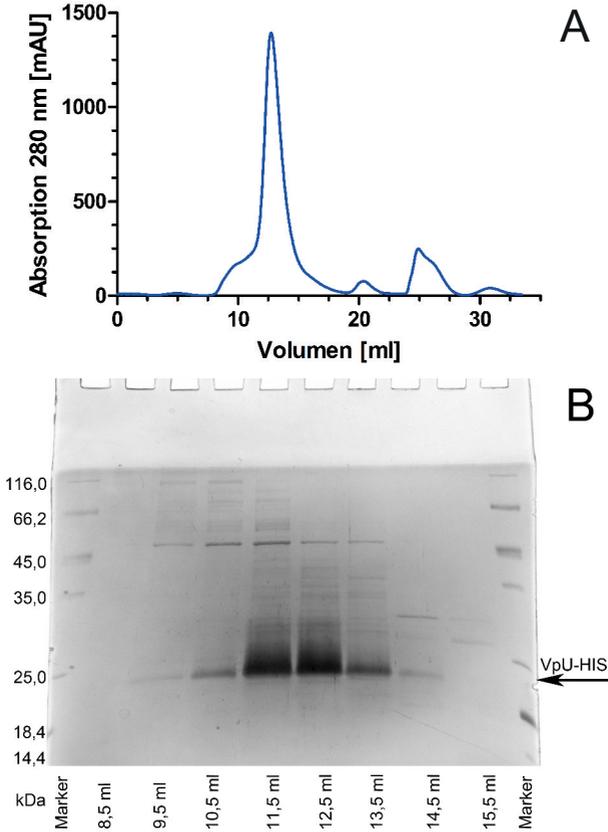


Abbildung 4.13: **A:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von VpU-HIS. Bei 12-13 ml befindet sich der Peak des VpU-HIS, bei 20 ml das überschüssige DPC. Bei 26 ml ist das Signal des Imidazols zu sehen. **B:** Silberfärbung der proteinhaltigen Fraktionen. Die Fraktionen 11,5 ml und 12,5 ml enthielten die größte Menge des VpU-HIS, welches auf der Abbildung mit einem Pfeil markiert ist.

4.2.2 NMR-Spektroskopie VpU-HIS in DPC-Mizellen

4.2.2.1 Vergleich von deuteriertem mit protoniertem VpU-HIS

Als erstes wurde ein 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektrum aufgenommen, um die Qualität der NMR-Probe und die Pufferbedingungen zu kontrollieren. Hierzu wurde [U - ^{15}N ;NA-NWCQ]-VpU-HIS verwendet, welches mit ^{15}N -markiertem Algen-Aminosäure-Mix hergestellt wurde. Da dieser Mix die Aminosäuren Asparagin, Tryptophan, Glutamin und Cystein nicht beinhaltete, wurden diese in nicht markierter Form hinzugegeben. Die H^{N} -Korrelationen dieser Aminosäuren sind daher im 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektrum (Abb.: 4.14a) nicht detektierbar. Aufgenommen wurde das Spektrum bei 40°C und das Protein lag in Puffer II (Tab.: 4.1) mit 500 mM DPC vor. Ausgehend von der Aminosäuresequenz des VpU-HIS (Abb.: 4.10) waren 73 H^{N} -Korrelationspeaks der Rückgratamidgruppen zu erwarten. Diese Anzahl ergibt sich aus den 89 Aminosäuren des VpU-HIS abzüglich der zwei Proline, welche kein Amidproton besitzen und daher nicht detektiert werden können, der vier Glutamine, der zwei Tryptophane, des einen Asparagins und der sechs C-terminalen Histidine, welche bei pH 7,0 nicht detektierbar sind, als auch des N-terminalen Methionins, welches aufgrund schnellen chemischen Austausches nicht beobachtbar ist. Im Spektrum waren 64 H^{N} -Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen zu erkennen. Das sind neun weniger als erwartet. Dies lag vor allem an der ausgeprägten Signalüberlagerung aufgrund breiter Signale im Zentrum des 2D Spektrums. Hierdurch konnten einige Kreuzpeaks nicht als separate Signale wahrgenommen werden. Um die Signaldispersion zu erhöhen, wurde deuteriertes VpU-HIS eingesetzt (Kap.: 3.13.5). Dieses Protein war [U - ^2H , U - ^{15}N , U - ^{13}C] markiert, mit Ausnahme des Tryptophans, das nur [U - ^{15}N , U - ^{13}C] markiert war. Dreifach markiertes Tryptophan stand nicht zur Verfügung. Die Pufferbedingungen waren die gleichen wie bei der Messung mit protoniertem Protein. Es wurde ein 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektrum bei 40°C aufgenommen. Ausgehend von der Aminosäuresequenz waren 80 H^{N} -Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen zu erwarten. Diese Anzahl ergibt sich aus den 89 Aminosäuren

des VpU-HIS, abzüglich der zwei Proline, der sechs C-terminalen Histidine und des N-terminalen Methionins. Zusätzlich sind im TROSY-Spektrum $H^N N$ -Korrelationen der Amide aus den Seitenketten der Glutamine und des Asparagins zu erkennen, als auch die zusätzlichen Seitenkettensignale der Tryptophane. Im Spektrum ließen sich 91 $H^N N$ -Korrelationssignale von Rückgratamidgruppen erkennen. Das waren elf mehr als erwartet. Es ist anzunehmen, dass das Protein in mehr als einer Konformation vorlag. Die Signaldispersion konnte durch den Einsatz von deuteriertem Protein stark erhöht werden. Daher wurden alle NMR-spektroskopischen Experimente für die Resonanzzuordnung des VpU-HIS mit derart markiertem VpU-HIS durchgeführt.

4.2.2.2 Sequenzielle Resonanzzuordnung

Im Zuge der sequenzspezifischen Zuordnung (Kap.: 3.14.3) des VpU-HIS erfolgte eine Verknüpfung der Rückgrat- $H_i^N N_i$ -Korrelationensignale aus dem 2D TROSY-Spektrum mit den C_i^α -, C_i^β -Resonanzen, CO_i -Resonanzen als auch den CO_{i-1} -Resonanzen. Dies geschah unter Verwendung mehrerer 3D-NMR-Experimente. Zunächst wurden die C_i^α -Resonanzen über ein 3D TROSY-HNCA-Spektrum, die C_i^β -Resonanzen über ein 3D TROSY-HNCACB-Spektrum und die CO_i - und einige CO_{i-1} -Resonanzen über ein 3D TROSY-HN(CA)CO-Spektrum mit den $H_i^N N_i$ -Korrelationssignalen des 2D TROSY-Spektrums verknüpft. Die $H^N N$ -Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen wurden unter Verwendung eines 3D TROSY-HN(CO)CA-Spektrums (korreliert $H_i^N N_i$ mit C_{i-1}^α), eines 3D TROSY-HN(CO)CACB-Spektrums (korreliert $H_i^N N_i$ mit C_{i-1}^β) und eines 3D TROSY-HNCO-Spektrums (korreliert $H_i^N N_i$ mit CO_{i-1}) sequenziell verknüpft. Mit Hilfe dieser drei Spektren konnten die C_{i-1}^α -, die C_{i-1}^β - und die CO_{i-1} -Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure ($i - 1$) eindeutig identifiziert werden. Die so erhaltenen Folgen sequenziell verknüpfter Spinsysteme wurden anschließend der Aminosäuresequenz des VpU-HIS zugeordnet (Abb.: 4.16). Auf diese Weise konnten 71 der 91 (78,0%) im 2D $[^1H-^{15}N]$ -TROSY-Spektrum beobachteten $H^N N$ -Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen einer Aminosäure des

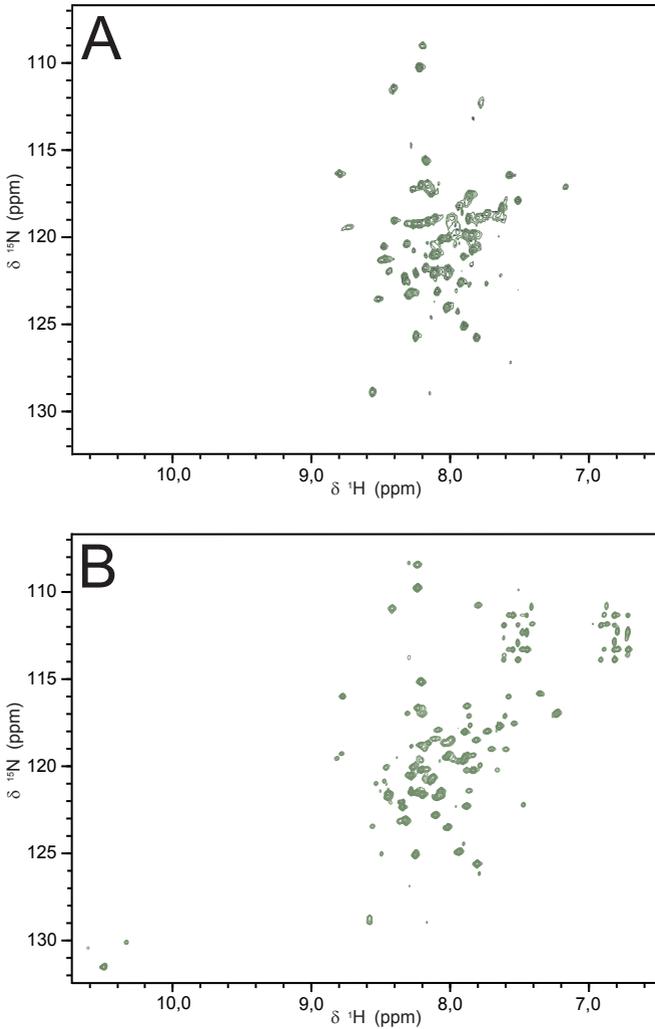


Abbildung 4.14: Vergleich der 2D NMR-Spektren von deuteriertem und protoniertem VpU-HIS. Beide wurden in 500 mM DPC und bei 40 °C und 21,1 T gemessen. **A:** [^1H - ^{15}N]-TROSY des protonierten [U - ^{15}N ;NA-NWCQ]-VpU-HIS. Die Aminosäuren Asp, Trp, Glu und Cys sind nicht isotopenmarkiert. **B:** [^1H - ^{15}N]-TROSY des deuterierten [U - ^{15}N , U - ^{13}C , U - ^2H]-VpU-HIS.

VpU-HIS zugeordnet werden. Für drei Sequenzabschnitte des VpU war eine ununterbrochene sequenzielle Resonanzzuordnung möglich. Diese drei Fragmente waren P3 bis A16, I18 bis E29 und I43 bis L81. Neun Aminosäuren (L67, V68, R70, G71, L73, A74, W76, D77 und V78) wurden je zwei H^N -Korrelationssignale zugeordnet, wobei jeweils eins davon eine deutlich geringere Linienbreite aufwies. Dieser Befund deutet auf mindestens zwei unterschiedliche Konformationen hin. Die nachfolgenden Werte beziehen sich auf die deutlich intensiveren NMR-Signale, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die dominante Konformation widerspiegeln. Von den 78 erwarteten H^N -Korrelationen der Rückgratamidgruppen des VpU (81 Aminosäuren abzüglich der zwei Proline und des N-terminalen Methionins) wurden 60 (76,9%) im 3D TROSY-Spektrum zugeordnet. Unter Verwendung der 3D NMR-Spektren konnten 64 von 81 erwarteten C^α -Resonanzen (79,1%) und 60 von 78 erwarteten C^β -Resonanzen (76,9%) den Aminosäuren des VpU zugeordnet werden. Weiterhin konnten 65 der 81 erwarteten CO-Resonanzen (80,3%) den Aminosäuren zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen aller zugeordneten Resonanzen können dem Anhang 6.2 dieser Arbeit entnommen werden.

4.2.2.3 Sekundärstrukturanalyse mittels chemischer Verschiebungen

Die Sekundärstruktur des VpU wurde unter Verwendung des Programmes TALOS-N abgeleitet (Kap.: 3.14.5). Die Vorhersage beruhte auf den experimentellen chemischen Verschiebungen H^N , N, C^α , C^β und CO (Kap.: 4.2.2.2) als auch auf der Aminosäuresequenz des VpU. Für Aminosäuren ohne zugeordnete chemische Verschiebungen leitete TALOS-N die Sekundärstruktur anhand gespeicherter Torsionswinkel in einer Proteindatenbank unter Berücksichtigung der flankierenden Aminosäuren ab. Die durch das Programm berechneten Wahrscheinlichkeiten für das Vorliegen bestimmter Sekundärstrukturtypen sind in Abbildung 4.17 dargestellt. Es wurden keine β -Faltblätter identifiziert. Die 21 Aminosäuren von P3 bis W23 wurden als α -helikal eingestuft. Eine weitere α -Helix von 19 Aminosäuren erstreckt sich vermutlich von I28 bis I46, da auch diese Aminosäuren als α -helikal einge-

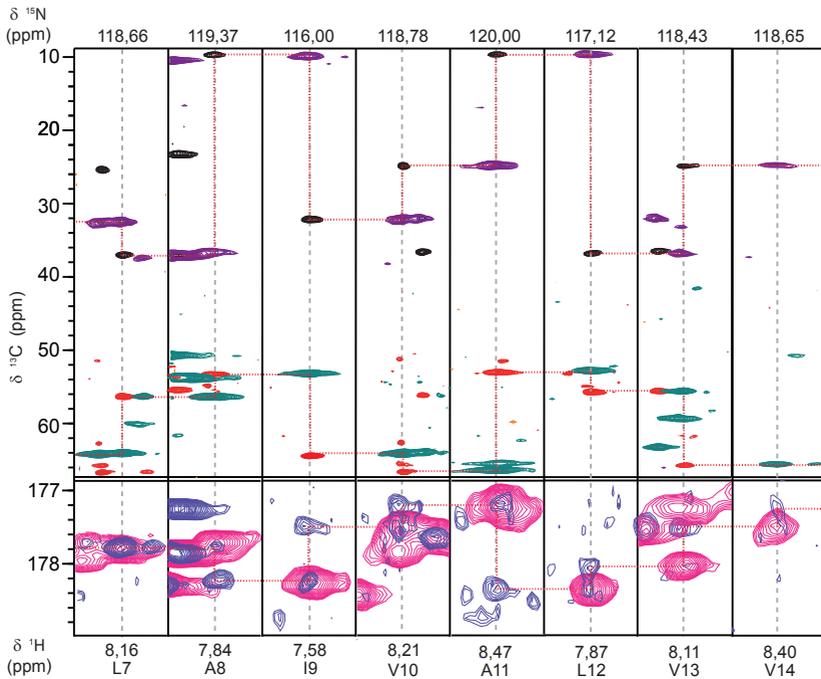


Abbildung 4.15: Sequenzielle Zuordnung der Korrelationssignale am Beispiel einer acht Aminosäuren langen Sequenz (L7 bis V14) des VpU. Verwendete Spektren: 3D TROSY-HN(CO)CA-Spektrum (dunkelgrün; C_{i-1}^{α}), 3D TROSY-HNCA-Spektrum (rot; C_i^{α}), 3D TROSY-HN(CO)CACB-Spektrum (lila; C_{i-1}^{β}), 3D TROSY-HNCACB-Spektrum (schwarz; C_i^{β}), 3D TROSY-HN(CA)CO-Spektrum (blau; $\text{CO}_{i-1} + \text{CO}_i$), 3D TROSY-HNCO-Spektrum (rosa; CO_{-i}). Die sequenziellen Verknüpfungen der Signale in den Streifen benachbarter Aminosäuren sind durch eine rote gestrichelte Linie angegeben.

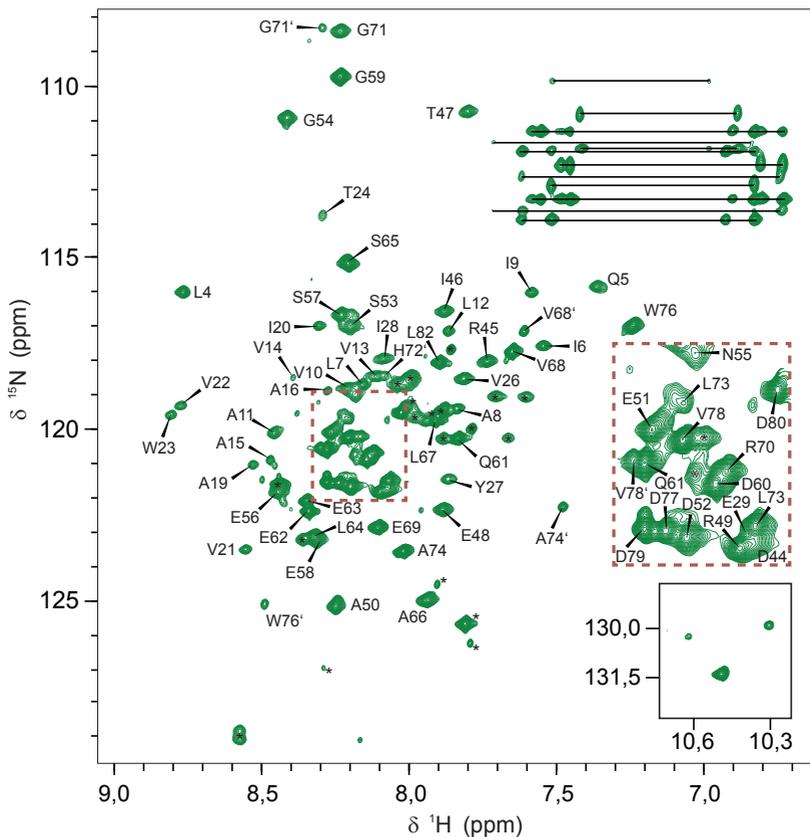


Abbildung 4.16: 2D $[^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}]$ -TROSY-Spektrum des $[\text{U}\text{-}^{15}\text{N}, \text{U}\text{-}^{13}\text{C}, \text{U}\text{-}^2\text{H}]$ -VpU-HIS in DPC-Mizellen. Gemessen bei 40°C und 21,1 T. Die Tryptophan-Seitenkettenamidresonanzen sind in einem extra Ausschnitt rechts unten dargestellt. Nicht zugeordnete $\text{H}^{\text{N}}\text{N}$ -Korrelationssignale sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Wurden für eine gegebene Aminosäure des VpU mehrere Rückgrat- $\text{H}^{\text{N}}\text{N}$ -Korrelationssignale gefunden, so ist der Peak mit geringerer Linienbreite mit einem Apostroph (') gekennzeichnet. Diese Signale reflektieren wahrscheinlich alternative Proteinkonformationen.

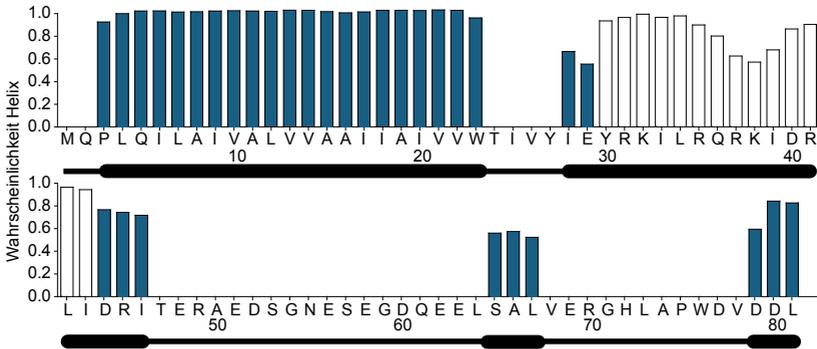


Abbildung 4.17: Mit TALOS-N abgeleitete Sekundärstruktur des VpU, unter Verwendung der gemessenen chemischen Verschiebungen (blau) oder der Aminosäuresequenz allein (offen). Die Höhe der Balken gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass die jeweilige Aminosäure in einem α -helicalen Bereich liegt. Alle Werte unter 0,5 wurden auf 0 herabgesetzt. Der schwarze horizontale Balken unter dem Diagramm zeigt die Position der als α -helikal eingestuft Bereiche.

stuft wurden. Ebenso verhält es sich mit den drei Aminosäuren S65 bis L67 und den drei Aminosäuren von D79 bis L81. Alle verbliebenen Aminosäuren wurden unstrukturierten Bereichen zugeordnet. Die durch TALOS-N identifizierten α -helicalen Bereiche reflektieren wahrscheinlich eine Transmembranhelix (P3-W23) und mindestens eine zytoplasmatische Helix (I28-I46). Der berechnete Ordnungsparameter $RCI-S^2$ (Abb.: 4.18) zeigt einen Bereich von L4 bis Y27 (mit der Ausnahme von I17) mit unflexiblen Aminosäuren an. Dieser deckt sich nahezu mit dem Bereich der wahrscheinlichen Transmembranhelix. Die restlichen Aminosäuren des Proteins wurden auf der Basis des $RCI-S^2$ Ordnungsparameters als flexibel eingestuft.

4.2.2.4 Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen von der DPC-Konzentration

Um die Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen des HIS-VpU von der DPC-Konzentration zu untersuchen, wurde $[U-^{15}N;NA-NWCQ]-VpU-HIS$ (300 μ M) gegen schrittweise steigende DPC-Konzentrationen (60 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM, 600 mM und 700 mM) titriert. Nach jedem Schritt

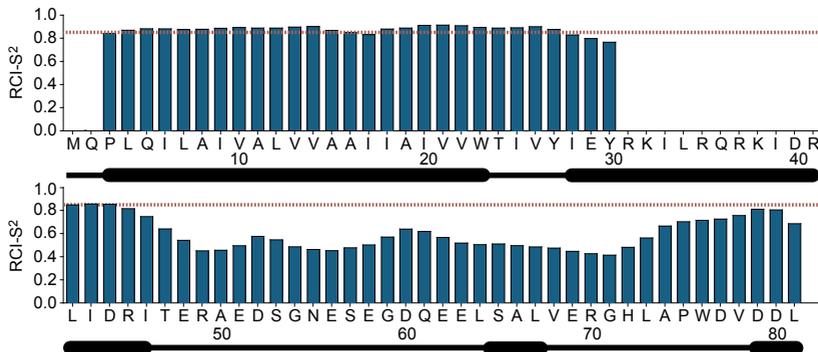


Abbildung 4.18: Mit TALOS-N berechneter Ordnungsparameter $RCI-S^2$. Aminosäuren mit einem $RCI-S^2$ Wert über 0,85 (rote gepunktete Linie) werden als unflexibel angesehen. Für Aminosäuren, bei denen aufgrund der unvollständigen Resonanzzuordnung keine Aussage getroffen werden konnte, ist kein Balken dargestellt. Die als α -helikal eingestuft Bereiche sind mit schwarzen Balken unter der Sequenz dargestellt.

wurde ein 2D [1H - ^{15}N]-TROSY-Spektrum aufgenommen. Die Spektren wurden übereinandergelegt und die H^N -Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen, die die größten Veränderungen in der chemischen Verschiebung zeigten und eindeutig identifiziert werden konnten, beschriftet (Abb.: 4.19). Aufgrund der Verwendung von protoniertem Protein war die Signaldispersion gering und es konnte nur ein Teil der Korrelationssignale zugeordnet werden. Die stärksten Veränderungen der chemischen Verschiebung erfuhren die H^N -Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen der Aminosäuren T47, A50, E51, L61, S65, E69, G71, A74 und A74'.

4.3 Interaktion von VpU-HIS mit HIS-BST2tmcyt

Die Interaktion von BST2 und VpU wurde anhand von NMR-Messungen untersucht (Kap.: 3.14.4). Dazu wurden die Proteine HIS-BST2tmcyt und VpU-HIS durch zellfreie Proteinsynthese hergestellt und anschließend gegeneinander titriert und im NMR-Spektrometer gemessen.

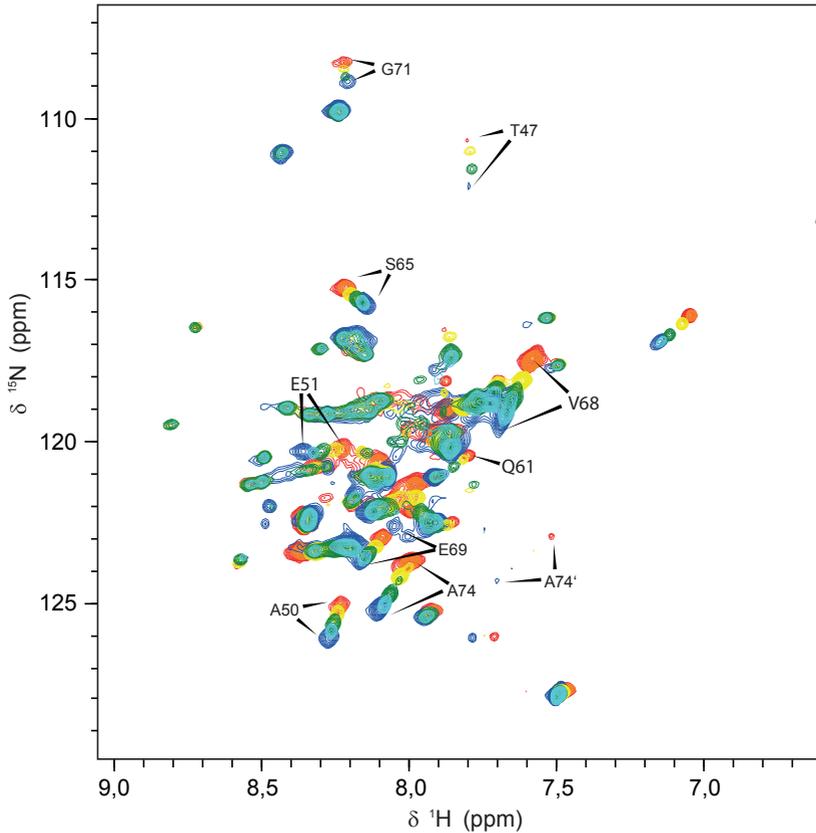


Abbildung 4.19: Die Abbildung zeigt 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY Spektren der Titration des [^{15}N] $_2$ NA-NWCQI-VpU-HIS mit DPC. Gemessen bei 40°C und 21,1 T. **blau:** 60 mM DPC; **cyan:** 100 mM DPC; **grün:** 200 mM DPC; **gelb:** 400 mM DPC; **orange:** 600 mM DPC; **rot:** 700 mM DPC. Start- und Endpunkt der ausgeprägtesten Verschiebungen wurden markiert. Name und Sequenzposition der jeweiligen Aminosäure des VpU sind angegeben.

4.3.1 Lokalisierung der Bindestelle auf HIS-BST2tmcyt

Für die Lokalisierung der Bindestelle für das HIV-1 VpU auf dem humanen BST2 wurde $[U-^{15}N, U-^{13}C]$ -HIS-BST2tmcyt und unmarkiertes VpU-HIS hergestellt. Zunächst wurde ein 2D $[^1H-^{15}N]$ -TROSY-Spektrum vom HIS-BST2tmcyt in 500 mM DPC aufgenommen. Die Konzentration des HIS-BST2tmcyt betrug hierbei 500 μ M. Anschließend wurde schrittweise unmarkiertes VpU, aus einer 1550 μ M Stammlösung mit 500 mM DPC, in die Probe gegeben. Nach jedem Schritt wurde erneut ein 2D $[^1H-^{15}N]$ -TROSY-Spektrum aufgenommen. Die einzelnen Titrationsschritte sind der Tabelle 4.2 zu entnehmen. Die so entstandenen Spektren wurden übereinander gelegt (Abb.: 4.20). Die chemische Verschiebung der einzelnen H^N -Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen wurde in jedem Spektrum bestimmt. Anschließend wurde die Veränderung der chemischen Verschiebungen in Bezug zum Ausgangsspektrum ohne VpU-HIS berechnet. Die maximale Veränderung wurde in einem Balkendiagramm (Abb.: 4.21) aufgetragen. Diese war bereits nach dem ersten Titrationsschritt erreicht. Die H^N -Korrelationssignale der Aminosäuren S9, R10, V11, M13, E14, D15 und L24 des BST2tmcyt zeigten die stärksten Veränderungen in ihren chemischen Verschiebungen. Dabei sind die H^N -Korrelationspeaks gänzlich von ihrer ursprünglichen Position verschwunden und verfügen an ihrer neuen Position über die selbe Intensität wie zuvor. Die Intensität ändert sich auch in den darauf folgenden Titrationsschritten nicht. Anhand dieses Befundes lässt sich keine Aussage über die Art der Interaktion von HIS-BST2tmcyt und VpU-HIS treffen. Es könnte sich sowohl um schnellen als auch um langsamen Austausch handeln. Um hier eine genauere Aussage treffen zu können, wären weitere Titrationsnennungen, wobei die Titrationsschritte zwischen Schritt 0 und Schritt 1 des bereits durchgeführten Versuches (Tab.: 4.2) angesiedelt sein müssten.

4.3.2 Lokalisierung der Bindestelle auf VpU-HIS

Für die Lokalisierung der Bindestelle auf dem HIV-1 VpU für das humane BST2 wurde $[U-^2H, U-^{15}N, U-^{13}C]$ -VpU und unmarkiertes HIS-BST2tmcyt

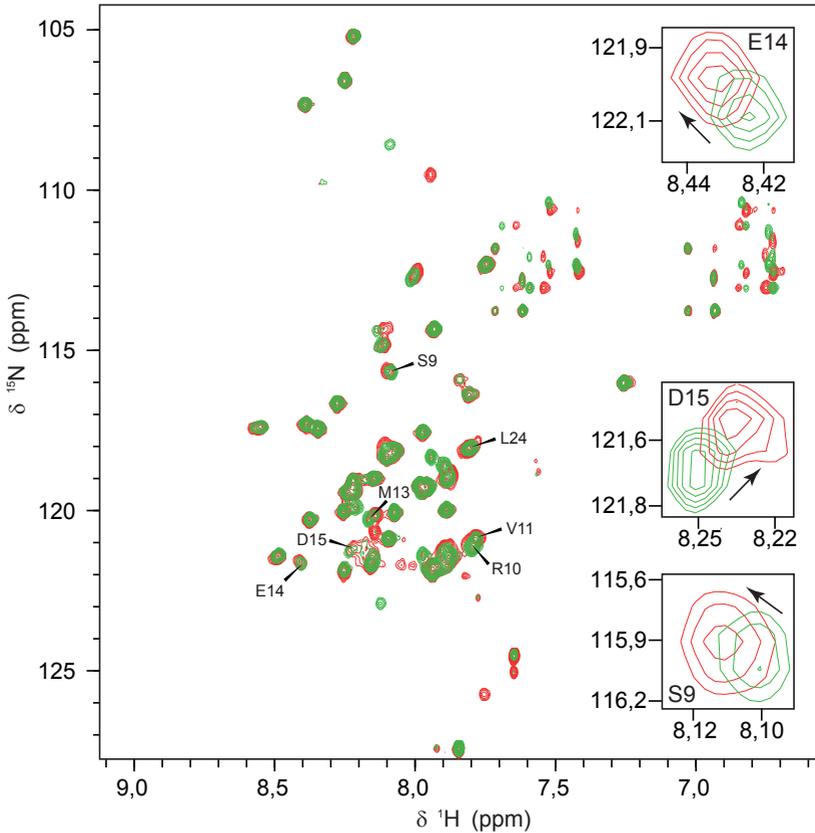


Abbildung 4.20: 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektren des [^{15}N , ^{13}C]-HIS-BST2tmyc in DPC-Mizellen. Gemessen bei 40 °C und 21,1 T. **Grün:** 0 μM VpU; **Rot:** 198,7 μM VpU. Die acht ^1H - ^{15}N -Korrelationssignale mit den stärksten ändernden chemischen Verschiebungen wurden beschriftet. Die ^1H - ^{15}N -Korrelationssignale der Aminosäuren S9, E14 und D15 wurden vergrößert dargestellt.

Tabelle 4.2: Titrationsschritte für die Lokalisierung der Bindestelle am HIS-BST2tmyct

Schritt	c(HIS-BST2tmyct) [μM]	c(VpU-HIS) [μM]
0	500	0
1	458	199
2	406	352
3	365	529
4	331	633

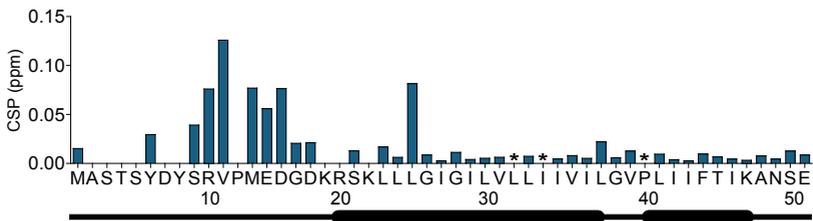


Abbildung 4.21: Maximale Verschiebung der H^N N-Korrelationssignale des BST2tmyct nach Titration mit VpU. Bei den mit einem Stern gekennzeichneten Aminosäuren konnte, aufgrund von Überlagerungen im Spektrum, die Verschiebung der H^N N-Korrelationssignale nicht bestimmt werden. Der schwarze Balken unter der Sequenz stellt die zuvor ermittelten α -helikalen Bereiche dar.

Tabelle 4.3: Titrationschritte für die Lokalisierung der Bindestelle am VpU-HIS

Schritt	c(VpU-HIS) [μ M]	c(HIS-BST2tmcyt) [μ M]
0	500	0
1	438	115
2	389	204
3	350	276
4	311	378
5	290	414

hergestellt. Zunächst wurde ein 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektrum einer Probe mit 500 μM VpU-HIS in 500 mM DPC aufgenommen. Anschließend wurde in sechs Schritten HIS-BST2tmcyt aus einer 920 μM Stammlösung mit 500 mM DPC hinzugegeben (Tab.: 4.3). Nach jedem Schritt wurde erneut ein 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektrum aufgenommen. In jedem Spektrum wurden die chemischen Verschiebungen der Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen bestimmt. Die Abweichungen der chemischen Verschiebung zum Ausgangsspektrum ohne HIS-BST2tmcyt wurden berechnet. Die Veränderungen der chemischen Verschiebungen im Spektrum mit der höchsten HIS-BST2tmcyt Konzentration im Vergleich zum Spektrum des VpU-HIS ohne HIS-BST2tmcyt wurden in einem Balkendiagramm aufgetragen (Abb.: 4.24). Die chemischen Verschiebungen der Aminosäuren V14, I20, T24, E29, V68', V68 und E69 zeigen die dominantesten Veränderungen relativ zum Ausgangsspektrum. Bei der Interaktion von VpU-HIS und HIS-BST2tmcyt liegt wahrscheinlich ein schneller Austausch vor. Zu erkennen ist dies an der Veränderung der chemischen Verschiebung der Korrelationspeaks während der Titration (Abb.: 4.23). Die H^{N} -Korrelationspeaks der Aminosäuren, welche Veränderungen in ihrer chemischen Verschiebung zeigten, änderten ihre Position sukzessive bei aufeinanderfolgenden Titrationschritten, und zwar ohne merkliche Änderung ihrer Intensität. Dabei sind die Positionsänderungen zu Beginn der Titration stärker ausgeprägt.

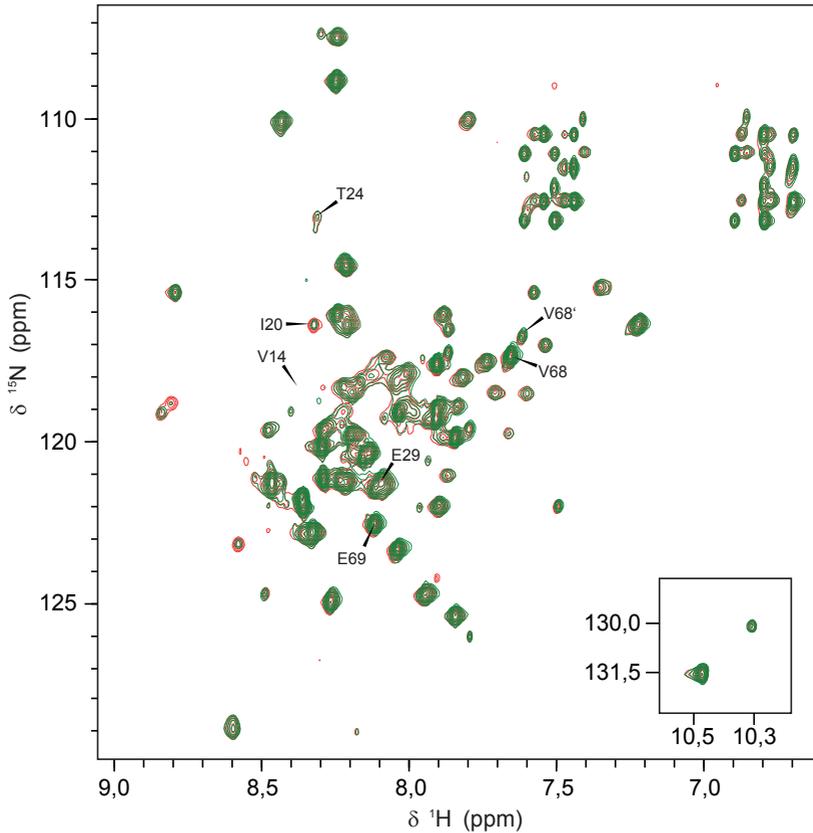


Abbildung 4.22: 2D [^1H - ^{15}N]-TROSY-Spektren des VpU in DPC-Mizellen in Gegenwart ansteigender HIS-BST2mcyt Konzentrationen. Gemessen bei 40°C und 21,1 T. **Grün:** $0\ \mu\text{M}$ HIS-BST2mcyt; **Rot:** $290\ \mu\text{M}$ HIS-BST2mcyt. Die Tryptophan-Seitenkettenamidkorrelationssignale sind in einem extra Ausschnitt dargestellt. Die H^{N} -Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen der Aminosäuren mit den größten Änderungen der chemischen Verschiebung wurden markiert.

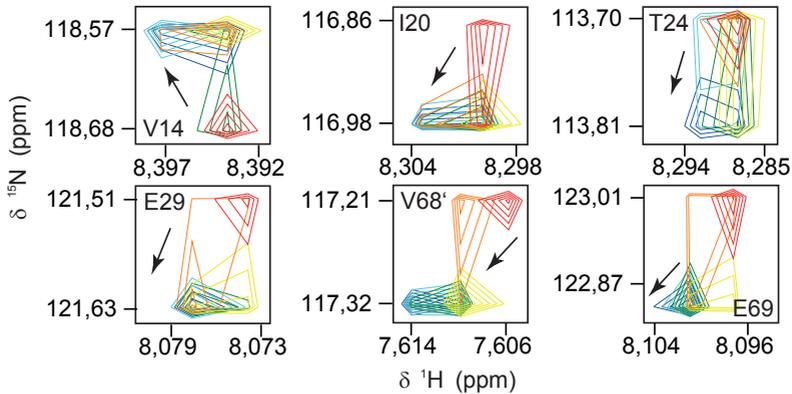


Abbildung 4.23: Detailansicht der chemischen Verschiebungen der H^N - N -Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen der Aminosäuren V14, I20, T24, E29, V68' und E69. Die einzelnen Titrationsschritte sind farblich kodiert. Von Schritt 0 bis 5 (siehe Tab.: 4.3): **rot** (0 μ M HIS-BST2tmcyt), **orange** (115 μ M HIS-BST2tmcyt), **gelb** (204 μ M HIS-BST2tmcyt), **grün** (276 μ M HIS-BST2tmcyt), **cyan** (378 μ M HIS-BST2tmcyt), **blau** (414 μ M HIS-BST2tmcyt). Die Richtung der Veränderung der chemischen Verschiebung wurde mit einem Pfeil markiert.

4.3.3 Fusionsprotein BST2tmcyt-VpU-Rho

Um die Interaktion von BST2 und VpU genauer charakterisieren zu können, wurde ein Fusionsprotein entworfen. Hierzu wurde ein Plasmid konzipiert, welches die Gensequenz der zytoplasmatischen und der Transmembrandomäne des BST2 sowie die Gensequenz des VpU Proteins enthält. Das Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein in dem die genannten BST2 und VpU Aminosäuresequenzen durch eine zehn Aminosäure lange flexible (GS)₅-Sequenz verbunden sind. Zusätzlich enthält das Fusionsprotein einen C-terminalen Rho-Tag, welcher über eine PreScission-Schnittstelle abgespalten werden kann (Abb.: 4.25). Ein entsprechendes Gen wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den pET22b_deltaLac-Vektor hineinkloniert. Der Name des resultierenden Vektors ist pET22b_deltaLac_BST2tmcyt-VpU-Rho. Erste Versuche zur Herstellung und Reinigung des Fusionsproteins erfolgten durch die Firma Cube Biotech aus Monheim am Rhein. Die Herstellung erfolgte durch *E. coli* basierte zellfreie Proteinsynthese. Das Ziel-

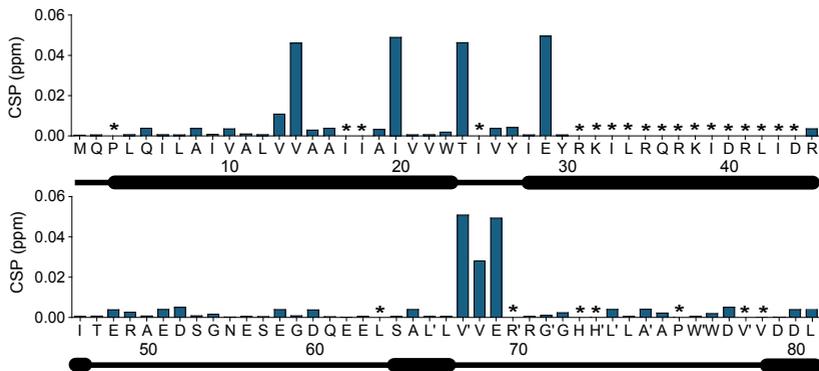


Abbildung 4.24: Chemische Verschiebung der H^N N-Korrelationssignale der Rückgratamidgruppen des VpU-HIS mit gebundenen HIS-BST2tmyc im Vergleich zu den H^N N-Korrelationssignalen der Rückgratamidgruppen des VpU-HIS ohne gebundenes HIS-BST2tmyc. Oberes Balkendiagramm zeigt Aminosäuren 1 bis 45. Das untere die Aminosäuren 46 bis 81 inklusive der Aminosäuren der alternativen Proteinkonformation. Die größten chemischen Verschiebungen zeigten sich bei den H^N N-Korrelationssignalen der Aminosäuren V14, I20, T24, E29, V68, V68 und E69. H^N N-Korrelationssignale die mit einem Stern gekennzeichnet sind, wurden entweder bei der zuvor durchgeführten Resonanzzuordnung (Kap.: 4.2.2.2) nicht zugeordnet oder waren im Spektrum überlagert und konnten deshalb nicht exakt bestimmt werden. Die zuvor ermittelten α -helikalen Bereiche sind mit einem schwarzen Balken unter der Sequenz gekennzeichnet.

10	20	30	40
MASTSYDYSR	VPMEDGDKRS	KLLLLGIGILV	LIIVILGVPL
50	60	70	80
LIIFTIKANS	EGSGSGSGSG	SMQPLQILAI	VALVVAIIIA
90	100	110	120
IVVWTIVYIE	YRKILRQRKI	DRLIDRITER	AEDSGNESEG
130	140	150	160
DQEELSALVE	RGHLAPWDVD	DLLEVLFGQP	GSSGTETSQV
163			
APA			

Abbildung 4.25: Aminosäuresequenz des BST2mcyt-VpU-Rho Fusionsproteins, welches auf dem pET22b_deltaLac_deltaLac_BST2mcyt-VpU-Rho Plasmid kodiert ist. Das Zielprotein besteht aus der Sequenz der zytoplasmatischen und der Transmembrandomäne des BST2 (AS: 1-51, grün), einem (GS)₅-Linker (AS: 52-61, blau) und dem vollständigem VpU Protein (AS: 62-142, rot). Außerdem verfügt es über eine PreScission-Schnittstelle (AS: 143-150), so dass der rho-1D4 Tag (AS: 155-163) entfernt werden kann.

protein konnte in analytischen Maßstab hergestellt und mittel Affinitätschromatografie gegen das Rho-Tag gereinigt werden. Eine Herstellung des Fusionsproteins im präparativen Maßstab (3 ml Reaktion) war zwar möglich, leider gelang es aber nicht, das synthetisierte Protein bei der anschließenden Reinigung vom Säulenmaterial zu eluieren. Es wurde versucht das Protein durch den Einsatz von doppelter Menge Detergenz im Elutionspuffer vom Säulenmaterial zu lösen. Dies gelang ebenso wenig wie die Elution bei 45 °C.

4.4 Nanodiscs mit geladenen Lipiden

Für weiterführende Versuche empfahl es sich, anstatt der DPC-Mizellen auf Nanodiscs als Modellmembran zurückzugreifen. Nanodiscs sind eine Modellmembran welche der natürlichen Zellmembran in Hinsicht auf ihre Struktur näher kommt als eine Mizelle. Zudem ist bei gleichzeitiger Einbringung von BST2 und VpU in die Nanodiscs eine Interaktion dieser beiden Proteine

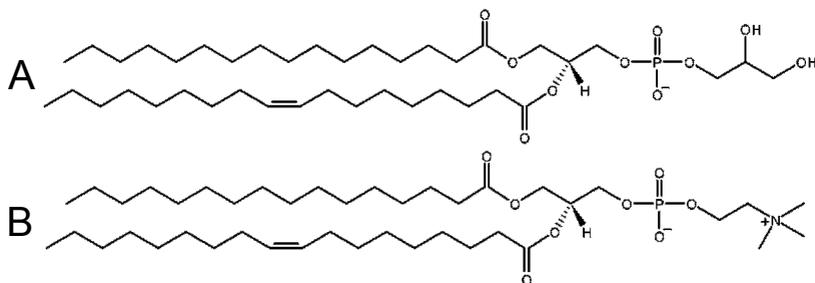


Abbildung 4.26: Valenzstrichformeln der Lipide POPG (A) und POPC (B).

durch ihre Transmembrandomäne erleichtert. Da für NMR-Experimente eine hohe Konzentration des Zielproteins in der zu messenden Probe von Vorteil ist, müssten dazu die Nanodiscs in hoher Konzentration eingesetzt werden. Nanodiscs neigen jedoch dazu, bei hoher Konzentration zu aggregieren, wodurch sie in einem Flüssigkeits-NMR-Experiment nicht mehr zu messen wären. Um dies zu verhindern, wurden im Zuge dieser Arbeit elektrostatisch geladene Nanodiscs hergestellt. Diese sollten auch bei hoher Konzentration nicht aggregieren, da sie sich aufgrund ihrer Ladung abstoßen. Die positive Ladung wurde in die Nanodiscs eingebracht, indem eine Lipidmischung, bestehend aus kationischem 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (POPG) und zwitterionischem 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), verwendet wurde (Abb.: 4.26). Als Gerüstprotein für die Nanodiscs wurde die MSP1-Variante MSP1D1 [24] verwendet.

4.4.1 Herstellung des Gerüstproteins MSP1D1

Die Herstellung von MSP1D1 konnte wahlweise im 1 l Kolben oder im 40 l Fermenter stattfinden. Die effiziente Herstellung im Fermentermaßstab wurde im Rahmen dieser Arbeit am Forschungszentrum Jülich etabliert. Das Protein enthält einen N-terminalen His-Tag, welcher über eine TEV-Schnittstelle entfernt werden kann.

4.4.1.1 Expression im 1 l Kolben

Für die Herstellung im 1 l Kolben wurde der *E-coli* Stamm BL21(DE3)RIL mit dem pET28a_MSP1D1 Plasmid transformiert. Dieser wurde dann in LB-Medium, welches 50 µg/ml Kanamycin enthielt, bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ herangezogen. An diesem Punkt wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression dauerte 3 h. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C. Vor Induktion mit IPTG und 3 h danach wurden Proben für eine SDS-PAGE entnommen, um so den Erfolg der Expression zu kontrollieren (Abb.: 4.27) Das Zellpellet aus 1 l Expressionskultur hatte ein Gewicht von 3 g.

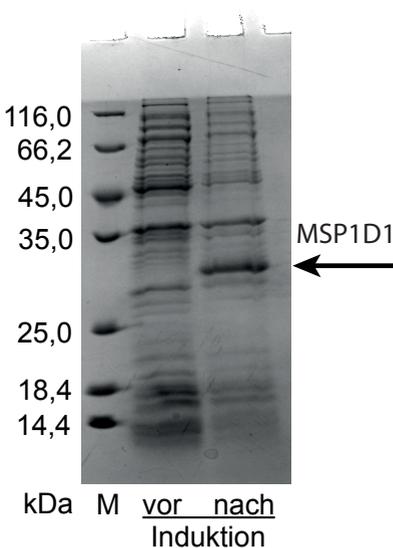


Abbildung 4.27: Coomassie gefärbtes SDS-Gel. Es zeigt die Produktion von MSP1D1 im 1 l Kolben. **(M)** Größenstandard, **(vor)** *E. coli* Zellen unmittelbar vor der Induktion, **(nach)** *E. coli* Zellen nach 3 h Expression. Das MSP1D1 ist mit einem Pfeil markiert.

4.4.1.2 Expression im 40 l Fermenter

Die Herstellung von MSP1D1 im Fermenter fand in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) im Forschungszentrum Jülich statt. Durch die Verwendung eines Fermenters sollte der Zeitaufwand und die Kosten für die Produktion von MSP1D1 verringert werden. Die Fermentation fand in einem Fermenter mit einem Standardkammervolumen

Tabelle 4.4: Medien für die Expression von MSP1D1 im Fermenter. Alle Medien wurden auf die angegebene Menge mit H₂O aufgefüllt.

1,5 l HZD-Batch	1 l Vitamin-Lösung	1 l Spurenelemente
3 g NH ₄ Cl	0,05 g Riboflavin	10 g CaCl ₂
30 g (NH ₄)SO ₄	5 g Thiamin-HCl	0,5 g ZnSO ₄
195 g KH ₂ PO ₄	0,25 g Nicotinsäure	0,25 g CuCl ₂
150 g K ₂ HPO ₄	0,25 g Pyridoxin-HCl	2,5 g MnSO ₄
90 g NaH ₂ PO ₄	0,25 g Ca-Phanthotenat	0,125 g H ₃ BO ₃
45 g Hefeextrakt	0,0005 g Biotin	2,5 g AlCl ₃
	0,001 g Folsäure	0,5 g Na ₂ MoO ₄
	0,005 g Cyanocobalamin	10 g FeSO ₄
0,5 l HZD-Feed	9,9 l Batch-Medium	5 l Feed-Lösung
500 ml HZD-Batch	1 l HZD-Batch	0,5 l HZD-Feed
75 g Hefeextrakt	3 ml Antifoam	2 ml Antifoam
	50 ml 2,2 M Glukose-Lösung	4,18 l 2,2 M Glukose-Lösung
	50 ml 1,7 M MgSO ₄ -Lösung	250 ml 1,7 M MgSO ₄ -Lösung
	50 ml Vitamin-Lösung	25 ml Vitamin-Lösung
	40 ml Spurenelemente	20 ml Spurenelemente
	5 ml 0,6 M Thiamin-Lösung	25 ml 0,6 M Thiamin-Lösung

von 40 l statt, der mit einem dreistufigen 6-Blatt Scheibenrührer ausgestattet war. Es wurde eine Hochzelldichte-Fermentation unter Glukose-limitierten Bedingungen unter Anwendung eines Fed-Batch Verfahrens durchgeführt. Zunächst wurde eine 100 ml *E. coli* BL21(DE3)RIL pET28a_MSP1D1 LB-Vorkultur mit 50 µg/ml Kanamycin für 18 h bei 37 °C herangezogen. Diese 100 ml wurden zusammen mit 9,9 l Batch-Medium (Tab.: 4.4) in den Fermenter gegeben. Diese Kultur wurde für 28 h bei 30 °C und mit 1,5 mM Kanamycin kultiviert. Der pH-Wert als auch der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) wurden elektronisch überwacht. Über eine automatische Zugabe von 25%iger Ammoniaklösung wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Über die Regelung der Sauerstoffzuführung wurde der pO₂ auf 30% eingestellt. Um die Versorgung der Bakterienzellen mit Nährstoffen sicherzustellen, wurde die Feed-Lösung (Tab.: 4.4) automatisch und kontinuierlich über den gesamten Fermentationsprozess nach Korz et al. [64] hinzugegeben. Nach 28 h wurde die MSP1D1

Expression durch die Zugabe von 2 mM IPTG induziert und die Temperatur auf 37 °C hochgeregelt. Nach weiteren 13,5 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 g und 4 °C für 20 min geerntet (2,15 kg Zellpellet) und bei -80 °C eingefroren. Vor Induktion und bei der Ernte wurden Proben von den Zellen genommen. Mit diesen Proben wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, um den Erfolg der Expression zu kontrollieren (Abb.: 4.28). Für das Gel wurde die gleiche Menge an Zellpellet für den Auftrag verwendet wie für das Gel der Expressionskontrolle im 1 l Kolben (Abb.: 4.27). Die Ausbeute des MSP1D1 pro Gramm Zellgewicht ist, nach den beiden Gelen zu urteilen, bei beiden Methoden in der gleichen Größenordnung. Der Zeitaufwand für die Produktion im Fermenter beträgt ca. 3 Tage. Dies ist in etwa 1 Tag mehr als bei der Expression im 1 l Kolben. Die MSP1D1-Ausbeute liegt im Fermenter jedoch ca. 700-mal höher.

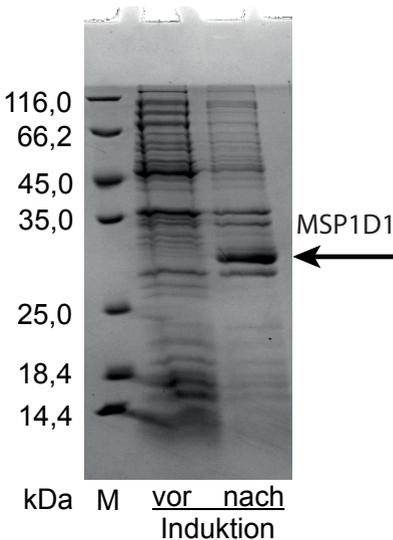


Abbildung 4.28: Coomassie gefärbtes SDS-Gel. Es zeigt die Produktion von MSP1D1 im Fermenter. **(M)** Größenstandard, **(vor)** *E. coli* Zellen unmittelbar vor der Induktion, **(nach)** *E. coli* Zellen nach 13,5 h Expression. Das MSP1D1 ist mit einem Pfeil markiert.

4.4.1.3 Reinigung des MSP1D1

Die Reinigung von MSP1D1 wurde mittels Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA durchgeführt. Hierzu wurden 10 g Zellpellet in 50 ml MSP-Lyso-

puffer (Tab.: 4.5) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Stabbeschallers Branson Sonifier 250 aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 45000 g und 4 °C für 30 min wurde der klare Überstand (Ü) auf eine 15 ml Ni²⁺-NTA Säule gegeben, welche zuvor mit 3 CV MSP-Waschpuffer I (Tab.: 4.5) equilibriert worden war. Der Durchfluss wurde aufgefangen (D). Anschließend wurde die Säule mit 3 CV MSP-Waschpuffer I gewaschen (WI). Es folgte ein Waschschrift mit 3 CV MSP-Waschpuffer II (Tab.: 4.5) (WII) und einer mit 3 CV MSP-Waschpuffer III (Tab.: 4.5) (WIII). Zusätzlich wurde erneut mit 3 CV MSP-Waschpuffer II (WIV) und mit 3 CV MSP-Waschpuffer IV (Tab.: 4.5) gewaschen (WV). Um das auf der Säule verbliebene MSP1D1 zu eluieren, wurde mit 3 CV MSP-Elutionspuffer I (Tab.: 4.5) gewaschen (EI). Um letzte Verunreinigungen von der Säule zu eluieren, wurde mit 3 CV MSP-Elutionspuffer II (Tab.: 4.5) gewaschen (EII). Zur Kontrolle der Proteinreinigung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb.: 4.29). Die MSP1D1-

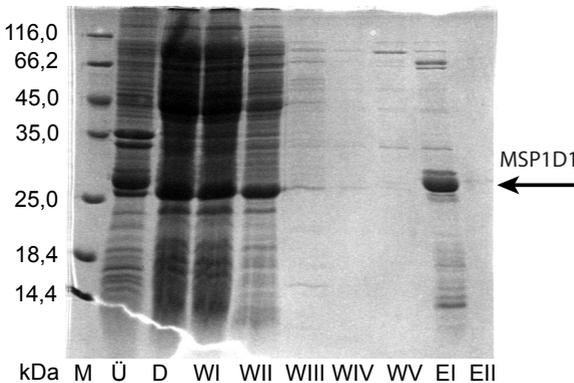


Abbildung 4.29: Coomassie gefärbtes SDS-Gel zur Kontrolle der Reinigung des MSP1D1. (M) Größenstandard, (Ü) Überstand nach Zentrifugation des Lysats, (D) Durchfluss des Lysats an der Ni²⁺-NTA Säule, (WI - WV) Waschschriffe, (EI + EII) Elutionsschriffe.

enthaltende Fraktion EI wurde in einem Dialyseschlach mit einem MWCO von 3,5 kDa 2-mal für 1 h gegen 1 l und danach für 18 h gegen 3 l Nanodiscs-Assemblierungspuffer (Tab.: 4.8) dialysiert. In einer Amicon200 Kammer mit einem MWCO von 3 kDa wurde das MSP1D1 auf eine Konzentration von 2 mg/ml einkonzentriert und anschließend in 2 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese wurden dann an der Lyophylle gefriergetrocknet und

Tabelle 4.5: Puffer für MSP-Reinigung

MSP-Lysepuffer	MSP-Waschpuffer I	MSP-Waschpuffer II
20 mM NaPi, pH 7,4	40 mM Tris-HCl, pH 8	40 mM Tris-HCl pH 7,4
1 Tab. Protease Inhibitor	300 mM NaCl	300 mM NaCl
1% (v/v) Triton-X-100	1% (v/v) Triton-X-100	
Lysozym		
MSP-Waschpuffer III	MSP-Waschpuffer IV	MSP-Elutionspuffer I
40 mM Tris-HCl, pH 8	40 mM Tris-HCl, pH 8	40 mM Tris-HCl, pH 8
300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
50 mM Natrium-Cholat	10 mM Imidazol	300 mM Imidazol
MSP-Elutionspuffer II		
40 mM Tris-HCl pH 8		
300 mM NaCl		
750 mM Imidazol		

bei -80°C gelagert. Die Proteinausbeute lag sowohl bei der Expression im Kolben als auch bei der Expression im Fermenter bei ca. 5 mg Protein pro Gramm Zellgewicht bei identischer Reinheit.

4.4.2 Herstellung der HIS-TEV-Protease

4.4.2.1 Expression der TEV-Protease in *E. coli*

Die TEV-Protease wurde in *E. coli* BL21(DE3)RIL pRK793_TEV expremiert. Dies erfolgte in 500 ml LB Kulturen mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 50 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol. Die Anzucht bis zur Induktion der Expression erfolgte bei 37°C . Danach wurde die Temperatur auf 30°C heruntergeregelt. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG. Die Expression dauerte 3 h. Aus einer 1 l Expressionskultur konnten 3 g Zellpellet gewonnen werden.

4.4.2.2 Reinigung der TEV-Protease

Für die Reinigung von TEV-Protease wurde eine Affinitätschromatografie an Ni^{2+} -NTA durchgeführt. Dazu wurden 10 g Zellpellet in 30 mL 4 °C kaltem TEV-Lysepuffer (Tab.: 4.6) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe des Stabbeschallers Branson Sonifier 250 aufgeschlossen. Nach der Zugabe von 0,1% (v/v) Polyethylenimin wurden die aufgeschlossenen Zellen bei 50000 g und 11 °C für 30 min zentrifugiert. Der klare Überstand (Ü) wurde abgenommen und auf eine, zuvor mit TEV-Lysepuffer equilibrierte, 10 ml Ni^{2+} -NTA Säule gegeben. Der Durchfluss (D) wurde aufgefangen. Dann wurde die Säule mit 15 CV TEV-Lysepuffer gewaschen. Der hierbei entstehende Durchfluss (DI) wurde ebenfalls aufgefangen. Anschließend wurden Proteine mit geringer Affinität zum Säulenmaterial, mit 1 CV TEV-Elutionspuffer (Tab.: 4.6) + 100 mM Imidazol, von der Säule eluiert (EI). In fünf Elutionsschritten mit jeweils 1 CV TEV-Elutionspuffer + 300 mM Imidazol wurde die TEV-Protease von der Säule eluiert (EII - EVI). In jede dieser aufgefangenen Fraktionen wurde 1 mM EDTA und 1 mM DTT gegeben. Noch auf der Säule verbliebene Proteine wurden mit 5 CV TEV-Elutionspuffer + 750 mM Imidazol von dem Säulenmaterial eluiert (EVII). Zur Kontrolle der Reinigung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb.: 4.30). Die TEV-Protease enthaltenden Fraktionen des Eluats (EII-EVI) wurden vereinigt. Anschließend wurde der Puffer durch Dialyse bei 7 °C gegen TEV-Lagerungspuffer (Tab.: 4.6) ausgetauscht. Mit einer Amicon200 Kammer wurde die Protease bis zu einer UV-Absorption von 3 (bei 280 nm und einer Schichtdicke von 10 mm) einkonzentriert. Das Konzentrat wurde in 2 ml Aliquots mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.4.2.3 Abspalten des His-Tags des MSP1D1

Um den His-Tag vom MSP1D1 abzuspalten, wurde das Protein mit TEV-Protease geschnitten. Dazu wurde das MSP1D1 mittels Dialyse in TEV-Spaltpuffer (Tab.: 4.7) bei 4 °C überführt. Nach Zugabe von 4 ml TEV-Protease wurde erneut für 18 h gegen 4 l TEV-Spaltpuffer dialysiert. Zur Kontrolle der

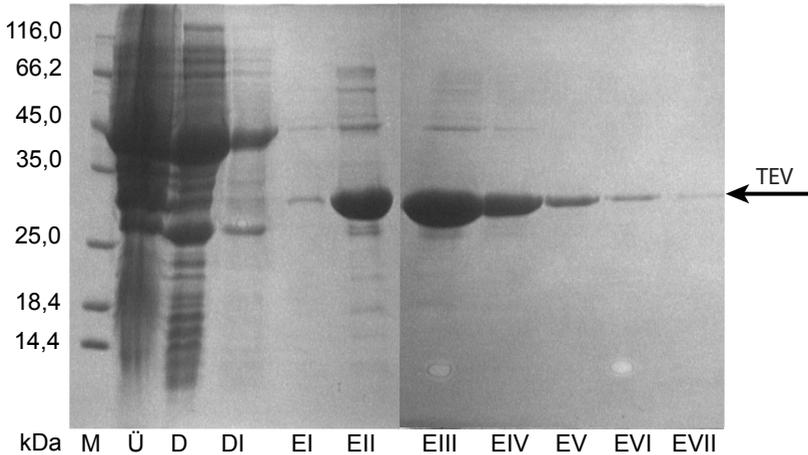


Abbildung 4.30: Coomassie gefärbte SDS-Gele. (**M**) Größenstandard, (**Ü**) Überstand des Zelllysats, (**D**) Durchfluss des Lysats an der Ni²⁺-NTA Säule, (**DI**) zweiter Durchfluss, (**EI - EVII**) Elutionsschritte (Die Bande der TEV-Protease wurde mit einem Pfeil markiert).

Tabelle 4.6: Puffer für TEV-Protease Reinigung

TEV-Lysepuffer	TEV-Elutionspuffer	TEV-Lagerungspuffer
20 mM Tris-HCl, pH 8	20 mM Tris-HCl, pH 8	50 mM Tris-HCl, pH 8
500 mM NaCl	500 mM NaCl	25 mM NaCl
10 mM Imidazol	10 % (v/v) Glycerin	0,5 mM EDTA
		2 mM DTT
		10 % (v/v) Glycerin

Tabelle 4.7: Puffer für die Abspaltung des His-Tags vom MSP1D1

TEV-Spaltpuffer	MSP-Batch-Puffer
50 mM Tris-HCl, pH 8,0	20 mM Tris-HCl, pH 8,0
0,5 mM EDTA	150 mM NaCl
1 mM DTT	50 mM Natriumcholat

Spaltung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb.: 4.31). Nach Zugabe von 50 mM Natriumcholat und 20 ml Ni^{2+} -NTA, die in MSP-Batch-Puffer (Tab.: 4.7) equilibriert worden war, wurde das Ganze bei Raumtemperatur für 2 h auf einem Rollschüttler inkubiert. Dabei banden das abgespaltene His-Tag des MSP1D1 und die TEV-Protease an die Ni^{2+} -NTA. An einer Säule konnte der MSP1D1-haltige Puffer ablaufen (cID). Um verbliebenes MSP1D1 von der Säule zu waschen, wurde noch 2-mal mit 2 CV MSP-Batch-Puffer gewaschen (cIWI und cIWI). Um auch das His-Tag und die TEV-Protease vom Säulenmaterial zu eluieren wurde 3-mal mit 2 CV MSP-Batch-Puffer + 750 mM Imidazol gewaschen (cIEI-cIEIII). Zur Kontrolle der Affinitätschromatographie wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb.: 4.31 rechts). Die MSP1D1-enhaltenden Fraktionen cID und cIWI wurden vereint und der Puffer mittels Dialyse gegen Nanodiscs-Assemblierungspuffer (Tab.: 4.8) ausgetauscht. In einer Amicon200 Kammer wurde das MSP1D1 auf eine Konzentration von 2 mg/ml konzentriert und anschließend in 2 ml Aliquots mit flüssigem Stickstoff eingefroren. An der Lyophylle wurden diese Aliquots gefriergetrocknet und anschließend bei -80°C gelagert.

4.4.3 Herstellung von Nanodiscs

Für die Herstellung von Nanodiscs konnte MSP1D1 mit und ohne His-Tag verwendet werden. Die Lipide POPC und POPG lagen gelöst in Chloroform vor. Um das Chloroform von den Lipiden bzw. Lipidmischungen zu entfernen, wurde die Lösung in einem Reagenzglas mit Hilfe eines feinen Strahles Stickstoffgas getrocknet. Das trockene Lipid wurde in 1 ml Zyklohexan auf-

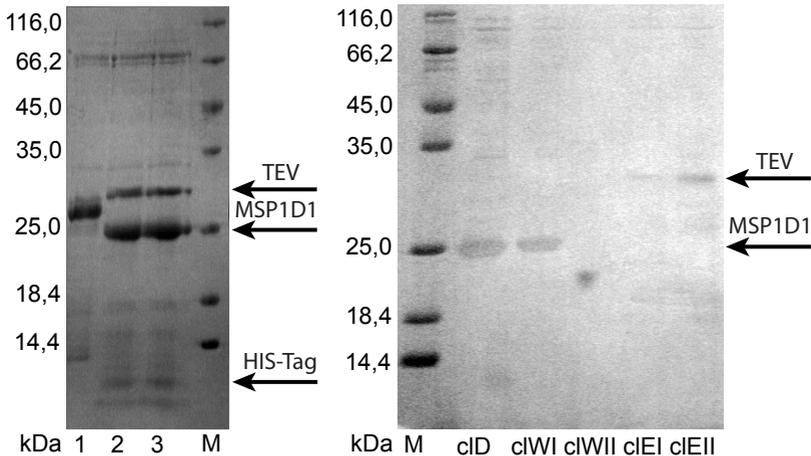


Abbildung 4.31: Coomassie gefärbte SDS-Gele. **Links:** Abspaltung des His-Tag über die TEV-Schnittstelle vom MSP1D1. **(1)** MSP1D1 mit His-Tag vor der Spaltung, **(2 und 3)** Spaltansatz nach Spaltung (MSP1D1 ohne His-Tag, TEV-Protease und abgespalteter His-Tag sind mit einem Pfeil markiert), **(M)** Größenstandard. **Rechts:** **(M)** Größenstandard, **(cID)** Durchfluss nach Spaltung an der Säule, **(cIWI/cIWII)** Waschschritte, **(cIEI/cEII)** Elutionsschritte (TEV-Protease und geschnittenes MSP1D1 wurden mit Pfeilen markiert). Das schwache Signal des abgespaltenen His-Tags ist nicht sichtbar).

Tabelle 4.8: Puffer für die Assemblierung von Nanodiscs

Lipidpuffer	SEC-Puffer	Nanodisc-Assemblierungspuffer
20 mM Tris-HCl, pH 7,4 100 mM Natrium Cholat	10 mM NaPi, pH 7,4 100 mM NaCl	20 mM Tris-HCl pH 7,4 100 mM NaCl 0,5 mM EDTA

genommen und anschließend mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe einer Lyophylle wurde das Zylohexan entfernt und das Lipid gefriergetrocknet. Das Lipid lag nun in Pulverform vor. Dieses wurde bei 37 °C in Lipidpuffer (Tab.: 4.8) aufgenommen, so dass eine Lösung mit 50 mM Lipid und 100 mM Natriumcholat entstand. Ein Aliquot davon wurde dann im Volumenverhältnis 1 : 35 zu Assemblierungspuffer (Tab.: 4.5) mit gelöstem MSP1D1 (1 mg/ml) gegeben, so dass ein molares Verhältnis MSP1D1 : Lipid : Natriumcholat von 1 : 35 : 70 im Assemblierungsansatz vorlag. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation, abwechselnd 3-mal auf Eis und 3-mal bei 4 °C. Durch eine 18-stündige Dialyse gegen das 1000-fache Volumen Assemblierungspuffer wurde das Natriumcholat entfernt. Hier wurde ein Dialyseschlauch mit einem MWCO von 3,5 kDa verwendet. Durch die Entfernung von Natriumcholat bildeten sich bei korrektem anfänglichen molaren Verhältnis des MSP1D1 : Lipid : Natriumcholat von ca. 1:35:70 spontan Nanodiscs. Mit einem 0,45 µm PVDF Filter wurden die Nanodiscs von größeren Verunreinigungen befreit, bevor diese mittels Größenausschlusschromatographie von überschüssigem MSP1D1, überschüssigen Lipiden und anderen Pufferkomponenten gereinigt wurden (Abb.: 4.32). Für die Größenausschlusschromatographie wurde SEC-Puffer (Tab.: 4.8) verwendet. Für die analytische Präparation wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule und für präparative Präparation die Superdex 200 XK 26/70 Säule benutzt. Hierdurch konnte eine Qualitätskontrolle der Nanodiscs durchgeführt werden. Ein schmaler Peak im Chromatogramm der analytischen Säule bei ca. 12 ml zeigt eine Nanodiscpopulation homogener Größe an.

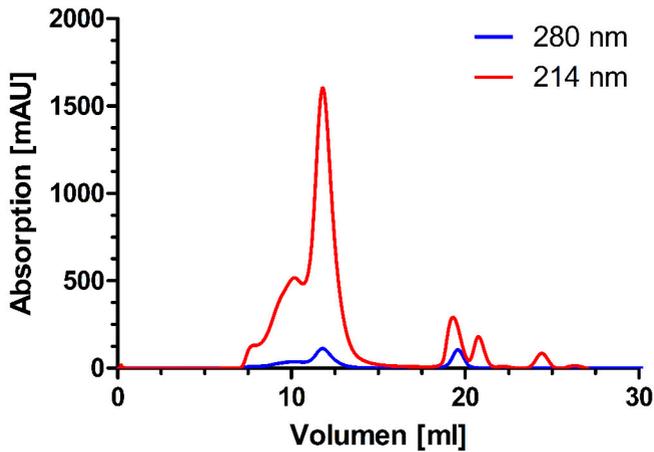


Abbildung 4.32: Die Abbildung zeigt die Separation von POPC/POPG MSP1D1 Nanodiscs mittels Größenausschlusschromatographie an der Superdex 200 10/300 GL Säule. Die Absorption wurde bei 280 nm (blau) und 214 nm (rot) gemessen. Das schmale Signal von 11 ml bis 13 ml repräsentiert Nanodiscs homogener Größe. Bei den Signalen von 7 ml bis 11 ml handelt es sich um überschüssiges Lipid und aggregierte oder fehlgestaltete Nanodiscs. Bei den Signalen um 20 ml handelt es sich um Pufferkomponenten.

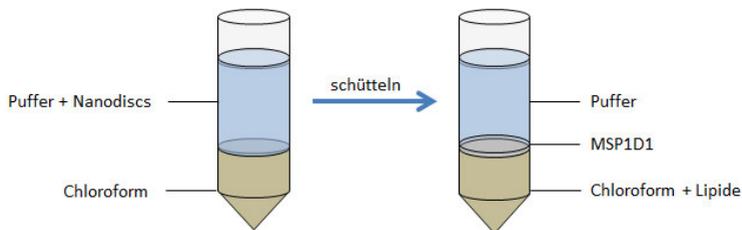


Abbildung 4.33: Die Darstellung zeigt das Prinzip der Isolierung der Lipide aus Nanodiscs für die Dünnschichtchromatografie. Dargestellt ist das Reaktionsgefäß, vor und nach dem Aufbrechen der Nanodiscs, in dem sich die verschiedenen Phasen befinden.

4.4.4 Untersuchung der Lipidzusammensetzung der geladenen Nanodiscs

4.4.4.1 Lipidisolierung aus Nanodiscs

Um den erfolgreichen und gleichberechtigten Einbau der beiden Lipide POPG und POPC in die Nanodiscs zu verifizieren, musste die Lipidzusammensetzung in den Nanodiscs untersucht werden. In dieser Arbeit wurde dazu eine Dünnschichtchromatografie durchgeführt, in der die Lipide aufgetrennt und anschließend sichtbar gemacht werden können. Hierzu mussten die Lipide zunächst aus den Nanodiscs isoliert werden. Dazu wurden 100 μl einer 2 mg/ml Nanodisc-Probe in SEC-Puffer (Tab.: 4.8) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurden 100 μl Chloroform gegeben. Es bildeten sich zwei Phasen aus. Das schwerere Chloroform bildete die untere Phase (Abb.: 4.33). Durch 2-minütiges intensives Mischen der Probe auf einem Vortexer wurden die Nanodiscs durch das Chloroform und die mechanischen Scherkräfte aufgebrochen. Die hydrophoben Lipide lösten sich im Chloroform. Die MSP1D1 Proteine fielen in der wässrigen Lösung aus. Nach Beenden des Schüttelns bildeten sich zwei flüssige Phasen aus, die von einer Schicht MSP1D1 Protein getrennt waren. Die untere Phase bestand aus Chloroform und den darin gelösten Lipiden, die obere aus dem SEC-Puffer (Tab.: 4.8).

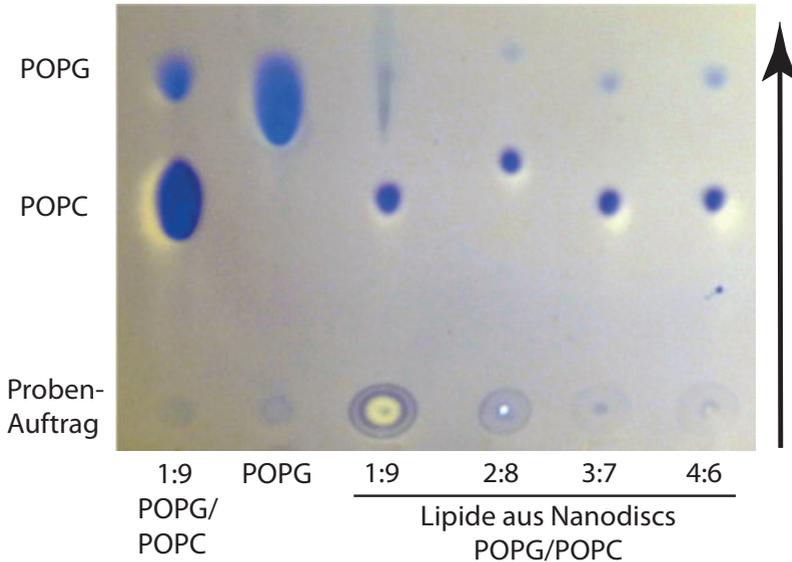


Abbildung 4.34: Die Abbildung zeigt die TLC-Analyse der Lipidzusammensetzung geladener Nanodiscs. Auf den ersten beiden Bahnen von links befinden sich die Kontrollen. POPC hat eine dunkelblaue intensive Färbung. POPG hat eine, im Vergleich zum POPC, helle und weniger intensive blaue Färbung. Die vier rechten Bahnen wurden mit Lipiden beladen, die aus Nanodiscs isoliert wurden. Das nominale molare POPG:POPC-Verhältnis in den Nanodiscs ist unter der jeweiligen Spur angegeben. Am unteren Rand der Platte ist der Auftragungspunkt der Proben zu sehen. Die leichte Abweichung in der Lauffront bei 2:8 wurde wahrscheinlich beim Einbringen der Platte in die Inkubationskammer verursacht. Der Pfeil deutet die Laufrichtung an.

4.4.4.2 Verifizierung der Lipidkomposition mittels Dünnschichtchromatographie

Die Kontrolle der Lipidzusammensetzung wurde mittels TLC (Kapitel: 3.11) durchgeführt. Es wurden jeweils 10 μl der in Chloroform gelösten Lipide auf die TLC-Platte aufgebracht. Verwendet wurden Proben der Nanodiscs mit nominalen molaren POPG/POPC Verhältnissen von 1:9, 2:8, 3:7 und 4:6. Als Kontrolle dienten 10 μl einer 20 mM 1:9 POPG/POPC-Lösung und einer 20 mM POPG-Lösung in Chloroform. Auf der nach dem Lauf gefärbten Platte

(Abb.: 4.34) war zu erkennen, dass beide Lipide in die Nanodiscs eingebaut wurden. Das Signal des POPG ist im Verhältnis schwächer und heller als das des POPC. Daher ist ein quantitativer Vergleich der Lipide mit dieser Methode nicht möglich. Qualitativ wird das Signal des POPGs intensiver, je mehr POPG in der anfänglichen Lipidlösung enthalten war. In der 1:9 POPG/POPC Probe ist das Signal des POPG sehr schwach. Die Intensität steigt in etwa proportional zur anfänglichen Konzentration des POPG in den Lipidmischungen an. Die Intensität des POPC-Signals nimmt hingegen etwas ab. Dies deutet darauf hin, dass der POPG Anteil in den Nanodiscs mit zunehmenden POPG Anteil in der Assemblierungs-Lipidmischung steigt. Eine Quantifizierung der Lipidmischung der Nanodiscs war jedoch nicht möglich.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Das humane BST2tmcyt

Der Versuch der Herstellung von Proteinkonstrukten in *E. coli* scheiterte, wenn diese die Transmembrandomäne des BST2 beinhalteten. Hierbei lysierten die *E. coli* Zellen umgehend nach Induktion der Expression. Daher wurden diese Konstrukte mittels auf *E. coli* basierender zellfreier Proteinsynthese hergestellt. Die Synthese erfolgte, je nach späterer Verwendung des Proteins, entweder unter Einsatz unmarkierter, [U-¹⁵N;NA-NWCQ] markierter oder [U-¹³C, U-¹⁵N] markierter Aminosäuren. Das HIS-BST2tmcyt wurde unter Verwendung von Affinitäts- und Größenausschlusschromatografie gereinigt. Während des gesamten Synthese- und Reinigungsprozesses lag das Membranprotein stets in detergenzhaltigem Puffer milder Detergenzien vor, so dass wahrscheinlich keine Denaturierung des Membranproteins erfolgte. Die Ausbeute an gereinigtem Protein lag bei durchschnittlich 0,8 mg pro 3 ml Reaktionsansatz und zeigte keine Abhängigkeit von der gewählten Isotopenmarkierung des Zielproteins. Für die Herstellung einer durchschnittlichen NMR-Probe des HIS-BST2tmcyt waren in dieser Arbeit ca. 2 mg Protein erforderlich.

5.1.1 NMR-spektroskopische Experimente ermöglichten nahezu vollständige Zuordnung der Proteinrückgratresonanzen

Durch die Verwendung von dreidimensionalen NMR-Experimenten konnte eine nahezu vollständige Resonanzzuordnung des BST2tmcyt in Phosphatpuffer (pH 7) mit 500 mM DPC erreicht werden. Die Zuordnungsexperimente erfolgten in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) bei 40 °C. Die NMR-Proben enthielten dabei 500 μ M HIS-BST2tmcyt. Die folgenden Zuordnungsquoten beziehen sich auf die 51 Aminosäuren des BST2tmcyt. Für die Rückgratamidgruppen konnten 98,0% der H^N -Resonanzen und 94,1% der N-Resonanzen zugeordnet werden. Die Zuordnung der C^α -Resonanzen war zu 98,1% und die der C^β -Resonanzen zu 95,7% vollständig. Die Resonanzen der Carbonylkohlenstoffe wurden zu 92,2% und die H^α Atome zu 84,9% zugeordnet. Zusätzlich wurden 58,1% der H^β Atome zugeordnet. Weitere NMR-Experimente sind erforderlich, um zusätzliche Seitenkettenatome zuzuordnen. Den C-terminalen Aminosäuren N49 und S50 konnten je zwei komplette Resonanzsätze zugeordnet werden. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um zwei verschiedene Konformationen handelt. Diese entstehen wahrscheinlich aufgrund der höheren Flexibilität am C-terminalen Ende des HIS-BST2tmcyt. Das C-terminale Ende des BST2tmcyt ist jedoch ohnehin artifizuell, da das natürlich vorkommende Vollängen-Protein BST2 hier fortgesetzt werden würde.

5.1.2 Die Transmembrandomäne von BST2 konnte lokalisiert werden

Unter Verwendung der gemessenen NMR-Daten konnte die wahrscheinliche Ausdehnung der Transmembrandomäne von BST2tmcyt ermittelt werden. Durch Berechnungen des Programmes TALOS-N konnte eine relativ unflexible, 29 Aminosäuren lange Proteinregion mit α -helikaler Signatur ermittelt werden. Diese erstreckt sich vom R19 bis zum K47. Auch die intensiven NOE-Korrelationen sequenziell benachbarter Amidprotonen ($d_{NN}(d_{N\delta}, d_{\delta N})$), so-

wie die Helix-typischen NOE-Kreuzpeaks zwischen H^α -Atomen und den in charakteristischem Sequenzabstand folgenden H^N -Protonen ($d_{\alpha N}(i, i + 2)$, $d_{\alpha N}(i, i + 3)$ und $d_{\alpha N}(i, i + 4)$), die nur an dieser Stelle beobachtet wurden, deuten auf eine α -Helix hin. Unterbrochen wird diese helikale Region von einem zwei Aminosäuren langen Bereich. Diese zwei Aminosäuren G38 und V39 zeigen RCI-S²-Werte, die auf eine etwas erhöhte Flexibilität hindeuten und weisen gleichzeitig keine α -Helix-typischen chemischen Verschiebungen auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass die α -Helix in diesem Bereich unterbrochen ist bzw. einen Knick hat. Gestützt wird diese Hypothese davon, dass eine dieser Aminosäuren ein Glycin ist und diesen beiden Aminosäuren mit P40 ein Prolin folgt. Sowohl Glycine als auch Proline sind aufgrund ihrer Struktur, als typische Helixbrecher bekannt [8]. Auch die ebenfalls an dieser Stelle fehlenden NOE-Korrelationen ($d_{NN}(d_{N\delta}, d_{\delta N})$) der sequenziell benachbarten Amidprotonen stützt diese Vermutung. Auffallend ist zudem das Fehlen der $d_{\alpha N}(i, i + 2)$, $d_{\alpha N}(i, i + 3)$ und $d_{\alpha N}(i, i + 4)$ im Bereich C-terminal der Unterbrechung der Helix. Eventuell ist dies ein Hinweis darauf, dass dieser Bereich der Helix bereits außerhalb der Mizelle liegt und daher etwas flexibler ist als der Bereich innerhalb der Mizelle.

Bereits Kupzig et al. (2003) [66] gingen davon aus, dass es sich bei BST2 um ein Typ-II Transmembranprotein handelt. Durch die Untersuchung der sequenzspezifischen Hydrophobizität des Proteins postulierten sie eine 22 Aminosäuren lange Transmembrandomäne vom L22 bis zum I43. Bei Skasko et al. (2012) [123] wird eine 24 Aminosäuren lange Transmembranhelix vom L22 bis zum T45 angenommen. Die in den beiden zitierten Arbeiten angenommene Lage der Transmembranhelix in der BST2-Sequenz stimmt mit der Position der in dieser Arbeit experimentell bestimmten α -Helix von R19 bis K47 recht gut überein. Bezüglich der Länge der Transmembranhelix gibt es jedoch Differenzen. Es ist denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Ausdehnung der Transmembranhelix durch die hier verwendete Modellmembran (DPC-Mizelle) beeinflusst wird und eventuell geringfügig von der Länge dieser Helix in einer Lipidmembran abweicht. Um diese Frage zu klären, wären komplementäre experimentelle Studien an BST2 in Modell-

membranen erforderlich, welche die Struktur, Zusammensetzung und Dynamik BST2-haltiger Zellmembranen genauer widerspiegeln als DPC-Mizellen (z.B. Nanodiscs, Liposomen). Dennoch bleibt zu konstatieren, dass die hier gefundene Ausdehnung der α -Helix von R19 bis zum K47 auf experimentellen Daten basiert, während die in der Literatur postulierten, etwas kürzeren Helices das Ergebnis von Strukturvorhersagen sind. Eine detaillierte Charakterisierung der wahrscheinlich bei G38 und V39 unterbrochenen Transmembranhelix des BST2 bedarf weiterer experimenteller Untersuchungen.

5.2 Das HIV-1 VpU-HIS

5.2.1 Zellfreie Synthese von VpU-HIS lieferte ausreichende Proteinmengen für NMR-Messungen

Das HIV-1 VpU-HIS wurde durch *E. coli* basierte zellfreie Proteinsynthese hergestellt. Dies geschah zum einen, um denaturierende Bedingungen während der Synthese und Reinigung des Proteins zu vermeiden. Das alternativ im Institut verwendete Protokoll zur Reinigung von VpU aus *E. coli* Zellen, modifiziert nach Wittlich [150], beinhaltet eine Denaturierung. Zum anderen wurde VpU-HIS genutzt, um die Eignung des in dieser Arbeit etablierten zellfreien Synthesystems für die Produktion von Transmembranproteinen zu validieren. Das Protein wurde entweder unter Verwendung unmarkierter Aminosäuren oder mit [U-¹⁵N]₂NA-NWCQ], [U-¹³C, U-¹⁵N] bzw. [U-²H, U-¹³C, U-¹⁵N] isotoopenmarkierten Aminosäuren hergestellt. Das Reinigungsprotokoll gewährleistete, dass das Membranprotein VpU-HIS mit Hilfe milder Detergenzien ununterbrochen in Lösung gehalten und somit höchstwahrscheinlich nicht denaturiert wurde. Die Ausbeute lag bei durchschnittlich 0,8 mg gereinigtes VpU-HIS pro 3 ml Reaktionsmedium und zeigte keine Abhängigkeit von der Art der gewählten Isotoopenmarkierung des VpU-HIS. Für eine Proteinprobe wurden im Durchschnitt 2 mg VpU-HIS benötigt.

5.2.2 Mehr als 70% der Proteinrückgratresonanzen des VpU-HIS wurden zugeordnet

Basierend auf den NMR-Experimenten an dreifach isotopenmarkiertem VpU-HIS [$U\text{-}^{15}\text{N}, U\text{-}^{13}\text{C}, U\text{-}^2\text{H}$] konnte eine teilweise sequenzielle Resonanzzuordnung des Volllängen-VpU erreicht werden (Anhang: 6.2). Die dazu verwendeten NMR-Proben enthielten $522\ \mu\text{M}$ VpU-HIS in $20\ \text{mM}$ Phosphatpuffer (pH 7,0) unter Zusatz von $500\ \text{mM}$ DPC und wurden bei $40\ ^\circ\text{C}$ untersucht. Eine ununterbrochene sequenzielle Resonanzzuordnung war für drei Fragmente des 81 Aminosäuren umfassenden Proteins VpU möglich, das sind die Bereiche P3 bis A16, I18 bis E29 und I43 bis L81. Die in diesen drei Fragmenten durch sequenzielle Verknüpfung und Abgleich mit der Aminosäuresequenz des VpU zugeordneten Resonanzfrequenzen widerspiegeln die Hauptkonformation des VpU.

Für den C-terminalen Bereich des VpU konnte einigen Aminosäuren (L67, V68, R70, G71, H72, L73, A74, W76 und V78) ein zweiter Satz von Resonanzfrequenzen zugeordnet werden. Im Gegensatz zu den Korrelationsignalen der durchgehend zugeordneten, dominierenden Konformation (Hauptkonformation) des C-terminalen VpU-Fragmentes weisen diese zusätzlichen Korrelationssignale deutlich geringere Intensitäten und kleinere Linienbreiten auf. Einige der zusätzlichen Resonanzsätze geringer Intensität zeigen sequenzielle Verknüpfungen zu Resonanzfrequenzen von Aminosäuren, welche bereits der Hauptkonformation zugeordnet waren. Erst dadurch wurde eine sequenzielle Zuordnung der schwachen Resonanzsätze überhaupt möglich. Das beobachtete Verhalten deutet auf eine ausgeprägte Flexibilität der VpU Konformation im Bereich von L67 bis V78 hin. Die Koexistenz verschiedener Konformationen könnte mit der möglichen cis/trans Isomerisierung des Prolins P75 zusammenhängen. Es ist auch möglich, dass der C-terminal befindliche, artifizielle His-Tag oder Wechselwirkungen mit dem verwendeten Detergenz hier eine Rolle spielen. Darüber hinaus weisen die beiden Enden von Proteinen häufig flexible Konformationen auf.

Neben den sequenziell zugeordneten Resonanzen sind in den 2D und 3D

NMR-Spektren des VpU-HIS eine Reihe weiterer Korrelationssignale enthalten, die sich mit den vorhandenen NMR-Spektren noch nicht in eindeutiger Weise bestimmten Aminosäuren des VpU zuordnen ließen. So konnten 20 der im 2D [$^1\text{H},^{15}\text{N}$]-TROSY-Spektrum beobachteten Rückgrat $\text{H}^{\text{N}}\text{N}$ Korrelationen noch nicht eindeutig zugeordnet werden. Diese Zahl deckt sich nahezu mit den 18 Aminosäuren des VpU, für die zwar Rückgrat $\text{H}^{\text{N}}\text{N}$ Amid-Korrelationspeaks im 2D [$^1\text{H},^{15}\text{N}$]-TROSY-Spektrum erwartet werden, für die eine eindeutige Resonanzzuordnung aber noch aussteht.

Unter alleiniger Berücksichtigung der zur Hauptkonformation gehörigen und eindeutig zugeordneten Resonanzen in den drei sequenziell zugeordneten Fragmenten des VpU ergeben sich bei Bezug auf die Gesamtzahl der für VpU erwarteten NMR Signale folgende Grade der bisher erreichten Signalzuordnung: 74,7% für H^{N} , 72,8% für N, 79,1% für C^{α} , 76,9% für C^{β} und 80,3% für CO. Zur Vervollständigung der Resonanzzuordnung wären zusätzliche und komplementäre 3D NMR-Spektren erforderlich.

5.2.3 Die NMR-Daten sind mit einer postulierten Transmembranhelix sowie einem strukturierten zytoplasmatischen Bereich des VpU im Einklang

In dieser Arbeit wurde für die strukturelle Charakterisierung des HIV-1 VpU das Volllängen-Protein verwendet und kein Teilkonstrukt. Im Folgenden wird zur Benennung der einzelnen Sekundärstrukturelemente die bei Wittlich et al. (2009) [151] eingeführte Nomenklatur verwendet. Bei dieser wird die Transmembranhelix als Helix I bezeichnet und die zytoplasmatischen Helices fortlaufend durchnummeriert. Anhand von Teilkonstrukten wurde die Sekundärstruktur von HIV-1 VpU bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht. Dabei wurden die Aminosäuresequenzen von VpU aus verschiedenen HIV-1 Isolaten zugrunde gelegt, welche geringfügig voneinander abweichen. Bei Sharpe et al. (2006) [116] wurde ein VpU-Konstrukt verwendet, welches die Aminosäuren 1 bis 40 des VpU des HIV-1 Isolat BH10 umfasste. Dort wurde eine 24 Aminosäuren lange Transmembranhelix

(Helix I) gefunden, die sich von Aminosäure 3 bis 27 erstreckt. Bei dieser Festkörper-NMR-Studie wurde VpU(1-40) in Lipidmembranen untersucht. In Arbeiten von Park et al. [97,98] wurde ein Peptid verwendet, das die Aminosäuren 2 bis 30 des VpU (Isolat BH10) beinhaltet. Dabei wurde eine Helix von Aminosäure 8 bis 25 gefunden. Dieses Ergebnis wurde sowohl mittels Flüssigkeits-NMR-Untersuchungen am VpU-Peptid in DHPC-Mizellen [97] als auch mit Festkörper-NMR-Untersuchungen an VpU in DHPC/DMPC Mizellen [98] gewonnen. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Transmembranhelix erstreckt sich vom P3 bis zum W23 des VpU (Isolat SF162) (Kap.: 4.2.2.3). Obwohl ein anderes HIV-1 Isolat verwendet wurde, entspricht der Beginn der Transmembranhelix dem bei Sharpe et al. [116] gefundenen. Die Abweichung des C-terminalen Endes der Transmembranhelix um eine bis drei Aminosäuren von den zuvor publizierten Daten kann verschiedene Ursachen haben. Hier sind unter anderem die abweichende VpU-Sequenz der verwendeten HIV-1 Isolate und die unterschiedlichen Modellmembranen zu nennen.

Betrachtet man die Arbeiten, welche bisher für den zytoplasmatischen Bereich des VpU publiziert wurden, so ergeben sich in diesem Bereich zwei oder drei helikale Abschnitte. Bei Wittlich et al. (2009) [151] wurde dieser Bereich anhand eines Konstrukts untersucht, welches die Aminosäuren I39 bis L81 des VpU (Isolat SF162) umfasste. Anhand des Vergleichs von NMR-Spektren mit und ohne DPC-Mizellen wurde festgestellt, dass sich die α -helikale Sekundärstruktur der zytoplasmatischen Domäne des VpU nur in Anwesenheit von DPC-Mizellen ausbildet. So wurden in 100 mM DPC zwei Helices von I39 bis E48 (Helix II) und von L64 bis R70 (Helix III) gefunden. Auch in der Arbeit von Ma et al. (2002) [74] wurden zwei α -Helices im zytoplasmatischen Bereich des VpU (Isolat HTLVIII_B) gefunden. In Gegenwart von Mizellen (200 mM DHPC) umfassen diese die Aminosäuren 30 - 49 (Helix II) und 58 - 70 (Helix III). Federau et al. (1996) [32] identifizierten zwei Helices von Aminosäure 37 - 51 (Helix II) und 57 - 72 (Helix III) des VpU (Isolat HTLVIII_B). Diese Ergebnisse wurden mit Flüssigkeits-NMR in 50% TFE erzielt. Drei Helices im zytoplasmatischen Bereich des VpU wurden in

der Arbeit von Willbold et al. (1997) [146] gefunden. Diese erstrecken sich von Aminosäure 40 - 51 (Helix II), 62 - 68 (Helix III) und 75 - 79 (Helix IV) des VpU (Isolat SF162). Diese Ergebnisse wurden ebenfalls mittels Flüssigkeits-NMR ermittelt, jedoch unter Hochsalzbedingungen mit 500 mM Na₂SO₄. Dies könnte das Vorhandensein der Helix IV erklären. In den letztgenannten beiden Arbeiten wurden die Messungen bei einer niedrigeren Temperatur von 25 °C durchgeführt. Zudem lag in beiden Studien das VpU nicht in einer Modellmembran vor, sondern wurde anderweitig in Lösung gehalten. In der vorliegenden Arbeit wurden eine zytoplasmatische Helix und zwei Bereiche mit jeweils drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die helikalen Charakter zeigen, aus den chemischen Verschiebungen bzw. der Aminosäuresequenz des VpU (Isolat SF162) abgeleitet (Kap.: 4.2.2.3). Eine α -Helix wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Amidprotonen (z.B. der Aminosäure *i*) und Carboxylsauerstoffatomen (z.B. der Aminosäure *i*-4) in der Sequenz des Proteins stabilisiert. Somit muss eine α -Helix mindestens fünf aufeinanderfolgende Aminosäuren umfassen, praktisch ist eine energetische Stabilisierung durch mehrere Wasserstoffbrückenbindungen erforderlich. Daher kann bei drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren mit α -Helix-typischen chemischen Verschiebungen nicht auf das Vorliegen einer α -Helix geschlossen werden. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Helix erstreckt sich von Aminosäure I28 bis I46 und entspricht der Helix II früherer Arbeiten. Der erste Bereich mit drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren mit helikalem Charakter erstreckt sich von S65 bis L67 und liegt somit im Bereich der Helix III vorheriger Arbeiten. Der zweite Bereich dieser Art erstreckt sich von D79 bis L81. Der helikale Charakter dieses Bereiches ist möglicherweise durch das artifizielle His-Tag verursacht und findet sich in keiner der vorherigen Arbeiten.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Sekundärstrukturelemente der zytoplasmatischen Domäne des VpU lassen sich am besten mit den Ergebnissen von Wittlich et. al. vergleichen [151] (VpU-Sequenz des gleichen HIV-1 Isolats, Untersuchung in DPC Mizellen). Allerdings enthält das dort verwendete Protein lediglich die Aminosäuren I39 bis L81 des VpU. Die von Wittlich

et al. experimentell gefundene Helix II endet mit E48, Helix III erstreckt sich von L64 bis R70. Die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Programmes TALOS-N identifizierten helikalen Bereiche sind etwas kürzer, Helix II endet bei I46 und im Bereich von Helix III zeigen nur S65-L67 helikalen Charakter. Wittlich et al. schätzen aufgrund der gemessenen chemischen Verschiebungen des VpU die Population der helikalen Konformation in der NMR Probe für beide Helices ab. Demnach steigt die Flexibilität der VpU Konformation zum C-terminus hin an. Helix II liegt in ca. 80% und Helix III in ca. 40% der dynamischen Konformere vor [151]. Die entsprechend geringer ausgeprägten Änderungen der chemischen Verschiebungen im Bereich der beiden Helices sind vermutlich die Ursache dafür, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine geringere Ausdehnung der helikalen Bereiche ableitet wurde. Die höhere Konformationsdynamik in der C-terminalen Hälfte des VpU spiegelt sich auch im relativ niedrigen und damit für eine reguläre α -Helix untypischen RCI-S2 Ordnungsparameter wider (Kap.: 4.2.2.3).

In der vorliegenden Arbeit beginnt Helix II mit I28. Dies deckt sich nahezu mit dem Beginn der Helix II (W30 bis E49) im Peptid aus den VpU Aminosäuren 28 bis 81 (Isolat HTLVIII_B) in der Gegenwart von DHPC Mizellen [74]. Auch wenn die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte Helix II des VpU in großen Teilen lediglich aus der Aminosäuresequenz des VpU vorhergesagt wurde, so beruhen Anfang und Ende der postulierten Helix II auf experimentellen NMR-Daten.

Eine weitere Ursache der unterschiedlichen Ausdehnung helikaler Bereiche in den publizierten VpU Studien könnte in den unterschiedlichen Arten und Konzentrationen der verwendeten Detergensmizellen liegen. Die Titration des VpU gegen DPC im Rahmen der vorliegenden Arbeit (Kap.: 4.2.2.4) hat gezeigt, dass die chemischen Verschiebungen der Aminosäuren an den Rändern der α -helikalen Bereiche des VpU und daher vermutlich auch die Ausdehnung der Helices sensitiv auf eine Veränderung der DPC Konzentration reagieren.

5.3 Interaktion von HIS-BST2tmcyt und VpU-HIS

Unter Verwendung der zytoplasmatischen und der Transmembrandomäne des BST2 sowie des kompletten VpU wurde in der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkung dieser beiden Proteine auf Strukturebene untersucht. Da es sich bei dem BST2 um ein Typ-II Transmembranprotein [66] und bei dem VpU um ein Typ-I Transmembranprotein [97] handelt, war eine antiparallele Orientierung der beiden Transmembrandomänen zu erwarten. Eine solche wurde auch in zuvor publizierten Arbeiten nachgewiesen [5, 123]. Anhand von Untersuchungen eines Peptides, welches die Aminosäuren K18 bis K47 des BST2 enthielt, und eines weiteren Peptides, das die Aminosäuren Q2 bis R30 des VpU (Isolat BH10) umfasste, wurde in der Arbeit von Skasko et al. (2012) [123] die Interaktion der beiden Transmembranhelices untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Aminosäuren V30, I34 und L37 des BST2 und die Aminosäuren I4, I6, A10, I15, W22, S23, I26 und I27 des VpU an der Bindung beteiligt sind. Das hoch konservierte ¹⁰AXXXAXXA¹⁸ Motiv in der Transmembranhelix des VpU wurde als essenziell für die Bindung des VpU an BST2 eingestuft. Ebenso ist die Anwesenheit der Isoleucine I16, I17 und I18 des VpU (Isolat BH10) wichtig für die Stabilisierung der Bindung [72]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit ein anderes VpU (Isolat SF162) verwendet wurde, dessen Aminosäuresequenz sich von der des VpU aus Isolat BH10 leicht unterscheidet, ist das AXXXAXXA Motiv auch hier vorhanden. Eine Gegenüberstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten VpU und BST2 Konstrukte mit denen, welche in der Arbeit von Skasko et al. benutzt wurden, ist in Abbildung 5.1 zu sehen.

5.3.1 Zytoplasmatische Domänen von VpU und BST2 sind an der Interaktion der beiden Proteine beteiligt

Die Aminosäuren S9, R10, V11, M13, E14 und D15 aus dem zytoplasmatischen Teil und L24 aus der Transmembranhelix des BST2tmcyt zeigen bei der Titration mit VpU-HIS signifikante Änderungen der chemischen Verschiebungen ihrer H^N-Amidresonanzen (Abb.: 4.21). Dies deutet auf die

räumliche Nähe dieser Aminosäuren zur Bindestelle hin. Dies gilt sinngemäß ebenso für die Aminosäuren V14 und I20 aus der Transmembranhelix und T24, E29, V68 und E69 aus der zytoplasmatischen Domäne des VpU, deren chemische Verschiebungen sich bei der Titration mit HIS-BST2tmcyt signifikant ändern (Abb.: 4.24). Interessanterweise befinden sich alle auf diese Weise detektierten potentiellen Bindungsstellen in den zytoplasmatischen Bereichen der beiden Proteine oder in der Hälfte der jeweiligen Transmembranhelix, die sich an die zytoplasmatische Domäne anschließt (Abb.: 5.1). Dies deutet auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine in der Nähe der polaren Lipid-Wasser Grenzschicht auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran hin und steht im Einklang mit der vermuteten antiparallelen Orientierung der Transmembranhelices der beiden Interaktionspartner. Die wahrscheinlich an der Bindung des BST2tmcyt beteiligten V14 und I20 in der Transmembranhelix des VpU sind unmittelbare Nachbarn zweier Alanine im $^{11}\text{A}\text{X}\text{X}\text{X}\text{A}\text{X}\text{X}\text{X}\text{A}^{19}$ Motiv des VpU. Eine Bindung der voluminösen Seitenkette des L24 des BST2 an das $^{11}\text{A}\text{X}\text{X}\text{X}\text{A}\text{X}\text{X}\text{X}\text{A}^{19}$ Motiv des VpU stünde mit dem von Skasko et al. [123] postulierten Kontakt der stark hydrophoben Seiten der beiden Transmembranhelices in Einklang. Allerdings unterscheiden sich die Sequenzpositionen der meisten von Skasko et al. identifizierten potentiellen Bindestellen auf beiden Proteinen stark von den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Kandidaten. Für diese signifikanten Unterschiede kommen mehrere Ursachen in Frage. Erstens unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen der in beiden Arbeiten verwendeten VpU Varianten. Zweitens umfassen nur die in der vorliegenden Arbeit verwendeten VpU und BST2 Proteine sowohl die Transmembranhelices als auch die zytoplasmatischen Bereiche beider Proteine und damit alle potentiellen Kontaktstellen, während bei Skasko et al. wesentlich kürzere Peptide untersucht wurden (Abb.: 5.1). Drittens wurden die Untersuchungen in unterschiedlichen Detergenzmizellen durchgeführt. Zum besseren Verständnis der VpU-BST2 Interaktion sind weitere Studien unter Einbeziehung der zytoplasmatischen Domänen beider Proteine in besser geeigneten Modellmembranen (z.B. Nanodisks) erforderlich. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Transmembranhe-

lices des VpU (P3 bis W23; 21 Aminosäuren) und des BST2 (R19 bis K47; 29 Aminosäuren) unterscheiden sich deutlich in ihrer Länge. Dies könnte auf einen starken Tilt der BST2-Helix relativ zur Membrannormalen hindeuten. Andererseits ist die BST2-Helix bei G38/V39 unterbrochen und könnte an dieser Stelle einen starken Knick aufweisen. Diese Frage könnte auf der Basis der Messung geeigneter dipolarer Kopplungen des BST2 genauer untersucht werden. Auch diese Messungen sollten idealerweise an BST2 in Nanodisks erfolgen

5.3.2 Fusionsprotein aus BST2myc und VpU wurde entworfen und konnte synthetisiert werden.

Um die Interaktion zwischen BST2 und VpU im Detail zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit ein Fusionsprotein aus beiden Proteinen entworfen. VpU besitzt nur einen sehr kurzen extrazellulären Bereich. Daher ist anzunehmen, dass sich die Interaktion von VpU und BST2 auf die Transmembrandomäne und die zytoplasmatischen Bereiche beider Proteine beschränkt. Der N-Terminus des BST2 ist im Zytoplasma lokalisiert. Der N-Terminus des VpU liegt hingegen auf der anderen Seite der Zellmembran im extrazellulären Bereich. Durch diese Orientierungen ist es möglich, ein Fusionsprotein aus den vollständigen zytoplasmatischen und Transmembrandomänen beider Proteine herzustellen, welches die erwartete antiparallele Bindung der Transmembranhelices der Proteine zulässt. Bei der Wahl der Länge des extrazellulären Teils des BST2 und des Linkers zwischen beiden Proteinen existieren Freiheitsgrade, die zur Optimierung des Fusionsproteins genutzt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde ein 51 Aminosäuren langes BST2-Konstrukt charakterisiert. Dieses enthielt C-terminal der experimentell gefundenen Transmembranhelix (R19 - K47) noch vier weitere Aminosäuren. Diese 51 Aminosäuren wurde auch für den BST2-Abschnitt des Fusionsproteins gewählt. Als Linker wurde eine zehn Aminosäuren lange (GS)₅-Sequenz gewählt. Beide Variablen könnten in weiterführenden Experimenten empirisch variiert werden, um die Herstellung als auch die Interaktion des BST2-

A:

	10	20	30
VpU (1–81)	<u>MQP</u> <u>IQ</u> <u>LLAIV</u>	<u>ALVVA</u> <u>ALLAI</u>	<u>VV</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>VY</u> <u>IEY</u>
	40	50	60
	<u>RKILRQ</u> <u>RKID</u>	<u>RLIDR</u> <u>ITERA</u>	<u>EDSGNE</u> <u>SEGD</u>
	70	80	
	<u>QEELS</u> <u>SAL</u> <u>VER</u>	<u>GHLAP</u> <u>WDVDD</u>	<u>L</u>
	10	20	30
BST2 (1–51)	<u>MA</u> <u>STSYDY</u> <u>SR</u>	<u>VP</u> <u>MED</u> <u>GDKRS</u>	<u>KLL</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u>
	40	50	
	<u>LLI</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>P</u>	<u>LI</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>S</u>	<u>E</u>

B:

	10	20	30
VpU (2–30)	<u>-Q</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>A</u>	<u>LV</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>V</u>	<u>V</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>R</u>
	10	20	30
BST2 (18–47)		<u>KRS</u>	<u>KLL</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u>
	40	47	
	<u>LLI</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>P</u>	<u>LI</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>K</u>	

Abbildung 5.1: NMR-basierte Studien zur Wechselwirkung von VpU und BST2. **A:** Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Die zytoplasmatischen und Transmembrandomänen beider Proteine wurden in DPC Mizellen untersucht. VpU Sequenz stammt aus HIV-1 Isolat SF162. **B:** Literaturdaten aus Skasko et al. (2012) [123]. Die Transmembrandomänen mit wenigen flankierenden Aminosäuren wurden in DHPC Mizellen studiert. VpU Sequenz stammt aus HIV-1 Isolat BH10. Helikale Bereiche wurden mittels Analyse der chemischen Verschiebungen bzw. der Aminosäuresequenz ermittelt. Transmembranhelices sind doppelt, zytoplasmatische Bereiche mit helikalem Charakter sind einfach unterstrichen. Aminosäuren, deren chemische Verschiebungen sich bei Zugabe des Interaktionspartners am stärksten änderten sind rot hervorgehoben. Farblich markiert sind das stark konservierte AXXXAXXA Motiv (blau) und das darauf folgende invariante Tryptophan (grün) in der Transmembranregion des VpU.

und des VpU-Bereichs zu optimieren. Nach erfolgreichem Einbau des Fusionsproteins in eine membranähnliche Umgebung (z.B. Mizelle oder Nanodisc) sollte die räumliche Nähe der beiden Interaktionspartner den heterodimeren Komplex stabilisieren und so die Untersuchung der Interaktion mit NMR-Spektroskopie vereinfachen. Bei Verwendung separater Proteine ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass beide Interaktionspartner in unterschiedlichen Mizellen vorliegen und so eine Energiebarriere für die Komplexbildung überwunden werden muss. Durch erhöhte Temperatur sollte es möglich sein, eine solche Barriere zu überwinden. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die NMR-Messungen an beiden Proteinen (HIS-BST2tmcyt und VpU-HIS) bei 40 °C durchgeführt. Darüber hinaus haben experimentelle NMR-Studien zur Dimerisierung des Transmembranproteins Glycophorin A in DPC-Mizellen und DHPC-Bizellen gezeigt, dass sich in diesen Systemen Homodimere des Glycophorin A spontan bilden [84]. Der Vorteil eines Fusionsproteins aus beiden Interaktionspartnern besteht darin, dass sich beide Partner stets in räumlicher Nähe zueinander befinden und folglich in derselben Mizelle lokalisiert sein sollten. Die genannte Energiebarriere sollte daher gar nicht existieren. Obwohl die Herstellung des Fusionsproteins durch die Firma CubeBiotech gelang, scheiterte die Elution des Fusionsproteins von der Affinitätsäule im präparativen Maßstab. Um dieses Problem zu umgehen, könnte alternativ auf ein His-Tag zurückgegriffen werden. Auch der Einsatz anderer Detergenzien (z.B. DHPC) bzw. die Veränderung der Detergenzkonzentration bei der Expression bzw. Reinigung sollte für zukünftige Experimente erwogen werden. Es ist denkbar, dass die im Fusionsprotein enthaltenen Interaktionspartner direkt nach der Proteinsynthese einen stabilen Komplex (Heterodimer) bilden, sofern der flexible Linker dies zulässt. Dadurch sollte die Anfälligkeit des Fusionsproteins für unspezifische Wechselwirkungen drastisch sinken. Um diese Hypothese zu testen sollte der Linker in Länge und Art variiert werden.

5.4 Elektrostatisch geladene Nanodiscs

5.4.1 Erfolgreiche Herstellung elektrostatisch geladener Nanodiscs

In dieser Arbeit wurde die effiziente Herstellung von stabileren und elektrostatisch geladenen Nanodiscs getestet. Mit diesen positiv geladenen Nanodiscs soll in weiterführenden Versuchen eine höhere Konzentration des Proteins in den zu messenden NMR-Proben erreicht werden, als es mit den bisherigen ungeladenen Nanodiscs möglich war. Zur weiteren Stabilisierung der Nanodiscs wurde im Rahmen dieser Arbeit die MSP Variante MSP1D1 in unserem Labor eingeführt. Bei dieser Variante fehlt im Vergleich zum ursprünglichen MSP1 die N-terminale Hälfte der Helix I. Mit Hilfe von MSP1D1 produzierte Nanodiscs zeichnen sich durch eine erhöhte Stabilität aus [24].

Die MSP1D1-Herstellung wurde erfolgreich in unserem Labor etabliert. Das MSP1D1 wurde im Fermenter hergestellt und mit einem etablierten Protokoll gereinigt. Die Proteinreinheit als auch Proteinausbeute pro Gramm Zellpellet war hierbei identisch mit der der Proteinreinheit und Proteinausbeute der Herstellung im 1 l Kolben. Unter Verwendung dieses Gerüstproteins wurden erfolgreich Nanodiscs hergestellt die unterschiedliche Mengen POPG enthielten. Der Einbau dieses negativ geladenen Lipids in die Nanodiscs konnte mittels TLC bestätigt werden.

5.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein System für die zellfreie Synthese von humanem BST2 und HIV-1 VpU etabliert werden. Dieses System liefert Proteinmengen in ausreichendem Maße für NMR-Studien. Zudem ist es möglich, damit Modifikationen wie isotopenmarkierte Aminosäuren und andere Markierungen gezielt in die Proteine einzubauen. Mit Hilfe der auf *E. coli* basierenden zellfreien Proteinsynthese wird es möglich sein, weiterführende Studien zu dieser Thematik durchzuführen. Ebenso bietet sie die Mög-

lichkeit, auch andere Proteine schnell und reproduzierbar zu synthetisieren, deren Expression in *E. coli* schwierig oder unmöglich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur des VpU abhängig von der verwendeten Modellmembran und insbesondere von Art und Konzentration des Detergenz ist. Für eine genauere Charakterisierung der Sekundärstruktur ist die Verwendung von geeigneteren Modellmembranen anzuraten, die der natürlichen Zellmembran eher entsprechen. Dies könnten zum einen Liposomen sein, in denen die Proteine mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht werden können. Zum anderen eignen sich Nanodiscs hier sehr gut. Diese bieten Bedingungen, die der natürlichen Zellmembran sehr nahe kommen. Mit Blick auf zukünftige NMR-Untersuchungen sollten kleine Nanodiscs verwendet werden. Diese können unter Einsatz verkürzter MSP-Varianten hergestellt werden und haben sich bereits bei NMR-Studien bewährt [44]. Des Weiteren konnten in der vorliegenden Arbeit nicht alle chemischen Verschiebungen des VpU ermittelt werden. Hier sind weitere komplementäre NMR-Experimente erforderlich. Dabei könnte sich das selektive Markieren einzelner Aminosäuretypen als praktisch erweisen. Dies wäre mit der in der vorliegenden Arbeit etablierten zellfreien Proteinsynthese recht einfach zu realisieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion der zytoplasmatischen als auch der Transmembrandomänen der Proteine BST2 und VpU nachgewiesen werden. Die Interaktion ist jedoch in den durchgeführten NMR-Experimenten nur schwach zu sehen. Dies liegt vor allem daran, dass die Interaktionspartner bei der Verwendung von Mizellen als Modellmembran zumeist in verschiedenen Mizellen vorliegen, und so nicht alle Proteinmoleküle in der Probe eine Interaktion eingehen. Dieses Problem kann durch die Verwendung von Nanodiscs und einem Fusionsprotein aus VpU und BST2 in Zukunft umgangen werden. Das in der vorliegenden Arbeit entworfene Fusionsprotein aus BST2mcyt und VpU stellt sicher, dass die Interaktionspartner in räumlicher Nähe und in korrekter Orientierung zueinander vorliegen. Die Inkorporation des Proteins in Nanodiscs könnte mit dem zellfreien Synthesystem parallel zur Synthese (kotrational) erfolgen [73, 120].

Bezüglich der in der Literatur diskutierten Frage der Oligomerisierung von VpU bieten die in der vorliegenden Arbeit geschaffenen Grundlagen die Möglichkeit, diese mittels NMR-Spektroskopie genauer zu untersuchen. Für diese Untersuchungen ist es erforderlich, VpU auch in sehr geringen Konzentrationen mittels NMR-Spektroskopie zu detektieren. Mit Hilfe des [U-²H]-markierten VpU ist es möglich, NMR-Spektren mit hoher Auflösung über einen weiten Konzentrationsbereich zu generieren.

Kapitel 6

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom; engl.: acquired immunodeficiency syndrome
APOBEC3	engl.: apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3
ATP	Adenosintriphosphat
BST2	engl.: bone marrow stromal cell antigen 2
BST2tmyct	Transmembrandomäne und zytoplasmatische Domäne des BST2
CD4	engl.: cluster of differentiation 4
CD8	engl.: cluster of differentiation 8
CECF	engl.: continuous-exchange cell-free Synthese
CSP	Änderung der chemischen Verschiebung; engl.: chemical shift perturbation
CTP	Cytidintriphosphat
CV	Säulenvolumen; engl.: column volume
D ₂ O	Deuteriumoxid
Da	Dalton
DHPC	1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPC	Dodecylphosphocholin
<i>E. coli</i>	Escherichia Coli
FM	Fütterungsmedium
FMD	Durchlauf des Fütterungsmediums bei der Affinitätschromatographie
FMW	Waschfraktion des Fütterungsmediums bei der Affinitätschromatographie

FME	Elutionsfraktion des Fütterungsmediums bei der Affinitätschromatographie
γ	gyromagnetisches Verhältnis
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Plancksches Wirkungsquantum
\hbar	reduziertes Plancksches Wirkungsquantum
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus Typ-1
HSQC	engl.: heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
I	Kernspinzahanzahl
Ig	Immunglobuline
IMAC	engl.: immobilized-metal affinity chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Austauschrate
LB-Medium	Lysogeny-Bertani Medium
\vec{M}	Drehmoment
m	magnetische Quantenzahl
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex; engl.: Major Histocompatibility Complex
mRNA	Boten-RNA; engl.: messenger-RNA
MSP1	engl.: membrane scaffold protein 1
MSP1D1	Varante des membrane scaffold protein
MSP1E1D1	Varante des membrane scaffold protein
MSP2N2	Varante des membrane scaffold protein
MWCO	engl.: Molekular weight cut off
NMR	Kernmagnetische Resonanz; engl.: nuclear magnetic resonance
NTA	Nitrilotriessigsäure; engl.: nitrilotriacetic acid
NOESY	engl.: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
$\vec{\mu}$	Magnetisches Moment
OD	Optische Dichte
\vec{p}	Drehimpuls
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung; engl.: phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

POPG	1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
ppm	Einheiten pro Million; engl.: parts per million
RISC	engl.: RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure; engl.: ribonucleic acid
RM	Reaktionsmedium
RMD	Durchlauf des Reaktionsmediums bei der Affinitätschromatographie
RMW	Waschfraktion des Reaktionsmediums bei der Affinitätschromatographie
RME	Elutionsfraktion des Reaktionsmediums bei der Affinitätschromatographie
rpm	Umdrehungen pro Minute; engl.: revolutions per minute
Δ	Differenz
SAMHD1	engl.: sterile alpha motif- and HD-domain containing protein 1
SDS	Natriumdodecylsulfat; engl.: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese; engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOB-Medium	Super Optimal Broth Medium
siRNA	kleine eingreifende RNA; engl.: small interfering RNA
T7RNAP	RNA-Polymerase des Bakterophagen T7
TB-Medium	Terrific Broth Medium
TBS	Tris gepufferte Salzlösung; engl.: tris buffered saline
TEV-Protease	Cystein Protease des Tobacco Etch Virus
TLC	Dünnschichtchromatografie; engl.: thin layer chromatography
TRIM5α	engl.: tripartite motif-containing protein 5 alpha
tRNA	transfer-RNA
TROSY	engl.: transverse relaxation optimized spectroscopy
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
(v/w)	Volumen pro Gewicht
VpU	Virus-Protein-U
VpUtm	Transmembran-Domäne des Virus Proteins U
(w/v)	Gewicht pro Volumen
ν_L	Larmorfrequenz

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des humanen BST2	5
1.2	Schematische Darstellung des HIV-1 Virions	8
1.3	Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms	9
1.4	Schematische Darstellung des HIV-1 VpU	12
1.5	Schematische Darstellung verschiedener Transmembranproteine	14
1.6	^1H NMR-Spektrum eines kleinen Proteins	24
1.7	Schematische Darstellung verschiedener Modellmembranen .	25
2.1	In dieser Arbeit verwendete Größenstandards	35
3.1	IR-Spektrum Beispiel	42
3.2	Schneiden und Ligation eines DNA-Stranges	48
3.3	Reaktoren für die zellfreie Proteinsynthese	65
3.4	Äktakurve T7-RNA-Polymerase	69
3.5	Reinigung T7-RNA-Polymerase	69
4.1	Aminosäuresequenz des HIS-BST2tmyc Proteins	83
4.2	Western-Blot des Detergens-Vergleichs für die Synthese von HIS-BST2tmyc	83
4.3	Ni^{2+} -NTA Reinigung HIS-BST2tmyc	85
4.4	Größenausschlusschromatografie HIS-BST2tmyc	86
4.5	HSQC-Spektrum des HIS-BST2tmyc	88
4.6	Sequenzspezifische Korrelation des Proteinrückgrats des BST2tmyc	89
4.7	Zuordnung der H^{N} -Korrelationssignale des BST2tmyc . . .	90
4.8	Strukturberechnung BST2tmyc	91
4.9	Proton-Proton NOE BST2tmyc	92
4.10	Aminosäuresequenz des VpU-HIS Proteins	93
4.11	Western-Blot des Detergenz-Vergleichs für die Synthese von VpU-HIS	94

4.12	Ni-NTA Reinigung VpU-HIS	95
4.13	Größenausschluss Chromatografie VpU-HIS	96
4.14	Vergleich der TROSY-Spektren von deuterierten mit protonieren VpU-HIS	99
4.15	Sequenzielle Zuordnung VpU	101
4.16	Zuordnung der H ^N N-Korrelationssignale des VpU-HIS	102
4.17	Strukturvorhersage VpU-HIS	103
4.18	Strukturparameter RCI-S ² VpU	104
4.19	Titration VpU-HIS gegen DPC	105
4.20	Titration des VpU-HIS gegen DPC-Mizellen	107
4.21	Titration BST2	108
4.22	Titration des VpU-HIS gegen HIS-BST2tmcyt	110
4.23	Detailansicht der chemischen Verschiebungen	111
4.24	Bindestellen des VpU	112
4.25	Aminosäuresequenz des BST2tmcyt-VpU-Rho Fusionsproteins	113
4.26	Valenzstrichformeln der verwendeten Lipide	114
4.27	Expression MSP1D1 im Fermenter	115
4.28	Expression MSP1D1 im Fermenter	117
4.29	Ni-NTA Reinigung MSP1D1	118
4.30	Reinigung der TEV-Protease	121
4.31	Spaltung des MSP1D1 mit TEV-Protease	123
4.32	Chromatografiekurve Nanodiscsherstellung	125
4.33	Darstellung der Isolierung von Lipiden aus Nanodiscs	126
4.34	Analyse der Lipidzusammensetzung in geladenen Nanodiscs	127
5.1	Vergleich der NMR-Ergebnisse mit Werten aus der Literatur	141
6.1	Vektorkarte des pET22b_deltaLac_VpU-HIS	180
6.2	Vektorkarte des pET22b_deltaLac_BST2tmcyt	181
6.3	Vektorkarte des pET22b_deltaLac_BST2tmcyt-VpU-Rho	182

Tabellenverzeichnis

2.1	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme	29
2.2	Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide	30
2.3	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide	31
2.4	Die verwendeten Biochemikalien, Chemikalien und Kits	31
2.5	Die verwendeten Biochemikalien, Chemikalien und Kits (Fortsetzung I)	32
2.6	Die verwendeten Biochemikalien, Chemikalien und Kits (Fortsetzung II)	33
2.7	Die verwendeten Enzyme, Proteine und Antikörper	33
2.8	Die verwendeten Aminosäuren und Aminosäuremischungen	34
2.9	Die verwendeten Größenstandards	35
2.10	Die verwendeten Geräte	36
2.11	Die verwendeten Geräte (Fortsetzung)	37
2.12	Die verwendeten Verbrauchsmaterialien	37
2.13	Die verwendeten Computerprogramme	38
3.1	Puffer für die DNA-Gelelektrophorese	45
3.2	Kolonie-PCR Mix für die Durchführung einer Reaktion	47
3.3	PCR Schema für Kolonie-PCR	47
3.4	20 µl Spaltansatz mit „FastDigest“ (FD) Enzymen.	49
3.5	20 µl Ligationsansatz	50
3.6	LB (engl.: Lysogeny broth) -Medium zur Kultivierung von <i>E. coli</i> [11]	51
3.7	Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen	52
3.8	Rezepte für Laemmli- und Laufpuffer	54
3.9	Rezepte für SDS-Gele	55
3.10	Rezept der Fixierlösung für SDS-Gele.	55
3.11	Rezept der Coomassie-Färbelösung.	56
3.12	Puffer für die Silberfärbung	57

3.13	Puffer für den Western Blot	58
3.14	Rezept des Laufpuffers und der Färbelösung für die Dünnschichtchromatografie.	60
3.15	Phosphat-gepufferte Salzlösung	61
3.16	Medien für die zellfreie Proteinsynthese	64
3.17	Puffer und Medium für die Herstellung des Zellextraktes	67
3.18	Der T7-Puffer und T7-Lagerungspuffer für die Herstellung von T7-RNA-Polymerase.	68
3.19	Aufnahme- und Prozessierungsparameter der verwendeten NMR-Experimente	73
4.1	Puffer zur Reinigung von synthetisierten Proteinen	85
4.2	Titrationsschritte für die Lokalisierung des Bindestelle am HIS-BST2tmcyt	108
4.3	Titrationsschritte für die Lokalisierung der Bindestelle am VpU	109
4.4	Medien für die Expression von MSP1D1 im Fermenter	116
4.5	Puffer für MSP-Reinigung	119
4.6	Puffer für TEV-Protease Reinigung	121
4.7	Puffer für die Abspaltung des His-Tags vom MSP1D1	122
4.8	Puffer für die Assemblierung von Nanodiscs	124

Literaturverzeichnis

- [1] ALKHATIB, G. ; COMBADIÈRE, C. ; BRODER, C. C. ; FENG, Y. ; KENNEDY, P. E. ; MURPHY, P. M. ; BERGER, E. A.: CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. In: *Science* 272 (1996), Nr. 5270, S. 1955–8
- [2] ANDREW, A. J. ; MIYAGI, E. ; STREBEL, K.: Differential effects of human immunodeficiency virus type 1 Vpu on the stability of BST-2/tetherin. In: *J Virol* 85 (2011), Nr. 6, S. 2611–9
- [3] ANTWAL, M. ; GURJAR, R. ; CHIDRAWAR, S. ; PAWAR, J. ; GAIKWAD, S. ; PANCHAL, N. ; KALE, V. ; THAKAR, M. ; RISBUD, A. ; TRIPATHY, S.: Clinical profile of HIV infected patients attending a HIV referral clinic in Pune, India. In: *Indian J Med Res* 140 (2014), Nr. 2, S. 271–7
- [4] AUE, W. P. ; BARTHOLDI, E. ; ERNST, R. R.: Two dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. In: *The Journal of Chemical Physics* 64 (1976), Nr. 5, S. 2229–2246
- [5] BANNING, C. ; VOTTELER, J. ; HOFFMANN, D. ; KOPPENSTEINER, H. ; WARMER, M. ; REIMER, R. ; KIRCHHOFF, F. ; SCHUBERT, U. ; HAUBER, J. ; SCHINDLER, M.: A Flow Cytometry-Based FRET Assay to Identify and Analyse Protein-Protein Interactions in Living Cells. In: *PLoS ONE* 5 (2010), Nr. 2, S. e9344
- [6] BARKHUIJSEN, H. ; BEER, R. de ; BOVÉE, W. M. M. J. ; ORMONDT, D. van: Retrieval of frequencies, amplitudes, damping factors, and phases from time-domain signals using a linear least-squares procedure. In: *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 61 (1985), Nr. 3, S. 465–481
- [7] BAUMFORTH, K. R. ; YOUNG, L. S. ; FLAVELL, K. J. ; CONSTANDINO, C. ; MURRAY, P. G.: The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. In: *Mol Pathol* 52 (1999), Nr. 6, S. 307–22

- [8] BERG, J. M. ; TYMOCZKO, J. L. ; STRYER, L.: *Biochemie*. 7. Aufl. Heidelberg : Springer Spektrum, 2013
- [9] BERJANSKII, M. V. ; WISHART, D. S.: The RCI server: rapid and accurate calculation of protein flexibility using chemical shifts. In: *Nucleic Acids Research* 35 (2007), Nr. suppl 2, S. W531–W537
- [10] BERJANSKII, M. V. ; WISHART, D. S.: Application of the random coil index to studying protein flexibility. In: *J Biomol NMR* 40 (2008), Nr. 1, S. 31–48
- [11] BERTANI, G.: Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 62 (1951), Nr. 3, S. 293–300
- [12] BIBOLLET-RUCHE, F. ; LOUSSERT-AJAKA, I. ; SIMON, F. ; MBOUP, S. ; NGOLE, E. M. ; SAMAN, E. ; DELAPORTE, E. ; PEETERS, M.: Genetic characterization of accessory genes from human immunodeficiency virus type 1 group O strains. In: *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 (1998), Nr. 11, S. 951–61
- [13] BLOCH, F. ; HANSEN, W. W. ; PACKARD, M.: Nuclear Induction. In: *Physical Review* 69 (1946), Nr. 3-4, S. 127–127
- [14] BUZON, M. J. ; SUN, H. ; LI, C. ; SHAW, A. ; SEISS, K. ; OUYANG, Z. ; MARTIN-GAYO, E. ; LENG, J. ; HENRICH, T. J. ; LI, J. Z. ; PEREYRA, F. ; ZURAKOWSKI, R. ; WALKER, B. D. ; ROSENBERG, E. S. ; YU, X. G. ; LICHTERFELD, M.: HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. In: *Nat Med* 20 (2014), Nr. 2, S. 139–142
- [15] CAVANAGH, J.: *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*. Amsterdam ; Boston : Academic Press, 2007
- [16] CHAN, D. C. ; FASS, D. ; BERGER, J. M. ; KIM, P. S.: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. In: *Cell* 89 (1997), Nr. 2, S. 263–73
- [17] CHRISTIE, W. W.: *Lipid analysis: isolation, separation, identification and structural analysis of lipids*. 2. Auflage. Oxford u.a. : Pergamon Pr., 1982 (Pergamon international library)
- [18] CLARK, A. J.: Genetic analysis of a "double male" strain of *Escherichia coli* K-12. In: *Genetics* 48 (1963), S. 105–20
- [19] DANIEL, N.: Suppression of anti-TROSY lines in a sensitivity enhanced gradient selection TROSY scheme. In: *Journal of Biomolecular NMR* 31 (2004), Nr. 2, S. 161–166

- [20] DAS, S. R. ; JAMEEL, S.: Biology of the HIV Nef protein. In: *Indian J Med Res* 121 (2005), Nr. 4, S. 315–32
- [21] DECKWER, W.-D. ; ACKERMANN, W.: *Römpp-Lexikon Biotechnologie und Gentechnik*. 2., völlig überarb. Aufl. Stuttgart u.a. : Thieme, 1999
- [22] DELAGLIO, F. ; GRZESIEK, S. ; VUISTER, G. W. ; ZHU, G. ; PFEIFER, J. ; BAX, A.: NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. In: *J Biomol NMR* 6 (1995), Nr. 3, S. 277–93
- [23] DENG, X. ; MORRIS, J. ; CHATON, C. ; SCHRODER, G. F. ; DAVIDSON, W. S. ; THOMPSON, T. B.: Small-angle X-ray scattering of apolipoprotein A-IV reveals the importance of its termini for structural stability. In: *J Biol Chem* 288 (2013), Nr. 7, S. 4854–66
- [24] DENISOV, I. G. ; GRINKOVA, Y. V. ; LAZARIDES, A. A. ; SLIGAR, S. G.: Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. In: *J Am Chem Soc* 126 (2004), Nr. 11, S. 3477–87
- [25] DO HOA, Q. ; WITTLICH, M. ; GLÜCK JULIAN, M. ; MÖCKEL, L. ; WILLBOLD, D. ; KOENIG BERND, W. ; HEISE, H.: *Full-length Vpu and human CD4(372–433) in phospholipid bilayers as seen by magic angle spinning NMR*. 2013
- [26] DYSON, H. J. ; WRIGHT, P. E.: Equilibrium NMR studies of unfolded and partially folded proteins. In: *Nat Struct Mol Biol* (1998)
- [27] ETEZADY-ESFARJANI, T. ; HILLER, S. ; VILLALBA, C. ; WUTHRICH, K.: Cell-free protein synthesis of perdeuterated proteins for NMR studies. In: *J Biomol NMR* 39 (2007), Nr. 3, S. 229–38
- [28] EVANS, D. T. ; SERRA-MORENO, R. ; SINGH, R. K. ; GUATELLI, J. C.: BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. In: *Trends in Microbiology* 18 (2010), Nr. 9, S. 388–396
- [29] EWART, G. D. ; SUTHERLAND, T. ; GAGE, P. W. ; COX, G. B.: The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. In: *J Virol* 70 (1996), Nr. 10, S. 7108–15
- [30] FALKNER, B. ; SCHRÖDER, G. F.: Cross-validation in cryo-EM-based structural modeling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (2013), Nr. 22, S. 8930–8935
- [31] FAVIER, A. ; BRUTSCHER, B.: Recovering lost magnetization: polarization enhancement in biomolecular NMR. In: *J Biomol NMR* 49 (2011), Nr. 1, S. 9–15

- [32] FEDERAU, T. ; SCHUBERT, U. ; FLOSSDORF, J. ; HENKLEIN, P. ; SCHOMBURG, D. ; WRAY, V.: Solution structure of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 encoded virus protein U (Vpu). In: *Int J Pept Protein Res* 47 (1996), Nr. 4, S. 297–310
- [33] FENG, Y. ; BRODER, C. C. ; KENNEDY, P. E. ; BERGER, E. A.: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. In: *Science* 272 (1996), Nr. 5263, S. 872–87
- [34] FINDEISEN, M. ; BRAND, T. ; BERGER, S.: A 1H-NMR thermometer suitable for cryoprobes. In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 45 (2007), Nr. 2, S. 175–178
- [35] FIRE, A. ; XU, S. ; MONTGOMERY, M. K. ; KOSTAS, S. A. ; DRIVER, S. E. ; MELLO, C. C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (1998), Nr. 6669, S. 806–811
- [36] FRIEDRICH, M. S.: A model-free algorithm for the removal of baseline artifacts. In: *J Biomol NMR* 5 (1995), Nr. 2, S. 147–53
- [37] GARDNER, K. H. ; KAY, L. E.: The use of 2H, 13C, 15N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27 (1998), S. 357–406
- [38] GIESE, S. ; MARSH, M.: Tetherin can restrict cell-free and cell-cell transmission of HIV from primary macrophages to T cells. In: *PLoS Pathog* 10 (2014), Nr. 7, S. e1004189
- [39] GOFFINET, C. ; ALLESPACH, I. ; HOMANN, S. ; TERVO, H.-M. ; HABERMANN, A. ; RUPP, D. ; OBERBREMER, L. ; KERN, C. ; TIBRONI, N. ; WELSCH, S. ; KRIJNSE-LOCKER, J. ; BANTING, G. ; KRÄUSSLICH, H.-G. ; FACKLER, O. T. ; KEPPLER, O. T.: HIV-1 Antagonism of CD317 Is Species Specific and Involves Vpu-Mediated Proteasomal Degradation of the Restriction Factor. In: *Cell Host and Microbe* 5 (2009), Nr. 3, S. 285–297
- [40] GRANZIN, J. ; COUSIN, A. ; WEIRAU, M. ; SCHLESINGER, R. ; BÜLDT, G. ; BATRA-SAFFERLING, R.: Crystal Structure of p44, a Constitutively Active Splice Variant of Visual Arrestin. In: *Journal of Molecular Biology* 416 (2012), Nr. 5, S. 611–618
- [41] GREEN, M. R. ; SAMBROOK, J. ; SAMBROOK, J.: *Molecular cloning : a laboratory manual*. 4th. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012

- [42] GRZESIEK, S. ; BAX, A.: Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. In: *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 96 (1992), Nr. 2, S. 432–440
- [43] GRZESIEK, S. ; BAX, A.: Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins. In: *J Biomol NMR* 3 (1993), Nr. 2, S. 185–204
- [44] HAGN, F. ; ETZKORN, M. ; RASCHLE, T. ; WAGNER, G.: Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. In: *J Am Chem Soc* 135 (2013), Nr. 5, S. 1919–25
- [45] HAMMONDS, J. ; WANG, J. J. ; SPEARMAN, P.: Restriction of Retroviral Replication by Tetherin/BST-2. In: *Mol Biol Int* 2012 (2012), S. 424768
- [46] HAMMONDS, J. ; WANG, J. J. ; YI, H. ; SPEARMAN, P.: Immunoelectron microscopic evidence for Tetherin/BST2 as the physical bridge between HIV-1 virions and the plasma membrane. In: *PLoS Pathog* 6 (2010), Nr. 2, S. e1000749
- [47] HARRIS, R. S. ; BISHOP, K. N. ; SHEEHY, A. M. ; CRAIG, H. M. ; PETERSEN-MAHRT, S. K. ; WATT, I. N. ; NEUBERGER, M. S. ; MALIM, M. H.: DNA Deamination Mediates Innate Immunity to Retroviral Infection. In: *Cell* 113 (2003), Nr. 6, S. 803–809
- [48] HILGEFORT, G.: *HANDBUCH HIV-Prävention für Mädchen und Frauen*. 2., überarbeitete Auflage. Deutsche AIDS-Hilfe e.V., 2010
- [49] HÄNSEL, R. ; STEINEGGER, E.: *Pharmakognosie - Phytopharmazie: mit 182 Tabellen*. 9., überarb. und aktualisierte Aufl. Heidelberg : Springer, 2010
- [50] HODGES, R. S. ; HEATON, R. J. ; PARKER, J. M. ; MOLDAJ, L. ; MOLDAJ, R. S.: Antigen-antibody interaction. Synthetic peptides define linear antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies directed to the cytoplasmic carboxyl terminus of rhodopsin. In: *J Biol Chem* 263 (1988), Nr. 24, S. 11768–75
- [51] HRECKA, K. ; HAO, C. ; GIERSZEWSKA, M. ; SWANSON, S. K. ; KESIK-BRODACKA, M. ; SRIVASTAVA, S. ; FLORENS, L. ; WASHBURN, M. P. ; SKOWRONSKI, J.: Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. In: *Nature* 474 (2011), Nr. 7353, S. 658–661

- [52] ISH-HOROWICZ, D. ; BURKE, J. F.: Rapid and efficient cosmid cloning. In: *Nucleic Acids Res* 9 (1981), Nr. 13, S. 2989–98
- [53] IWABU, Y. ; FUJITA, H. ; KINOMOTO, M. ; KANEKO, K. ; ISHIZAKA, Y. ; TANAKA, Y. ; SATA, T. ; TOKUNAGA, K.: HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. In: *J Biol Chem* 284 (2009), Nr. 50, S. 35060–72
- [54] JEENER, J.: Lecture notes from Ampere Summer School in Basko Polje, Yugoslavia, September, 1971. (1971)
- [55] JIA, B. ; SERRA-MORENO, R. ; NEIDERMYER, JR. W. ; RAHMBERG, A. ; MACKAY, J. ; FOFANA, I. B. ; JOHNSON, W. E. ; WESTMORELAND, S. ; EVANS, D. T.: Species-Specific Activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in Overcoming Restriction by Tetherin/BST2. In: *PLoS Pathog* 5 (2009), Nr. 5, S. e1000429
- [56] JOUVENET, N. ; NEIL, S. J. ; ZHADINA, M. ; ZANG, T. ; KRATOVAC, Z. ; LEE, Y. ; MCNATT, M. ; HATZIOANNOU, T. ; BIENIASZ, P. D.: Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. In: *J Virol* 83 (2009), Nr. 4, S. 1837–44
- [57] KAINOSHO, M. ; TORIZAWA, T. ; IWASHITA, Y. ; TERAUCHI, T. ; MEI ONO, A. ; GÜNTERT, P.: Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations. In: *Nature* 440 (2006), Nr. 7080, S. 52–57
- [58] KAPUST, R. B. ; TOZSER, J. ; FOX, J. D. ; ANDERSON, D. E. ; CHERRY, S. ; COPELAND, T. D. ; WAUGH, D. S.: Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. In: *Protein Eng* 14 (2001), Nr. 12, S. 993–1000
- [59] KARLSSON HEDESTAM, G. B. ; FOUCHIER, R. A. M. ; PHOGAT, S. ; BURTON, D. R. ; SODROSKI, J. ; WYATT, R. T.: The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. In: *Nat Rev Micro* 6 (2008), Nr. 2, S. 143–155
- [60] KAY, L. ; KEIFER, P. ; SAARINEN, T.: Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. In: *Journal of the American Chemical Society* 114 (1992), Nr. 26, S. 10663–10665
- [61] KAY, L. E.: Protein dynamics from NMR. In: *Nat Struct Biol* 5 Suppl (1998), S. 513–7

- [62] KAY, L. E. ; GARDNER, K. H.: Solution NMR spectroscopy beyond 25 kDa. In: *Curr Opin Struct Biol* 7 (1997), Nr. 5, S. 722–31
- [63] KIM, J. B. ; SHARP, P. A.: Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 15, S. 12317–23
- [64] KORZ, D. J. ; RINAS, U. ; HELLMUTH, K. ; SANDERS, E. A. ; DECKWER, W. D.: Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. In: *Journal of Biotechnology* 39 (1995), Nr. 1, S. 59–65
- [65] KUDCHODKAR, S. B. ; LEVINE, B.: Viruses and autophagy. In: *Reviews in Medical Virology* 19 (2009), Nr. 6, S. 359–378
- [66] KUPZIG, S. ; KOROLCHUK, V. ; ROLLASON, R. ; SUGDEN, A. ; WILDE, A. ; BANTING, G.: Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. In: *Traffic* 4 (2003), Nr. 10, S. 694–709
- [67] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Nr. 5259, S. 680–5
- [68] LAHOUASSA, H. ; DADDACHA, W. ; HOFMANN, H. ; AYINDE, D. ; LOGUE, E. C. ; DRAGIN, L. ; BLOCH, N. ; MAUDET, C. ; BERTRAND, M. ; GRAMBERG, T. ; PANCINO, G. ; PRIET, S. ; CANARD, B. ; LAGUETTE, N. ; BENKIRANE, M. ; TRANSY, C. ; LANDAU, N. R. ; KIM, B. ; MARGOTTIN-GOGUET, F.: SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. In: *Nat Immunol* 13 (2012), Nr. 3, S. 223–228
- [69] LE ROUZIC, E. ; BENICHOUS, S.: The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. In: *Retrovirology* 2 (2005), S. 11
- [70] LEMASTER, D. M.: Isotope labeling in solution protein assignment and structural analysis. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 26 (1994), S. 371–419
- [71] LUNDSTROM, K. H.: *Structural genomics on membrane proteins*. Boca Raton : CRC Press, Taylor and Francis, 2006
- [72] LV, M. ; WANG, J. ; WANG, X. ; ZUO, T. ; ZHU, Y. ; KONG, W. ; YU, X.: Polarity changes in the transmembrane domain core of HIV-1 Vpu inhibits its anti-tetherin activity. In: *PLoS One* 6 (2011), Nr. 6, s. e20890

- [73] LYUKMANOVA, E. N. ; SHENKAREV, Z. O. ; KHABIBULLINA, N. F. ; KOPEINA, G. S. ; SHULEPKO, M. A. ; PARAMONOV, A. S. ; MINEEV, K. S. ; TIKHONOV, R. V. ; SHINGAROVA, L. N. ; PETROVSKAYA, L. E. ; DOLGIKH, D. A. ; ARSENIYEV, A. S. ; KIRPICHNIKOV, M. P.: Lipid-protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: Comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818 (2012), Nr. 3, S. 349–358
- [74] MA, C. ; MARASSI, F. M. ; JONES, D. H. ; STRAUS, S. K. ; BOUR, S. ; STREBEL, K. ; SCHUBERT, U. ; OBLATT-MONTAL, M. ; MONTAL, M. ; OPELLA, S. J.: Expression, purification, and activities of full-length and truncated versions of the integral membrane protein Vpu from HIV-1. In: *Protein Sci* 11 (2002), Nr. 3, S. 546–57
- [75] MAILLARD, P. V. ; CIAUDO, C. ; MARCHAIS, A. ; LI, Y. ; JAY, F. ; DING, S. W. ; VOINNET, O.: Antiviral RNA Interference in Mammalian Cells. In: *Science* 342 (2013), Nr. 6155, S. 235–238
- [76] MANGEAT, B. ; TURELLI, P. ; CARON, G. ; FRIEDLI, M. ; PERRIN, L. ; TRONO, D.: Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. In: *Nature* 424 (2003), Nr. 6944, S. 99–103
- [77] MANSOURI, M. ; VISWANATHAN, K. ; DOUGLAS, J. L. ; HINES, J. ; GUSTIN, J. ; MOSES, A. V. ; FRUH, K.: Molecular mechanism of BST2/tetherin downregulation by K5/MIR2 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. In: *J Virol* 83 (2009), Nr. 19, S. 9672–81
- [78] MARASSI, F. M. ; MA, C. ; GRATKOWSKI, H. ; STRAUS, S. K. ; STREBEL, K. ; OBLATT-MONTAL, M. ; MONTAL, M. ; OPELLA, S. J.: Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Nr. 25, S. 14336–41
- [79] MARION, D. ; DRISCOLL, P. C. ; KAY, L. E. ; WINGFIELD, P. T. ; BAX, A. ; GRONENBORN, A. M. ; CLORE, G. M.: Overcoming the overlap problem in the assignment of proton NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear proton-nitrogen-15 Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1.β. In: *Biochemistry* 28 (1989), Nr. 15, S. 6150–6156

- [80] MARION, D. ; IKURA, M. ; TSCHUDIN, R. ; BAX, A.: Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. In: *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 85 (1989), Nr. 2, S. 393–399
- [81] MARKLEY, J. L. ; BAX, A. ; ARATA, Y. ; HILBERS, C. W. ; KAPTEIN, R. ; SYKES, B. D. ; WRIGHT, P. E. ; WUTHRICH, K.: Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids—IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the standardization of data bases of protein and nucleic acid structures determined by NMR spectroscopy. In: *Eur J Biochem* 256 (1998), Nr. 1, S. 1–15
- [82] MCINTOSH, L. P. ; DAHLQUIST, F. W.: Biosynthetic incorporation of ¹⁵N and ¹³C for assignment and interpretation of nuclear magnetic resonance spectra of proteins. In: *Q Rev Biophys* 23 (1990), Nr. 1, S. 1–38
- [83] MCNATT, M. W. ; ZANG, T. ; HATZIOANNOU, T. ; BARTLETT, M. ; FOFANA, I. B. ; JOHNSON, W. E. ; NEIL, S. J. D. ; BIENIASZ, P. D.: Species-Specific Activity of HIV-1 Vpu and Positive Selection of Tetherin Transmembrane Domain Variants. In: *PLoS Pathog* 5 (2009), Nr. 2, S. e1000300
- [84] MINEEV, K. S. ; BOCHAROV, E. V. ; VOLYNSKY, P. E. ; GONCHARUK, M. V. ; TKACH, E. N. ; ERMOLYUK, Y. S. ; SCHULGA, A. A. ; CHUPIN, V. V. ; MASLENNIKOV, I. V. ; EFREMOV, R. G. ; ARSENIYEV, A. S.: Dimeric structure of the transmembrane domain of glycophorin a in lipidic and detergent environments. In: *Acta Naturae* 3 (2011), Nr. 2, S. 90–8
- [85] MIROUX, B. ; WALKER, J. E.: Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. In: *J Mol Biol* 260 (1996), Nr. 3, S. 289–98
- [86] MUHANDIRAM, D. R. ; KAY, L. E.: Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity. In: *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 103 (1994), Nr. 3, S. 203–216
- [87] MULLIS, K. B. ; FALOONA, F. A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods Enzymol* 155 (1987), S. 335–50
- [88] MUNAWWAR, A. ; SHARMA, S. K. ; GUPTA, S. ; SINGH, S.: Seroprevalence and Determinants of Kaposi Sarcoma-Associated Human Herpesvirus 8 in Indian HIV-Infected Males. In: *AIDS Res Hum Retroviruses* (2014)

- [89] NATH, A. ; ATKINS, W. M. ; SLIGAR, S. G.: Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. In: *Biochemistry* 46 (2007), Nr. 8, S. 2059–69
- [90] NEIL, S. J. D. ; ZANG, T. ; BIENIASZ, P. D.: Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. In: *Nature* 451 (2008), Nr. 7177, S. 425–430
- [91] NEUDECKER, P. ; ROBUSTELLI, P. ; CAVALLI, A. ; WALSH, P. ; LUNDSTRÖM, P. ; ZARRINE-AFSAR, A. ; SHARPE, S. ; VENDRUSCOLO, M. ; KAY, L. E.: Structure of an Intermediate State in Protein Folding and Aggregation. In: *Science* 336 (2012), Nr. 6079, S. 362–366
- [92] OPRIAN, D. D. ; MOLDAI, R. S. ; KAUFMAN, R. J. ; KHORANA, H. G.: Expression of a synthetic bovine rhodopsin gene in monkey kidney cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987), Nr. 24, S. 8874–8
- [93] ORTH, J. H. C. ; SCHORCH, B. ; BOUNDY, S. ; FFRENCH-CONSTANT, R. ; KUBICK, S. ; AKTORIES, K.: Cell-free synthesis and characterization of a novel cytotoxic pierisin-like protein from the cabbage butterfly *Pieris rapae*. In: *Toxicon* 57 (2011), Nr. 2, S. 199–207
- [94] ORVEDAHL, A. ; ALEXANDER, D. ; TALLÓCZY, Z. ; SUN, Q. ; WEI, Y. ; ZHANG, W. ; BURNS, D. ; LEIB, D. A. ; LEVINE, B.: HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. In: *Cell host and microbe* 1 (2007), Nr. 1, S. 23–35
- [95] PALMER, 3rd A. G. A. G.: Probing molecular motion by NMR. In: *Curr Opin Struct Biol* 7 (1997), Nr. 5, S. 732–7
- [96] PARDIEU, C. ; VIGAN, R. ; WILSON, S. J. ; CALVI, A. ; ZANG, T. ; BIENIASZ, P. ; KELLAM, P. ; TOWERS, G. J. ; NEIL, S. J. D.: The RING-CH Ligase K5 Antagonizes Restriction of KSHV and HIV-1 Particle Release by Mediating Ubiquitin-Dependent Endosomal Degradation of Tetherin. In: *PLoS Pathog* 6 (2010), Nr. 4, S. e1000843
- [97] PARK, S. H. ; DE ANGELIS, A. A. ; NEVZOROV, A. A. ; WU, C. H. ; OPELLA, S. J.: Three-dimensional structure of the transmembrane domain of Vpu from HIV-1 in aligned phospholipid bicelles. In: *Biophys J* 91 (2006), Nr. 8, S. 3032–42
- [98] PARK, S. H. ; MRSE, A. A. ; NEVZOROV, A. A. ; MESLEH, M. F. ; OBLATTMONTAL, M. ; MONTAL, M. ; OPELLA, S. J.: Three-dimensional structure of

the channel-forming trans-membrane domain of virus protein ü"(Vpu) from HIV-1. In: *J Mol Biol* 333 (2003), Nr. 2, S. 409–24

- [99] PAULI JR, W.: Zur Frage der theoretischen Deutung der Satelliten einiger Spektrallinien und ihrer Beeinflussung durch magnetische Felder. In: *Naturwissenschaften* 12 (1924), Nr. 37, S. 741–743
- [100] PORATH, J. ; CARLSSON, J. ; OLSSON, I. ; BELFRAGE, G.: Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. In: *Nature* 258 (1975), Nr. 5536, S. 598–9
- [101] PURCELL, E. M. ; TORREY, H. C. ; POUND, R. V.: Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. In: *Physical Review* 69 (1946), Nr. 1-2, S. 37–38
- [102] RABI, I. I.: *The Molecular Beam Resonance Method for Measuring Nuclear Magnetic Moment: The Magnetic Moments of 3Li6, 3Li7 and 9F19*. American Physical Society, 1939
- [103] RAMRATH, D. J. F. ; YAMAMOTO, H. ; ROTHER, K. ; WITTEK, D. ; PECH, M. ; MIELKE, T. ; LOERKE, J. ; SCHEERER, P. ; IVANOV, P. ; TERAOKA, Y. ; SHPANCHENKO, O. ; NIERHAUS, K. H. ; SPAHN, C. M. T.: The complex of tmRNA-SmpB and EF-G on translocating ribosomes. In: *Nature* 485 (2012), Nr. 7399, S. 526–529
- [104] RECKEL, S. ; SOBHANIFAR, S. ; DURST, F. ; LOHR, F. ; SHIROKOV, V. A. ; DOTSCH, V. ; BERNHARD, F.: Strategies for the cell-free expression of membrane proteins. In: *Methods Mol Biol* 607 (2010), S. 187–212
- [105] ROBINSON, H. L.: New hope for an aids vaccine. In: *Nat Rev Immunol* 2 (2002), Nr. 4, S. 239–250
- [106] ROCCATANO, D. ; COLOMBO, G. ; FIORONI, M. ; MARK, A. E.: Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Nr. 19, S. 12179–84
- [107] SAKUMA, T. ; NODA, T. ; URATA, S. ; KAWAOKA, Y. ; YASUDA, J.: Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. In: *J Virol* 83 (2009), Nr. 5, S. 2382–5
- [108] SALZBERGER, B. ; FRANZEN, C.: *Aktuelle HIV-Therapie*. 3. Aufl. Bremen u.a. : UNI-MED-Verl., 2011 (UNI-MED science)

- [109] SANDERS, 2nd C. R. C. R. ; SCHWONEK, J. P.: Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR. In: *Biochemistry* 31 (1992), Nr. 37, S. 8898–905
- [110] SAUERMOST, R. ; FREUDIG, D.: *Lexikon der Biologie: in fünfzehn Bänden*. Heidelberg : Spektrum
- [111] SAUTER, D. ; SPECHT, A. ; KIRCHHOFF, F.: Tetherin: Holding On and Letting Go. In: *Cell* 141 (2010), Nr. 3, S. 392–398
- [112] SCHLEUCHER, J. ; SCHWENDINGER, M. ; SATTLER, M. ; SCHMIDT, P. ; SCHEDLETZKY, O. ; GLASER, S. J. ; SØRENSEN, O. W. ; GRIESINGER, C.: A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. In: *Journal of Biomolecular NMR* 4 (1994), Nr. 2, S. 301–306
- [113] SCHUBERT, U. ; FERRER-MONTIEL, A. V. ; OBLATT-MONTAL, M. ; HENKLEIN, P. ; STREBEL, K. ; MONTAL, M.: Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. In: *FEBS Lett* 398 (1996), Nr. 1, S. 12–8
- [114] SCHWARZ, D. ; JUNGE, F. ; DURST, F. ; FROLICH, N. ; SCHNEIDER, B. ; RECKEL, S. ; SOBHANIFAR, S. ; DOTSCH, V. ; BERNHARD, F.: Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems. In: *Nat Protoc* 2 (2007), Nr. 11, S. 2945–57
- [115] SHAKA, A. J. ; KEELER, J.: Broadband spin decoupling in isotropic-liquids. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 19 (1987), Nr. 1, S. 47–129
- [116] SHARPE, S. ; YAU, W. M. ; TYCKO, R.: Structure and dynamics of the HIV-1 Vpu transmembrane domain revealed by solid-state NMR with magic-angle spinning. In: *Biochemistry* 45 (2006), Nr. 3, S. 918–33
- [117] SHEEHY, A. M. ; GADDIS, N. C. ; CHOI, J. D. ; MALIM, M. H.: Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. In: *Nature* 418 (2002), Nr. 6898, S. 646–650
- [118] SHEN, Y. ; BAX, A.: Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks. In: *Journal of Biomolecular NMR* 56 (2013), Nr. 3, S. 227–241

- [119] SHEN, Y. ; DELAGLIO, F. ; CORNILESCU, G. ; BAX, A.: TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. In: *J Biomol NMR* 44 (2009), Nr. 4, S. 213–23
- [120] SHENKAREV, Z. O. ; LYUKMANOVA, E. N. ; PARAMONOV, A. S. ; SHINGAROVA, L. N. ; CHUPIN, V. V. ; KIRPICHNIKOV, M. P. ; BLOMMERS, M. J. J. ; ARSENIYEV, A. S.: Lipid-protein nanodiscs as reference medium in detergent screening for high-resolution NMR studies of integral membrane proteins. In: *Journal of the American Chemical Society* 132 (2010), Nr. 16, S. 5628–5629
- [121] SHIROKOV, V. A. ; KOMMER, A. ; KOLB, V. A. ; SPIRIN, A. S.: *Continuous-exchange protein-synthesizing systems*. 2007
- [122] SHUKER, S. B. ; HAJDUK, P. J. ; MEADOWS, R. P. ; FESIK, S. W.: Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. In: *Science* 274 (1996), Nr. 5292, S. 1531–4
- [123] SKASKO, M. ; WANG, Y. ; TIAN, Y. ; TOKAREV, A. ; MUNGUIA, J. ; RUIZ, A. ; STEPHENS, E. B. ; OPELLA, S. J. ; GUATELLI, J.: HIV-1 Vpu protein antagonizes innate restriction factor BST-2 via lipid-embedded helix-helix interactions. In: *J Biol Chem* 287 (2012), Nr. 1, S. 58–67
- [124] SMET-NOCCA, C. ; WIERUSZESKI, J. M. ; LEGER, H. ; EILEBRECHT, S. ; BENECKE, A.: SUMO-1 regulates the conformational dynamics of thymine-DNA Glycosylase regulatory domain and competes with its DNA binding activity. In: *BMC Biochem* 12 (2011), S. 4
- [125] SOLYOM, Z. ; SCHWARTEN, M. ; GEIST, L. ; KONRAT, R. ; WILLBOLD, D. ; BRUTSCHER, B.: BEST-TROSY experiments for time-efficient sequential resonance assignment of large disordered proteins. In: *J Biomol NMR* 55 (2013), Nr. 4, S. 311–21
- [126] STANGLER, T. ; HARTMANN, R. ; WILLBOLD, D. ; KOENIG, B. W.: Modern High Resolution NMR for the Study of Structure, Dynamics and Interactions of Biological Macromolecules. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 220 (2006), Nr. 5/2006, S. 567–613
- [127] STANLEY, B. J. ; EHRLICH, E. S. ; SHORT, L. ; YU, Y. ; XIAO, Z. ; YU, X. F. ; XIANG, Y.: Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. In: *J Virol* 82 (2008), Nr. 17, S. 8656–63

- [128] STATES, D. J. ; HABERKORN, R. A. ; RUBEN, D. J.: A two-dimensional nuclear overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. In: *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 48 (1982), Nr. 2, S. 286–292
- [129] STAUNTON, D. ; SCHLINKERT, R. ; ZANETTI, G. ; COLEBROOK, S. A. ; CAMPBELL, I. D.: Cell-free expression and selective isotope labelling in protein NMR. In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 44 (2006), Nr. S1, S. S2–S9
- [130] STREBEL, K.: Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. In: *AIDS* 17 Suppl 4 (2003), S. S25–34
- [131] STREBEL, K. ; KLIMKAIT, T. ; MALDARELLI, F. ; MARTIN, M. A.: Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. In: *J Virol* 63 (1989), Nr. 9, S. 3784–91
- [132] STREBEL, K. ; KLIMKAIT, T. ; MARTIN, M. A.: A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. In: *Science* 241 (1988), Nr. 4870, S. 1221–3
- [133] STREMLAU, M. ; OWENS, C. M. ; PERRON, M. J. ; KIESSLING, M. ; AUTISSIER, P. ; SODROSKI, J.: The cytoplasmic body component TRIM5[alpha] restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. In: *Nature* 427 (2004), Nr. 6977, S. 848–853
- [134] STREMLAU, M. ; PERRON, M. ; LEE, M. ; LI, Y. ; SONG, B. ; JAVANBAKHT, H. ; DIAZ-GRIFFERO, F. ; ANDERSON, D. J. ; SUNDQUIST, W. I. ; SODROSKI, J.: Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 α restriction factor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006), Nr. 14, S. 5514–5519
- [135] SUN, N. ; HARTMANN, R. ; LECHER, J. ; STOLDT, M. ; FUNKE, S. A. ; GREMER, L. ; LUDWIG, H.-H. ; DEMUTH, H.-U. ; KLEINSCHMIDT, M. ; WILLBOLD, D.: Structural analysis of the pyroglutamate-modified isoform of the Alzheimer's disease-related amyloid- β using NMR spectroscopy. In: *Journal of Peptide Science* 18 (2012), Nr. 11, S. 691–695
- [136] SWIECKI, M. ; SCHEAFFER, S. M. ; ALLAIRE, M. ; FREMONT, D. H. ; COLONNA, M. ; BRETT, T. J.: Structural and biophysical analysis of BST-2/tetherin ectodomains reveals an evolutionary conserved design to inhibit virus release. In: *J Biol Chem* 286 (2011), Nr. 4, S. 2987–97
- [137] TERWILLIGER, E. F. ; COHEN, E. A. ; LU, Y. C. ; SODROSKI, J. G. ; HASELTINE, W. A.: Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989), Nr. 13, S. 5163–7

- [138] TRONO, D.: HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. In: *Cell* 82 (1995), Nr. 2, S. 189–92
- [139] VAN DAMME, N. ; GOFF, D. ; KATSURA, C. ; JORGENSEN, R. L. ; MITCHELL, R. ; JOHNSON, M. C. ; STEPHENS, E. B. ; GUATELLI, J.: The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. In: *Cell Host Microbe* 3 (2008), Nr. 4, S. 245–52
- [140] VARGHESE, S. ; YANG, F. ; PACHECO, V. ; WREDE, K. ; MEDVEDEV, A. ; OGATA, H. ; KNIPP, M. ; HEISE, H.: Expression, Purification, and Solid-State NMR Characterization of the Membrane Binding Heme Protein Nitrophorin 7 in Two Electronic Spin States. In: *Biochemistry* 52 (2013), Nr. 40, S. 7031–7040
- [141] VINAROV, D. A. ; LYTLE, B. L. ; PETERSON, F. C. ; TYLER, E. M. ; VOLKMAN, B. F. ; MARKLEY, J. L.: Cell-free protein production and labeling protocol for NMR-based structural proteomics. In: *Nat Meth* 1 (2004), Nr. 2, S. 149–153
- [142] 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.: The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. In: *Proteins* 59 (2005), Nr. 4, S. 687–96
- [143] WAGNER, G. ; WUTHRICH, K.: Sequential resonance assignments in protein ¹H nuclear magnetic resonance spectra. Basic pancreatic trypsin inhibitor. In: *J Mol Biol* 155 (1982), Nr. 3, S. 347–66
- [144] WALLIN, E. ; VON HEIJNE, G.: Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. In: *Protein Science* 7 (1998), Nr. 4, S. 1029–1038
- [145] WARSCHAWSKI, D. E. ; ARNOLD, A. A. ; BEAUGRAND, M. ; GRAVEL, A. ; CHARTRAND, É. ; MARCOTTE, I.: Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808 (2011), Nr. 8, S. 1957–1974
- [146] WILLBOLD, D. ; HOFFMANN, S. ; ROSCH, P.: Secondary structure and tertiary fold of the human immunodeficiency virus protein U (Vpu) cytoplasmic domain in solution. In: *Eur J Biochem* 245 (1997), Nr. 3, S. 581–8

- [147] WILLEY, R. L. ; MALDARELLI, F. ; MARTIN, M. A. ; STREBEL, K.: Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. In: *J Virol* 66 (1992), Nr. 1, S. 226–34
- [148] WISHART, D. ; BIGAM, C. ; HOLM, A. ; HODGES, R. ; SYKES, B.: ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. In: *Journal of Biomolecular NMR* 5 (1995), Nr. 1, S. 67–81
- [149] WISHART, D. S. ; SYKES, B. D.: Chemical shifts as a tool for structure determination. In: *Methods Enzymol* 239 (1994), S. 363–92
- [150] WITTLICH, M.: *Schriften des Forschungszentrum Jülich*. Bd. 2: *Strukturelle Untersuchungen an membransoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)*. Jülich : Forschungszentrum Jülich GmbH, 2008
- [151] WITTLICH, M. ; KOENIG, B. W. ; STOLDT, M. ; SCHMIDT, H. ; WILLBOLD, D.: NMR structural characterization of HIV-1 virus protein U cytoplasmic domain in the presence of dodecylphosphatidylcholine micelles. In: *FEBS J* 276 (2009), Nr. 22, S. 6560–75
- [152] WÜTHRICH, K.: *NMR of proteins and nucleic acids*. New York : Wiley, 1986 (George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University)
- [153] XUN, Y. ; TREMOUILHAC, P. ; CARRAHER, C. ; GELHAUS, C. ; OZAWA, K. ; OTTING, G. ; DIXON, N. E. ; LEIPPE, M. ; GRÖTZINGER, J. ; DINGLEY, A. J. ; KRALICEK, A. V.: Cell-free synthesis and combinatorial selective ¹⁵N-labeling of the cytotoxic protein amoebapore A from *Entamoeba histolytica*. In: *Protein Expression and Purification* 68 (2009), Nr. 1, S. 22–27
- [154] YANG, D. ; KAY, L.: Improved ¹HN-detected triple resonance TROSY-based experiments. In: *Journal of Biomolecular NMR* 13 (1999), Nr. 1, S. 3–10
- [155] YANG, D. ; KAY, L. E.: TROSY Triple-Resonance Four-Dimensional NMR Spectroscopy of a 46 ns Tumbling Protein. In: *Journal of the American Chemical Society* 121 (1999), Nr. 11, S. 2571–2575
- [156] YAO, X. ; DÜRR, U. H. N. ; GATTIN, Z. ; LAUKAT, Y. ; NARAYANAN, R. L. ; BRÜCKNER, A.-K. ; MEISINGER, C. ; LANGE, A. ; BECKER, S. ; ZWECKSTETTER, M.: NMR-Based Detection of Hydrogen/Deuterium Exchange in

- Liposome-Embedded Membrane Proteins. In: *PLoS ONE* 9 (2014), Nr. 11, S. e112374
- [157] ZHANG, O. ; KAY, L. E. ; OLIVIER, J. P. ; FORMAN-KAY, J. D.: Backbone ^1H and ^{15}N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques. In: *J Biomol NMR* 4 (1994), Nr. 6, S. 845–58
- [158] ZHOU, D. ; SPECTOR, S. A.: Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy. In: *AIDS (London, England)* 22 (2008), Nr. 6, S. 695–699
- [159] ZUIDERWEG, E. R.: Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. In: *Biochemistry* 41 (2002), Nr. 1, S. 1–7
- [160] ZUIDERWEG, E. R. P. ; FESIK, S. W.: Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. In: *Biochemistry* 28 (1989), Nr. 6, S. 2387–2391

Liste der chemischen Verschiebungen

Die nachfolgenden Tabellen listeten die chemischen Verschiebungen der zytoplasmatischen und transmembran Region des humanen BST2 (Kap.: 6.1) und die des HIV-1 VpU (Kap.: 6.2) auf. Die Messungen erfolgten in 20 mM NaPi (pH7), 100 mM NaCl, 3 mM DTT, 3 mM EDTA und 500 mM DPC bei 40 °C. Bei Kernen, für die kein Wert ermittelt werden konnte, blieb das entsprechende Tabellenfeld frei.

6.1 BST2tmyt

AA	#	H ^N	N	C	C α	C β	H α	H β
M	1	8,06	119,17	176,13	56,43	33,23	4,37	2,05
A	2	8,20	122,80	177,70	19,43	52,95	4,34	1,41
S	3	8,12	113,89	174,81	59,05	63,92		
T	4	7,97	114,61	174,45	62,23	69,85		
S	5	8,17	117,15	173,97	58,90	63,96	4,40	3,79
Y	6	8,03	121,61	174,79	58,12	38,94	4,45	2,88
D	7	7,96	121,18	176,09	53,84	41,13	4,57	2,53/2,65
Y	8	7,96	121,31	175,81	58,75	38,54	4,44	3,04
S	9	8,17	115,50	174,46	59,65	63,84	4,43	
R	10	7,89	121,04	175,98	56,12	30,82		
V	11	7,87	120,99		60,67	32,52		
P	12	-		176,38	63,37	31,64	4,47	1,99/2,24
M	13	8,25	120,14	176,21	55,73	33,72	4,47	2,04
E	14	8,49	121,54	176,29	56,95	30,76	4,31	1,98/2,08
D	15	8,32	121,17	177,00	54,74	41,55	4,59	2,69
G	16	8,41	109,50	174,50	46,31	-	3,96	-
D	17	8,27	120,85	175,67	55,35	33,85		
K	18	8,26	121,82				4,78	2,90/2,72
R	19			177,43	58,84	30,29		
S	20	8,20	114,66	175,91	61,61	63,29		
K	21	7,99	121,72	177,73	59,77	32,60	4,02	
L	22	7,96	118,86	178,10	58,50	42,04	4,07	1,75
L	23	8,05	117,37	178,40	58,48	41,81	4,00	1,55/1,40
L	24	7,88	117,88	178,26	58,40	41,93	4,05	1,77
G	25	8,30	104,92	174,35	48,00	-	3,63	-
I	26	8,46	120,12	176,85	65,20	37,40	3,68	
G	27	8,48	107,06	174,49	48,03	-	3,60	-
I	28	8,34	119,86	177,38	65,20	37,40	3,65	2,04
L	29	7,96	119,82	178,07	58,78	42,01	3,97	1,79
V	30	8,47	117,12	177,20	67,48	31,14	3,45	2,22
L	31	8,06	119,04	178,00	58,71	41,57	3,93	1,75
L	32	8,43	117,27	178,38	58,50	41,89	3,91	1,94
I	33	8,18	118,17	177,30	65,71		3,53	
I	34	8,23	118,83	177,36	66,03	37,43	3,51	
V	35	8,16	117,93	176,32	67,37	31,67	3,59	2,18
I	36	8,36	116,46	174,85	65,04	37,47	3,68	1,87
L	37	7,82	112,12	178,63	56,00	42,87	4,42	
G	38	8,33	106,29	175,40	47,62	-	3,75/3,86	-
V	39	8,30	118,92		58,88	28,95		
P	40	-		177,56	66,51	31,12	4,12	

AA	#	H ^N	N	C	C α	C β	H α	H β
L	41	7,32	115,80	179,74	58,70	42,03	4,15	1,97/1,80
I	42	8,58	121,30	177,65	65,53	37,92	3,72	2,15
I	43	8,32	119,28	177,56	65,72	37,79	3,59	1,89
F	44	8,64	117,22	177,19	61,33	39,22	7,26	3,31/3,18
T	45	8,01	114,12	176,22	66,57	69,07	4,34	3,98
I	46	8,17	120,73	177,93	64,32	38,25	3,92	2,00
K	47	8,15	119,88	177,42	57,79	32,48	4,16	1,86
A	48	8,02	121,78	176,45	53,45	19,06	4,28	1,36
N	49	7,88	116,15	174,93	53,59	39,73	4,78	2,90
N'	49	7,85	122,56	175,69	55,09	41,21		2,72
S	50	7,91	115,71	177,43	58,73	30,29	4,10	1,93
S'	50	8,23	121,25	173,40	58,60	64,51		
E	51	7,92	127,33		58,39	31,52		

6.2 VpU

AA	#	H ^N	N	C	C α	C β
M	1					
Q	2					
P	3	-		177,67	65,93	31,44
L	4	8,77	115,98	178,61	57,35	40,65
Q	5	7,36	115,81	177,48	58,43	27,87
I	6	7,54	117,53	177,58	64,32	36,62
L	7	8,15	118,64	177,58	57,54	40,58
A	8	7,83	119,36	178,27	54,86	17,53
I	9	7,58	115,98	177,43	64,55	36,76
V	10	8,21	118,77	177,11	66,61	30,48
A	11	8,46	120,05	178,36	54,94	17,11
L	12	7,86	117,10	178,08	57,53	40,92
V	13	8,11	118,44	177,57	66,46	30,27
V	14	8,40	118,63	177,39	66,70	30,12
A	15	8,47	120,86	178,42	54,95	16,82
A	16	8,28	118,83	178,90	54,76	16,86
I	17					
I	18			177,38	65,09	36,06
A	19	8,53	120,87	178,87	55,23	17,20
I	20	8,31	116,98	179,35	64,83	37,05

AA	#	H ^N	N	C	C α	C β
V	21	8,56	123,46	177,58	67,08	30,38
V	22	8,78	119,26	177,42	66,97	30,39
W	23	8,81	119,51	177,68	60,97	
T	24	8,29	113,76	176,00		54,36
I	25			178,00	56,49	39,83
V	26	7,81	118,47	178,50	57,29	29,34
Y	27	7,86	121,39	178,33	57,36	40,85
I	28	8,08	117,89	178,54	63,77	36,59
E	29	8,08	121,63		56,51	29,84
Y	30					
R	31					
K	32					
I	33					
L	34					
R	35					
Q	36					
R	37					
K	38					
I	39					
D	40					
R	41					
L	42					
I	43			174,97	56,62	
D	44	8,07	121,70	177,78	56,44	40,04
R	45	7,73	117,96	178,21	57,14	29,31
I	46	7,88	116,52	176,30	62,75	37,54
T	47	7,80	110,75	174,96	62,24	69,40
E	48	7,88	122,28	176,57	56,60	29,06
R	49	8,10	121,76	176,28	55,44	29,81
A	50	8,25	125,06	177,80	51,98	18,56
E	51	8,26	120,01	176,34	56,11	29,63
D	52	8,20	121,60	176,40	53,77	40,78
S	53	8,20	116,95	175,32	58,20	63,16
G	54	8,42	110,93	174,10	45,01	-
N	55	8,19	118,97	175,43	53,32	33,74
E	56	8,44	121,80	176,65	56,37	29,29
S	57	8,23	116,64	175,91	57,75	63,33
E	58	8,31	123,12	177,03	56,31	29,42
G	59	8,23	109,73	173,93	44,70	-
D	60	8,14	120,83	176,49	53,95	40,79
Q	61	8,28	120,51	176,26	55,46	28,64
E	62	8,34	122,29	176,79	56,43	29,44
E	63	8,35	122,06	177,15	56,39	29,47

AA	#	H ^N	N	C	C α	C β
L	64	8,33	123,06	178,07	55,73	41,06
S	65	8,21	115,14	175,09	59,08	62,67
A	66	7,94	124,90	178,36	52,66	18,24
L	67	7,91	119,67	177,70	55,83	41,29
L'	67	7,94	119,71	177,56	55,96	41,38
V	68	7,65	117,69	176,42	62,33	31,65
V'	68	7,60	117,01	176,18	62,22	31,65
E	69	8,10	122,77	176,94	56,44	29,45
R	70	8,12	120,64	177,06	56,13	29,66
R'	70	8,30	108,34	174,15	56,25	29,69
G	71	8,23	108,44	173,92	45,11	-
G'	71	8,29	108,25	174,15	45,14	-
H	72			175,77	55,76	29,95
H'	72	8,07	118,33	175,05	56,40	30,11
L	73	8,07	121,44	176,07	54,43	41,73
L'	73	8,20	119,45	175,56	54,09	41,49
A	74	8,02	123,49	175,79	49,79	17,56
A'	74	7,47	122,17	175,23	50,48	17,68
P	75	-		175,91	62,90	30,53
W	76	7,23	116,95	175,05	56,15	29,68
W'	76	8,50	125,07	175,06	56,91	29,53
D	77	8,23	121,50	176,58	53,28	41,27
V	78	8,21	120,18	176,43	63,09	31,41
V'	78	8,30	120,39	177,54	63,22	31,36
D	79	8,28	121,48	177,55	55,93	40,14
D	80	8,03	119,46	177,51	55,30	40,63
L	81	7,83	120,23	177,80	56,26	41,38

Vektorkarte

pET22b_deltaLac_VpU-HIS

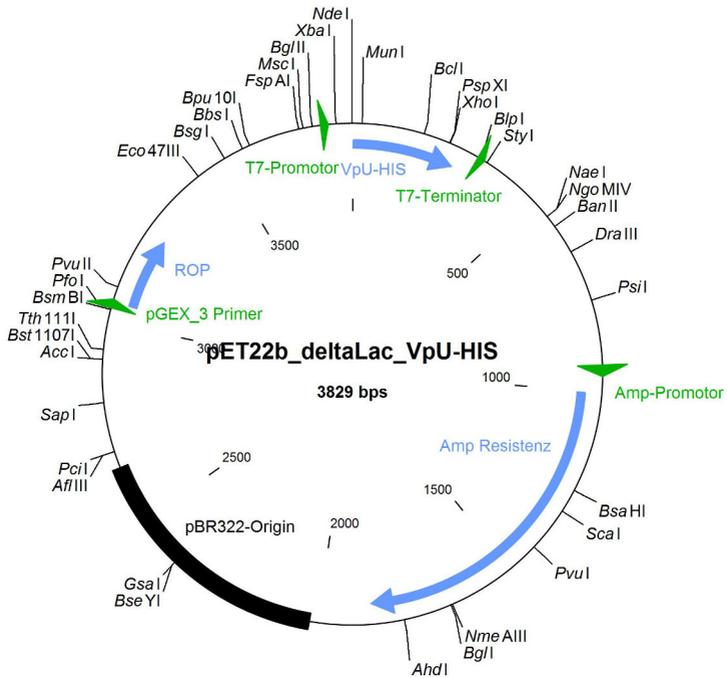


Abbildung 6.1: Vektorkarte des **pET22b_deltaLac_VpU-HIS**. Das *vpU*-Gen wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den pET22b_deltaLac Vektor hineinkloniert, wodurch das Protein einen C-terminalen His₆-Tag erhielt.

Vektorkarte

pET22b_deltaLac_BST2tmcyt

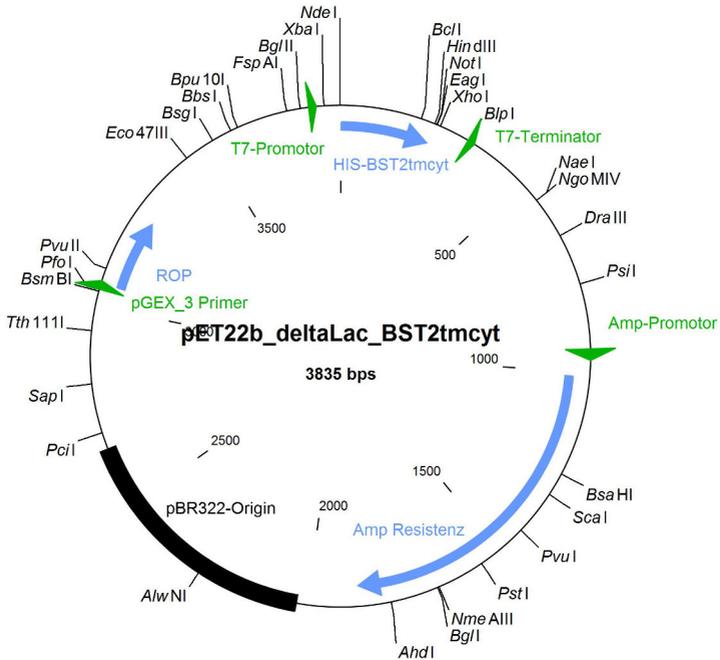


Abbildung 6.2: Vektorkarte des pET22b_deltaLac_BST2tmcyt . Das *his-bst2tmcyt*-Gen wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* in den pET22b_deltaLac Vektor hineinkloniert. Ein Stoppcodon verhindert das Ablesen des Vektor-eigenen His₆-Tags.

Vektorkarte

pET22b_deltaLac_BST2tmcyt-VpU-Rho

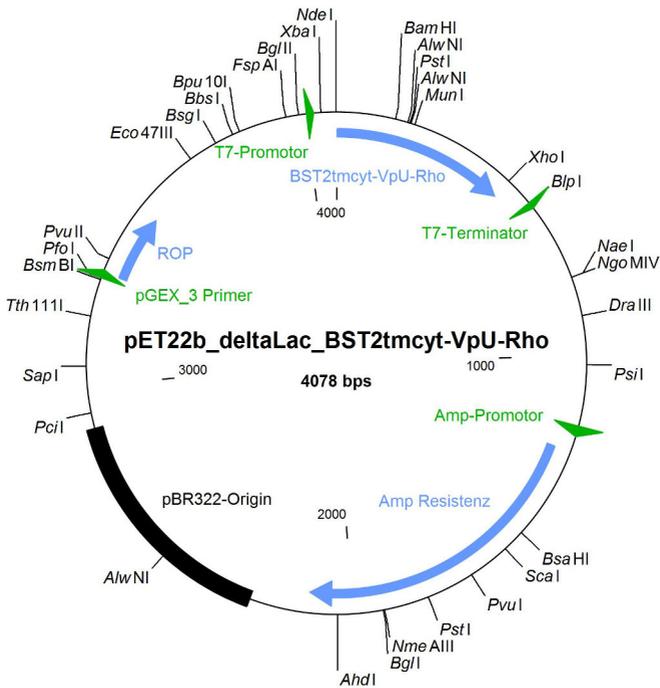


Abbildung 6.3: Vektorkarte des pET22b_deltaLac_BST2tmcyt-VpU-Rho. Das *bst2tmcyt-vpu-rho*-Gen wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den pET22b_deltaLac Vektor hineinkloniert. Ein Stoppcodon verhindert das Ablesen des Vektor-eigenen His₆-Tags.

Danksagung

Am Ende meines Weges hin zu einem promovierten Biologen möchte ich die Gelegenheit nutzen und den Leuten danken die mir dienstlich und Privat zur Seite gestanden haben. Diese Leute haben mit ihrer fachlichen und/oder moralischen Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

An Prof. Dr. Dieter Willbold geht der Dank für die Möglichkeit meine Dissertation über ein derart interessantes und spannendes Thema zu verfassen.

Besonderer Dank geht an PD Dr. Bernd König der es als Physiker mit mir als Biologen nicht immer ganz leicht hatte. Für seine geduldige Unterstützung beim Verständnis physikalischer Themen, die gute Zusammenarbeit beim Planen von Experimenten, dem Interpretieren der Ergebnisse und der Hilfestellung beim Schreiben von Veröffentlichungen bin ich ihm sehr dankbar.

Auch Dr. Philipp Neudecker darf hier nicht unerwähnt bleiben, ohne dessen Hilfestellung, bei den Messungen am NMR-Spektrometer, diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Bürokollegen Christina Winzösch, Stephan Weber und der am Ende dazustoßenden Julia Post möchte ich für die entspannte und oftmals heitere Atmosphäre im Büro danken. Ebenso wie Daniel Frenzel der mir in den Mittagspausen immer unterhaltsame und nerdige Gesellschaft leistete.

Ein Dank geht auch an alle anderen Mitarbeiter des Instituts von denen es einige sicher nicht immer ganz einfach mit mir hatten. Es hat mit große Freunde bereitet mich euch allen zusammenzuarbeiten.

Unbedingt erwähnt gehört hier auch meine Familie für ihre Unterstützung und den Geist den sie mir mitgegeben hat. Auf sie war immer und in jeder Situation Verlass, wofür ich sehr dankbar bin.

Zu guter Letzt möchte ich allen meinen Freunden danken, die mich hier teilweise seit acht langen Jahren begleiten. Ohne euch wäre es in diesen Jahren wohl recht langweilig und einsam geworden.

Eidesstattliche Erklärung

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

Datum, Ort

Unterschrift