

HIV-1 Nef destabilisiert artifizielle Membransysteme:
Untersuchung der Bedeutung des Myristoylankers
und des positiven Ladungsclusters

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Ruth Szilluweit
aus Wiesbaden

Göttingen 2009

D 7

Referent: Prof. Dr. Claudia Steinem

Korreferent: Prof. Dr. Jörg Schroeder

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Doktorarbeit wurde an der Universität Regensburg, Fakultät für Chemie, Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, im November 2005 unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem begonnen und von April 2006 bis März 2009 an der Universität Göttingen, Fakultät für Chemie, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie bei Prof. Dr. Claudia Steinem fertiggestellt.

Meiner Familie

Abstract. The HIV-1 Nef protein belongs to the so-called accessory proteins and is critical for optimal viral replication and the pathogenesis of AIDS. It is supposed that the functions of Nef require its membrane association. For many years it was thought, that this targeting is mediated by an N-terminal myristoylation site. But recent studies showed that also a non-myristoylated mutant can stably bind to cellular membranes. Therefore, it has been suggested that the N-terminal basic residues also play an important role in the association of Nef with cellular membranes via electrostatic interactions with the head groups of lipids.

The aim of this study was to investigate the influence of the membrane anchor and the impact of the basic amino acid cluster on the interaction of Nef with artificial membrane systems. The results obtained with the wild type protein were compared with those obtained with a non-myristoylated mutant (Nef G2A) or with mutants with a reduced basic cluster (Nef KKAA, Nef R4A).

Surprisingly, for all measurements performed with either large unilamellar vesicles or solid supported membranes, no stable binding of Nef to membranes was monitored even in the presence of the myristoyl anchor; in fact, the experiments show that the protein is able to perturb the membrane assembly. This was shown in vesicle leakage experiments by the release of 5(6)-carboxyfluorescein. In time resolved QCM and ellipsometry measurements the addition of the protein resulted in a loss of material from the surface. This observation was visualised by fluorescence and scanning force microscopy. By using a FITC-conjugated rabbit anti-6xHIS antibody, the protein was localised in membrane defects.

Apart from the vesicle leakage experiments performed with vesicles composed of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC):1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-(phospho-L-serine) (POPS) (4:1) all results indicate that the N-terminal myristoyl anchor is not the decisive determinant for the disturbing impact of the protein on lipid membranes. They rather demonstrate that the mutation of the basic residues results in a decrease of the membrane disordering induced by Nef. Beside the influence of mutations in the membrane binding motif of the protein the impact of the lipid composition on the interaction of Nef with artificial membranes was investigated. The results of this study show that the introduction of negative charge into the membrane results in a decrease of the membrane perturbing ability of the protein.

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	HUMANES IMMUNODEFIZIENZVIRUS (HIV) UND <i>ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME</i> (AIDS).....	1
1.2	AUFBAU DES HI-VIRUS	1
1.3	HIV-1 NEF PROTEIN	3
2	<u>ZIELSETZUNG</u>	9
3	<u>MATERIALIEN UND METHODEN</u>	11
3.1	VERWENDETE SUBSTANZEN	11
3.1.1	LIPIDE	11
3.1.2	PROTEINE	12
3.2	HERSTELLUNG ARTIFIZIELLER MEMBRANSYSTEME	13
3.2.1	HERSTELLUNG VON LIPIDFILMEN	13
3.2.2	HERSTELLUNG UNILAMELLARER VESIKEL	14
3.2.3	HERSTELLUNG PLANARER FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTER MEMBRANEN AUF GOLD	15
3.2.4	HERSTELLUNG PLANARER FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTER MEMBRANEN AUF SILIZIUMDIOXID	15
3.3	BIOPHYSIKALISCHE METHODEN.....	16
3.3.1	VESIKELCOSEDIMENTATIONSASSAYS	16
3.3.2	FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE (<i>RELEASE</i> -MESSUNGEN)	18
3.3.3	IMPEDANZSPEKTROSKOPIE	21
3.3.4	QUARZMIKROWAAGETECHNIK (QCM)	24
3.3.5	ELLIPSOMETRIE	26
3.3.6	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	32
3.3.7	RASTERKRAFTMIKROSKOPIE (AFM)	35
4	<u>ERGEBNISSE</u>	43
4.1	UNTERSUCHUNG DER BINDUNG VON HIV-1 NEF AN UNILAMELLARE VESIKEL MITTELS VESIKELCOSEDIMENTATIONSASSAYS	43
4.1.1	UNTERSUCHUNG DER BINDUNG VON HIV-1 NEF AN POPC-VESIKEL	44
4.1.2	UNTERSUCHUNG DER BINDUNG VON HIV-1 NEF AN VESIKEL BESTEHEND AUS POPC:SM:CHOL (2:1:1)	45

4.1.3	UNTERSUCHUNG DER ANBINDUNG VON HIV-1 NEF AN VESIKEL BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1)	47
4.2	UNTERSUCHUNG DER FREISETZUNG VON 5(6)-CARBOXYFLUORESCEIN (CF) AUS UNILAMELLAREN VESIKELN INDUZIERT DURCH HIV-1 NEF	49
4.2.1	FREISETZUNG VON 5(6)-CARBOXYFLUORESCEIN AUS UNILAMELLAREN POPC-VESIKELN INDUZIERT DURCH HIV-1 NEF	50
4.2.2	FREISETZUNG VON 5(6)-CARBOXYFLUORESCEIN AUS UNILAMELLAREN VESIKELN BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1) INDUZIERT DURCH HIV-1 NEF	52
4.2.3	FREISETZUNG VON 5(6)-CARBOXYFLUORESCEIN AUS UNILAMELLAREN VESIKELN BESTEHEND AUS POPC:POPG (4:1) INDUZIERT DURCH HIV-1 NEF	54
4.3	UNTERSUCHUNG DER WECHSELWIRKUNG VON HIV-1 NEF MIT PLANAREN LIPIDDOPPELSCHICHTEN MITTELS QUARZMIKROWAAGEMESSUNGEN.....	56
4.3.1	IMPEDANZSPEKTROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER MEMBRANEN	57
4.3.2	WECHSELWIRKUNG VON HIV-1 NEF MIT FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTEN OT/POPC-MEMBRANEN	58
4.3.3	WECHSELWIRKUNG VON HIV-1 NEF MIT FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTEN OT/(POPC:SM:CHOL 2:1:1)-MEMBRANEN	61
4.4	CHARAKTERISIERUNG DER SCHICHTDICKENÄNDERUNGEN VON FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTEN POPC-MEMBRANEN INDUZIERT DURCH HIV-1 NEF MITTELS ELLIPSOMETRIE	63
4.5	VISUALISIERUNG DER INTERAKTION VON HIV-1 NEF MIT ARTIFIZIELLEN FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTEN MEMBRANEN MITTELS FLUORESZENZ- UND RASTERKRAFTMIKROSKOPIE.....	66
4.5.1	VISUALISIERUNG DER INTERAKTION VON HIV-1 NEF MIT ARTIFIZIELLEN FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTEN POPC-MEMBRANEN	67
4.5.2	VISUALISIERUNG DER INTERAKTION VON HIV-1 NEF MIT ARTIFIZIELLEN FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTEN MEMBRANEN BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1)	91
5	<u>DISKUSSION</u>	103
5.1	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DES N-TERMINALEN LIPIDANKERS VON HIV-1 NEF AUF DIE WECHSELWIRKUNG MIT ARTIFIZIELLEN MEMBRAN-SYSTEMEN.....	103
5.2	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DES POSITIVEN LADUNGSCLUSTERS IM N-TERMINUS VON HIV-1 NEF AUF DIE WECHSELWIRKUNG MIT ARTIFIZIELLEN MEMBRAN-SYSTEMEN	117
5.3	EINORDNUNG IN DEN PHYSIOLOGISCHEN KONTEXT	125
5.4	MODELL DER INTERAKTION VON HIV-1 NEF MIT ARTIFIZIELLEN MEMBRANEN	127

6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	131
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	133
8	<u>ANHANG</u>	147
8.1	SYMBOLVERZEICHNIS.....	147
8.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	148
8.3	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	150
8.4	MATERIALEN.....	151
8.5	GERÄTE.....	151
8.6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	153

1 Einleitung

1.1 Humanes Immunodefizienzvirus (HIV) und *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS)

Zu Beginn der 1980er Jahre wurde in den USA erstmals der Verlauf einer Krankheit beschrieben, die später als *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) bekannt wurde. Bei an AIDS Erkrankten ist das Immunsystem stark geschwächt und durch Folgeinfektionen führt die Krankheit schließlich zum Tod der Infizierten. 1983 gelang es Luc Montagnier und kurz darauf auch Robert Gallo von an AIDS Erkrankten einen Retrovirus zu isolieren.^{1, 2} Dieses Retrovirus wurde als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS identifiziert und als **Humanes Immunodefizienzvirus (HIV)** bezeichnet. Heute wird das Virus in zwei Arten unterschieden: HIV-1 und HIV-2. HIV-2 ist in Westafrika endemisch und breitet sich inzwischen auch in Indien aus. Die weltweit meisten AIDS-Fälle werden jedoch von HIV-1 verursacht. Obwohl HIV seit mehr als 25 Jahren als Auslöser von AIDS bekannt ist, gilt die Krankheit als unheilbar und hat sich zu einer weltweiten Pandemie entwickelt. Seit 2000 hat sich zwar die Zahl der mit HIV Infizierten stabilisiert, dennoch lebten 2007 nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) circa 33 Millionen Menschen mit HIV. Pro Jahr infizieren sich weltweit ungefähr 3 Millionen Menschen neu mit dem Virus.³ Obwohl in der Entwicklung von Wirkstoffen große Fortschritte gemacht wurden, führt die hohe Mutationsrate von HIV immer wieder zu Rückschlägen. Daher steht die Entwicklung einer erfolgreichen Therapie oder eines Impfstoffes noch aus, allerdings konnte bisher die Lebenserwartung von Infizierten erheblich gesteigert werden.

1.2 Aufbau des HI-Virus

Das HI-Virus gehört zur Klasse der Retroviren. Diese Virusklasse ist nach dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) benannt, welches 1970 von Temin und Mizutani sowie von Baltimore entdeckt wurde.^{4, 5} Die Reverse Transkriptase versetzt Retroviren in die Lage, den genetischen Informationsfluss umzukehren. Es vermag die einzelsträngige virale RNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Diese wird dann in den Kern der Wirtszelle eingeschleust und von dem Enzym Integrase in das Wirtsgenom eingebaut. Inner-

halb der Klasse der Retroviren gehört das HI-Virus zur Untergruppe der Lentiviren. Die Bezeichnung für diese Gruppe leitet sich vom lateinischen *lentus* (langsam) ab und bezieht sich auf das langsame Voranschreiten der Krankheit.⁶

Das Genom des Virus besteht aus einer einzigen RNA, umfasst circa 9000 Basen und enthält 9 offene Leserahmen, die von sogenannten *long terminal repeats* (LTRs) flankiert werden. Insgesamt werden 15 Proteine codiert (siehe Abbildung 1.1).⁷⁻⁹

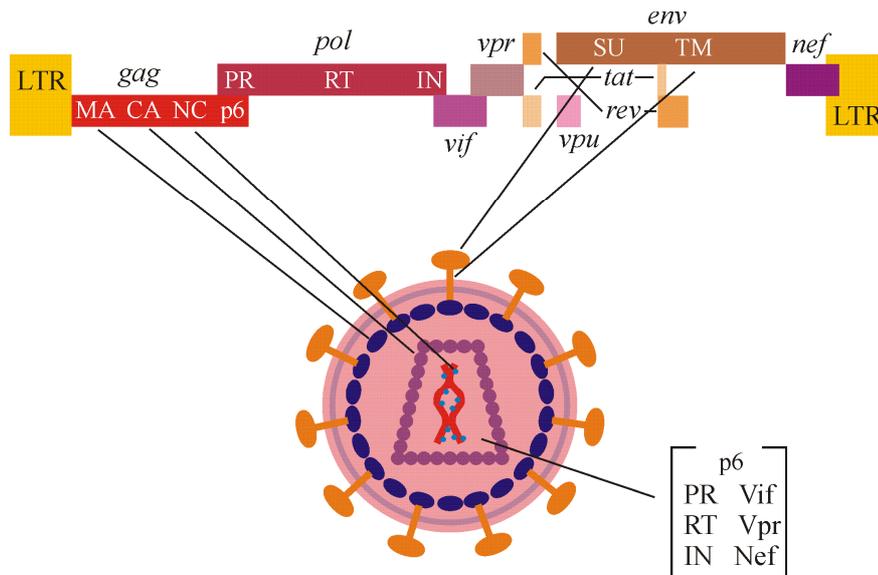


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des HIV-Genoms und Virions. LTR: *long terminal repeat*, gag: *group-specific antigen*, pol: *polymerase*, env: *envelope*, MA: Matrix, CA: Capsid, NC: Nukleocapsid, p6: Protein mit der Größe 6 kDa, PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase, IN: Integrase, SU: *surface protein*, TM: Transmembranprotein.

Drei dieser Leserahmen codieren für die Polyproteine *group-specific antigen* (gag), *polymerase* (pol) und *envelope* (env). Diese werden proteolytisch in einzelne Proteine gespalten, die allen Retroviren eigen sind. So wird gag in vier Proteine gespalten: Matrix (MA), Capsid (CA), Nukleocapsid (NC) und p6. Zusammen mit den zwei env Proteinen dem *surface protein* (SU oder gp120) und dem Transmembranprotein (TM oder gp41) bilden sie die strukturellen Komponenten, die den Kern des Virions und die äußere Virushülle bilden. Die drei pol Proteine Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) bilden die Enzyme des Virus, die im Partikel vorhanden sind. Neben diesen neun Proteinen codiert HIV-1 noch 6 zusätzliche Proteine, die auch als akzessorische Proteine bezeichnet werden und keine enzymatische Aktivität besitzen, aber bei der Virusreplikation eine wichtige Rolle spielen. Vif, Vpr und Nef sind im Viruspartikel lokali-

siert. Tat und Rev stellen wichtige regulatorische Faktoren dar, und Vpu ist erforderlich, um das Virion korrekt zusammenzubauen. Neben diesen Proteinen enthält das Virion noch zwei genomische RNA-Moleküle (siehe Abbildung 1.1).

1.3 HIV-1 Nef Protein

Das HIV-1 Nef Protein gehört zu den sogenannten akzessorischen Proteinen.^{10, 11} Nef ist eine Abkürzung für *negative factor*. Diese Bezeichnung wurde dem Protein irrtümlich gegeben, da bei der Untersuchung von Zellkulturen (*in vitro*) der Verlust des *nef*-Gens keinen oder sogar einen positiven Einfluss auf die HIV-Replikation hatte.¹²⁻¹⁵ Bei der Untersuchung von *nef*-deletierten Viren (*in vivo*) wurde dieser Irrtum allerdings schnell deutlich, da sich in diesen Experimenten zeigte, dass die Funktion von Nef darin besteht die Virusreplikation zu steigern.¹⁶⁻¹⁸

Struktur des HIV-1 Nef Proteins

Das HIV-1 Nef Protein besteht aus 206 Aminosäuren und hat eine molare Masse von 26 kDa. Die Kristallstruktur der Kerndomäne von Nef wurde durch Komplexierung mit der SH3-Domäne einer Fyn-Tyrosinkinase geklärt.^{19, 20} Zusätzlich wurde die Struktur von HIV-1 Nef in Lösungen allein und durch Bindung an ein Peptid des cytoplasmatischen Teils von CD4 mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt.²¹⁻²³ In Abbildung 1.2 ist die Sekundärstruktur des Proteins dargestellt. Zudem sind die Strukturmodule gekennzeichnet, die zur Interaktion mit anderen Proteinen nötig sind. Nur ein geringer Teil des Proteins besitzt eine definierte Struktur. Der gut strukturierte Teil von HIV-1 Nef stellt die Kerndomäne des Proteins dar und umfasst circa 93 Aminosäuren. Innerhalb dieser Domäne findet sich eine Typ II Polyprolinhelix (Aminosäuren 70-77), diese stellt die Hauptbindungsstelle für Proteine der Scr-Protein-Familie dar. Dieser Helix schließen sich zwei α -Helices (Aminosäuren 81-120), vier antiparallele β -Faltblätter (Aminosäuren 121-186) und nochmals zwei α -Helices (Aminosäuren 187-203) an. Die Aminosäuren 60-71 und 149-180 bilden dem umgebenden Medium zugewandte flexible Schleifen. Innerhalb der C-terminalen flexiblen Schleife findet sich ein Di-Leucin (LL-) Motiv, welches im vesikulären Zelltransport die Internalisierung eines Moleküls steuert.

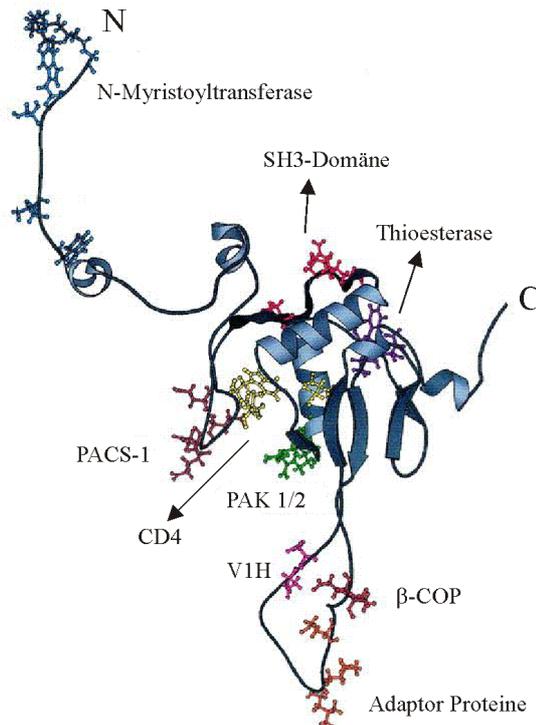


Abbildung 1.2: Sekundärstruktur von HIV-1 Nef, sowie die Struktur motive, die für die Funktionen von Nef von Bedeutung sind.¹⁰

Auch der N-terminale Bereich des Proteins (Aminosäuren 1-70) ist recht flexibel.^{9, 11} Zudem ist der N-Terminus des Proteins myristoyliert. Dieser N-terminale Lipidanker wurde über viele Jahre als entscheidender Parameter für die Protein-Membran-Wechselwirkung verantwortlich gemacht.²⁴ In den letzten Jahren konnten aber mehrere Gruppen zeigen, dass auch eine unmyristoylierte Mutante des Proteins die Fähigkeit besitzt an Membranen zu binden und damit funktionell zu sein.^{25, 26} Daher wird vermutet, dass es andere strukturelle Motive im Protein geben muss, die einen Einfluss auf die Interaktion des Proteins mit Membranen haben, wie zum Beispiel die Anhäufung basischer Aminosäuren im N-Terminus des Proteins. Innerhalb der ersten 26 N-terminalen Aminosäuren befinden sich insgesamt sieben basische Aminosäuren in Form von Lysin und Arginin. Diese bilden unter physiologischen Bedingungen einen positiven Ladungscluster und können so mit den Kopfgruppen der Lipide interagieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen sowohl der Einfluss des N-terminalen Lipidankers als auch die Bedeutung des positiven Ladungsclusters beleuchtet werden. Daher wurden die Wechselwirkung des Wildtyps (wt) Nef sowie die Interaktion der nichtmyristoylierten

Mutante Nef G2A und die der Mutanten Nef KKAA und Nef R4A, welche eine verringerte positive N-terminale Ladungsdichte besitzen, mit Lipiddoppelschichten untersucht. In der Zelle kann HIV-1 Nef in verschiedenen Konformationen vorliegen. Es wird von einem „Nef-Zyklus“ gesprochen (Abbildung 1.3).²⁷ Nach der Translation kann das Protein in der sogenannten *closed conformation* vorliegen. Dabei sind der N-Terminus des Proteins und die flexible C-terminale Schleife um die Kerndomäne gewickelt. Dadurch sind der Membrananker und Bindungsmotive unzugänglich. Die Myristoylsäure interagiert mit hydrophoben Regionen in der Kerndomäne, die positiven Ladungen des N-Terminus wechselwirken mit negativen Ladungen der Kerndomäne. Der Kontakt mit der Plasmamembran kann eine Konformationsänderung des Proteins bewirken und so die Membranbindungsstelle freigeben. In der sogenannten *signalling conformation* interagiert Nef fast ausschließlich mit Signalmolekülen. Durch eine weitere Konformationsänderung, welche wahrscheinlich durch eine Modifikation des Proteins ausgelöst wird, kann auch die flexible C-terminale Schleife freigegeben werden (*open conformation*). Die genauen Mechanismen dieser Konformationsänderung wurden noch nicht aufgeklärt. In der *open conformation* ist HIV-1 Nef in der Lage, auch mit anderen Proteinen wechselwirken zu können.²⁷ Alle Nef-Modelle wurden auf der Basis von NMR-Daten konstruiert.^{21, 28}

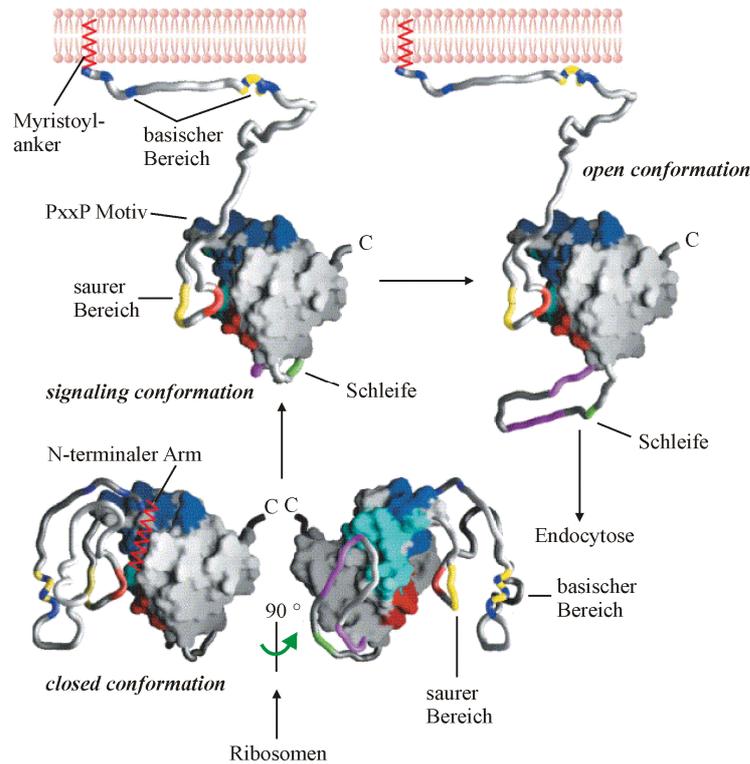


Abbildung 1.3: Überblick über die verschiedenen Konformationen, die HIV-1 Nef in der Zelle einnehmen kann.²⁷

Funktionen des HIV-1 Nef Proteins

In der Literatur ist bekannt, dass das HIV-1 Nef Protein eine Vielzahl von Funktionen in der Pathogenese von AIDS erfüllt. Die wichtigsten sollen hier vorgestellt werden. Sie beinhalten unter anderem die Induzierung des Abbaus von CD4-Molekülen (*cluster of differentiation 4*) und MHC I-Proteinen (*major histocompatibility complex I*), die Erhöhung der viralen Infektiosität und die Rekrutierung von Kinasen zur Veränderung der Zellaktivität.^{11, 29}

Downregulierung von CD4-Molekülen

Die Downregulierung von CD4 ist die bestverstandene Funktion von HIV-1 Nef. CD4-Moleküle bilden den primären Rezeptor für HIV.³⁰ Sie sind transmembrane Glykoproteine, die in den Membranen von Zellen des Immunsystems (T-Helferzellen, Monocyten, Macrophagen) vorkommen. CD4 ist von großer Bedeutung für das Immunsystem. So sind CD4-Moleküle zum Beispiel notwendig für die Reifung von T-Zellen, außerdem sind sie in die Aktivierung von vollentwickelten T-Helferzellen involviert.

Wie wichtig die Downregulierung von CD4 für die Pathogenese von AIDS ist, zeigt sich darin, dass HIV-1 drei Proteine (Vpu, Env, Nef) für diese Aufgabe beansprucht.³¹ Während Vpu und Env die Zahl an CD4-Molekülen verringern, indem sie den Transport von neuen Molekülen an die Zelloberfläche verhindern, wird Nef im viralen Zyklus früh exprimiert und degradiert CD4-Moleküle von der Zelloberfläche durch Endozytose.^{32, 33} Nur HIV-1 Nef ist in der Lage, CD4-Moleküle, welche bereits vor der HIV-Infektion an der Zelloberfläche präsent waren, abzubauen und spielt so die wichtigste Rolle bei der Downregulierung von CD4.³⁴ Durch den Abbau von CD4 wird die Freisetzung und die Infektiösität von HIV-1-Partikeln erhöht und einer Superinfektion durch HIV vorgebeugt.^{35, 36} Im Verlauf der HIV-Infektion wird die Zahl der CD4-Moleküle kontinuierlich verringert und führt schließlich zu einem schweren Immundefekt. Die Zahl der CD4-Zellen pro Mikroliter Blut ist unter anderem ein Faktor, der den Übergang von HIV zu AIDS markiert.

Downregulierung von MHC I

Neben der Induzierung des Abbaus von CD4 ist die Downregulierung von MHC I-Molekülen am besten verstanden.^{37, 38} MHC I-Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Immunerkennung. Sie sind für die Präsentation von Antigenen an der Zelloberfläche verantwortlich und zeigen somit an, ob eine Zelle gesund ist oder nicht. So wird verhindert, dass gesunde Zellen cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) zum Opfer fallen. Durch die Verminderung dieser Moleküle werden HIV-1 infizierte Zellen vor der Lysierung durch CTLs geschützt. HIV-1 infizierte Zellen entkommen somit einer Immunantwort des Wirts.³⁹ HIV-1 Nef downreguliert allerdings nicht alle MHC I-Moleküle, sondern nur die Untertypen HLA-A/B (*human leucocyte antigen*). Die Untertypen HLA-C/D bleiben auf der Zelloberfläche präsent.⁴⁰ Dadurch schützt HIV-1 Nef infizierte Zellen vor der Immunantwort der *natural killer cells* (NK). Diese würden bei einem Fehlen beider Untertypen auf der Zelloberfläche aktiviert. Durch die selektive Downregulierung gelingt HIV-1 infizierten Zellen die Balance zwischen der Lysierung durch CTLs und der Vernichtung durch NKs.

Erhöhung der viralen Infektiösität

Die Erhöhung der viralen Infektiösität wird unter anderem durch die Downregulierung von CD4 von HIV-1 Nef erreicht. Durch den Abbau wird die Freisetzung von Virionen erleichtert. Zudem steigert die Anwesenheit von Nef in infizierten Zellen die Aktivität

der Reversen Transkriptase und sorgt so für ein effizienteres Umschreiben der viralen RNA in DNA.⁴¹

Rekrutierung von Kinasen

Proteinkinasen sind Enzyme, die die Aufgabe haben andere Proteine zu phosphorylieren. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Zelle. Es ist bekannt, dass HIV-1 Nef mit einer Vielzahl von zellulären Proteinkinasen wechselwirkt. Dabei ist Nef zum einen das Substrat der Kinasen, zum anderen moduliert es auch deren Aktivität.⁴² Durch diese Wechselwirkungen ist HIV-1 Nef in der Lage in die Signaltransduktion der Zelle einzugreifen.

2 Zielsetzung

Das HI-Virus verursacht die bisher unheilbare Krankheit AIDS. Mehr als 30 Millionen Menschen weltweit sind mit HIV infiziert. Das akzessorische HIV-1 Nef Protein spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von AIDS. Die Erhöhung der viralen Infektiösität, Veränderungen der signalen Transduktionswege der Zellen und die Downregulierung von CD4- und MHC I-Molekülen, die von entscheidender Bedeutung für das Immunsystem des Menschen sind, sind als Funktionen des Proteins bekannt.

In der Literatur wurde berichtet, dass HIV-1 Nef mit der Plasmamembran der Wirtszelle assoziiert sein muss, um seine Funktionen ausüben zu können.

Ziel dieser Arbeit war es mittels artifizierlicher Membransysteme zur Aufklärung der Protein-Membran-Wechselwirkung beizutragen. Neben dem Wildtyp des Proteins wurde in dieser Arbeit mit einer nichtmyristoylierten Mutante Nef G2A gearbeitet, um den Einfluss des N-terminalen Lipidankers zu untersuchen. Des Weiteren wurde die Interaktion von zwei Mutanten mit reduziertem positiven Ladungscluster (Nef KKAA und Nef R4A) mit artifiziiellen Lipiddoppelschichten untersucht.

Um den Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Protein-Membran-Wechselwirkung zu untersuchen, wurden verschiedene Lipidsysteme eingesetzt. Neben reinen POPC-Membranen, wurden Membranen mit *raft*-ähnlicher Zusammensetzung (POPC:SM:Chol (2:1:1)) untersucht, da in der Literatur postuliert wird, dass eine Subpopulation des Proteins mit *lipid rafts* assoziiert ist. Des Weiteren wurde mit Membranen der Zusammensetzung POPC:POPS (4:1) und POPC:POPG (4:1) gearbeitet, welche die innere Hälfte der Plasmamembran nachahmen und die Untersuchung des Einflusses von negativer Ladungsdichte auf die Interaktion des Proteins mit artifiziiellen Membranen ermöglichen.

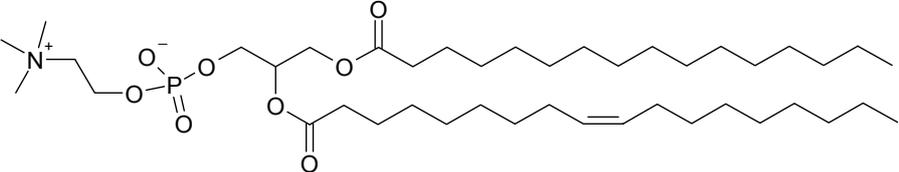
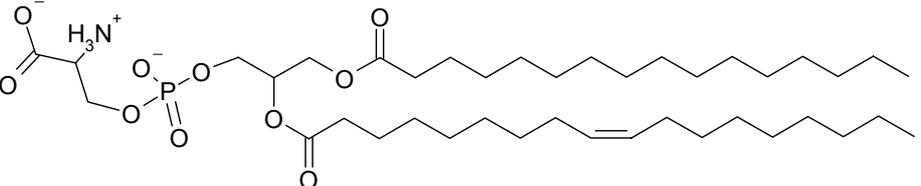
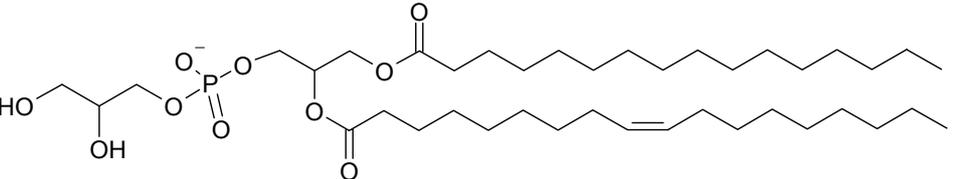
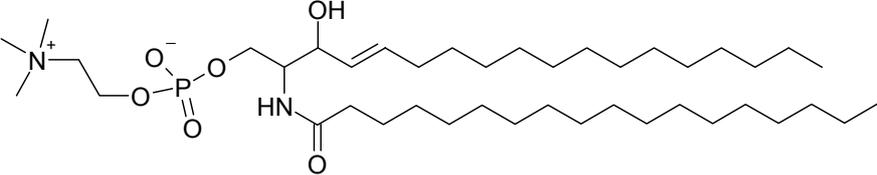
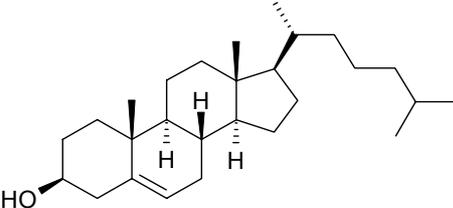
3 Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Substanzen

3.1.1 Lipide

In der vorliegenden Arbeit wurde mit unterschiedlichen Lipiden gearbeitet. In Tabelle 3.1 ist ein Überblick über diese gegeben.

Tabelle 3.1: Namen und Strukturformeln der verwendeten Lipide.

Name	Strukturformel
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (POPC)	
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-(phospho-L-serin) (POPS)	
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho- <i>rac</i> -(1-glycerin)] (POPG)	
Sphingomyelin (SM)	
Cholesterin (Chol)	

POPC, POPS und POPG sind Phosphoglycerolipide, die über gleiche Fettsäureketten verfügen und sich lediglich in der Struktur und Ladung ihrer Kopfgruppe unterscheiden. Bei POPC handelt es sich um ein Lipid mit zwitterionischer Kopfgruppe. Es hat eine molare Masse von $M = 760,1$ g/mol und eine Hauptphasenumwandlungstemperatur (T_M) von -2 °C. POPS ($M = 783,5$ g/mol, $T_M = 14$ °C) und POPG ($M = 770,5$ g/mol, $T_M = -2$ °C) sind einfach negativ geladene Lipide.

Sphingomyelin ist ein zwitterionisches Lipid und gehört zur Klasse der Sphingolipide, deren Grundgerüst das Sphingosin ist. Die Aminofunktion des Sphingosins ist über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft. In dieser Arbeit wurde mit natürlichem Sphingomyelin gearbeitet, welches aus Rinderhirn isoliert wurde. Daher ist es ein Gemisch aus mit unterschiedlichen Fettsäuren (hauptsächlich Stearinsäure) verknüpften Molekülen. Es hat eine mittlere molare Masse von $M = 731,1$ g/mol und einen Hauptphasenumwandlungstemperaturbereich von 37-41 °C.

Cholesterin ($M = 368,7$ g/mol) wird zu den Steroiden gezählt und kommt nur in tierischen Membranen vor.

Neben Experimenten an Membranen beziehungsweise Vesikeln bestehend aus reinem POPC wurden auch Messungen mit folgenden Lipidgemischen durchgeführt: POPC:POPS im molaren Verhältnis (4:1), POPC:POPG (4:1), und POPC:SM:Chol (2:1:1). Sollten die Membranen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops visualisiert werden, so waren sie zusätzlich mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotiert.

3.1.2 Proteine

Das Protein HIV-1 Nef wurde von Holger Gerlach (AK PD Matthias Geyer, MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) in *Escherichia coli* expremiert.⁴³ Zur Aufreinigung wurde das Protein C-terminal mit einem His₆-tag versehen, der nach der Aufreinigung nicht wieder abgespalten wurde.

Neben dem Wildtyp (wt Nef) wurden zum besseren Verständnis der Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit artifiziellen Membransystemen in dieser Arbeit auch 3 Mutanten untersucht. Zur Untersuchung des Einflusses des Myristoylankers wurde mit der Mutante Nef G2A gearbeitet, welcher der Myristoylanker N-terminal, durch den Austausch der Aminosäure Glycin gegen Alanin, fehlt. Alanin ist kein Substrat der N-Myristoyltransferase, somit kann dieses Protein nicht posttranslational modifiziert werden. Um Informationen über den Einfluss des positiven Ladungsclusters zu erhalten,

wurden des Weiteren folgende Mutanten untersucht: Nef KKAA ist myristoyliert, allerdings wurde hier die Aminosäure Lysin an den Positionen 4 und 7 durch die ungeladene Aminosäure Alanin ersetzt und somit der positive Ladungscluster im N-Terminus des Proteins von 7 geladenen Aminosäuren auf 5 reduziert. Noch umfangreicher ist die Verringerung der positiven Ladung bei der Mutante Nef R4A. Hier wurden alle Arginine (Position 17, 19, 21, 22) auf der ersten Helix durch Alanine ersetzt. Durch den Austausch dieser 4 Aminosäuren trägt der N-Terminus nur noch 3 positive Ladungen. Abbildung 3.1 zeigt die Abfolge der ersten 26 Aminosäuren des N-Terminus von Nef, die basischen und die ausgetauschten Aminosäuren sind farbig markiert.

```

wt Nef      M G G K W S K C S M K G W P T I R E R M R R A E L Q
Nef G2A     M A G K W S K C S M K G W P T I R E R M R R A E L Q
Nef KKAA   M G G A W S A C S M K G W P T I R E R M R R A E L Q
Nef R4A    M G G K W S K C S M K G W P T I A E A M A A A E L Q

```

Abbildung 3.1 Aminosäuresequenz des N-Terminus von wt Nef beziehungsweise der Mutanten Nef G2A, Nef KKAA und Nef R4A im Einbuchstabencode. Die Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten sind blau markiert, die ausgetauschten rot.

Um das Protein im Fluoreszenzmikroskop visualisieren zu können, wurde ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierter Anti-His₆-tag-Antikörper (Immunology Consultants Laboratory, Inc. – USA), welcher aus Kaninchen isoliert wurde, verwendet. Dieser bindet spezifisch an den C-terminalen His₆-tag von HIV-1 Nef und zeigt somit die Position von Nef auf der Probe.

3.2 Herstellung artifizieller Membransysteme

3.2.1 Herstellung von Lipidfilmen

Bei der Herstellung von Lipidfilmen ist darauf zu achten, dass stets oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur aller Lipide gearbeitet wird. Zunächst wurden Stammlösungen der jeweiligen Lipide hergestellt. Hierzu wurden diese in Chloroform beziehungsweise POPS und POPG in einer Mischung aus Chloroform und Methanol (5/1)

gelöst. Die Konzentration der Stammlösungen wurde entweder mittels Veraschungen und anschließender Bestimmung des Phosphatgehalts oder durch Aufnahme von Isothermen an der Filmwaage bestimmt.⁴⁴ Von diesen Stammlösungen wurden entsprechende Volumina in Reagenzgläser pipettiert. Aus diesen wurde dann bei 30 °C oder bei 55 °C für die Lipidmischung POPC:SM:Chol (2:1:1) unter leichtem Stickstoffstrom das Lösungsmittel verblasen. Anschließend wurden die Lipidfilme im Vakuum für zwei Stunden weiter bei 30 °C oder 55 °C getrocknet und dann bei 4 °C gelagert.

3.2.2 Herstellung unilamellarer Vesikel

Für die Herstellung von unilamellaren Vesikeln wurden die Lipidfilme mit einem bestimmten Volumen an Puffer versetzt und für 20 min oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur aller verwendeten Lipide inkubiert. Für Lipidfilme bestehend aus POPC oder aus POPC:SM:Chol (2:1:1) wurde ein Puffer folgender Zusammensetzung verwendet: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4. Sollten Vesikel bestehend aus POPC:POPS (4:1) für die Herstellung von festkörperunterstützten Membranen verwendet werden, so enthielt oben genannter Puffer zusätzlich noch 1 mM CaCl₂. Für die Herstellung von Vesikeln für *Release*-Messungen bestehend aus POPC:POPS (4:1) oder POPC:POPG (4:1) enthielt der Puffer zusätzlich 0,5 mM EGTA. Nach der Inkubationszeit der Lipidfilme mit Puffer wurde dreimal in fünfminütigen Abständen jeweils 30 s gevortext. Die so erhaltenen multilamellaren Vesikel wurden durch zwei Methoden in unilamellare Vesikel umgewandelt. *Large unilamellar vesicles* (LUVs) bestehend aus POPC oder POPC:SM:Chol (2:1:1) wurden durch die Verwendung eines Miniextruders, welcher eine Polycarbonatmembran mit der Porengröße 100 nm enthielt, erhalten. *Small unilamellar vesicles* (SUVs) bestehend aus POPC:POPS (4:1) wurden durch den Einsatz von Ultraschall (50 W, 0,4 s Puls, zweimal 15 min) hergestellt.

Für *Release*-Messungen wurden die Vesikel immer durch die Extrusionsmethode hergestellt, zusätzlich enthielt der obengenannte Puffer noch 100 mM 5(6)-Carboxyfluorescein. Nach Herstellung der Vesikel wurde der externe Farbstoff durch Säulen der Vesikel über eine Sephadex™ G-25-Säule entfernt. Von den Vesikeln wurde mittels Veraschung und anschließender Bestimmung des Phosphatgehalts die Konzentration bestimmt.⁴⁴ Die Vesikel wurden bis zu den Experimenten im Dunkeln gelagert.

3.2.3 Herstellung planarer festkörperunterstützter Membranen auf Gold

Zur Herstellung von planaren festkörperunterstützten Membranen wurden beidseitig mit Gold bedampfte 5 MHz Schwingquarze verwendet. Zunächst wurde die Elektrode mit Silberleitlack mit einem Kontaktstück auf der Unterseite des Quarzes verbunden. Dieser wurde dann für 5 min im Argonplasma gereinigt, anschließend in die Messkammer eingebaut und mit 200 μL einer 2 mM ethanolschen Oktanthiollösung für zwei Stunden inkubiert. Danach wurde überschüssiges Oktanthiol (OT) durch Spülen entfernt. Insgesamt wurde fünfmal mit 500 μL Ethanol und fünfmal mit 500 μL Puffer (20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4) gespült. Im Anschluss wurde die Qualität der Oktanthiolschicht mittels Impedanzspektroskopie untersucht. Lag die Kapazität der Monoschicht zwischen 1,7-2,3 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, so konnte von einer vollständigen Belegung der Oberfläche ausgegangen werden, und der Quarz wurde für 1 h mit unilamellarer Vesikellösung (200 μL , 0,2 mg/mL) oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur aller Lipide inkubiert. Durch Spülen mit Puffer (20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4) (10 mal) wurden überschüssige Vesikel entfernt. Die Membran wurde ebenfalls impedanzspektroskopisch überprüft. Lag die erhaltene spezifische Kapazität bei $(1,0 \pm 0,3) \mu\text{F}/\text{cm}^2$, so wurde die Membran für Quarzmikrowaagemessungen verwendet.

3.2.4 Herstellung planarer festkörperunterstützter Membranen auf Siliziumdioxid

Substratvorbehandlung

Für das Spreiten von Lipidvesikeln auf Siliziumdioxidoberflächen wurden aus Siliziumwafern Stücke der passenden Größe geschnitten. Diese wurden mit Isopropanol und Reinstwasser gespült. Anschließend wurden sie für 20 min in einer 70 °C heißen wässrigen ammoniakalischen (25 %ig), wasserstoffperoxidhaltigen (30 %ig) Lösung ($\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ 5/1/1(v/v/v)) inkubiert. Danach wurden sie mehrfach mit Reinstwasser gespült und bis zur Verwendung unter Wasser gelagert. Für Ellipsometriemessungen wurden Siliziumwafer (Si-Mat, Landsberg/Lech, Deutschland, Dicke: 725 μm , Orientierung: (100), Dotierung: p-Typ Bor, Widerstand: 0-50 $\Omega\cdot\text{cm}$) mit einer 0,1-5 nm dicken nativen Siliziumdioxidschicht verwendet. Für Fluoreszenzmessungen wurden Siliziumwafer (CrysTec, Berlin, Deutschland, Dicke: 625 μm , Orientierung: (100), Dotierung:

p-Typ Bor, Widerstand: 1-20 Ω *cm) mit einer Siliziumdioxidschicht von 100 nm verwendet, um den Kontrast zu verbessern.

AFM- und Fluoreszenzmessungen

Für die AFM- und Fluoreszenzmessungen wurden die Siliziumplättchen in einen Teflontrog eingespannt und mit unilamellaren Vesikeln für eine Stunde inkubiert. POPC-Vesikel wurden bei Raumtemperatur inkubiert, die Konzentration der Vesikellösung betrug 0,1 mg/mL. Vesikel bestehend aus POPC:POCS (4:1) wurden bei 40 °C inkubiert (0,2 – 0,25 mg/mL) und der Calciumionengehalt auf 5 mM erhöht. Nach dem Spreitvorgang wurden die Membranen mit Puffer (20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4) gespült, um überschüssige Vesikel zu entfernen.

Ellipsometriemessungen

Für Ellipsometriemessungen wurden die Siliziumwafer in die EP³-Flüssigkeitszelle eingebaut und eine Vesikellösung (0,19 mg/mL) für circa eine Stunde durch die Zelle mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min gepumpt. Der Spreitvorgang wurde durch die Änderung der ellipsometrischen Winkel (Δ und Ψ) verfolgt. Nachdem dieser beendet war, wurde 30 min mit Puffer (20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4) gespült, um überschüssige Vesikel zu entfernen.

3.3 Biophysikalische Methoden

3.3.1 Vesikelcosedimentationsassays

Mit Hilfe von Vesikelcosedimentationsassays kann die Anbindung von Proteinen an sphärische Lipiddoppelschichten untersucht werden. Hierzu wurden frisch hergestellte unilamellare Vesikel ($c = 0,5$ mg/mL) bei 4 °C über Nacht mit 1,9 μ M wt Nef, Nef G2A, Nef KKAA oder Nef R4A inkubiert. Hierzu wurde dem Puffer noch 1 mM DTT hinzugefügt, um die Bildung von Proteindimeren oder -oligomeren via Disulfidbrücken zu verhindern. Am nächsten Tag wurden die Vesikel mittels einer Ultrazentrifuge bei 4°C und 232000 x g für eine Stunde abzentrifugiert. Vom Überstand (\ddot{U}_1) wurde eine Probe entnommen und der Rest verworfen. Das Pellet wurde mit Puffer aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Vom Überstand (\ddot{U}_2) und vom Pellet (P) wurde eine Probe entnommen.

Von den Proben wurden jeweils 15 μL mit 5 μL Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erwärmt. Nach dem Abkühlen der Proben wurden sie per Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Hierzu wurde ein 17 %iges Trenngel verwendet, welches zur besseren Trennung mit einem Sammelgel (5 %ig) überschichtet war. Zur Proteintrennung wurde pro Gel mit einer Stromstärke von 15 mA gearbeitet. Die Proteine im SDS-Gel wurden mit Coomassie-Brilliantblau nachgewiesen. Hierzu wurden sie für 3 min in einer Färbelösung geschwenkt, danach wurden sie solange in eine Entfärbelösung gelegt, bis nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren. Zur Aufbewahrung wurden sie für 30 min in Trocknungslösung geschwenkt und anschließend zwischen Cellophanfolien für zwei Tage getrocknet.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Sammelgel (5 %ig): 1,4 mL H_2O , 0,25 mL 1 M TRIS/HCl (pH 6,8), 0,33 mL Acrylamid-Bisacrylamid (30 %), 20 μL 10 % (w/v) SDS, 20 μL 10 % (w/v) APS, 2 μL TEMED

Trenngel (17 %ig): 0,81 mL H_2O , 1,3 mL 1,5 M TRIS/HCl (pH 8,8), 2,89 mL Acrylamid-Bisacrylamid (30 %), 50 μL 10 % (w/v) SDS, 50 μL 10 % (w/v) APS, 2 μL TEMED

Laufpuffer: 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Probenpuffer (6x): 175 mM TRIS/HCl (pH 6,8), 5 % (w/v) SDS, 15 % (v/v) Glycerin, 0,006 g/L Bromphenolblau, 0,3 M DTT

Färbelösung: 0,5 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau R250, 45 % (v/v) Methanol, 18,5 % (v/v) Eisessig

Entfärbelösung: 5 % (v/v) Ethanol, 7,5 % (v/v) Eisessig

Trocknungslösung: 20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Glycerin

3.3.2 Fluoreszenzspektroskopie (*Release-Messungen*)

Bei der Fluoreszenzspektroskopie werden Übergänge von Elektronen zwischen angeregten elektronischen Zuständen und dem elektronischen Grundzustand der Moleküle beobachtet. Die Anregung eines Moleküls in den ersten angeregten elektronischen Zustand erfolgt durch Aufnahme eines Photons geeigneter Energie und erfolgt streng nach dem Franck-Condon-Prinzip. Dieses besagt, dass durch den Übergang eines Elektrons vom elektronischen Grundzustand (S_0) in den ersten angeregten elektronischen Zustand (S_1) sich der Abstand der Kerne innerhalb des Moleküls nicht ändert. Die Kerne können aufgrund ihrer viel höheren Masse im Vergleich zu den Elektronen nicht auf Elektronenübergänge und die damit veränderte Elektronendichte reagieren. Elektronenübergänge, die ohne eine Veränderung des Kerngerüsts ablaufen, werden als vertikal bezeichnet. Des Weiteren ergibt sich aus dem Franck-Condon-Prinzip, dass der wahrscheinlichste Übergang aus dem Gleichgewichtsabstand R_{eq} des Schwingungsgrundzustands des elektronischen Grundzustands in den angeregten Zustand erfolgt, bei welchem der Kernabstand dem Gleichgewichtsabstand möglichst ähnlich ist.

Befindet sich ein Elektron in einem angeregten Schwingungszustand des ersten angeregten elektronischen Zustands, so kann es durch strahlungslose Desaktivierung, zum Beispiel durch Stöße mit anderen Molekülen, in den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten elektronischen Zustands gelangen. Von dort aus kann das Molekül durch spontane Emission eines Photons in den Grundzustand zurückkehren. Dieses Phänomen wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Fluoreszenz erfolgt ebenfalls vertikal und ist im Einklang mit dem Franck-Condon-Prinzip. Die Energie, die bei der Emission eines Photons frei wird, muss nicht zwangsläufig der Energie des aufgenommenen Photons entsprechen. Die Energie der Fluoreszenz ist zu kleineren Werten hin verschoben, da das Molekül einen Teil seiner Anregungsenergie durch strahlungslose Desaktivierung verloren hat.⁴⁵ Dies wird als *Stokes-shift* bezeichnet. In Abbildung 3.2 ist der Mechanismus der Fluoreszenz schematisch dargestellt. Die Anregung ist in blau, die strahlungslose Desaktivierung in grün und die Fluoreszenz in rot dargestellt.

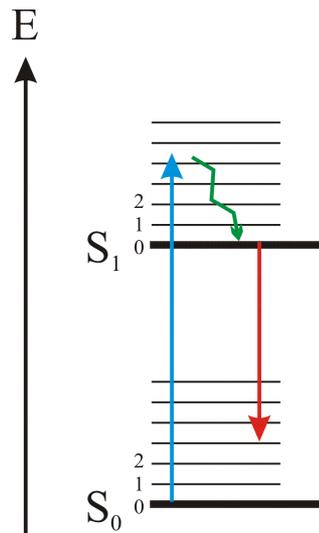


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Energiezustände von S_0 und S_1 mit Schwingungszuständen (0,1,2). Die Anregung ist in blau und die Fluoreszenz in rot veranschaulicht. Die strahlungslose Desaktivierung ist in grün dargestellt.

Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

In dieser Arbeit wurde mit einem Spektralfluorometer FP 6500 der Firma Jasco (Gotha, Deutschland) gearbeitet, dessen schematischer Aufbau in Abbildung 3.3 gezeigt ist.

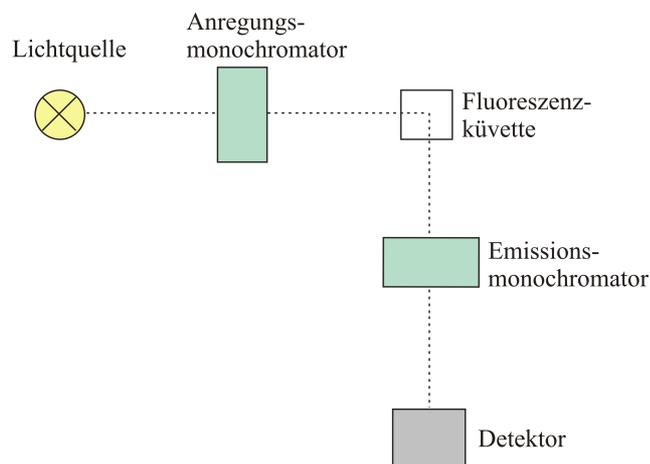


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau eines Spektralfluorometers.

Als Lichtquelle diente eine 150 W Xenonlampe, welche einen Wellenlängenbereich von $\lambda = 220\text{-}750$ nm abdeckt. Die Monochromatoren (hier Gittermonochromatoren) dienen

dazu, aus dem breiten Spektrum der Lampe einen schmalen Spektralbereich herauszufiltern. Als Detektor wird ein Photomultiplier verwendet.

Durchführung und Auswertung der Release-Messungen

Mit Hilfe der *Release*-Messungen können Porenbildung in Membranen oder Membrandestabilisierungen untersucht werden. Das Messprinzip beruht auf der Freisetzung von in den Vesikeln eingeschlossenem 5(6)-Carboxyfluorescein (CF). Dieses liegt in den Vesikeln in sich selbstlöschender Konzentration vor. Die Freisetzung von CF aus unilamellaren Vesikeln wurde über die zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals $F(t)$, nach Zugabe von HIV-1 Nef (Protein:Lipid-Verhältnis 1:65), verfolgt. Hierzu wurden in einer Fluoreszenzküvette (Starna® GmbH, Pfungstadt, Deutschland) 600 μL Vesikellösung (1,3 μM) vorgelegt und der Lösung 1 mM DTT hinzugefügt. Die Lösung wurde über den Zeitraum der Messung gerührt. CF wurde bei $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ (Bandbreite $\Delta\lambda_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$) angeregt und die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ (Bandbreite $\Delta\lambda_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$) beobachtet. Das maximale Fluoreszenzsignal F_{max} wurde nach der Zugabe von 2 μL TritonX-100 (10 % (w/w)) erreicht. TritonX-100 zerstört die Vesikel und führt somit zum vollständigen Austritt von 5(6)-Carboxyfluorescein. Die Strukturformeln von **A** 5(6)-Carboxyfluorescein und **B** TritonX-100 sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

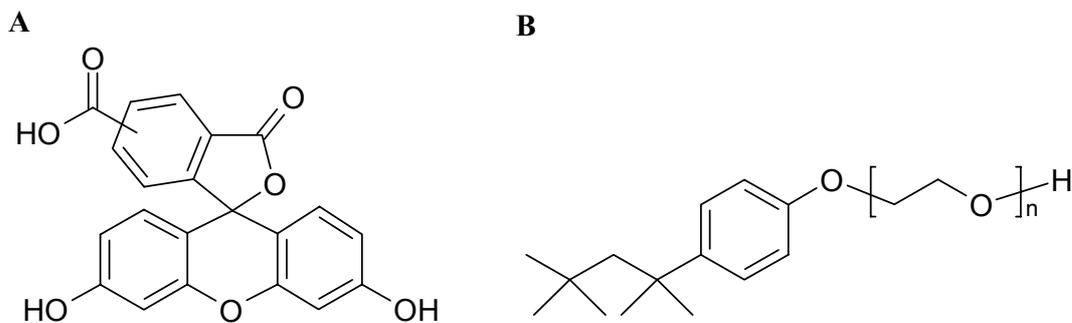


Abbildung 3.4: Strukturformeln von A: 5(6)-Carboxyfluorescein und B: TritonX-100.

Um die einzelnen Fluoreszenzsignalanstiege besser miteinander vergleichen zu können, wurde das Fluoreszenzsignal normiert ⁴⁶:

$$F_{\text{rel}}(t) = \frac{F(t) - F_0}{F_{\text{max}} - F_0} \quad (3.1)$$

mit $F_{\text{rel}}(t)$: relative Fluoreszenzintensität, F_0 : Fluoreszenz vor Proteinzugabe. Abbildung 3.5 zeigt einmal den Originaldatensatz einer *Release*-Messung sowie die dazugehörige Normierung. Der Zeitpunkt der Proteinzugabe wurde als $t = 0$ gesetzt.

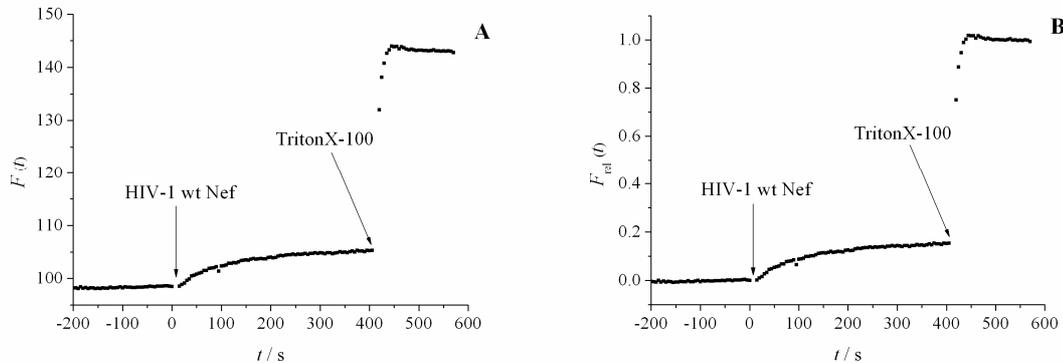


Abbildung 3.5: *Release*-Messung an POPC-Vesikeln mit 100 mM CF. Die Zugabe von HIV-1 wt Nef erfolgte bei $t=0$ (Protein:Lipid-Verhältnis: 1:65). F_{max} wurde durch Zugabe von 2 μL TritonX-100 erreicht. A: Originaldatensatz und B: normierter Datensatz.

3.3.3 Impedanzspektroskopie

Hauptsächlich findet die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) ihre Anwendung in der Materialforschung. Allerdings wird sie auch in der Biophysik zur Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von Lipidmembranen verwendet.⁴⁷

Bei der Impedanzspektroskopie wird mit einer sinusförmigen Wechselspannung kleiner Amplitude gearbeitet, deren Frequenz über einen großen Bereich variiert. Aufgezeichnet wird dabei die Impedanz (Wechselstromwiderstand) der Probe in Abhängigkeit von der Frequenz. Zur Auswertung der Impedanzspektren wird das Messsystem durch ein Ersatzschaltbild beschrieben. Dieses besteht aus einer Reihen- und Parallelschaltung von Impedanzelementen, die dasselbe frequenzabhängige Verhalten zeigen sollten wie das Proben-system.⁴⁸

Elektrochemische Beschreibung einer Lipiddoppelschicht

Die elektrischen Eigenschaften einer Membran lassen sich in erster Näherung durch eine Membrankapazität C_m und einem dazu parallel geschalteten Membranwiderstand R_m be-

schreiben. Die Membrankapazität kann dabei analog zu einem Plattenkondensator dargestellt werden:

$$C_m = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d} \quad (3.2)$$

mit A : Fläche der Membran, d : Dicke der Membran, ϵ_0 : elektrische Feldkonstante und ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante des hydrophoben Teils der Membran.

Zur vollständigen Beschreibung des Probensystems müssen zusätzlich der Ohmsche Widerstand der Elektrolytlösung R_e , die Grenzflächenkapazitäten sowohl der elektrochemischen Doppelschicht der verwendeten Platinelektrode als auch der Grenzfläche zwischen Membran und Elektrolyt C_{el} berücksichtigt werden. In Abbildung 3.5 **A** ist das resultierende Ersatzschaltbild (CRRC) dargestellt.

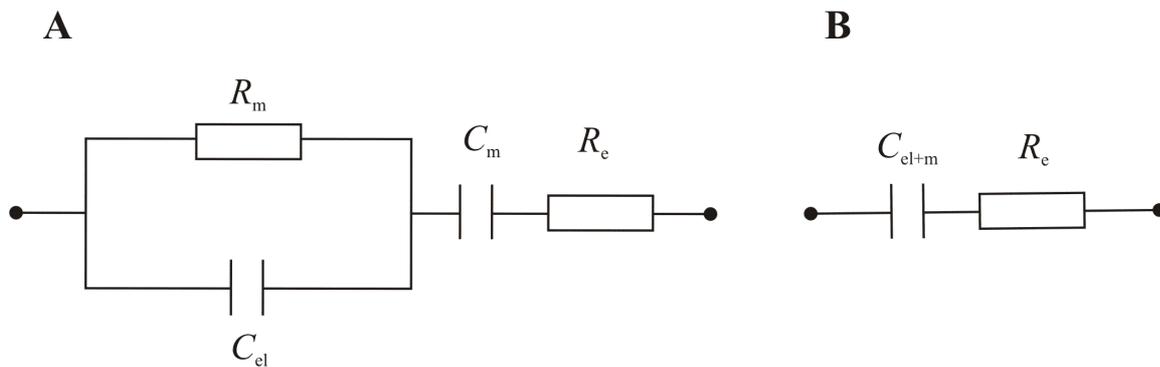


Abbildung 3.6: A Ersatzschaltbild für eine mit Puffer überschichtete Lipiddoppelschicht und B: für das vereinfachte System, geltend für hohe Membranwiderstände.

Für den Fall hoher spezifischer Membranwiderstände ($> 1 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$) im Messbereich (10^{-1} bis 10^6 Hz) lassen sich die Kapazitäten C_{el} und C_m nicht mehr unterscheiden und können zu C_{el+m} zusammengefasst werden (siehe Abbildung 3.6 **B**).

Darstellung und Auswertung von Impedanzspektren

Der Wechselstromwiderstand ist wie der Gleichstromwiderstand abhängig vom Strom I und der Spannung U . Dargestellt werden kann die Impedanz Z in Polarkoordinaten (Gleichung 3.3) oder in kartesischen Koordinaten (Gleichung 3.4):

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega, t)}{I(\omega, t)} = \frac{U_0 \exp(i\omega t)}{I_0(\omega) \exp(i(\omega t - \phi(\omega)))} = |Z|(\omega) \exp(i\phi(\omega)) \quad (3.3)$$

ω beschreibt hierbei die Kreisfrequenz und ϕ die Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung.

Es gilt:

$$Z(\omega) = Z^{\text{Re}}(\omega) + iZ^{\text{Im}}(\omega) \quad (3.4)$$

wobei Z^{Re} den Realteil (Wirkwiderstand) und Z^{Im} den Imaginärteil (Blindwiderstand) der Impedanz bezeichnen.

Zur Darstellung der Impedanzspektren wurde in dieser Arbeit ein sogenanntes Bode-Diagramm verwendet. Hierbei werden der Betrag der Impedanz $|Z|$ und die Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung in Abhängigkeit von der Frequenz aufgetragen. In Abbildung 3.7 ist zur Veranschaulichung ein simuliertes Bode-Diagramm für das in Abbildung 3.6 **B** dargestellte Ersatzschaltbild dargestellt.

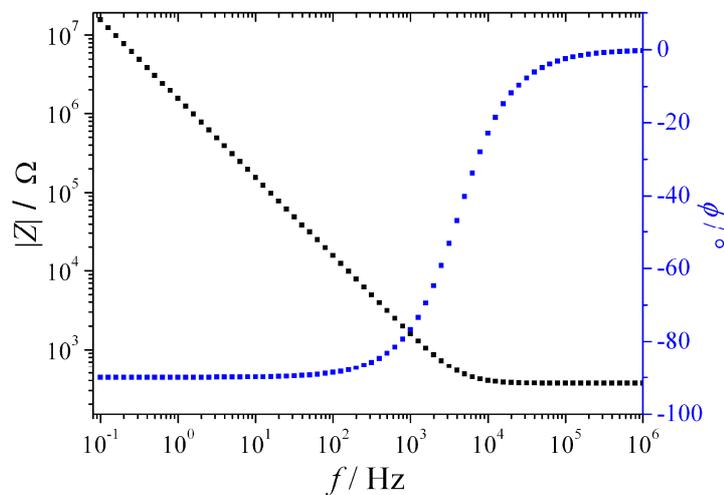


Abbildung 3.7: Simuliertes Bode-Diagramm für das in Abbildung 3.6 **B** dargestellte Ersatzschaltbild.

Um die aufgenommenen Impedanzspektren auswerten zu können, müssen entsprechende Ersatzschaltbilder mittels einer nicht-linearen Kurvenanpassung an die experimentellen Daten angepasst werden.

Messaufbau und Bedingungen

Für die impedanzspektroskopische Charakterisierung der auf der Goldelektrode präparierten OT/Lipid-Doppelschichten wurde ein Impedanzanalysator SI 1260 (Solartron Instruments, Farnborough, UK) verwendet. Als Arbeitselektrode diente die Goldelektrode des Schwingquarzes, Gegenelektrode war ein Platindraht, der in Puffer eingetaucht war. Es wurde mit einer Wechselspannung von $U = 30$ mV (*peak to peak*) gearbeitet und die Frequenz in einem Bereich von $f = 10^1$ - 10^6 Hz variiert. Aufgezeichnet wurden der frequenzabhängige Betrag der Impedanz und die Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung. Insgesamt wurden 61 Messpunkte aufgenommen und in doppelt-/halblogarithmischer Form gegen die Frequenz aufgetragen.

3.3.4 Quarzmikrowaagetechnik (QCM)

Die Quarzmikrowaagetechnik ist für die Biophysik von großer Bedeutung, da mit ihrer Hilfe kleinste Massenänderungen (zum Beispiel Adsorption von Proteinen an Membranen) detektiert werden können.⁴⁹⁻⁵¹ Den Mittelpunkt der QCM bildet ein Schwingquarz. Quarze sind Piezoelektrika und können somit durch Anlegen einer Wechselspannung zur resonanten Schwingung angeregt werden. Zum Einsatz kommen meist sogenannte AT-cut Quarze, da diese eine hohe Temperaturstabilität bezüglich ihrer Resonanzfrequenz aufweisen.⁵²

Der lineare Zusammenhang von Frequenzänderung Δf des Quarzes und Massenabscheidung Δm auf selbigem wurde erstmals 1959 von G. Sauerbrey beschrieben⁵³:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\mu_q \rho_q}} = -C_f \Delta m \quad (3.5)$$

f_0 steht hierbei für die Resonanzfrequenz des Quarzes, μ_q und ρ_q stehen für den Schermodul und die Dichte des Quarzes, A beschreibt die Elektrodenfläche und C_f steht für die Sauerbreykonstante.

Aus Gleichung 3.5 geht hervor, dass mit steigender Masse die Frequenz fällt. Diese Proportionalität von Δf und Δm gilt allerdings nur an Luft beziehungsweise in Vakuum und für dünne, starre Filme. Da die meisten biophysikalischen Systeme nur in Flüssigkeiten stabil sind, konnte diese Technik erst in der Biophysik verwendet werden, als der Zusammenhang der Resonanzfrequenzänderung des Quarzes und den Eigenschaften der Flüssigkeiten beschrieben wurde. In viskosen Flüssigkeiten kommt es zu einer Ausbrei-

tung der Schwerwelle in die Flüssigkeit hinein, diese wird dann in Abhängigkeit von Dichte und Viskosität der Flüssigkeit unterschiedlich stark gedämpft.

Dieser Zusammenhang wurde erstmal von Kanazawa und Gordon 1985 beschrieben⁵⁴:

$$\Delta f = -f_0^2 \sqrt{\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \mu_q \rho_q}} \quad (3.6)$$

wobei η_L und ρ_L für die Viskosität beziehungsweise für die Dichte der Flüssigkeit stehen. In dieser Arbeit wurde die QCM im aktiven Modus betrieben, hierbei ist der Quarz das frequenzbestimmende Bauteil und in eine Rückkopplungsschleife des Oszillatorschaltkreises eingebaut. Somit kann die auftretende Dämpfung phasenrichtig ausgeglichen werden.

Messaufbau und Durchführung

Der mit Silberleitlack kontaktierte 5 MHz Quarz wurde zwischen zwei Dichtringen in die Messkammer eingebaut. Dann wurde, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, eine festkörperunterstützte Membran präpariert und mittels Impedanzspektroskopie überprüft. Um sicherzustellen, dass keine Luftblasen im System waren, welche die Membran zerstören könnten, wurden die Schläuche und der Deckel der Messzelle gründlich mit Puffer gespült. Dann wurde die Kammer luftdicht verschlossen und an den Oszillatorschaltkreis (TTL SN74LS124N, Texas Instruments, Dallas, USA) angeschlossen. Dieser befand sich in einem auf 20 °C temperierten Faradaykäfig. Über eine Peristaltikpumpe wurde ein Flüssigkeitskreislauf angeschlossen und auf eine konstante Pumpgeschwindigkeit von 0,46 mL/min eingestellt. Über diesen Kreislauf konnte Proteinlösung zugegeben oder mit Puffer gespült werden. Abbildung 3.8 zeigt den schematischen Aufbau einer QCM mit angeschlossener Messkammer und Pumpkreislauf.

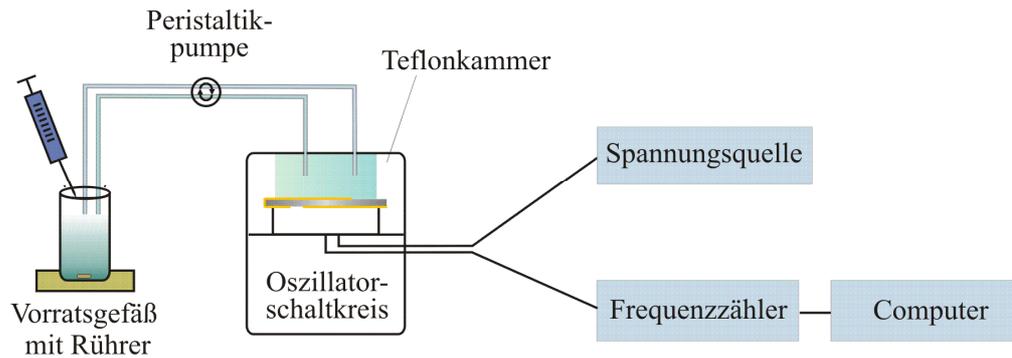


Abbildung 3.8: Schematischer Aufbau einer Quarzmikrowaage.

3.3.5 Ellipsometrie

Die Ellipsometrie ist eine optische, nicht-invasive Methode zur Charakterisierung dünner Filme.⁵⁵⁻⁵⁷ Erstmals wurde das Prinzip der Ellipsometrie von Paul Drude 1901 beschrieben.^{58, 59} Es wird die Änderung des Polarisationszustandes des Lichts, welche auftritt, wenn Licht von einer Probe reflektiert wird, gemessen. So lassen sich von dünnen Schichten die Dicken oder die Brechungsindices bestimmen. In der Biophysik kann die Ellipsometrie zur Bestimmung von Membraneigenschaften, zur Charakterisierung von Membran-Protein-Wechselwirkungen oder zur Untersuchung von Proteinadsorptionen an funktionalisierte Oberflächen eingesetzt werden.⁶⁰⁻⁶⁴

Polarisation von Licht

Licht lässt sich als eine sich im Raum ausbreitende elektromagnetische Welle beschreiben. Diese kann durch Kombination eines elektrischen Feldvektors E und eines magnetischen Feldvektors B dargestellt werden. Stehen E und B senkrecht aufeinander und senkrecht zur Ausbreitungsrichtung, so wird von Transversalwellen gesprochen. Das elektrische Feld kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$E = E_0 \sin(\omega t - kx + \delta) \quad (3.7)$$

E_0 entspricht hierbei der Amplitude, ω steht für die Kreisfrequenz, k für den Wellenvektor und δ für die Phasenverschiebung.

Bei natürlichem Licht sind die Schwingungsebenen der Feldvektoren statistisch verteilt. Bei polarisiertem Licht hingegen schwingen die Feldvektoren in definierten Ebenen. Für diesen Fall ergibt sich der elektrische Feldvektor aus der Überlagerung zweier polarisierter Teilstrahlen gleicher Wellenlänge, die senkrecht zueinander stehen. Sie können als elektrisches Feld senkrecht (E_S) und parallel (E_P) zur Einfallsebene des Lichtes dargestellt werden. Daraus ergibt sich für die Wellengleichungen:

$$E_S = E_{S,0} \sin(\omega t) \quad (3.8)$$

$$E_P = E_{P,0} \sin(\omega t + \delta) \quad (3.9)$$

Hierbei stellen $E_{S,0}$ und $E_{P,0}$ die jeweiligen Amplituden dar.

Insgesamt können drei Arten der Polarisation von Licht unterschieden werden. Diese sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

Lineare Polarisation

E_S und E_P überlagern sich so, dass der resultierende elektrische Feldvektor nur in einer Ebene mit der Phasenbeziehung $\delta = n\pi$ ($n = 0, 1, 2, \dots$) schwingt. Dies veranschaulicht Abbildung 3.9 **A**.

Zirkulare Polarisation

Zirkulare Polarisation von Licht ergibt sich wenn die Amplituden von E_S und E_P gleich groß, aber um $\delta = n\pi/2$ ($n = 1, 3, 5, \dots$) phasenverschoben sind. Der resultierende elektrische Feldvektor rotiert zirkular mit definierter Kreisfrequenz um den Wellenvektor (siehe Abbildung 3.9 **B**).

Elliptische Polarisation

Die elliptische Polarisation von Licht kann wiederum in zwei Fälle unterteilt werden: Zum einen kann elliptisch polarisiertes Licht entstehen, wenn $E_{S,0} \neq E_{P,0}$, aber eine Phasenverschiebung von $\delta = n\pi/2$ ($n = 1, 3, 5, \dots$) vorliegt (siehe Abbildung 3.9 **C**); zum anderen, wenn die Amplituden gleich groß sind, aber eine Phasenverschiebung von $\delta \neq n\pi/2$ vorliegt (Abbildung 3.9 **D**).

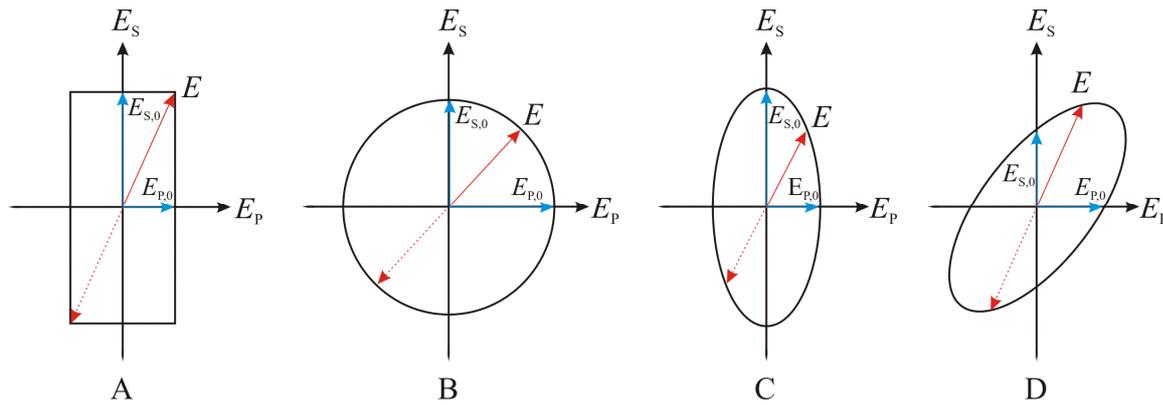


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung von **A:** linear polarisiertem Licht, **B:** zirkular polarisiertem Licht, **C:** elliptisch polarisiertem Licht mit $E_{S,0} \neq E_{P,0}$ und $\delta = n\pi/2$ ($n = 1, 3, 5, \dots$) und **D:** elliptisch polarisiertem Licht mit $E_{S,0} = E_{P,0}$ und $\delta \neq n\pi/2$.

Reflexion und Brechung an Oberflächen

Wie bereits erwähnt kann das elektrische Feld des Lichts in zwei Komponenten (E_S und E_P) zerlegt werden. E_S steht dabei senkrecht und E_P parallel zur Einfallsebene. Trifft ein polarisierter Lichtstrahl auf eine Grenzfläche, so wird er an dieser nicht nur reflektiert, sondern auch gebrochen. Dabei werden sowohl der reflektierte als auch der gebrochene Strahl teilpolarisiert. Das Amplitudenverhältnis der reflektierten und gebrochenen Teilwellen ist durch die Fresnelkoeffizienten r^P und r^S gegeben: ⁶⁵

$$r_{12}^P = \frac{n_2^* \cos \phi_1 - n_1^* \cos \phi_2}{n_2^* \cos \phi_1 + n_1^* \cos \phi_2} \quad (3.10)$$

$$r_{12}^S = \frac{n_1^* \cos \phi_1 - n_2^* \cos \phi_2}{n_1^* \cos \phi_1 + n_2^* \cos \phi_2} \quad (3.11)$$

wobei n^* für den komplexen Brechungsindex steht, ϕ_1 der Einfallswinkel und ϕ_2 der Winkel nach Brechung an der Grenzfläche ist.

In den meisten zu untersuchenden Systemen kommen jedoch mehrere Grenzflächen vor. Die Brechungen und Reflexionen an zwei Grenzflächen sind in Abbildung 3.10 veranschaulicht, wobei ϕ_3 für den Winkel nach Brechung am Substrat steht.

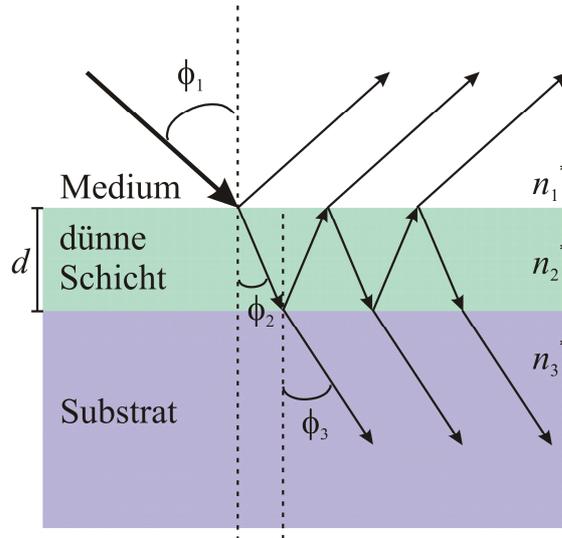


Abbildung 3.10: Reflexion und Brechung eines Lichtstrahls an zwei Grenzflächen.

Die Fresnelkoeffizienten hierfür lauten:

$$R^p = \frac{r_{12}^p + r_{23}^p \exp(-i2\beta)}{1 + r_{12}^p r_{23}^p \exp(-i2\beta)} \quad (3.12)$$

$$R^s = \frac{r_{12}^s + r_{23}^s \exp(-i2\beta)}{1 + r_{12}^s r_{23}^s \exp(-i2\beta)} \quad (3.13)$$

mit $r_{12}^{r/p}$: Fresnelkoeffizient der senkrechten/parallelen Teilwellen bei der Reflexion an der Grenzschicht 1/2, $r_{23}^{r/p}$: Fresnelkoeffizient der senkrechten/parallelen Teilwellen bei der Reflexion an der Grenzschicht 2/3 und β : der optischen Weglänge. Diese ist unter anderem von der Schichtdicke d abhängig.

$$\beta = 2\pi(d/\lambda)n_2^* \cos(\phi_2) \quad (3.14)$$

Ellipsometrische Grundgleichungen

In der Ellipsometrie werden die Winkel Delta (Δ) und Psi (Ψ) bestimmt. Delta repräsentiert hierbei die Phasendifferenz zwischen E_s und E_p der einfallenden Welle (δ_1) gegenüber der Phasendifferenz zwischen E_s und E_p der reflektierten Welle (δ_2).

$$\Delta = \delta_1 - \delta_2 \quad (3.15)$$

Delta ist die Änderung der Phasendifferenz, verursacht durch Reflexion, und kann Werte von 0-360 ° einnehmen.

Neben der Phasendifferenzänderung können sich auch die Amplituden der senkrechten und der parallelen Komponenten aufgrund von Reflexionen ändern. Diese Änderung wird durch den Winkel Psi beschrieben und kann Werte von 0-90 ° einnehmen.

$$\tan \Psi \exp(i\Delta) = \frac{R^P}{R^S} \quad (3.16)$$

Über die ellipsometrische Grundgleichung werden diese beiden Größen miteinander verknüpft: ^{55, 65}

$$\tan \Psi = \frac{|R^P|}{|R^S|} \quad (3.17)$$

Aufbau eines Ellipsometers

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Null-Ellipsometer EP³ der Firma Nanofilm (Göttingen, Deutschland) verwendet, dessen schematischer Aufbau in Abbildung 3.11 dargestellt ist.

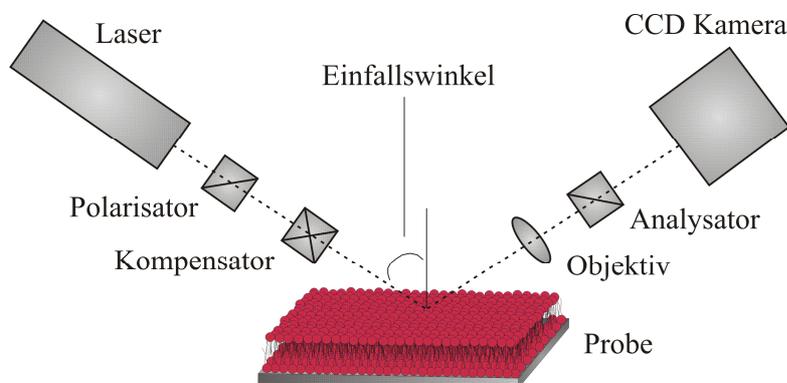


Abbildung 3.11: Schematischer Aufbau eines Ellipsometers.

Als Lichtquelle wurde ein Laser der Wellenlänge $\lambda = 636,7$ nm verwendet. Der Einfallswinkel betrug 60° . Trifft Licht auf den Polarisator, so wird es durch diesen linear polarisiert. Durch den Kompensator ($\lambda/4$ -Plättchen) wird dieses in elliptisch polarisiertes Licht umgewandelt und trifft auf die Probe. Der Polarisator und der Kompensator werden so eingestellt, dass von der Probe linear polarisiertes Licht reflektiert wird. Dies trifft nun auf den Analysator, dessen Winkel so eingestellt sind, dass die Intensität am Detektor (CCD Kamera) minimal ist. Durch diesen Vorgang werden die Winkel Δ und Ψ ermittelt. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Messungen wurden in der EP³-Flüssigkeitszelle durchgeführt.

Durchführung und Auswertung der Ellipsometriemessungen

Die festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten wurden wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben präpariert. Wurde nach der Vesikelzugabe ein Sichtdickenanstieg von 5-7 nm verzeichnet, der sich auch nach Spülen mit Puffer nicht änderte, konnte von der Ausbildung einer vollständigen Membran ausgegangen werden und die Proteinzugabe erfolgte. Die Konzentration lag stets bei $0,5 \mu\text{M}$. HIV-1 Nef wurde für ungefähr eine Stunde in den Pumpkreislauf eingespeist. Die Pumpgeschwindigkeit betrug $0,5 \text{ mL/min}$. Die Messungen mit HIV-1 Nef erfolgten stets in Gegenwart von 1 mM DTT . Wenn keine Änderung der Winkel mehr zu beobachten war, wurde für 30 min mit Puffer (20 mM TRIS/HCl , 100 mM NaCl , $\text{pH } 7,4$) gespült, um überschüssiges Protein zu entfernen. Die Schichtdicke der Membran wurde aus den Winkeln Delta und Psi über ein Modell berechnet, welches in Abbildung 3.12 veranschaulicht ist.

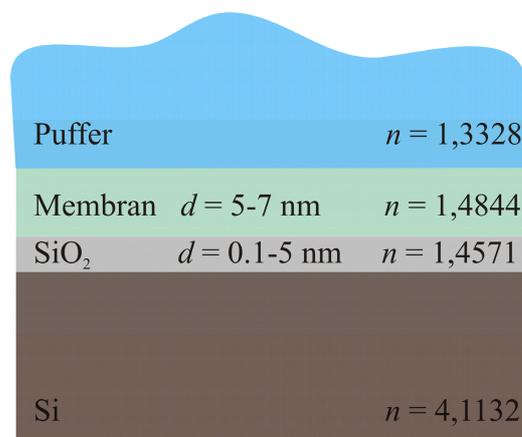


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Modells, welches zur Berechnung der Membranschichtdicke verwendet wurde, mit den zugehörigen Schichtdicken und Brechungsindices.

Das Modell besteht aus folgenden Schichten: Silizium dient als Substrat, gefolgt von einer dünnen Schicht Siliziumdioxid, auf der die Membran aufgebracht ist. Die Brechungsindizes für dotiertes Silizium, Siliziumdioxid und Wasser wurden von der Datenbank des Auswerteprogramms LayTec (Berlin, Germany) übernommen. Der Brechungsindex von Puffer wurde dem des Wassers gleichgesetzt. Als Brechungsindex für die Lipiddoppelschicht wurde der von Jin et al. 1996 publizierte verwendet.⁵⁷

3.3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Das unter Kapitel 3.3.2 beschriebene Phänomen der Fluoreszenz wird unter anderem in Fluoreszenzmikroskopen genutzt. Durch intrinsische Fluorophore oder gezielte Markierung von Biomolekülen mit Fluorophoren lassen sich hiermit biologische Prozesse visualisieren. Abbildung 3.13 zeigt den schematischen Aufbau eines Auflichtfluoreszenzmikroskops.

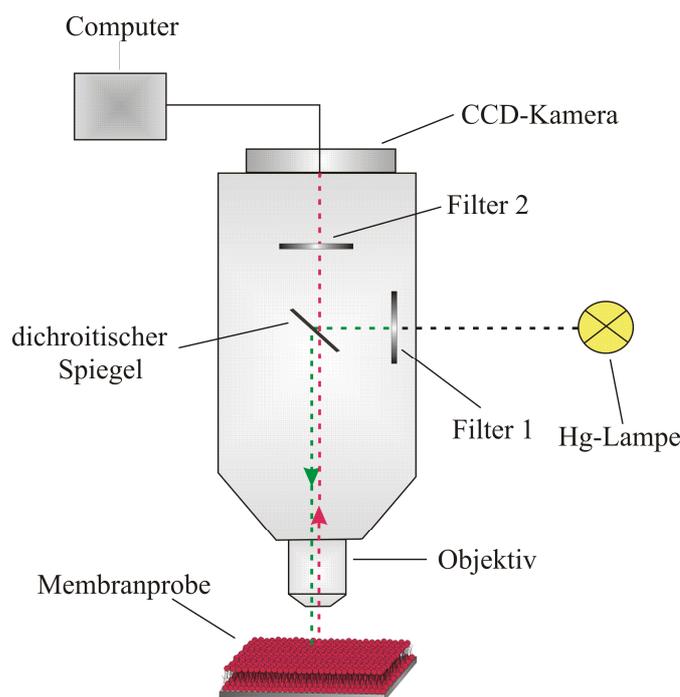


Abbildung 3.13: Schematischer Aufbau eines Auflichtfluoreszenzmikroskops.

Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampf-Lampe, welche einen Wellenlängenbereich von 270-700 nm abdeckt. Zur Anregung eines Fluorophors wird jedoch nur ein spezifischer, kleiner Wellenlängenbereich benötigt. Dieser wird über einen Bandpassfilter (Fil-

ter 1) eingestellt und über den dichroitischen Spiegel auf die Probe gelenkt. Das von der Probe emittierte Licht passiert den dichroitischen Spiegel ohne Ablenkung, zusätzlich passiert es noch einen zweiten Bandpassfilter (Filter 2), der störendes Streulicht absorbiert, bevor es auf die CCD-Kamera trifft.

Durchführung

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines Aufrichtfluoreszenzmikroskops (AxioTech Vario) der Firma Zeiss Lipiddoppelschichten visualisiert. Dazu wurden den Lipidmischungen das fluoreszenzmarkierte Lipid TexasRed DHPE, dessen Strukturformel in Abbildung 3.14 dargestellt ist, mit 0,1 mol% beigesetzt.

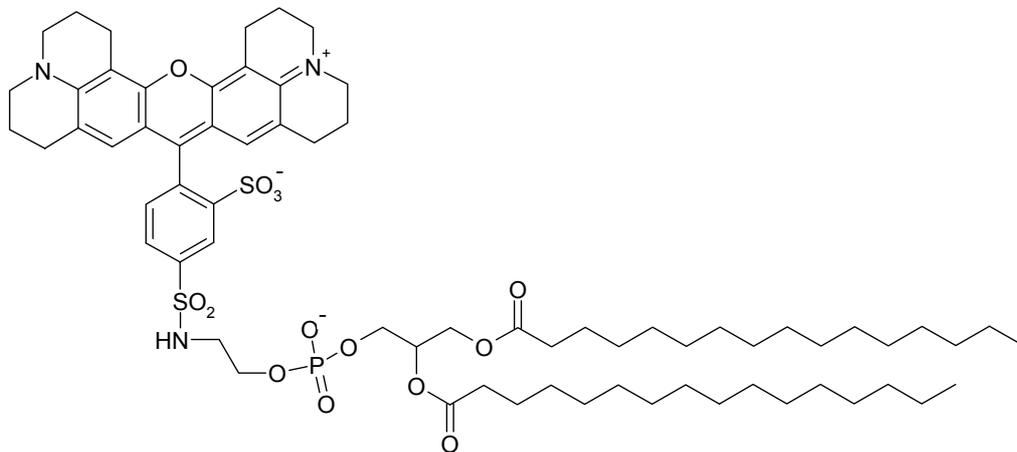


Abbildung 3.14: Strukturformel von TexasRed DHPE.

TexasRed DHPE ($M = 1381,9$ g/mol) ist ein Glycerophospholipid, dessen Kopfgruppe mit einer Sulforhodamingruppe verknüpft ist. Das Anregungsmaximum liegt bei $\lambda = 538$ nm und das Emissionsmaximum bei $\lambda = 601$ nm.

Die festkörperunterstützten Membranen wurden wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben präpariert. Nachdem sie mit Puffer (20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4) gespült waren, wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ihre Qualität überprüft. Zeigten die Membranen eine homogene Fluoreszenz, so wurde Protein zugegeben. Die Inkubation der Membranen fand unter zwei verschiedenen Bedingungen statt: Zum einen wurde die Lipiddoppelschicht über Nacht bei 4 °C mit HIV-1 Nef (1,0 μ M) in Gegenwart von 1 mM DTT inkubiert und anschließend mit Puffer (20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4) gespült, zum anderen wurden Messungen in einer Durchflusszelle durchgeführt. Hierbei wurden die Membranen für 2 h mit HIV-1 Nef (0,1 μ M-1,0 μ M) bei einer kon-

stanten Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min bei Raumtemperatur in Gegenwart von 1 mM DTT inkubiert. Anschließend wurde mit Puffer (20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4 gespült), um überschüssiges Protein zu entfernen. Danach wurden sie mittels Fluoreszenzmikroskopie und AFM charakterisiert. Die nach der Inkubation mit HIV-1 Nef erhaltenen Fluoreszenzbilder wurden zur Quantifizierung einer Pixelanalyse unterzogen. Verwendet wurde dazu das Programm ImageJ (National Institutes of Health, USA).

Um die Position von HIV-1 Nef auf den festkörperunterstützten Membranen fluoreszenzmikroskopisch zu lokalisieren, wurde ein FITC-konjugierter Anti-His₆-tag-Antikörper (siehe Kapitel 3.1.2) verwendet. Die Strukturformel von FITC ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

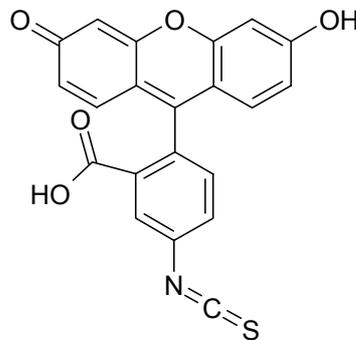


Abbildung 3.15: Strukturformel von FITC.

Fluoresceinisothiocyanat wird an Proteine meist über primäre Aminfunktionen (Lysine, N-Terminus des Proteins) gekoppelt. Es wird bei $\lambda = 495$ nm angeregt und hat sein Emissionsmaximum bei $\lambda = 519$ nm. Der Antikörper (Verdünnung 1:250) wurde für zwei Stunden auf der Membran bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde mit Puffer (20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4 gespült) und die Proben erneut mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Zur Beobachtung der TexasRed DHPE-Fluoreszenz wurde der Filtersatz 45 (BP 560/40, FT 485, BP 630/75, Zeiss) und zur Visualisierung der FITC-Fluoreszenz wurde der Filtersatz 44 (BP 475/40, FT 500, BP 530/50, Zeiss) verwendet. Als Objektiv wurde ein 40x Wasserimmersionsobjektiv (Achromplan 40x/0,8 W) verwendet.

3.3.7 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Bei der Auflösung atomarer Strukturen stoßen herkömmliche Mikroskope schnell an ihre Grenzen, da nach dem Gesetz von Abbé das Auflösungsvermögen durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichts auf $\lambda/2$ limitiert ist. So liegt zum Beispiel bei einer Wellenlänge von $\lambda = 400$ nm die maximale Auflösung bei 200 nm. Der erste Meilenstein in der Abbildung einzelner Atome wurde 1981 von Binnig und Rohrer mit der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops gemacht.⁶⁶ 1986 erhielten sie dafür den Nobelpreis für Physik. Allerdings eignete sich diese Methode nicht zur Untersuchung von biologischen Proben, da sich die Anwendung auf leitende Proben beschränkt. 1986 entwickelten Gerd Binnig und Calvin Quate das Rasterkraftmikroskop (engl. *atomic force microscope* AFM).⁶⁷ Mit dem AFM ist die Abbildung von leitenden und nichtleitenden Proben mit atomarer Auflösung sowohl an Luft als auch in Flüssigkeiten möglich.⁶⁸ Seit der Entwicklung des AFMs hat sich die Methode zu einer der wichtigsten in den Biowissenschaften entwickelt. 1993 wurde erstmals der sogenannte *intermittent contact mode* auch als Anwendung für Messungen in Flüssigkeiten kurz aufeinanderfolgend von Hansma et al. und Putman et al. beschrieben.^{69, 70} Dies stellte einen weiteren Durchbruch für die Abbildung von biologischen Proben dar, da somit die Probe schonender als im *contact mode* abgerastert werden konnte. Im Jahr darauf gab es die ersten Veröffentlichungen, in denen die Kraftkurven zur Bestimmung von Kräften zwischen wechselwirkenden Biomolekülen genutzt wurden. Lee et al. quantifizierten die Kraft, welche nötig ist, um DNA-Doppelhelices aufzubrechen.⁷¹ Ende der 1990er Jahre wurden mittels Kraftspektroskopie erstmals Proteine entfaltet.⁷² Bis heute hat sich die Technik mannigfaltig weiterentwickelt und findet in vielen Bereichen der Biowissenschaften Anwendung. So ist es möglich die Abbildung der Oberfläche mit der Kraftspektroskopie zu kombinieren, auch lebende Zellen und deren Wechselwirkungen untereinander können mittels AFM visualisiert werden.⁷³ Durch die Entwicklung von sogenannten *high-speed* AFMs ist sogar die Visualisierung von biomolekularen Prozessen möglich.⁷⁴

Aufbau

Das Rasterkraftmikroskop gehört zur Familie der Rastersondenmikroskope. Das heißt, die Oberfläche der Probe wird mit einer Sonde abgerastert. Der schematische Aufbau eines AFMs ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

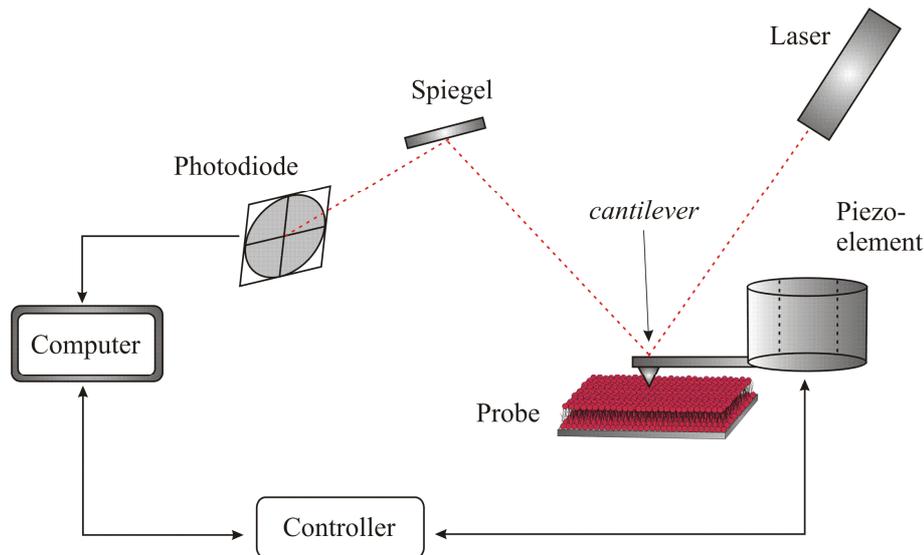


Abbildung 3.16: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.

Herzstück des AFMs ist ein Federbalken (engl. *cantilever*), an dessen Ende sich eine feine Spitze befindet. Diese Spitze rastert die Oberfläche ab. Hierbei wirken auf den *cantilever* mikroskopische Kräfte, welche beim Abtastvorgang zur Auslenkung desselbigen führen können. Die Verbiegung des Federbalkens wird durch die Ablenkung eines auf die Spitze gerichteten Laserstrahls mittels einer 4-Quadranten-Photodiode detektiert (Lichtzeigerprinzip). Diese Information wird zusammen mit den Rasterdaten zur Abbildung genutzt.

Kräfte in der Rasterkraftmikroskopie

Während der Messung findet die Spitze-Probe-Wechselwirkung auf atomarer Ebene statt. Zum einen wirken auf die Spitze abstoßende (zum Beispiel Pauli-Repulsion), zum anderen anziehende (zum Beispiel van der Waals-Wechselwirkungen) Kräfte. Das Wechselwirkungspotential zweier miteinander wechselwirkender Atome oder Moleküle lässt sich durch das Lennard-Jones-Potential beschreiben:

$$V(r) = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \quad (3.18)$$

A und B sind materialspezifische Konstanten, r repräsentiert den Spitze-Probe-Abstand. Abbildung 3.17 zeigt den Verlauf des Lennard-Jones-Potentials und in welchem Kräftebereich die einzelnen Betriebsmodi wirken.

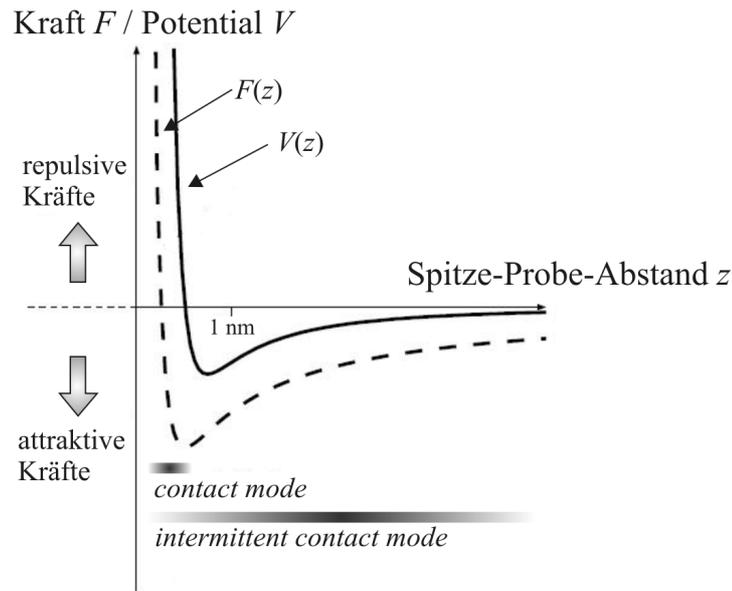


Abbildung 3.17: Lennard-Jones-Potential und die daraus abgeleitete Kraft als Funktion des Spitze-Probe-Abstands. Außerdem sind die Arbeitsbereiche des *contact* und *intermittent contact modes* eingezeichnet.

Neben den van der Waals-Kräften und der Pauli-Repulsion wirken auch noch Kapillar- und elektrostatische Kräfte auf die Spitze. Kapillarkräfte sind allerdings nur bei Messungen an Luft vorhanden und die Reichweite elektrostatischer Wechselwirkungen ist an Luft am größten.

Messmodi

Contact mode

Im *contact mode* steht die Messspitze im ständigen repulsiven Kontakt mit der Probe. Sie wird entweder mit konstanter Kraft (*constant force mode*) oder konstanter z -Piezoposition (*constant height mode*) über die Probe gerastert.

Im *constant force mode* wird die Verbiegung des *cantilevers* und damit die Kraft, welche zwischen Spitze und Probe wirkt, konstant gehalten. Höhenunterschiede auf der Probe werden durch die Bewegung des z -Piezos kompensiert. Allerdings kann die Auslenkung des *cantilevers* durch die Trägheit der Regelkreise nicht immer konstant gehalten werden. Dieses Fehlersignal wird im *vertical deflection*-Bild dargestellt.

Beim *constant height mode* wird die Auslenkung des Federbalkens nicht durch die z -Piezobewegung ausgeglichen.

Der Vorteil im *contact mode* ist das hohe Auflösungsvermögen. Zudem ist er vergleichsweise leicht zu realisieren und die Probe kann mit hoher Rastergeschwindigkeit abgetastet werden, da der Regelkreis unempfindlich ist. Nachteilig ist allerdings, dass beim Abtasten große Lateralkräfte wirken (1-2 nN) und so Objekte zur Seite geschoben werden können. Weiche Oberflächen können durch zu hohe Kräfte eingedrückt oder zerstört werden. Auch lassen sich adhäsive Proben nur schwer abbilden.

Lateral force microscopy (LFM)

Die *lateral force microscopy* ist eine Form des *contact modes*, bei der die Abtastrichtung senkrecht zur Längsachse des *cantilevers* ist. Dabei wird ausgenutzt, dass der *cantilever* eine Torsion erfährt, wenn laterale Kräfte wirken. So können Materialunterschiede auf der Probe sensitiv im LFM-Bild detektiert werden. Wie unterschieden werden kann, ob die Torsion des *cantilevers* wirklich durch Materialunterschiede hervorgerufen wird oder topographisch bedingt ist, veranschaulicht Abbildung 3.18.

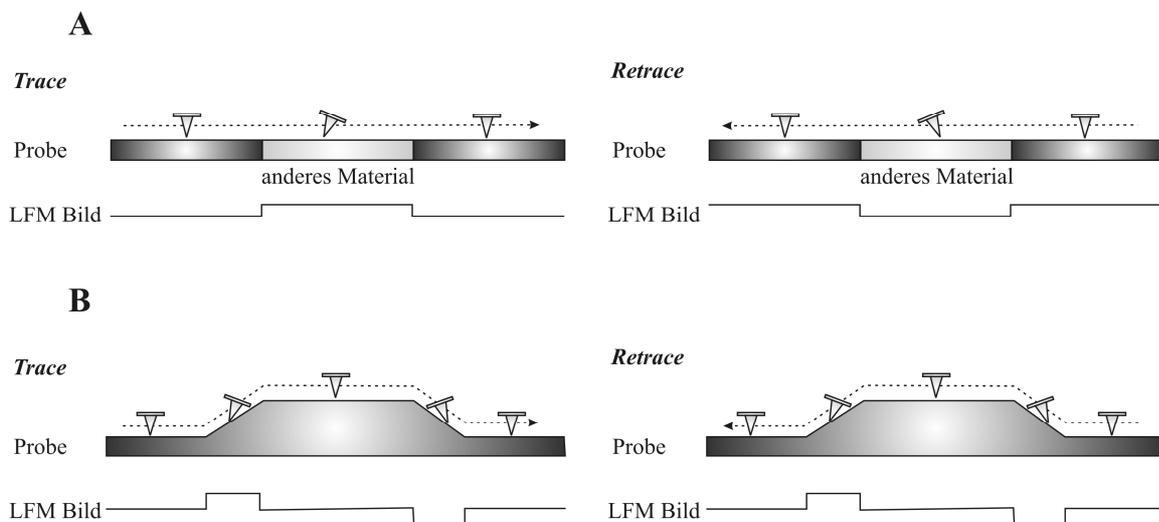


Abbildung 3.18 A: *cantilever* Torsion aufgrund von Materialunterschieden resultiert in einer Kontrastinversion des LFM-Bilds bei *Trace* und *Retrace*, während **B:** eine topographisch bedingte laterale Verbiegung des *cantilevers* richtungsunabhängig ist.

Im Falle eines Materialunterschieds (Abbildung 3.18 A) wird im LFM-Bild zwischen *Trace* und *Retrace* eine Kontrastinversion beobachtet, das heißt, die Torsion des *cantilevers* ist richtungsabhängig. Ist die laterale Verbiegung des *cantilevers* beispielsweise durch Erhebungen auf der Probe bedingt (Abbildung 3.18 B), so ist sie richtungsunabhängig und es wird keine Kontrastumkehr im LFM-Bild beobachtet.

Intermittent contact mode

Im Gegensatz zum *contact mode* ist der *cantilever* im *intermittent contact mode* nicht im ständigen repulsiven Kontakt mit der Probe, vielmehr berührt er die Oberfläche der Probe periodisch schwingend. Dazu wird er über ein zusätzliches Piezoelement sinusförmig bei seiner Resonanzfrequenz angeregt. Um diese zu finden, wird vor der Messung ein sogenannter *frequency-sweep* durchgeführt. Hierbei werden alle Frequenzen durchlaufen und sowohl die Amplitude als auch die Phasenverschiebung zwischen angeregter und tatsächlicher *cantilever*-Schwingung ausgegeben. Die Resonanzfrequenz liegt idealerweise bei maximaler Amplitude und einem Phasendurchgang von $\pi/2$.

Im *intermittent contact mode* wird im Gegensatz zum *contact mode* nicht mit einer konstanten Verbiegung gearbeitet, sondern mit konstanter Amplitude. Wenn der *cantilever* noch weit von der Probe entfernt ist, kann er ungestört bei seiner Resonanzfrequenz schwingen, da keine Oberflächenkräfte auf ihn wirken. Wird er der Probe angenähert, kommt er in das Wechselwirkungspotential der Probe und kann nicht mehr frei schwingen. Dies resultiert in einer Verschiebung der Resonanzfrequenz zu kleineren Werten. Um das auszugleichen, wird als Anregungsfrequenz zum Abbilden der Probe eine Frequenz gewählt, die etwa 5-8 % kleiner ist als die des frei schwingenden *cantilevers*. Bei der Abbildung wird die Probe mit konstanter Schwingungsamplitude abgerastert. Analog zum *contact mode* lässt sich auch hier ein Fehlersignal aufzeichnen, das Amplitudenbild. Materialunterschiede lassen sich im Phasenbild detektieren.

Biologische Proben können in der Regel im *intermittent contact mode* besser beziehungsweise zerstörungsfreier abgebildet werden, da die Messspitze nicht im ständigen Kontakt mit der Probe ist.

Abbildungsfehler

Die Güte der Abbildung der Oberfläche einer Probe wird unter anderem von der Spitzengeometrie des *cantilevers* bestimmt, da die abzubildenden Strukturen meist in der gleichen Größenordnung liegen wie die Messspitze. Abbildung 3.19 zeigt die gängigsten Fehlerquellen, die aus der Spitzengeometrie resultieren. Ist die Spitze kontaminiert (Abbildung 3.19 **A**), zum Beispiel durch Proteine, so beeinflusst dies die Spitzengeometrie und die Topographie wird nicht korrekt wiedergegeben. Ein weiteres Abbildungsproblem entsteht durch sogenannte Doppelspitzen (Abbildung 3.19 **B**) am *cantilever*, hierdurch wird die Struktur doppelt in der Abbildung dargestellt. Auch die Breite der Messspitze hat einen Einfluss auf die Darstellung von Konturen (Abbildung 3.19 **C/D**). Die Abbil-

dung setzt sich aus Spitzenform und eigentlicher Form des Objekts dar. Eine schmale Messspitze gibt die Topographie besser wieder als eine breite.

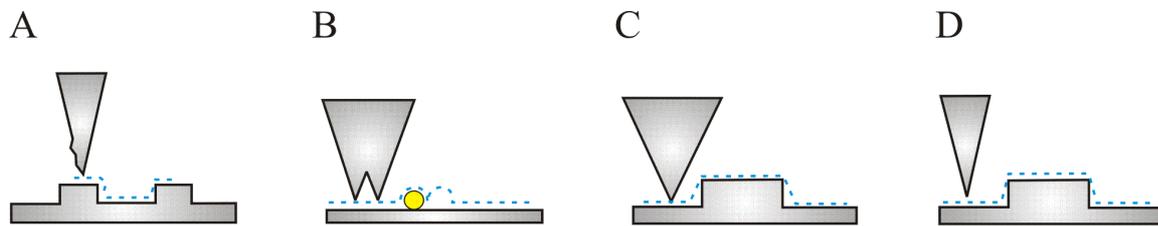


Abbildung 3.19: Mögliche Abbildungsfehler durch A: eine kontaminierte Spitze, B: Doppelspitze. C/D: verdeutlichen den Einfluss der Spitzenbreite. Mit einer schmalen Spitze (D) wird die Topographie besser wiedergegeben.

Neben den Abbildungsfehlern, die durch die Spitzengeometrie entstehen, gibt es auch diverse Artefakte, die durch den Piezoscanner entstehen.⁷⁵ Ein Problem ist die intrinsische Nichtlinearität der Piezos, das heißt, die angelegte Spannung ist nicht linear zur Ausdehnung des Scanners. Die führt zu einer fehlerhaften Positionsbestimmung der Spitze gegenüber der Probe. Zudem unterliegt die Ausdehnung der Piezos einer Hysterese, was ebenfalls zur einer fehlerhaften Positionsbestimmung führt. Der Effekt der Nichtlinearität und der Hysterese können durch Linearisierungen der Piezoscanner ausgeglichen werden. So kann zum Beispiel mit einem Gitter mit definiertem Linienabstand die tatsächliche Position des Scanners bestimmt werden. Eine weitere Fehlerquelle ist das sogenannte Kriechen. Bei einer sprunghaften Spannungsänderung reagiert der Piezo verzögert. Der sogenannte Bow-Effekt tritt vor allem bei Röhrenscannern auf, die Scannerbewegung ist nicht linear, sondern beschreibt eine Kugelkappe (engl. *bow*). Dies kommt vor allem bei großen Scanfenstern zum Tragen, kann aber durch eine nachträgliche Bildbearbeitung ausgeglichen werden.

Durchführung

In dieser Arbeit wurden die AFM-Aufnahmen mit einem Nanowizard I/II der Firma JPK (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden wie in Kapitel 3.2.4 und 3.3.6 beschrieben präpariert. Für Messungen im *contact mode* wurde mit CSC 38 Siliziumcantilevern (Mikromash, Tallinn, Estland) gearbeitet. Sie haben eine nominale Federkonstante von 0,03 N/m und eine Resonanzfrequenz bei 10 kHz. Im *intermittent contact mode* wurden CSC 37 cantilever (Mikromash, Tallinn, Estland) mit einer Resonanzfre-

quenz bei 21 kHz und einer nominalen Federkonstante von 0,3 N/m verwendet. Die Scangeschwindigkeit lag zwischen 0,5-1 Hz. Die Bildauflösung betrug 512 x 512 Pixel.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Bindung von HIV-1 Nef an unilamellare Vesikel mittels Vesikelcosedimentationsassays

In der Literatur wird postuliert, dass HIV-1 Nef mit der Plasmamembran assoziiert sein muss, um seine Funktionen in der Zelle ausüben zu können. Dies wird unter anderem durch den N-terminalen Lipidanker in Form einer Myristoyle Säure gewährleistet.^{24, 76} Um die Bindung von Nef an Membranen zu charakterisieren, wurde ein Vesikelcosedimentationsassay gewählt. Hierbei handelt es sich um eine etablierte Methode, um die Bindung von Proteinen an Lipidvesikel zu untersuchen.⁴⁹ Hat ein Protein nach einer bestimmten Inkubationszeit stabil an die Lipidmembran gebunden, so wird es in der Aufarbeitung des Assays durch Zentrifugation mit den Vesikeln sedimentiert und kann im Pellet nachgewiesen werden. Findet keine Bindung statt, oder ist diese nicht stabil, so wird das Protein nach der Aufarbeitung des Assays in den Überständen detektierbar sein.

Mit Hilfe des Vesikelcosedimentationsassays wurden mehrere Faktoren untersucht. Zunächst sollte der Einfluss des Membranankers auf die Bindung von HIV-1 Nef an die Membran untersucht werden. Hierzu wurden Messungen mit HIV-1 wt Nef und der nichtmyristoylierten Mutante Nef G2A durchgeführt und miteinander verglichen. Die Rolle des positiven Ladungscusters im N-Terminus des Proteins wurde mit Hilfe der Mutanten Nef KKAA und Nef R4A untersucht. Bei diesen Mutanten wurde die positive Ladungsdichte durch Mutation verringert. Beim Wildtyp sind unter den ersten 26 Aminosäuren des N-Terminus insgesamt 7 basische Aminosäuren in Form von 3 Lysinen und 4 Argininen zu finden (siehe Kapitel 3.2.1). Bei der Mutante Nef KKAA wurden zwei Lysine (Position 4, 7) gegen Alanin ausgetauscht. Damit wurde die Anzahl positiver Ladungen von 7 auf 5 reduziert. Beim Nef R4A wurden alle 4 Arginine (Position 17, 19, 21, 22) auf der ersten α -Helix durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt. Mit diesen Mutanten wurden die gleichen Experimente durchgeführt und die Ergebnisse mit denen des Wildtyps verglichen.

Weiterhin wurde auch der Einfluss der Lipidzusammensetzung der Vesikel auf die Proteinanbindung untersucht. Hierzu wurde der Vesikelcosedimentationsassay mit verschiedenen Lipidmischungen durchgeführt.

4.1.1 Untersuchung der Bindung von HIV-1 Nef an POPC-Vesikel

Zunächst wurden Messungen mit unilamellaren Vesikeln (LUVs) bestehend aus POPC durchgeführt. Nach der Inkubation der Vesikel mit 1,9 μM wt Nef oder Nef G2A über Nacht wurden diese zentrifugiert und die Überstände (\ddot{U}_1 , \ddot{U}_2) und das Pellet (P) per SDS-PAGE analysiert. Der erste Überstand wurde hierbei nach der Zentrifugation der Vesikel erhalten, \ddot{U}_2 ergab sich nach dem Waschen des Pellets mit Puffer und erneuter Zentrifugation. Abbildung 4.1 zeigt ein solches SDS-Gel.

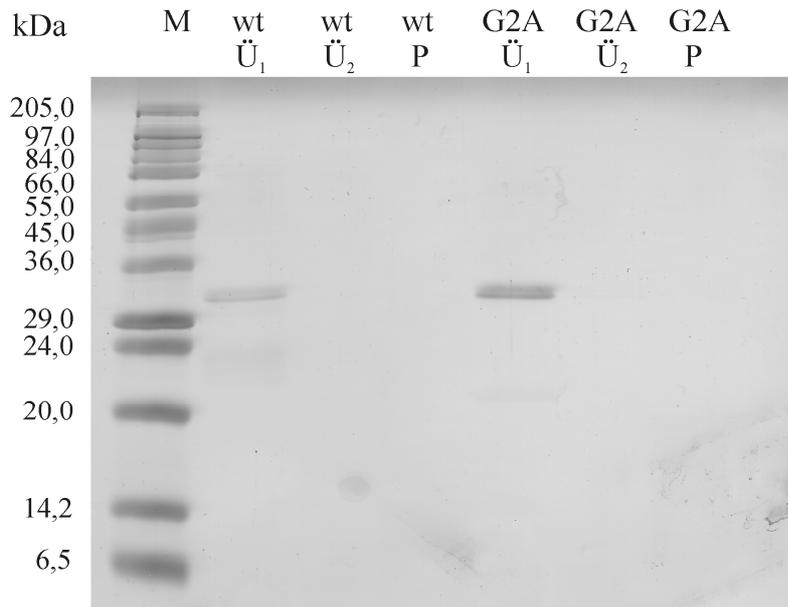


Abbildung 4.1: Analyse des Vesikelcosedimentationsassays von POPC-Vesikeln mit wt Nef und Nef G2A per SDS-PAGE. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt.

In Bahn M des Gels ist ein Proteinmarker (Sigma Marker, Sigma-Aldrich, Saint-Luis, USA) aufgetragen. In den Taschen 2-4 wurden die Proben der Überstände (\ddot{U}_1 , \ddot{U}_2) und des Pellets (P) von wt Nef aufgetragen. Die Taschen 5-7 wurden mit den Proben von Nef G2A beladen. In dem Gel sind die Proteinbanden von HIV-1 wt Nef und Nef G2A deutlich in den Bahnen 2 und 5 sichtbar, das heißt, sowohl HIV-1 wt Nef als auch Nef G2A sind nur im Überstand \ddot{U}_1 zu finden. Weder im Überstand nach dem Waschen der Vesikel (\ddot{U}_2), noch im Pellet lässt sich eine Proteinbande detektieren. Daraus kann gefolgert werden, dass HIV-1 nicht oder nicht stabil an unilamellare Vesikel bestehend aus POPC bindet. Die molare Masse des Proteins wurde bei der Analyse per SDS-PAGE leicht überbe-

stimmt. Nef hat eine molare Masse von 26 kDa, wird aber in allen SDS-Gelen bei einer Masse von ungefähr 30 kDa detektiert.

4.1.2 Untersuchung der Bindung von HIV-1 Nef an Vesikel bestehend aus POPC:SM:Chol (2:1:1)

In der Literatur wird unter anderem diskutiert, dass eine Subpopulation von Nef in sogenannten *detergent-resistant membrane* Mikrodomänen, welche auch als *lipid rafts* bezeichnet werden, lokalisiert ist.⁷⁷⁻⁸⁰ Diese Mikrodomänen befinden sich auf der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran und sind mit Sphingomyelin und Cholesterin angereichert. Sie befinden sich im Gegensatz zu den umgebenden Lipiden in der flüssig geordneten Phase. Um diese *lipid rafts* nachzuahmen, wurde als Lipidzusammensetzung der Vesikel folgende gewählt: POPC:SM:Chol (2:1:1). Der Vesikelcosedimentationsassay wurde sowohl mit HIV-1 wt Nef als auch mit HIV-1 Nef G2A durchgeführt. Erneut wurde der Einfluss der Myristoyle Säure auf die Bindefähigkeit, durch Vergleich der Ergebnisse von wt Nef mit denen der N-terminal unmyristoylierten Mutante Nef G2A, charakterisiert.

Nachdem die Vesikel über Nacht mit entweder 1,9 μM wt Nef oder 1,9 μM Nef G2A inkubiert wurden, wurden sie durch Zentrifugation aufgearbeitet und per SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.2 gezeigt.

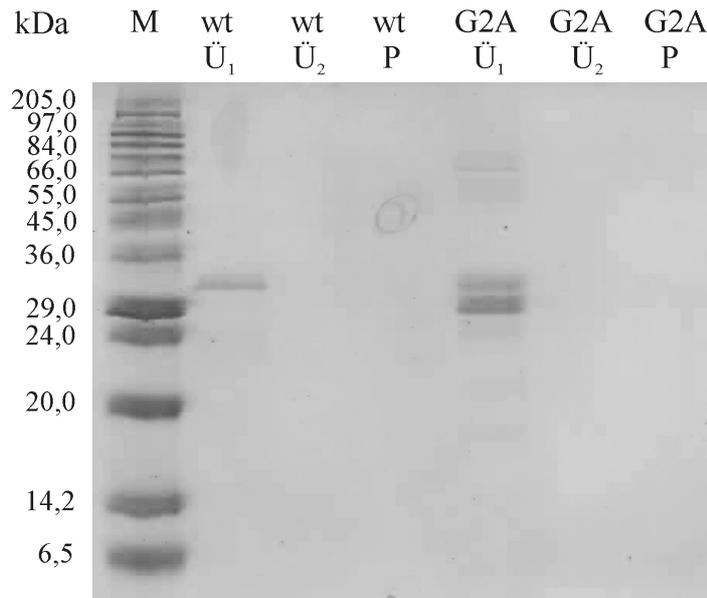


Abbildung 4.2: Analyse des Vesikelcosedimentationsassays von Vesikeln bestehend aus POPC:SM:Chol (2:1:1) mit wt Nef und Nef G2A per SDS-PAGE. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt.

Auch hier wurde die erste Bahn des Gels mit dem Proteinmarker beladen. Die Bahnen 2-4 wurden mit den Proben aus den Überständen und dem Pellet von wt Nef beladen. In den Bahnen 5-7 wurden die Überstände und das Pellet von Nef G2A aufgetragen. Die Proteinbanden von wt Nef und Nef G2A lassen sich im jeweils ersten Überstand nachweisen. Es konnte keine oder keine stabile Bindung von Nef an Vesikel bestehend aus POPC:SM:Chol im molaren Verhältnis von (2:1:1) beobachtet werden, da sich keine Proteinbande im Pellet nachweisen ließ. Die molare Masse von wt Nef und Nef G2A wurde auch hier wieder leicht überbestimmt, sie wurde bei circa 30 kDa detektiert. Im ersten Überstand von Nef G2A ist neben der Hauptproteinbande noch eine weitere Bande im höhermolekularen Bereich bei einer Masse von 55-66 kDa sichtbar. Sie lässt sich Nef-Dimeren zuordnen, die durch Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken entstanden sind.

4.1.3 Untersuchung der Anbindung von HIV-1 Nef an Vesikel bestehend aus POPC:POPS (4:1)

Nachdem eine Bindung des Proteins weder an POPC-Vesikel noch an Vesikel bestehend aus POPC:SM:Chol (2:1:1) beobachtet werden konnte und das HIV-1 Nef Protein in Wirtszellen an cytoplasmatischen Hälfte der Plasmamembran lokalisiert ist, wurde versucht diese Membranhälfte in artifiziellen Systemen, wie es Lipidvesikel darstellen, nachzuahmen. Es ist bekannt, dass auf der cytoplasmatischen Membranhälfte sehr viele negativ geladene Lipide, hauptsächlich in Form von Phosphatidylserinen (PS), lokalisiert sind. Daher wurde ein Vesikelcosedimentationsassay mit Vesikeln bestehend aus POPC:POPS (4:1) durchgeführt. Mit diesem Assay konnte auch der Einfluss von negativ geladenen Lipiden auf die Bindung von Nef an Membranen untersucht werden. Es wurden Experimente mit dem Wildtyp Nef und seinen drei Mutanten Nef G2A, Nef KKAA und Nef R4A ausgeführt.

Um die Bindung von HIV-1 Nef an die Vesikel zu induzieren, wurden diese über Nacht bei Raumtemperatur mit 1,9 μM Protein inkubiert und am nächsten Tag aufgearbeitet. Die Überstände und Pellets wurden per SDS-PAGE analysiert.

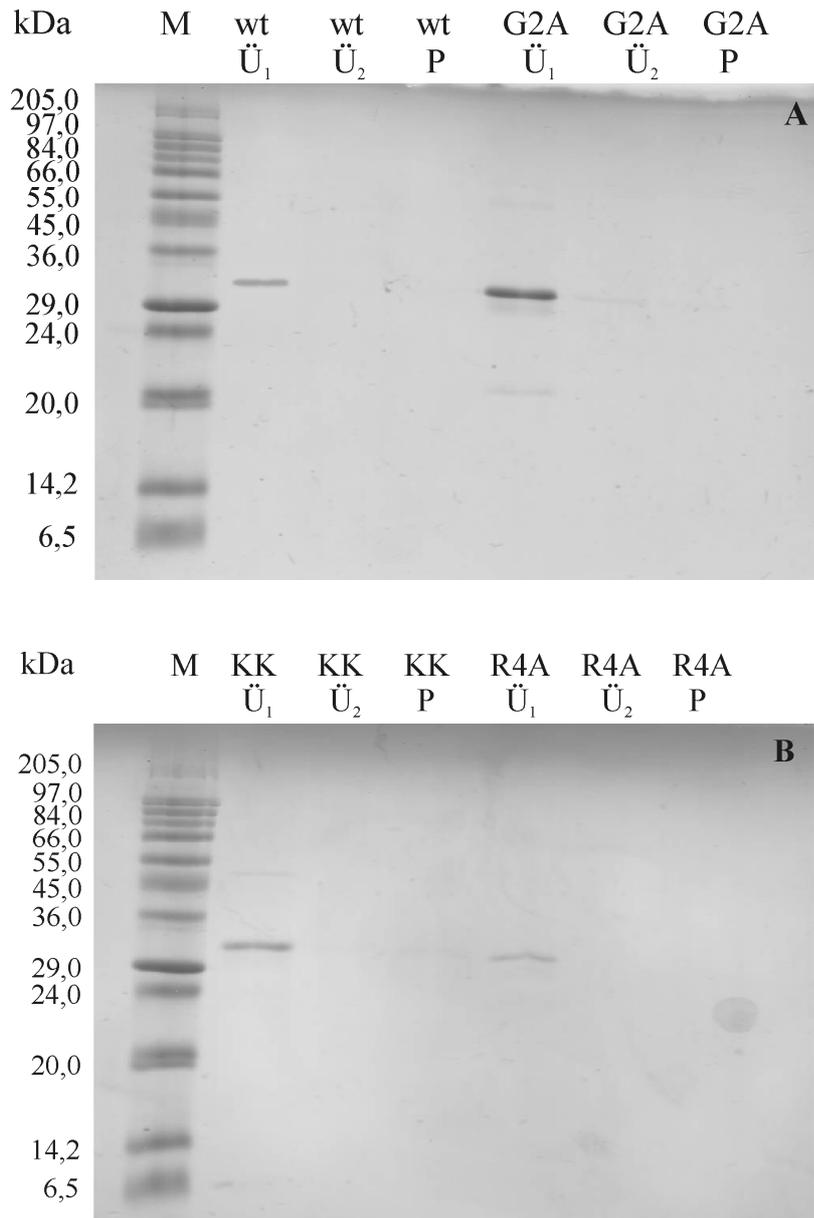


Abbildung 4.3: Analyse des Vesikelcosedimentationsassays von Vesikeln bestehend aus POPC:POPS (4:1) mit wt Nef und Nef G2A (A), beziehungsweise mit Nef KKAA und Nef R4A (B) per SDS-PAGE. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt.

Abbildung 4.3 A zeigt das Resultat des Vesikelcosedimentationsassays mit wt Nef und Nef G2A. In der ersten Tasche wurde ein Proteinmarker aufgetragen. In den Taschen 2-4 wurden die Proben von wt Nef und in den Bahnen 5-7 die Proben von Nef G2A aufgetragen. In Abbildung 4.3 B ist das analysierte SDS-Gel für die Mutanten Nef KKAA und Nef R4A dargestellt. Analog zu Abbildung 4.3 A wurde zuerst ein Proteinmarker aufgetragen, dann die Überstände und das Pellet von Nef KKAA und die Proben von Nef R4A. Die Proteinbanden der einzelnen Nef Proteine wurde jeweils im ersten Überstand detek-

tiert, somit konnte auch für diese Lipidmischung keine stabile Bindung von HIV-1 Nef an Lipidmembranen beobachtet werden. Auch wurde durch die Verminderung des positiven Ladungsclusters keine Bindung an Lipidvesikel hervorgerufen.

4.2 Untersuchung der Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) aus unilamellaren Vesikeln induziert durch HIV-1 Nef

In den Vesikelcosedimentationsassays konnte keine beziehungsweise keine stabile Bindung von HIV-1 Nef an Vesikel beobachtet werden. Zudem wurden Mitte der 1990er Jahre von Azad und Mitarbeitern Ergebnisse veröffentlicht, die darauf schließen lassen, dass Nef sowie N-terminale Fragmente von Nef in der Lage sind, die Stabilität von Membranen zu stören.⁸¹ Um diese Beobachtungen zu verifizieren, wurden *Release*-Messungen durchgeführt. Im Unterschied zu den von Azad und Mitarbeitern durchgeführten Experimenten wurde in dieser Arbeit immer mit dem *full length* Protein gearbeitet. Zudem wurde darauf geachtet natürliche vorkommende Lipide zu verwenden.

Die 5(6)-Carboxyfluorescein-*Release*-Methode ist eine in der Literatur bekannte und etablierte Methode zur Untersuchung von Porenbildung oder Membranstörungen in unilamellaren Lipidvesikeln.^{46, 82-84} Das Messprinzip beruht auf der Freisetzung von in den Vesikeln eingeschlossenem Carboxyfluorescein. In diesen liegt das CF in selbstlöschender Konzentration vor, daher wird nur ein schwaches Fluoreszenzsignal beobachtet. Wird nun zu einer Lösung von mit CF gefüllten Vesikeln ein membranaktives Protein oder Peptid gegeben, so kann der Farbstoff aus den Vesikeln austreten und unterschreitet die selbstlöschende Konzentration. Dies resultiert in einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Um den maximalen Anstieg des Fluoreszenzsignals detektieren zu können, wurde am Ende jeder Messung TritonX-100, welches die Vesikel vollständig zerstört, zugesetzt.

Die *Release*-Messungen wurden in dieser Arbeit mit dem Wildtyp Nef und den drei Mutanten Nef G2A, Nef KKAA und Nef R4A durchgeführt.

Um die Bedeutung der Lipidzusammensetzung zu analysieren, wurden Vesikel verschiedener Lipidmischungen verwendet. Neben POPC-Vesikeln wurde mit Vesikeln bestehend aus POPC:POPS (4:1) sowie POPC:POPG (4:1) gearbeitet. POPC ist ein zwitterionisches Lipid, POPS und POPG hingegen sind einfach negativ geladene Lipide, welche auf der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran vorkommen. Somit konnte untersucht werden, ob negative Ladungen in der Membran die Wechselwirkung mit

HIV-1 Nef beeinflusst. Bei allen *Release*-Messungen wurde mit einem konstanten Protein:Lipid-Verhältnis von 1:65 gearbeitet, da sich diese Konzentration an HIV-1 Nef als ausreichend für die Wechselwirkung erwies. Bei kleineren Protein:Lipid-Verhältnissen konnte kaum eine Wechselwirkung des Proteins mit den Vesikeln beobachtet werden.

4.2.1 Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein aus unilamellaren POPC-Vesikeln induziert durch HIV-1 Nef

Als erstes wurde die Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit unilamellaren POPC-Vesikeln untersucht. Zunächst wurde in eine Fluoreszenzküvette 600 μL Vesikellösung (1,3 μM) vorgelegt. Die Fluoreszenz von CF wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 520 \text{ nm}$ über die Zeit aufgezeichnet. Waren die Vesikel stabil, so konnte kein Farbstoff austreten und es wurde ein konstantes Fluoreszenzsignal beobachtet. Im diesem Fall wurde HIV-1 wt Nef oder eine seiner Mutanten (Nef G2A, Nef KKAA, Nef R4A) zugegeben. Die Konzentration der Proteine betrug 0,02 μM , so dass mit einem konstanten Protein:Lipid-Verhältnis von 1:65 gearbeitet wurde. Die maximale Fluoreszenzintensität wurde durch Zugabe von 2 μL TritonX-100 (10 % (w/v)) erhalten. Die Messdaten wurden nach Gleichung 3.1 normiert. Abbildung 4.4 zeigt einen Überblick über die Ergebnisse der *Release*-Messungen an unilamellaren POPC-Vesikeln.

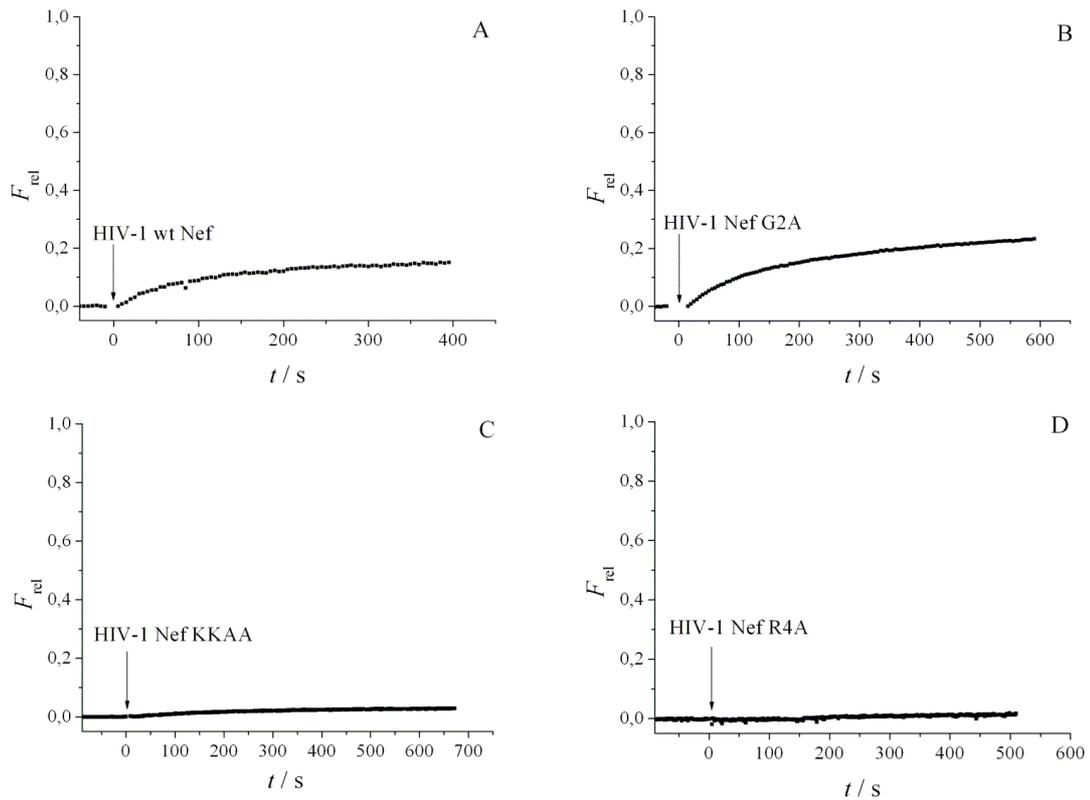


Abbildung 4.4: Freisetzung von CF aus unilamellaren POPC-Vesikeln ($1,3 \mu\text{M}$) über die Zeit nach Zugabe von **A:** wt Nef, **B:** Nef G2A, **C:** Nef KKAA, **D:** Nef R4A. Die Konzentration aller Proteine betrug $0,02 \mu\text{M}$. Die Graphen wurden nach Gleichung 3.1 normiert. Die Proteinzugabe erfolgte bei $t = 0$. Das Protein:Lipid-Verhältnis betrug 1:65. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Abbildung 4.4 A zeigt den charakteristischen Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von $0,02 \mu\text{M}$ HIV-1 wt Nef. Diese resultierte in einer Freisetzung von 14,7 % 5(6)-Carboxyfluorescein. Um den Einfluss des Membranankers zu untersuchen, wurden auch Messungen mit HIV-1 Nef G2A, das N-terminal unmyristoyliert ist, durchgeführt (Abbildung 4.4 B). Nach der Zugabe von Nef G2A erhöhte sich die Intensität des Fluoreszenzsignals um 22,7 %. Neben dem Einfluss des Myristoylankers wurde auch die Rolle des positiven Ladungsclusters auf die Freisetzung von CF aus Vesikeln bestehend aus POPC untersucht. Hierzu wurden Messungen mit Nef KKAA, welches nur noch 5 statt 7 positive Ladungen im N-Terminus trägt, und Nef R4A, welches nur noch 3 positive Ladungen besitzt, durchgeführt. Durch die Zugabe von $0,02 \mu\text{M}$ Nef KKAA erhöhte sich das Fluoreszenzsignal lediglich um 2,8 % (Abbildung 4.4 C). Nach der Zugabe von Nef R4A konnte keine Freisetzung von CF beobachtet werden, die Fluoreszenzintensität blieb

konstant (Abbildung 4.4 D). In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der *Release*-Messungen an POPC-Vesikeln zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Relative prozentuale Fluoreszenzanstiege nach der Zugabe von HIV-1 Nef zu unilamellaren Vesikeln bestehend aus POPC. Das Protein:Lipid-Verhältnis betrug 1:65. *n*: Anzahl der Messungen.

Protein	$F_{\text{rel}} / \%$
HIV-1 wt Nef	12 ± 4 ($n = 20$)
HIV-1 Nef G2A	14 ± 4 ($n = 20$)
HIV-1 Nef KKAA	$3 \pm 1,5$ ($n = 14$)
HIV-1 Nef R4A	0 ($n = 20$)

Für HIV-1 wt Nef ergab sich ein mittlerer Fluoreszenzintensitätsanstieg von $(12 \pm 4) \%$, während nach der Zugabe von HIV-1 Nef G2A $(14 \pm 4) \%$ Farbstoff freigesetzt wurden. Die Zugabe von HIV-1 Nef KKAA resultierte im Vergleich zu wt Nef in einem geringeren mittleren Anstieg des Fluoreszenzsignals von $(3 \pm 1,5) \%$. Bei den Messungen mit der Mutante HIV-1 Nef R4A wurde bei keinem Experiment eine Freisetzung von CF beobachtet.

4.2.2 Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein aus unilamellaren Vesikeln bestehend aus POPC:POPS (4:1) induziert durch HIV-1 Nef

Nachdem die Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein aus unilamellaren POPC-Vesikeln induziert durch HIV-1 Nef untersucht worden war, wurde durch die Lipidmischung POPC:POPS (4:1) versucht die natürliche Membranumgebung von Nef besser darzustellen. Zudem konnte mit dieser Lipidzusammensetzung auch mittels *Release*-Messungen untersucht werden, inwieweit negativ geladene Lipide die Membrandestabilisierung und die damit verbundene Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein nach der Zugabe von HIV-1 Nef beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden Vesikel bestehend aus POPC:POPS im Verhältnis von (4:1) gefüllt mit 100 mM CF präpariert und 600 μL dieser Vesikellösung (1,3 μM) in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt. War die Stabilität der Vesikel gewährleistet, so konnte Protein zu der Lösung gegeben werden und der Anstieg des Fluoreszenzsignals bei $\lambda = 520 \text{ nm}$ über die Zeit beobachtet werden. Das Protein:Lipid-Verhältnis betrug 1:65. Die maximale Fluoreszenzintensität wurde erneut

durch Zugabe von 2 μL TritonX-100 (10 % (w/v)) erreicht und der Originaldatensatz nach Gleichung 3.1 normiert.

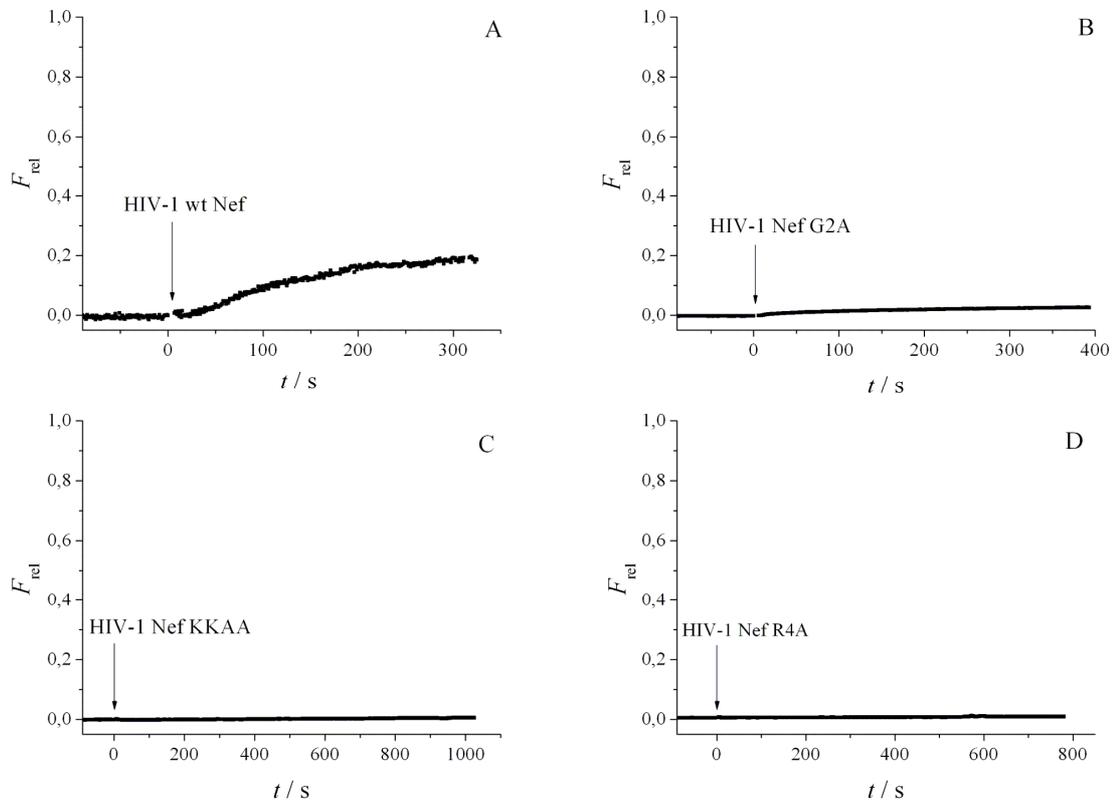


Abbildung 4.5: Freisetzung von CF aus unilamellaren POPC:POPS (4:1) Vesikeln (1,3 μM) über die Zeit nach Zugabe von A: wt Nef, B: Nef G2A, C: Nef KKAA, D: Nef R4A. Die Konzentration aller Proteine betrug 0,02 μM . Die Graphen wurden nach Gleichung 3.1 normiert. Die Proteinzugabe erfolgte bei $t=0$. Das Protein:Lipid-Verhältnis betrug 1:65. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Abbildung 4.5 A zeigt den typischen Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von 0,02 μM wt Nef zu unilamellaren Vesikeln bestehend aus POPC:POPS (4:1). In diesem Beispiel wurden 19,2 % des Farbstoffs freigegeben. Um den Einfluss des Membranankers zu untersuchen, wurden ebenfalls *Release*-Messungen mit Nef G2A durchgeführt. In Abbildung 4.5 B ist eine beispielhafte Messung dargestellt. In diesem Fall stieg die Fluoreszenzintensität nur um 2,6 % an, nachdem das Protein der Vesikellösung hinzugefügt wurde. Des Weiteren wurde auch die Bedeutung des positiven Ladungsclusters im N-Terminus von HIV-1 Nef analysiert. Hierzu wurden Experimente mit den Mutanten HIV-1 Nef KKAA und HIV-1 Nef R4A durchgeführt. In Abbildung 4.5 C und D sind

jeweils beispielhafte Messungen dargestellt. In beiden Fällen konnte keine Interaktion der Proteine mit den Vesikeln beobachtet werden, die zu einer Freisetzung der Farbstoffs geführt hätte.

Im Mittel ergab sich für HIV-1 wt Nef ein relativer Fluoreszenzanstieg von $(20,0 \pm 6,5) \%$. Für die nichtmyristoylierte Mutante Nef G2A konnte eine mittlere Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein aus den Vesikeln von nur $(3,3 \pm 2,3) \%$ beobachtet werde. Bei der Mutante Nef KKAA wurde ein relativer Fluoreszenzanstieg von $(0,3 \pm 0,6) \%$ beobachtet, bei Nef R4A wurde kein Anstieg des relativen Fluoreszenzsignals detektiert. Tabelle 4.2 fasst diese Ergebnisse zusammen.

Tabelle 4.2: Relative prozentuale Fluoreszenzanstiege nach der Zugabe von HIV-1 Nef zu unilamellaren Vesikeln bestehend aus POPC:POPS 4:1. Das Protein:Lipid-Verhältnis betrug 1:65. *n*: Anzahl der Messungen.

Protein	$F_{\text{rel}} / \%$
HIV-1 wt Nef	$20,0 \pm 6,5 (n = 9)$
HIV-1 Nef G2A	$3,3 \pm 2,3 (n = 18)$
HIV-1 Nef KKAA	$0,3 \pm 0,6 (n = 17)$
HIV-1 Nef R4A	$0 (n = 20)$

4.2.3 Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein aus unilamellaren Vesikeln bestehend aus POPC:POPG (4:1) induziert durch HIV-1 Nef

Ein weiterer Faktor, der in dieser Arbeit mit Hilfe der Freisetzung von CF aus unilamellaren Vesikeln, induziert durch HIV-1 Nef, untersucht wurde, war der Einfluss der Kopfgruppe des negativ geladenen Lipids. Hierzu wurde im Vergleich zu POPS das Lipid POPG gewählt. Wie POPS ist auch POPG ein einfach negativ geladenes Phosphoglycerolipid, allerdings ist die Phosphorsäureeinheit der Kopfgruppe mit Glycerin und nicht wie im Fall von POPS mit der Aminosäure Serin verknüpft. Als molares Verhältnis von POPC zu POPG wurde ebenfalls (4:1) gewählt.

In eine Fluoreszenzküvette wurden $600 \mu\text{L}$ Vesikel ($1,3 \mu\text{M}$), welche mit 100 mM 5(6)-Carboxyfluorescein gefüllt waren, vorgelegt. Die Stabilität der Vesikel wurde durch das Aufzeichnen des Fluoreszenzsignals bei $\lambda = 520 \text{ nm}$ über die Zeit festgestellt. Wurde eine stabile Basislinie beobachtet, so konnten der Wildtyp Nef bezie-

hungsweise Nef G2A, Nef KKAA oder Nef R4A ($0,02 \mu\text{M}$) zu der Lösung hinzugegeben werden. Das Pro-tein/Lipid-Verhältnis betrug 1:65. Die Freisetzung von CF wurde über die Zeit detektiert und die maximale Fluoreszenzintensität konnte durch Zugabe von $2 \mu\text{L}$ TritonX-100 (10 % (w/v)) erreicht werden. Zum besseren Vergleich der Intensitätsanstiege wurden die Daten anschließend nach Gleichung 3.1 normiert.

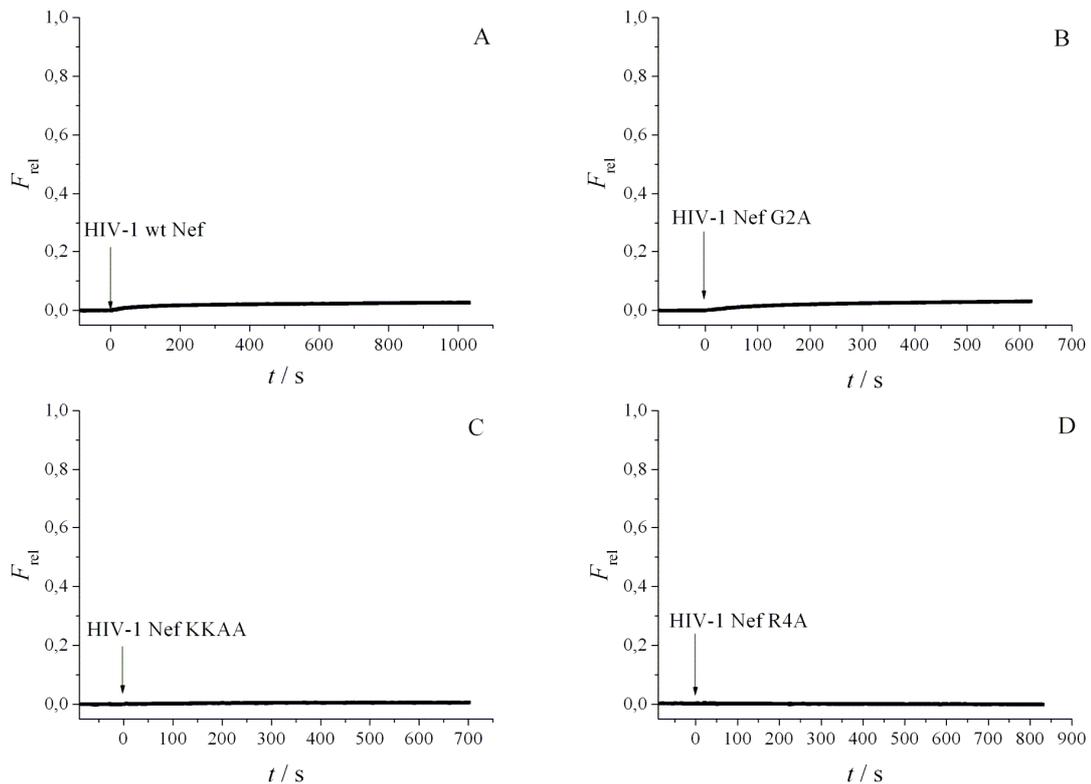


Abbildung 4.6: Freisetzung von CF aus unilamellaren POPC:POPG (4:1) Vesikeln ($1,3 \mu\text{M}$) über die Zeit nach Zugabe von A: wt Nef, B: Nef G2A, C: Nef KKAA, D: Nef R4A. Die Konzentration aller Proteine betrug $0,02 \mu\text{M}$. Die Graphen wurden nach Gleichung 3.1 normiert. Die Proteinzugabe erfolgte bei $t = 0$. Das Protein:Lipid-Verhältnis betrug 1:65. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Ein beispielhafter Kurvenverlauf des Fluoreszenzsignals nach der Zugabe von wt Nef zu unilamellaren Vesikeln bestehend aus POPC:POPG (4:1) ist in Abbildung 4.6 A dargestellt. Eine relative Freisetzung von 2,6 % Farbstoff wurde beobachtet. Abbildung 4.6 B zeigt ein exemplarisches Experiment mit Nef G2A. In diesem Fall wurde ein Fluoreszenzintensitätsanstieg von 3,0 % detektiert. Des Weiteren wurde auch der Einfluss des positiven Ladungskusters charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde die Freisetzung von

CF aus unilamellaren Vesikeln auch nach der Zugabe von Nef KKAA und Nef R4A beobachtet. Beispielhafte Messungen nach der Zugabe von 0,02 μM Nef KKAA oder Nef R4A sind in Abbildung 4.6 **C** und **D** gezeigt. In beiden Fällen konnte keine Freisetzung des Farbstoffs erfasst werden.

Tabelle 4.3: Relative prozentuale Fluoreszenzanstiege nach der Zugabe von HIV-1 Nef zu unilamellaren Vesikeln bestehend aus POPC:POPG (4:1). Das Protein:Lipid-Verhältnis betrug 1:65. n : Anzahl der Messungen.

Protein	$F_{\text{rel}} / \%$
HIV-1 wt Nef	$2,8 \pm 2,0$ ($n = 11$)
HIV-1 Nef G2A	$2,6 \pm 1,8$ ($n = 14$)
HIV-1 Nef KKAA	0 ($n = 12$)
HIV-1 Nef R4A	0 ($n = 20$)

In Tabelle 4.3 ist ein Überblick über alle *Release*-Messungen an Vesikeln bestehend aus POPC:POPG (4:1) gegeben. Als mittlerer relativer Anstieg der Fluoreszenzintensität ergab sich für wt Nef aus 11 Messungen ein Wert von $(2,8 \pm 2,0) \%$. Die Zugabe von HIV-1 Nef G2A führte im Mittel zu einer Freisetzung von $(2,6 \pm 1,8) \%$ 5(6)-Carboxyfluorescein. Bei den beiden Mutanten Nef KKAA und Nef R4A konnte keine Wechselwirkung mit den Vesikeln beobachtet werden, die zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führte.

4.3 Untersuchung der Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit planaren Lipiddoppelschichten mittels Quarzmikrowaagemessungen

In den vorherigen Kapiteln wurden alle Experimente mit unilamellaren Lipidvesikeln durchgeführt. In dem Vesikelcosedimentationsassay konnte keine Bindung beobachtet werden und die Zugabe von HIV-1 Nef zu Lipidvesikeln gefüllt mit 5(6)-Carboxyfluorescein resultierte in einer Freisetzung des Farbstoffs. Diese Ergebnisse schließen allerdings nicht aus, dass HIV-1 Nef schwach oder reversibel an Lipidmembranen bindet. Die bisher verwendeten Methoden können eine solche Wechselwirkungen nicht detektieren. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten Messmethoden erlaubt die Quarzmikrowaagetechnik die Detektion solcher Interaktionen. Mit Hilfe dieser Mess-

technik können kleinste Massenänderungen auf dem Schwingquarz erfasst werden. Einen weiteren Vorteil bietet die Technik, da sich im Gegensatz zu den durchgeführten Vesikelcosedimentationsassays sowohl Adsorptions- als auch Desorptionsprozesse zeitaufgelöst verfolgen lassen.

Mittels der QCM-Experimente sollte überprüft werden, ob HIV-1 Nef schwach oder reversibel an Lipidmembranen bindet. Des Weiteren wurde sowohl die Rolle des N-terminalen Membranankers als auch der Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Wechselwirkung mit Membranen untersucht. Hierzu wurden neben den Messungen mit wt Nef auch Experimente mit Nef G2A durchgeführt. Als Membransysteme wurden folgende Lipidmischungen gewählt: OT/POPC- und OT/(POPC:SM:Chol 2:1:1)-Doppelschichten. Alle Messungen fanden ohne Zugabe von DTT statt.

4.3.1 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der Membranen

Um die Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit artifiziellen festkörperunterstützten Membranen beobachten zu können, ist es notwendig, dass diese vollständig und defektfrei ausgebildet sind. Daher wurden sowohl die Monoschichten als auch die Doppelschichten vor der QCM-Messungen mittels Impedanzspektroskopie charakterisiert. Die Präparation der Doppelschichten erfolgte gemäß Kapitel 3.2.3. Zuerst wurde eine Oktanthiolmonoschicht auf die Goldelektrode des Quarzes chemisorbiert. Im Anschluss wurden unilamellare Lipidvesikel mit gewünschter Zusammensetzung auf der hydrophoben Oberfläche gespreitet. Die Impedanzspektren beider Schichten wurden in einem Bode-Diagramm graphisch dargestellt. Hier werden zum einen der Betrag der Impedanz (■, ■) und zum anderen die Phasenverschiebung (●, ●) gegen die Frequenz in einem Bereich von $0,1-10^{-6}$ Hz aufgetragen. In Abbildung 4.7 ist ein exemplarisches Bode-Diagramm sowohl einer OT-Monoschicht als auch einer OT/POPC-Doppelschicht dargestellt. Die Parameter des in Abbildung 3.6 **B** dargestellten Ersatzschaltbildes wurden an die erhaltenen Messdaten angepasst.

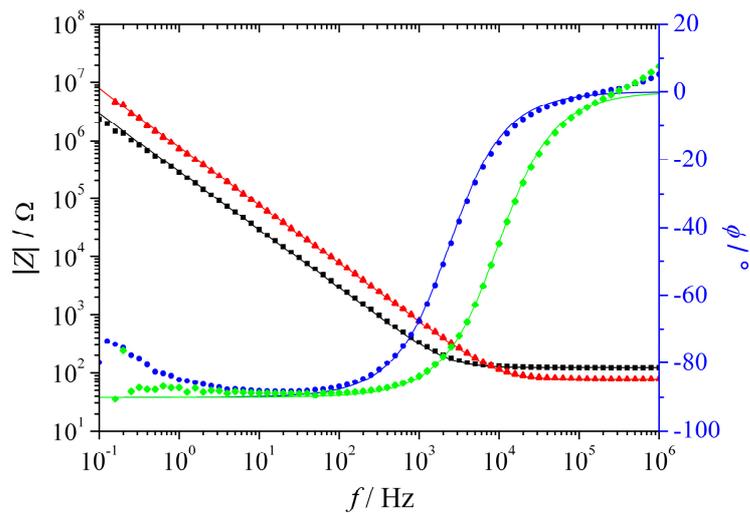


Abbildung 4.7: Impedanzspektrum einer OT-Monoschicht (■,●) und (OT/POPC)-Doppelschicht (■,●). Der Betrag der Impedanz, sowie die Phasenverschiebung sind als Funktion der angelegten Wechselspannung aufgetragen. Durch Anpassung der Parameter des Ersatzschaltbildes aus Abbildung 3.6 B an die Daten wurde für die Kapazität der Monoschicht ein Wert von $2,06 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, für die Kapazität der Doppelschicht ein Wert von $0,90 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ermittelt. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4.

Die erhaltenen Kapazitäten für die OT-Monoschicht lagen typischerweise bei $(2,0 \pm 0,3) \mu\text{F}/\text{cm}^2$, die der OT/POPC-Doppelschicht oder der OT/(POPC:SM:Chol 2:1:1)-Doppelschicht bei $(1,0 \pm 0,3) \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Lagen die ermittelten Kapazitäten in diesem Fehlerbereich, konnte von einem Belegungsgrad von über 99 % ausgegangen werden.⁸⁵ Doppelschichten, die einen geringeren Belegungsgrad hatten, wurden nicht für QCM-Messungen verwendet.

4.3.2 Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit festkörperunterstützten OT/POPC-Membranen

Die Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit auf Gold immobilisierten Lipiddoppelschichten, wurde zunächst mit Membransystemen bestehend aus Oktanthiol als untere und POPC als obere Monoschicht untersucht. Zur Durchführung der Experimente wurde der Schwingquarz in der Messzelle an die QCM angeschlossen und zur resonanten Schwingung angeregt. Die Änderung der Frequenz wurde dabei zeitlich aufgelöst aufgenommen. War die Schwingung stabil, das heißt die Frequenz änderte sich kaum, so konnte Protein

in den Pumpkreislauf injiziert werden. Die Pumpgeschwindigkeit betrug 0,46 mL/min. Zum besseren Vergleich der Daten wurde die Änderung der Resonanzfrequenz $\Delta f = f(t) - f(t = \text{Anfang})$ graphisch dargestellt. $f(t)$ stellt hierbei die Resonanzfrequenz zum Zeitpunkt t dar und $f(t = \text{Anfang})$ die Frequenz zu Beginn der Messung. Des Weiteren wurde der Zeitpunkt der Proteinzugabe als $t = 0$ gesetzt.

Nach der Zugabe von wt Nef zu den Membranen zeigten sich zwei mögliche repräsentative Verläufe der Resonanzfrequenz (Abbildung 4.8).

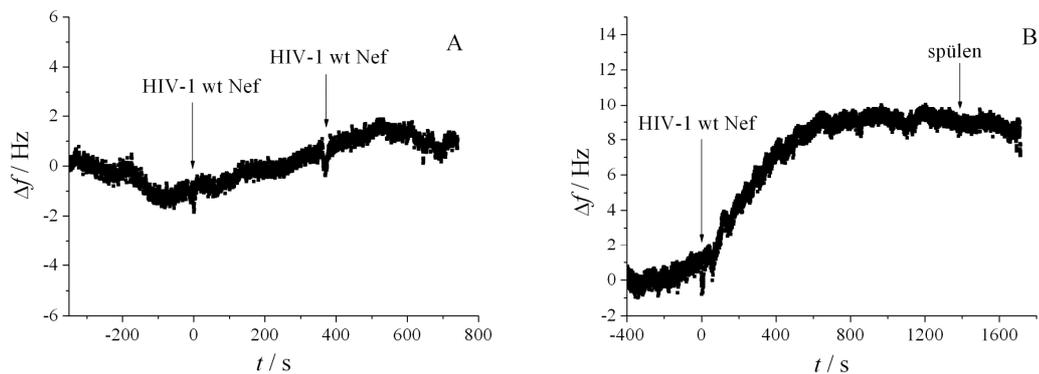


Abbildung 4.8: Exemplarische QCM-Messungen an OT/POPC-Doppelschichten. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Resonanzfrequenzänderung bei der Zugabe von HIV-1 wt Nef. **A:** Sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Zugabe von jeweils 0,15 μM HIV-1 wt Nef ändert sich die Frequenz nicht signifikant. **B:** Nach der Zugabe von 0,3 μM HIV-1 wt Nef steigt die Resonanzfrequenz um 9 Hz. Der Zeitpunkt der Proteinzugabe wurde als $t = 0$ gesetzt. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4.

Im ersten Beispiel (Abbildung 4.8 A) wurden bei $t = 0$ 0,15 μM wt Nef in den Pumpkreislauf gegeben. Die Frequenz war über circa 400 s nach der Zugabe annähernd konstant. Daher wurden nochmals 0,15 μM wt Nef zu der Membran hinzugefügt. Die Gesamtproteinkonzentration betrug also 0,3 μM . Auch nach der zweiten Proteinzugabe änderte sich die Frequenz nicht signifikant. Ein anderer Fall ist in Abbildung 4.8 B dargestellt. Hier wurden direkt 0,3 μM wt Nef in den Kreislauf injiziert. Direkt nach der Zugabe ist ein Anstieg der Resonanzfrequenz zu beobachten. Insgesamt stieg die Frequenz um 9 Hz an. Nachdem diese sich nicht mehr änderte, wurde mit Puffer gespült, um überschüssiges Protein zu entfernen. Durch den Spülvorgang änderte sich die Resonanzfrequenz nicht mehr.

Um die Rolle des Myristoylankers zu untersuchen, wurden QCM-Messungen auch mit der unmyristoylierten Mutante Nef G2A an OT/POPC-Doppelschichten durchgeführt.

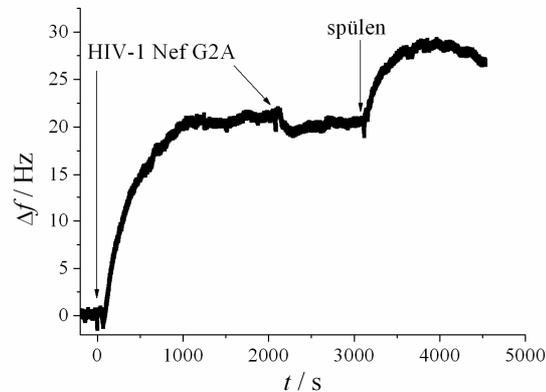


Abbildung 4.9: Zeitlicher Verlauf der Resonanzfrequenzänderung bei der Zugabe von HIV-1 Nef G2A. Bei jeder Zugabe wurden $0,3 \mu\text{M}$ Nef G2A in das System eingebracht, so dass die Gesamtproteinkonzentration $0,6 \mu\text{M}$ betrug. Der Zeitpunkt der Proteinzugabe wurde als $t = 0$ gesetzt. Puffer: 20 mM TRIS/HCl , 100 mM NaCl , $\text{pH } 7,4$.

In Abbildung 4.9 ist der typische Verlauf der Resonanzfrequenzänderung nach der Zugabe von HIV-1 Nef G2A dargestellt. Nachdem die Frequenz des Schwingquarzes stabil war, wurden $0,3 \mu\text{M}$ Nef G2A in dem Pumpkreislauf eingebracht. Durch die Zugabe stieg die Frequenz um 22 Hz an. Nachdem die Frequenz wieder stabil war, wurden erneut $0,3 \mu\text{M}$ Protein zugegeben. Dadurch fiel die Resonanzfrequenz um circa 2 Hz . Abschließend wurde mit Puffer (20 mM TRIS/HCl , 100 mM NaCl , $\text{pH } 7,4$) gespült, um überschüssiges Protein zu entfernen. Durch diesen Vorgang stieg die Frequenz erneut bis auf einen Endwert von 27 Hz .

Mit Hilfe der Quarzmikrowaagetechnik sollte untersucht werden, ob HIV-1 Nef an artificielle Lipiddoppelschichten bindet. Eine Bindung des Proteins würde zu einer Massenzunahme auf dem Quarz führen. Laut Gleichung 3.5 ist eine Erhöhung der Masse mit einer Abnahme der Resonanzfrequenz des Quarzes verbunden. Allerdings resultierte, wie oben beschrieben, sowohl die Zugabe von wt Nef als auch die von Nef G2A in einer Erhöhung der Resonanzfrequenz. Der in den Quarzmikrowaagemessungen beobachtete Frequenzanstieg beschreibt also entgegen der Erwartungen einen Massenverlust des auf dem

Schwingquarz aufgebrachten Membransystems. Dieser Massenverlust könnte darauf hinweisen, dass HIV-1 Nef Lipide aus den Membranverbund herauslöst.

4.3.3 Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit festkörperunterstützten OT/(POPC:SM:Chol 2:1:1)-Membranen

Wie schon in Kapitel 4.1.2 aufgeführt, wird in der Literatur diskutiert, dass ein Teil der in der Zelle vorliegenden Nef-Population mit sogenannten *lipid rafts* assoziiert ist.⁷⁷⁻⁸⁰ *lipid rafts* sind Mikrodomänen auf der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran, welche mit Sphingomyelin und Cholesterin angereichert sind. Erneut wurde als *raft*-ähnliche Lipidmischung POPC:SM:Chol (2:1:1) gewählt. Daher wurden auf Gold Membranen bestehend aus OT/(POPC:SM:Chol 2:1:1) immobilisiert. Danach wurde die Messzelle an die QCM angeschlossen und überprüft, ob der Quarz stabil bei einer Frequenz schwingt. War dies gewährleistet, konnte HIV-1 wt Nef zugegeben werden. Wie schon bei den Messungen an OT/POPC-Membranen zeigte sich auch hier kein einheitliches Verhalten nach Proteinzugabe. Ein exemplarischer Verlauf der Resonanzfrequenz nach Hinzufügen von HIV-1 wt Nef ist in Abbildung 4.10 A gezeigt. Nach der Zugabe von 0,3 µM HIV-1 wt Nef war ein Anstieg der Resonanzfrequenz um 43 Hz zu beobachten. Danach wurden dem System erneut 0,3 µM wt Nef injiziert. Die Gesamtkonzentration an Protein betrug nun 0,6 µM. Trotz wiederholter Zugabe änderte sich die Resonanzfrequenz des Quarzes nicht. Durch anschließendes Spülen, bei dem überschüssiges Protein entfernt wurde, stieg die Frequenz erneut um 8 Hz auf einen Endwert von 51 Hz.

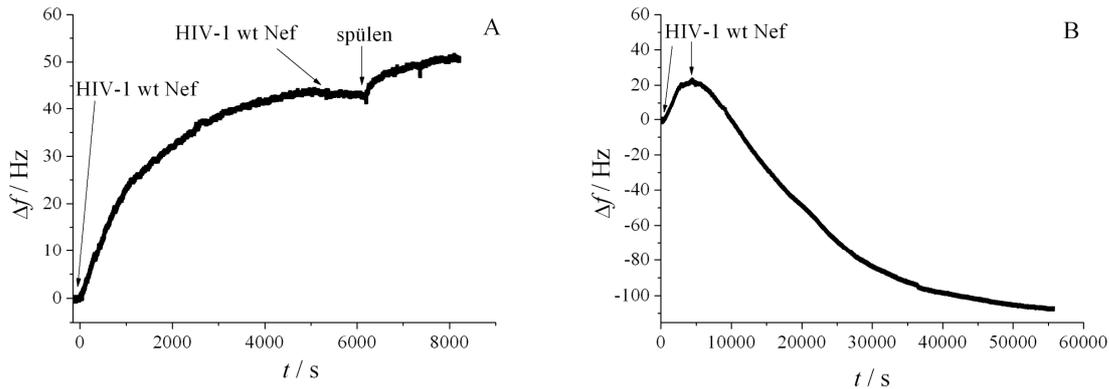


Abbildung 4.10: Zwei exemplarische QCM-Messungen an OT/(POPC:SM-Chol 2:1:1)-Doppelschichten. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Resonanzfrequenzänderung bei Zugabe von HIV-1 wt Nef. A/B: Die Pfeile markieren die Zugaben von jeweils $0,3 \mu\text{M}$ HIV-1 wt Nef. Der Zeitpunkt der Proteinzugabe wurde als $t = 0$ gesetzt. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4

Eine weitere Messung unter den gleichen Bedingungen ist in Abbildung 4.10 B dargestellt. Nach der ersten Zugabe von $0,3 \mu\text{M}$ wt Nef stieg die Resonanzfrequenz ebenfalls. Sie stabilisierte sich auf einen Wert von 23 Hz. Daraufhin wurden erneut $0,3 \mu\text{M}$ Protein in den Pumpkreislauf hinzugefügt. Die Resonanzfrequenz fiel daraufhin über einen langen Zeitraum sehr stark ab. Nach 56000 s hatte sie einen Endwert von -107 Hz erreicht.

Wie schon in Kapitel 4.3.2 erwähnt, war das Ziel der Quarzmikrowaagemessungen, die Bindung von wt Nef an festkörperunterstützte Membranen zu untersuchen. Nach Gleichung 3.5 führt Massenzunahme auf dem Quarz, welche einer Bindung des Proteins entspricht, zu einer Resonanzfrequenzerniedrigung. Auch bei den Untersuchungen mit dieser Lipidmischung konnte direkt nach der Zugabe des Proteins kein Frequenzabfall und damit keine Bindung von wt Nef an die Lipiddoppelschicht beobachtet werden. Wie schon bei den Messungen mit OT/POPC-Membranen wurde nach der ersten Zugabe von wt Nef ein Anstieg der Resonanzfrequenz detektiert. Dies lässt erneut die Vermutung zu, dass Nef Lipide aus der Membran entfernen könnte und Membranen destabilisiert. Allerdings scheint die in den QCM-Messungen verwendete OT/Lipid-Doppelschicht aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse nicht das geeignete Membransystem zu sein.

4.4 Charakterisierung der Schichtdickenänderungen von festkörperunterstützten POPC-Membranen induziert durch HIV-1 Nef mittels Ellipsometrie

Das in den QCM-Messungen verwendete Membransystem stellte sich aufgrund der unterschiedlichen Verläufe der Resonanzfrequenz nach der Zugabe von HIV-1 Nef als ungeeignet dar. Um eine eventuelle Bindung des Proteins oder eine Membrandestabilisierung, verursacht durch HIV-1 Nef, wie es sowohl die *Release*- als auch die QCM-Messungen indizieren, wurden die Wechselwirkung des Proteins mittels Ellipsometrie erneut versucht zu quantifizieren. Mit Hilfe dieser Technik können Schichtdickenänderungen dünner Filme zeitaufgelöst verfolgt werden. Die Membran wird hierbei durch Spreiten unilamellarer Lipidvesikel (0,2 mg/mL) auf Siliziumdioxid präpariert. Im Gegensatz zu den OT/Lipid-Doppelschichten bestehen hier beide Membranhälften aus derselben Lipidmischung, zudem ist dieses Membransystem deutlich fluidier, da die untere Membranhälfte nicht chemisch mit dem Festkörper verbunden ist. Aus diesen Gründen ist das bei ellipsometrischen Messungen verwendeten Membransystem natürlichen Membranen viel ähnlicher als das OT/Lipid-System. Durchgeführt wurden alle ellipsometrischen Messungen an Membranen bestehend aus POPC. Der Prozess der Membranbildung wurde durch die Änderung der ellipsometrischen Winkel Δ und Ψ verfolgt. Aus diesen Winkeln wurde mit Hilfe des Programms Laytech über ein Modell (siehe Abbildung 3.12) die Schichtdicke der Lipiddoppelschicht ermittelt. In Abbildung 4.11 **A** sind exemplarisch zeitliche Änderungen von Δ und Ψ nach der Vesikelzugabe dargestellt. Δ fällt durch den Membranspreitprozess um insgesamt 4° , Ψ ändert sich nur um wenige Zehntelgrad. Die daraus ermittelte Membrandicke ist in Abbildung 4.11 **B** dargestellt. Für dieses Beispiel ergibt sich nach dem Spreiten und Spülen der Membran mit Puffer eine Schichtdicke von $d = 7,1$ nm.

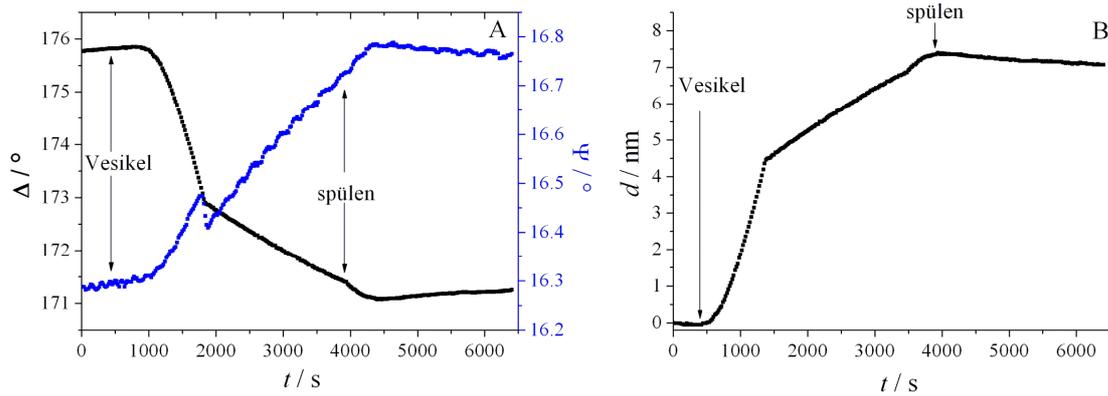


Abbildung 4.11: A: Zeitliche Änderungen der ellipsometrischen Winkel Delta und Psi nach Zugabe von POPC-Vesikeln (0,2 mg/mL) und anschließendem Spülen mit Puffer. B: Aus Delta und Psi über ein Modell berechnete Schichtdickenänderungen während des Vesikelspreitprozesses. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4.

Im Mittel ergab sich eine Membranschichtdicke von $d = (6.3 \pm 0.8)$ nm ($n = 12$). Dieser Wert spricht für die Ausbildung einer vollständigen Lipiddoppelschicht. Wenn nach dem Spreiten der Vesikel eine Schichtdicke für die Membran in diesem Bereich errechnet wurde, konnte Protein in den Pumpkreislauf gegeben werden. Durchgeführt wurden die Messungen sowohl mit wt Nef als auch mit der nichtmyristoylierten Mutante Nef G2A. Die Proteinkonzentration betrug stets $0,5 \mu\text{M}$. Das Protein wurde für circa eine Stunde mit einer Geschwindigkeit von $0,5 \text{ mL}/\text{min}$ durch die Zelle gepumpt. Danach wurde mit Puffer gespült, um Protein zu entfernen, das nicht mit der Membran interagiert hatte. Der Zeitpunkt der Proteinzugaben wurde stets als $t = 0$ gesetzt.

In Abbildung 4.12 ist ein typischer Verlauf der Schichtdickenänderung der Membran nach der Zugabe von $0,5 \mu\text{M}$ wt Nef gezeigt. Bevor HIV-1 wt Nef zu der Membran hinzugefügt wurde, hatte diese eine Schichtdicke von $6,4$ nm. Die Zugabe von wt Nef sowie das anschließende Spülen resultierten in einer Verringerung der Schichtdicke um $0,8$ nm. Dies entspricht einer prozentualen Abnahme von $9,0 \%$.

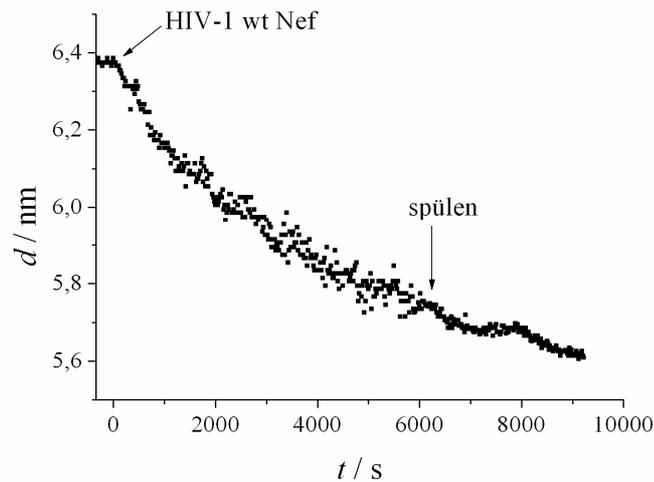


Abbildung 4.12: Ellipsometriemessung an einer POPC-Membran nach Zugabe von $0,5 \mu\text{M}$ HIV-1 wt Nef und anschließendem Spülen mit Puffer. Der Zeitpunkt der Proteinzugabe wurde als $t = 0$ gesetzt. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Nachdem die Zugabe von HIV-1 wt Nef zu einer Verringerung der Schichtdicke führte, wurden die Messungen mit der unmyristoylierte Mutante Nef G2A durchgeführt, um zu untersuchen welchen Einfluss der N-terminalen Membrananker auf die Wechselwirkung mit Membranen bestehend aus POPC hat. Eine exemplarische Messung ist Abbildung 4.13 dargestellt.

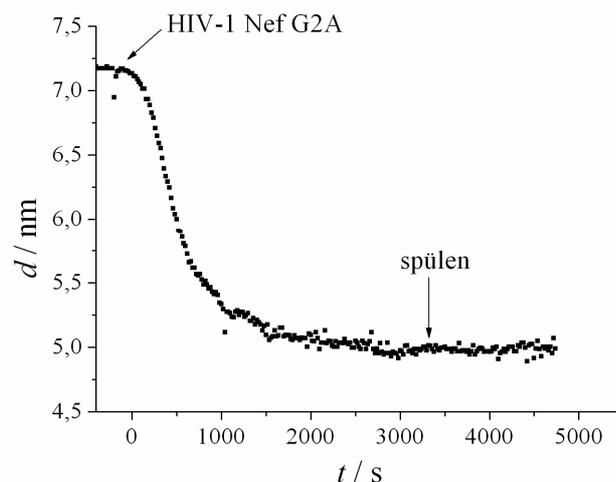


Abbildung 4.13: Ellipsometriemessung an einer POPC-Membran nach Zugabe von $0,5 \mu\text{M}$ HIV-1 Nef G2A und anschließendem Spülen mit Puffer. Der Zeitpunkt der Proteinzugabe wurde als $t = 0$ gesetzt. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Vor dem Hinzufügen von 0,5 μ M HIV-1 Nef G2A hatte die POPC-Membran eine Schichtdicke von 7,2 nm. Wie schon bei wt Nef induzierte die Zugabe von Nef G2A eine Reduzierung der Schichtdicke. In der hier gezeigten Messung verringerte sich die Schichtdicke um 2,1 nm. Anschließend wurde die Probe mit Puffer gespült, um überschüssiges Protein aus der Zelle zu entfernen. Die Schichtdicke blieb dabei konstant. Insgesamt induzierte die Zugabe von HIV-1 Nef G2A in diesem Beispiel eine Abnahme der Schichtdicke von 29,1 %.

Tabelle 4.4 fasst die Ergebnisse der Ellipsometriemessungen zusammen. Die Zugabe von HIV-1 wt Nef induzierte im Mittel eine Abnahme der Membrandicke um (9 ± 4) %, die Inkubation der POPC-Membran mit HIV-1 Nef G2A resultierte in einer mittleren Verringerung der Schichtdicke von (30 ± 7) %.

Tabelle 4.4: Prozentuale Abnahme der Membrandicke nach Zugabe von HIV-1 Nef. *n*: Anzahl der Messungen.

Protein	Abnahme der Membrandicke / %
HIV-1 wt Nef	9 ± 4 ($n = 7$)
HIV-1 Nef G2A	30 ± 7 ($n = 5$)

In den Ellipsometriemessungen konnte keine Bindung von HIV-1 wt Nef oder HIV-1 Nef G2A an Membranen, was in einer Zunahme der Schichtdicke resultiert wäre, beobachtet werden. Die Zugabe beider Proteine induzierte eine Verringerung der Schichtdicke. Somit deuten auch die Ellipsometriemessungen darauf hin, dass Nef in der Lage ist die Struktur von Membranen zu stören und auch Lipide aus dem Membranverbund herauslösen könnte.

4.5 Visualisierung der Interaktion von HIV-1 Nef mit artifiziellen festkörperunterstützten Membranen mittels Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie

Die bisherigen Messungen an Vesikeln und planaren festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten lassen die Vermutung zu, dass HIV-1 Nef Membranen destabilisieren könnte. Dies zeigte sich zum Beispiel bei den *Release*-Messungen in einer Freisetzung von

5(6)-Carboxyfluorescein nach der Zugabe des Proteins. Der bei den QCM-Messungen beobachtet Resonanzfrequenzanstieg nach dem Hinzufügen des Proteins sowie die bei den Ellipsometriemessungen durch HIV-1 Nef induzierte Verringerung der Schichtdicke stützen diese Hypothese. Um diese Annahme zu überprüfen und visualisieren zu können, wurden Experimente am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Hierzu wurden Membranen auf Siliziumdioxid gespreitet. Die Lipidfilme wurden zur Visualisierung der Membranen mit 0,1 mol% des Fluorophors TexasRed DHPE dotiert. Um eine höhere Auflösung zu erzielen und die Topographie zu erfassen, wurden die Proben zudem mit dem Rasterkraftmikroskop charakterisiert. Mit Hilfe dieser beiden Methoden wurde zum einen der Einfluss des Membranankers des Proteins untersucht. Hierfür wurden Experimente mit dem Wildtyp Nef und seiner nichtmyristoylierten Mutante Nef G2A durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Zum anderen wurde auch die Bedeutung des positiven Ladungsclusters im N-Terminus von Nef mit Hilfe der Mutanten Nef KKAA und Nef R4A untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit artifiziellen Membranen charakterisiert. Neben Lipiddoppelschichten bestehend aus POPC wurden auch Membranen bestehend aus POPC:POPS im molaren Verhältnis von (4:1) präpariert. Mit dieser Lipidmischung wurde, wie in Kapitel 4.1.3 erläutert, die innere Hälfte der Plasmamembran und damit die natürliche Membranumgebung von HIV-1 Nef nachgeahmt. Zudem konnte untersucht werden, inwieweit negativ geladene Lipide die Wechselwirkung mit HIV-1 Nef beeinflussen.

4.5.1 Visualisierung der Interaktion von HIV-1 Nef mit artifiziellen festkörperunterstützten POPC-Membranen

Zunächst wurden Experimente mit reinen POPC-Membranen durchgeführt. Dabei kamen zwei verschiedene Inkubationsbedingungen zum Einsatz. Zum einen wurden Lipiddoppelschichten mit HIV-1 Nef unter statischen Bedingungen über Nacht inkubiert, zum anderen wurde eine Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie-kompatible Durchflusszelle konzipiert. Hiermit konnten die erhaltenen Ergebnisse besser mit den Ergebnissen aus Ellipsometrie- und Quarzmikrowaagemessungen, die auch unter Durchfluss durchgeführt wurden, verglichen werden. Zunächst sollen die Resultate für die statischen Inkubationsbedingungen vorgestellt werden.

4.5.1.1 Visualisierung der Interaktion von HIV-1 Nef mit artifiziellen festkörperunterstützten Membranen unter statischen Inkubationsbedingungen

Um die Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit artifiziellen Membranen bestehend aus POPC beobachten zu können, wurden diese wie unter Kapitel 3.2.4 beschrieben auf Siliziumdioxid präpariert. Zur Visualisierung der Lipiddoppelschichten mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden sie mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotiert. Abbildung 4.14 A zeigt eine solche POPC-Membran nach dem Spreiten und anschließendem Spülen mit Puffer. Die homogene Fluoreszenz zeigt die Ausbildung einer vollständigen, defektfreien Lipiddoppelschicht an. Die helleren Punkte auf der Oberfläche können Vesikeln zugeordnet werden, welche an die Membran adsorbiert sind. Mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops wurde die Topographie der Membranoberfläche erfasst. In Abbildung 4.14 C ist die topographische Aufnahme einer auf Siliziumdioxid gespreiteten POPC-Membran gezeigt. Die Lipiddoppelschicht wurde im *intermittent contact mode* abgebildet. Wie schon in den Fluoreszenzaufnahmen wurden auch hier keine Defekte beobachtet. Zu defektfreien Membranen konnte HIV-1 Nef zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Am nächsten Tag wurden die Proben für 30 min bei Raumtemperatur aufgewärmt und dann mit Puffer gespült, um überschüssiges Protein zu entfernen. Um auszuschließen, dass die beobachteten Veränderungen auf Membranalterung zurückzuführen sind, wurde eine POPC-Membran unter den gleichen Bedingungen ohne die Zugabe von Protein inkubiert und am nächsten Tag fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 4.14 B). Es konnte keine Veränderung der Membranfluoreszenz im Vergleich zu Abbildung 4.14 A beobachtet werden. Diese Membran wurde ebenfalls mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht (Abbildung 4.14 D). Auch hier ließ sich im Vergleich zu Abbildung 4.14 C keine Veränderung detektieren. Das heißt, die Lipiddoppelschichten sind über Nacht stabil und eventuell auftretende Veränderungen der Membranfluoreszenz beziehungsweise der Oberflächentopographie sind auf die Wechselwirkung mit HIV-1 Nef zurückzuführen.

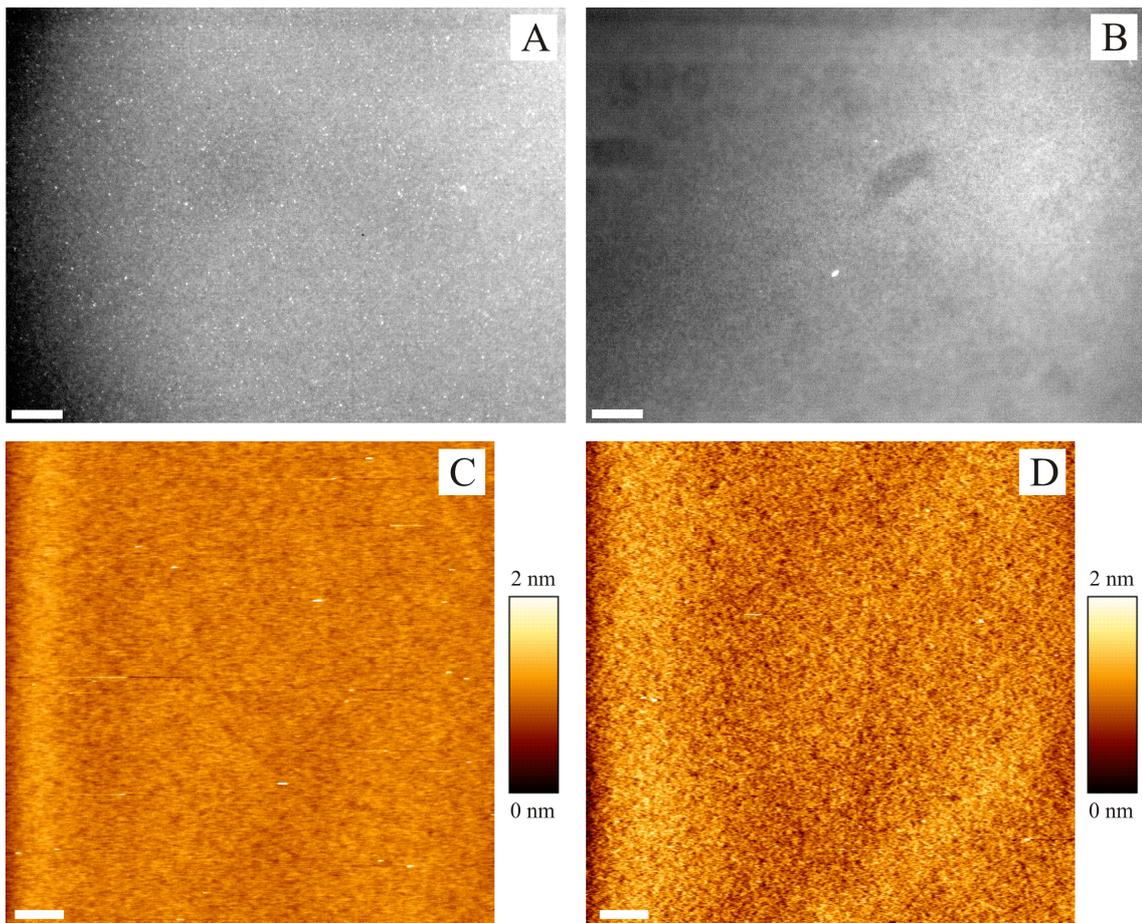


Abbildung 4.14 : Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran **A**: direkt nach dem Spreiten und **B**: Kontrollexperiment, bei dem die Membran ohne Protein über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Maßstabsbalken: 20 μm . **C**: Topographische AFM-Aufnahmen einer POPC-Membran vor Proteinzugabe und **D**: Kontrollexperiment, bei dem die Membran ohne Protein über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Die Aufnahmen wurden im *intermittent contact mode* aufgenommen. *cantilever*: CSC 37, Federkonstante: 0,3 N/m. Maßstabsbalken: 2 μm . Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4.

HIV-1 wt Nef

Zunächst wurden Experimente mit dem Wildtyp Nef durchgeführt. Hierfür wurden vollständig ausgebildete Lipiddoppelschichten mit 1,0 μM wt Nef über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie mit Puffer gespült, um überschüssiges Protein zu entfernen. Anschließend wurden die Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. In **Abbildung 4.15** ist das Ergebnis eines solchen Experiments gezeigt.

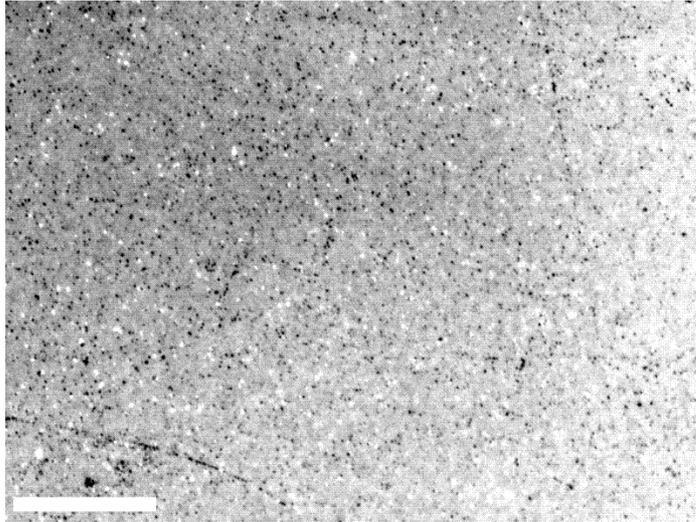


Abbildung 4.15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach der Inkubation mit 1,0 μM wt Nef über Nacht bei 4 °C. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μm .

Nach der Inkubation mit HIV-1 wt Nef wurde eine deutliche Veränderung der Membranfluoreszenz beobachtet. Statt einer homogenen Fluoreszenz waren viele nichtfluoreszierende Bereiche zu sehen. Die helleren Punkte auf der Membranoberfläche sind erneut Vesikel, welche an der Oberfläche haften und sich auch durch Spülen mit Puffer nicht entfernen ließen.

Um herauszufinden, ob HIV-1 wt Nef in den nichtfluoreszierenden Bereichen lokalisiert ist, wurde die Probe für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (Verdünnung 1:250) inkubiert. Dieser sollte spezifisch an den C-terminalen His₆-tag von Nef binden und so Aufschluss über die Position des Proteins auf der Membran geben. Nach der Inkubationszeit wurde die Probe mit Puffer gespült, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

Abbildung 4.16 A zeigt erneut die TexasRed DHPE-Fluoreszenz der Membran. Diese ist durch die Inkubation der Probe mit dem Antikörper nicht verändert. Die nichtfluoreszierenden Bereiche in der Membran sind deutlich sichtbar. Auch hier befinden sich auf der Probe noch Lipidvesikel, welche als hellere Punkte auf der Oberfläche zusehen sind.

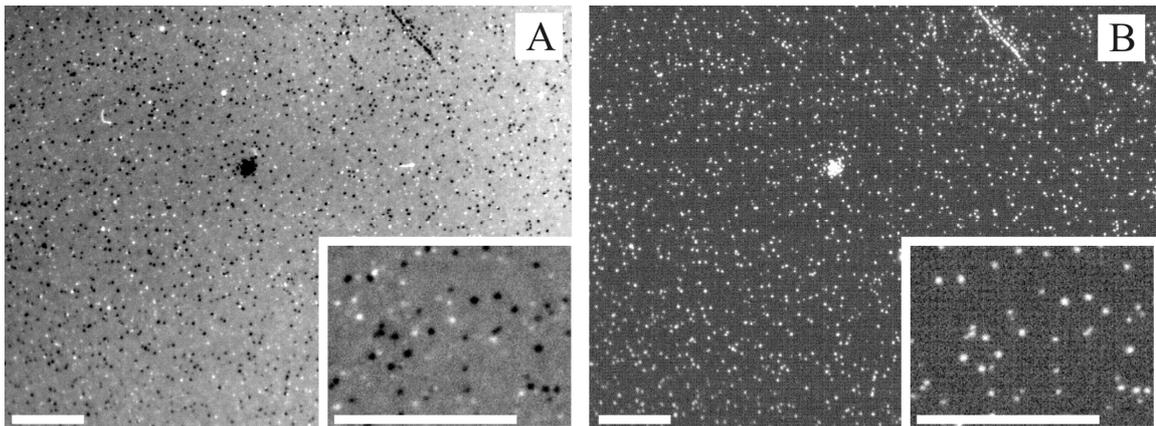


Abbildung 4.16: **A:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach der Inkubation mit 1,0 μM wt Nef über Nacht bei 4 °C und zwei-stündiger Inkubation mit dem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250) bei Raumtemperatur. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der FITC-Fluoreszenz des Antikörpers von derselben Stelle. Die Vergrößerungen zeigen Ausschnitte der jeweiligen Aufnahmen. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μm .

In Abbildung 4.16 **B** ist die Fluoreszenz des Antikörpers gezeigt. Es konnte eine nahezu perfekte Überlagerung der nichtfluoreszierenden Membranbereiche im TexasRed DHPE-Fluoreszenzbild mit der Fluoreszenz des Antikörpers beobachtet werden. Dies indiziert, dass wt Nef in den lipidfreien Bereichen lokalisiert ist. Durch ein Kontrollexperiment wurde zuvor ausgeschlossen, dass der Antikörper mit der Membran wechselwirkt und somit die Ergebnisse verfälscht. Die POPC-Membran wurde ebenfalls für zwei Stunden mit dem Antikörper inkubiert und danach mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Membranfluoreszenz war weiterhin homogen (Abbildung 4.17 **A**). Eine Fluoreszenz des Antikörpers konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 4.17 **B**).

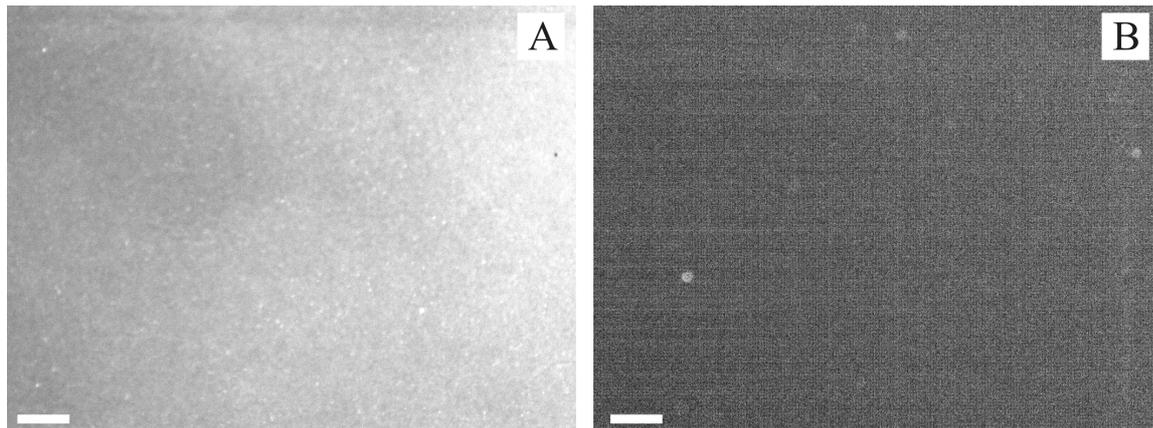


Abbildung 4.17: A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit einem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250). B: dieselbe Stelle der Membran durch den Filtersatz aufgenommen, in dem die Fluoreszenz des Antikörpers zu sehen ist. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Um die nach der Inkubation mit HIV-1 wt Nef erhaltenen Membranfluoreszenzbilder quantifizieren zu können, wurde eine Pixelanalyse mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health, USA) durchgeführt. Hierbei wurde der prozentuale Anteil an nicht-fluoreszierenden Bereichen auf den Membranen nach der Inkubation mit 1,0 μ M wt Nef bestimmt. Es ergibt sich für HIV-1 wt Nef ein mittlerer Wert von $(4,5 \pm 1,5) \% (n = 22)$.

Die Oberfläche der POPC-Membranen wurde, nachdem sie mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht worden war, mit dem AFM abgebildet. Das Rasterkraftmikroskop erlaubt eine höhere Auflösung als das Fluoreszenzmikroskop. Somit konnte mit dieser Methode die Struktur der nichtfluoreszierenden Membranbereiche mit hoher lateraler Auflösung visualisiert werden. Abbildung 4.18 zeigt zwei repräsentative topographische Aufnahmen einer POPC-Membran nach der Inkubation mit 1,0 μ M wt Nef über Nacht bei 4 °C.

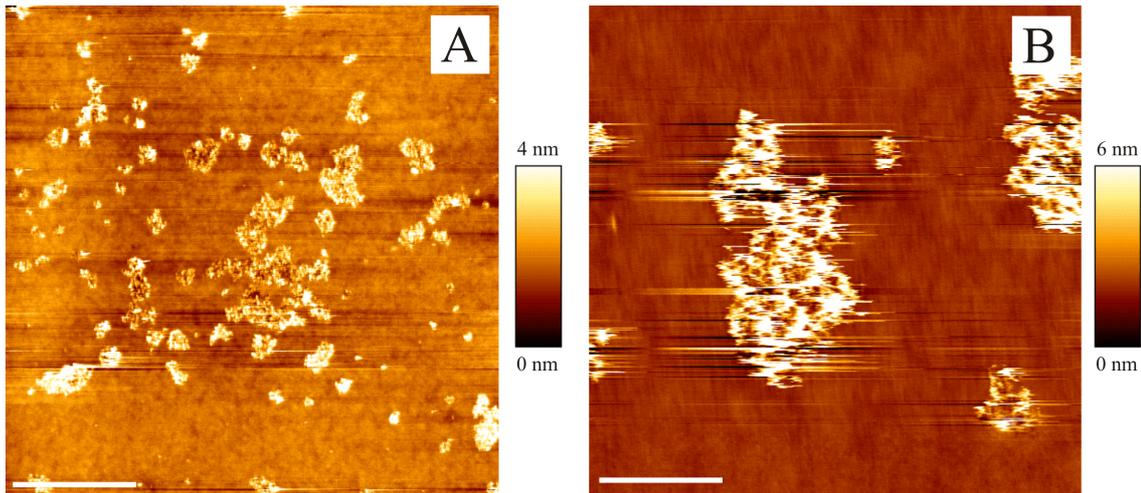


Abbildung 4.18: Topographische AFM-Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach der Inkubation mit 1,0 μM wt Nef über Nacht bei 4 °C. **A:** Maßstabsbalken : 5 μm , **B:** Maßstabsbalken: 1 μm . Die Aufnahmen wurden im *contact mode* aufgenommen. *cantilever:* CSC 38, Federkonstante: 0,03 N/m. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Die Bilder wurden im *contact mode* aufgenommen. In der topographischen Abbildung konnten nach der Inkubation mit Protein neben der planaren Membranoberfläche eine hellere und damit höhere Struktur visualisiert werden (Abbildung 4.18 A). Diese Strukturen sind den nichtfluoreszierenden Bereichen, welche in den Fluoreszenzaufnahmen sichtbar waren, in Größe, Form und Verteilung sehr ähnlich. Beim Abrastern von kleineren Bildausschnitten konnte die laterale Struktur noch detaillierter visualisiert werden (Abbildung 4.18 B). Die höhere Struktur indiziert, wie schon die Verteilung des FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörpers, dass HIV-1 wt Nef in diesen Bereichen zu finden ist. Insgesamt war es sehr schwierig die Strukturen abzubilden. Drückte die Messspitze des *cantilevers* während des Abtastvorgangs mit einer zu hohen Kraft auf die Probenoberfläche, so wurden diese Strukturen durch die Spitze heruntergedrückt oder das Protein wurde zum Teil durch den *cantilever* aus der Membran herausgerissen. In diesen Fällen wurde eine Vertiefung an diesen Stellen abgebildet. Daher konnte auch die Höhe der Proteincluster nicht bestimmt werden. Auch der für biologische Proben schonendere *intermittent contact mode* war zur Abbildung der Proben nicht geeignet. Hier zeigte sich in den meisten Fällen eine Höheninversion zwischen dem *Trace* und *Retrace*.

HIV-1 Nef G2A

Nachdem die Inkubation von wt Nef mit fluoreszenzmarkierten POPC-Membranen gezeigt hatte, dass das Protein die Bildung von nichtfluoreszierenden Bereichen in Lipidopelschichten induziert, wurde mit Hilfe der Mutante HIV-1 Nef G2A untersucht, welchen Einfluss das Fehlen des N-terminalen Lipidankers auf die Wechselwirkung mit POPC-Membranen hat.

Defektfreie Membranen wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei wt Nef mit Nef G2A inkubiert. Auch hier zeigte sich nach der Inkubation mit Nef G2A eine deutliche Veränderung der Membranfluoreszenz. Eine Vielzahl von nichtfluoreszierenden Bereichen konnte detektiert werden. Um das Protein auf der Probenoberfläche lokalisieren zu können, wurde die Membran für zwei Stunden mit einem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250) inkubiert. Anschließend wurde mit Puffer gespült, um nichtgebundenen Antikörper zu entfernen. In Abbildung 4.19 A ist die Fluoreszenz einer solchen mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran gezeigt. Durch die Zugabe des Antikörpers zeigte sich die Membranfluoreszenz unverändert.

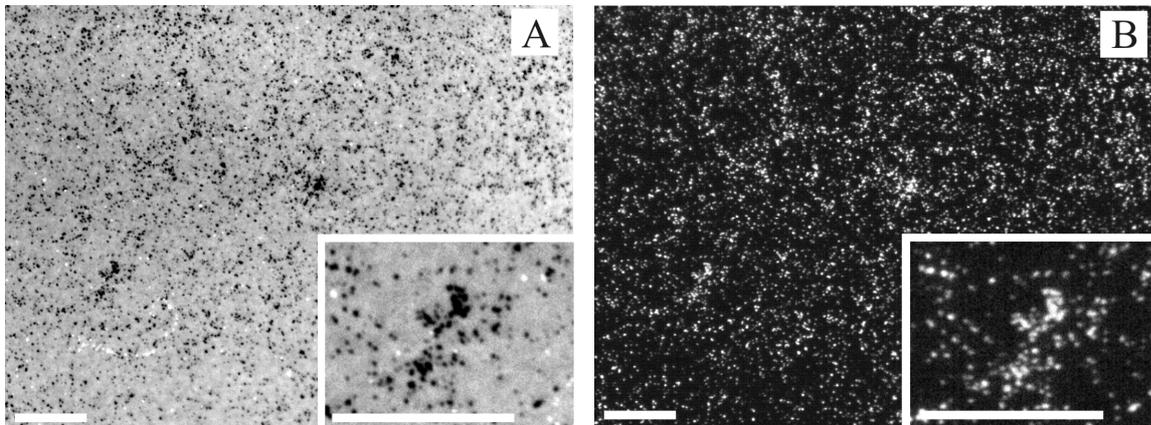


Abbildung 4.19: A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach der Inkubation mit 1,0 μ M Nef G2A über Nacht bei 4 °C und zweistündiger Inkubation mit dem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250) bei Raumtemperatur. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der FITC-Fluoreszenz des Antikörpers von derselben Stelle. Die Vergrößerungen zeigen Ausschnitte der jeweiligen Aufnahmen. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μ m.

In Abbildung 4.19 B ist die Fluoreszenz des Antikörpers derselben Stelle dargestellt. Es konnte ebenfalls eine nahezu perfekte Überlagerung der FITC-Fluoreszenz des Antikörpers mit den nichtfluoreszierenden Bereichen der Membranfluoreszenz beobachtet wer-

den. Zur Quantifizierung der nach der Inkubation mit Nef G2A erhaltenen Membranfluoreszenzbilder wurde der prozentuale Flächenanteil der nichtfluoreszierenden Bereiche mittels Pixelanalyse bestimmt. Im Mittel ergibt sich für Nef G2A ein prozentualer Anteil von $(4,4 \pm 2,6) \%$ ($n = 19$) nichtfluoreszierender Bereiche.

Um die nichtfluoreszierenden Bereiche in den Lipiddoppelschichten mit einer höheren lateralen Auflösung zu visualisieren, wurden die Proben mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht. In Abbildung 4.20 ist eine mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierte Membran bestehend aus POPC nach der Inkubation mit $1,0 \mu\text{M}$ Nef G2A über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gezeigt. Die Bilder wurden im *contact mode* aufgenommen.

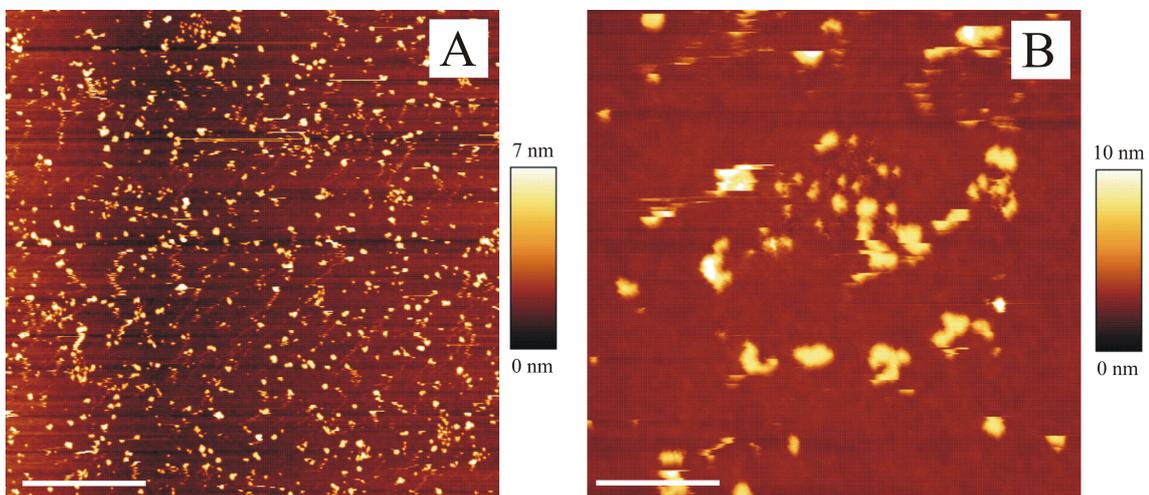


Abbildung 4.20: Topographische AFM-Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach der Inkubation mit $1,0 \mu\text{M}$ Nef G2A über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. **A:** Maßstabsbalken : $5 \mu\text{m}$, **B:** Maßstabsbalken: $1 \mu\text{m}$. Die Aufnahmen wurden im *contact mode* aufgenommen. *cantilever:* CSC 38, Federkonstante: $0,03 \text{ N/m}$. Puffer: 20 mM TRIS/HCl , 100 mM , 1 mM DTT , $\text{pH } 7,4$.

Die Oberfläche der Membran war nach der Inkubation mit dem Protein stark verändert. Eine Vielzahl von runden helleren und damit höheren Bereichen wurde beobachtet (Abbildung 4.20 **A**). Eine Vergrößerung dieser Strukturen ist in Abbildung 4.20 **B** dargestellt. Form, Größe, Anzahl und Anordnung dieser Erhöhungen stimmt gut mit den nichtfluoreszierenden Membranbereichen, welche mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet wurden, überein. Die Erhebung dieser Bereiche bestätigt, wie schon der FITC-konjugierte Antikörper, dass HIV-1 Nef G2A in diesen Strukturen lokalisiert ist.

Die Abbildung dieser Proben gestaltete sich schwierig, da das sehr weiche Proteinmaterial bei einer zu hohen Abtastkraft der Messspitze heruntergedrückt wurde und dann Tiefen abgebildet wurden. Zudem kontaminierte das Protein leicht die Messspitze und verfälschte so die Abbildung. Aufgrund dieser Probleme konnte die Höhe der Proteincluster nicht bestimmt werden. Insgesamt war die Abbildung von Proben, die mit Nef G2A inkubiert wurden, schwieriger als die Abbildung von Proben, welche mit wt Nef inkubiert wurden.

4.5.1.2 Visualisierung der Interaktion von HIV-1 Nef mit artifiziellen festkörperunterstützten Membranen unter dynamischen Inkubationsbedingungen

Um die mit dem Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskop durchgeführten Experimente besser mit den Ellipsometrie- und QCM-Messungen vergleichen zu können, wurden diese erneut mit POPC-Membranen unter Durchflussbedingungen wiederholt. Als weitere Vorteile ergeben sich aus den dynamischen Inkubationsbedingungen deutlich kürzere Inkubationszeiten und niedrigere einzusetzende Proteinkonzentrationen.

Zur Durchführung der Experimente wurden Membranen bestehend aus POPC dotiert mit 0,1 mol% TexasRed DHPE wie unter Kapitel 3.2.4 beschrieben auf Siliziumdioxid gespreitet. Anschließend wurden die Proben mit Puffer gespült, um überschüssige Vesikel zu entfernen.

Die TexasRed DHPE-Fluoreszenz einer solchen Membran ist in Abbildung 4.21 A dargestellt. Die homogene Fluoreszenz lässt auf die vollständige Ausbildung der Lipiddoppelschicht schließen. Die helleren Punkte auf der Oberfläche können an die Membran adsorbierten Vesikeln zugeordnet werden. Die Probe wurde ebenfalls mit dem AFM abgebildet. Eine planare Membran ohne Fehlstellen konnte visualisiert werden (vergleiche Abbildung 4.14 C). Wenn eine solche defektfreie Lipiddoppelschicht gegeben war, konnte sie mit HIV-1 Nef im Durchfluss mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min inkubiert werden. Die Inkubationszeit betrug stets zwei Stunden. Auch hier wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, um auszuschließen, dass die beobachteten Veränderungen der Membran auf die Durchflussbedingungen zurückzuführen sind. Hierzu wurde eine POPC-Membran ohne Protein unter den gleichen Bedingungen für zwei Stunden dem Durchfluss ausgesetzt und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.21 B dargestellt. In der repräsentativen Aufnahme ist keine Veränderung der Membranfluoreszenz zu beobachten. Auch beim an-

schließenden Abrastern der Membranoberfläche mittels AFM konnten keine Defekte abgebildet werden. Daraus kann gefolgert werden, dass die Lipiddoppelschicht unter den gegebenen Bedingungen stabil ist und Veränderungen nach der Inkubation mit HIV-1 Nef auf die Wechselwirkung des Proteins mit der Membran zurückzuführen sind.

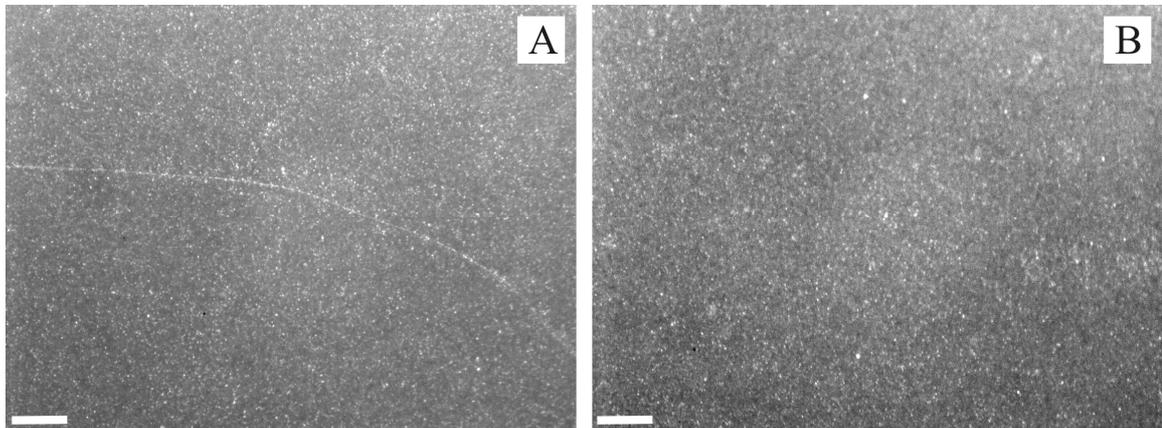


Abbildung 4.21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran. **A:** Direkt nach dem Spreiten und **B:** Kontrollexperiment, bei dem die Membran ohne Protein für 2 h in der Durchflusszelle mit Puffer inkubiert wurde. Die Pumpgeschwindigkeit betrug 0,25 mL/min. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μm .

HIV-1 wt Nef

Um den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Interaktion von wt Nef mit POPC-Membranen zu untersuchen und die bestmöglichste Konzentration für die Messungen zu finden, wurden unterschiedliche Konzentrationen von wt Nef bei Raumtemperatur durch die Messzelle für zwei Stunden mit einer Geschwindigkeit von 0,25 mL/min gepumpt. Anschließend wurden die Membranen mit Puffer gespült, um Protein, das nicht interagiert hatte, zu entfernen. Die Membranfluoreszenz wurde danach mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops visualisiert. Abbildung 4.22 fasst das Ergebnis dieser Konzentrationsreihe zusammen. Begonnen wurde mit einer Konzentration von 0,1 μM wt Nef (Abbildung 4.22 **A**). Abbildung 4.22 **B** zeigt das Ergebnis mit höherer Proteinkonzentration (0,2 μM). Des Weiteren wurden POPC-Membranen mit einer Konzentration von 0,5 μM wt Nef für 2 h im Durchfluss inkubiert (Abbildung 4.22 **C**). Abschließend wurde die Proteinkonzentration nochmals auf 1,0 μM erhöht. Dies ist in Abbildung 4.22 **D** dargestellt.

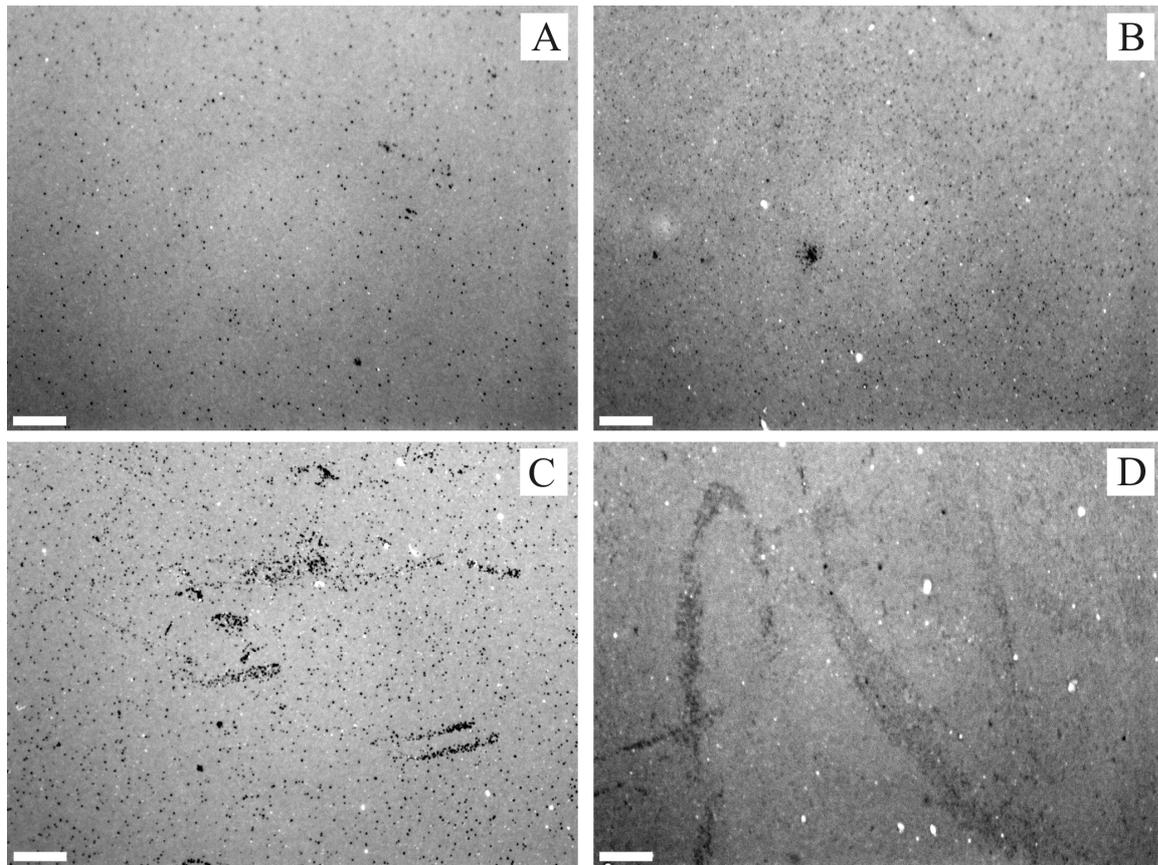


Abbildung 4.22: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer mit 0,1 mol% Texas-Red DHPE dotierten POPC-Membran nach der zweistündigen Inkubation mit A: 0,1 μM , B: 0,2 μM , C: 0,5 μM , D: 1,0 μM HIV-1 wt Nef im Durchflusssystem bei Raumtemperatur mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μm .

In allen Fällen war eine Veränderung der Membranfluoreszenz zu beobachten. Nach der Inkubation mit wt Nef waren viele nichtfluoreszierende Bereiche zu sehen. Die Anzahl dieser schwarzen Flecken nimmt mit Erhöhung der Proteinkonzentration von 0,1-0,5 μM zu. Eine weitere Steigerung der Konzentration auf 1,0 μM scheint nicht in einen weiteren Anstieg der Anzahl der lipidfreien Bereiche zu resultieren. Um diese Beobachtungen quantifizieren zu können, wurde eine detaillierte Pixelanalyse mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Bestimmt wurde dabei der prozentuale Flächenanteil der nichtfluoreszierenden Bereiche. Tabelle 4.5 fasst das Resultat der Pixelanalyse zusammen.

Tabelle 4.5: Prozentualer Anteil der nichtfluoreszierenden Bereiche der POPC-Membranen nach Inkubation mit HIV-1 wt Nef. *n*: Anzahl der analysierten Fluoreszenzbilder.

Konzentration / μM	Anteil der nichtfluoreszierenden Bereiche / %
0,1	$1,5 \pm 1,0$ ($n = 19$)
0,2	$3,3 \pm 1,7$ ($n = 8$)
0,5	$5,8 \pm 1,8$ ($n = 43$)
1,0	$4,7 \pm 1,6$ ($n = 14$)

Für die Inkubation mit 0,1 μM wt Nef ergab sich im Mittel ein prozentualer Anteil von nichtfluoreszierenden Bereichen von ($1,5 \pm 1,0$) %. Nach der Inkubation einer POPC-Membran mit 0,2 μM HIV-1 wt Nef betrug der Flächenanteil an schwarzen Punkten ($3,3 \pm 1,7$) %. Durch die Steigerung der Proteinkonzentration auf 0,5 μM erhöhte sich der mittlere Anteil an nichtfluoreszierenden Bereichen auf ($5,8 \pm 1,8$) %. Für 1,0 μM ergab sich ein Mittelwert von ($4,7 \pm 1,6$) %. Wie schon aus der Betrachtung der Fluoreszenzbilder vermutet, steigt mit einer Erhöhung der Proteinkonzentration auf 0,5 μM wt Nef der Anteil an nichtfluoreszierenden Bereichen. Eine weitere Steigerung auf 1,0 μM führte nicht zu einem größeren Anteil lipidfreier Bereiche.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde bei Messungen mit der Durchflusszelle stets mit einer Proteinkonzentration von 0,5 μM gearbeitet, da mit dieser Konzentration die maximale Interaktion beobachtet werden konnte. Zudem war diese auch schon bei Ellipsometriemessungen verwendet worden und erlaubt somit einen Vergleich der Ergebnisse. In weiteren Experimenten mit wt Nef, sollte herausgefunden werden, ob das Protein auch nach den Durchflussbedingungen in den nichtfluoreszierenden Bereichen lokalisiert ist. Hierzu wurden POPC-Membranen, welche vorher mit 0,5 μM wt Nef inkubiert worden waren, mit einem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250) versetzt. Dieser sollte spezifisch an den C-terminalen His₆-tag von HIV-1 Nef binden und somit die Position des Proteins visualisieren. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe mit Puffer gespült, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Membranen mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Abbildung 4.23 zeigt zum einen die Membranfluoreszenz (**A**) einer solchen Probe und zum anderen die FITC-Fluoreszenz des Antikörpers von derselben Stelle (**B**)

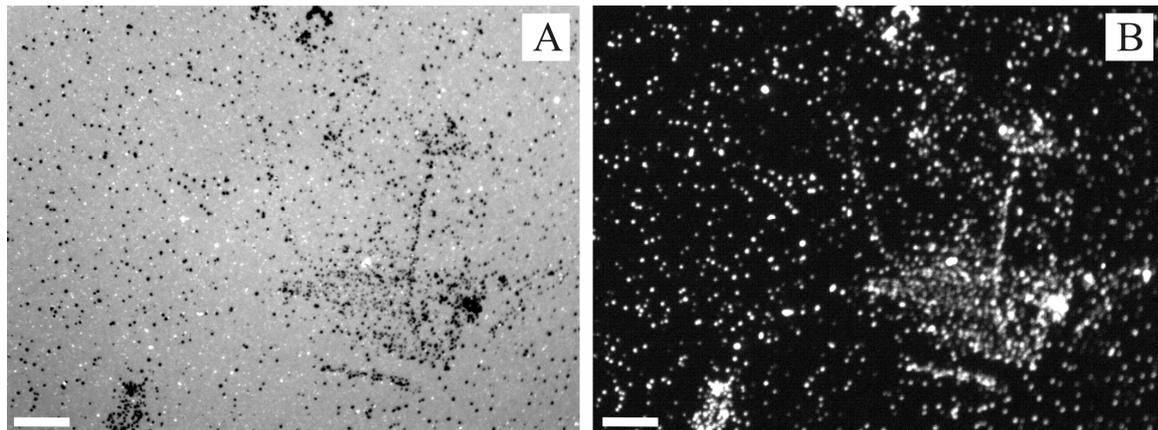


Abbildung 4.23: A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μM wt Nef mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min und zweistündiger Inkubation mit dem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250) bei Raumtemperatur. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der FITC-Fluoreszenz des Antikörpers von derselben Stelle. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μm .

Die Position der Fluoreszenz des Antikörpers stimmt nahezu perfekt mit der Position der nichtfluoreszierenden Bereiche überein. Somit konnte HIV-1 Nef in diesen Bereichen lokalisiert werden.

Um eine höhere Auflösung der Membranveränderung zu erzielen und die Topographie der Oberfläche abzubilden, wurden die Proben im *contact mode* rasterkraftmikroskopisch untersucht. Abbildung 4.24 zeigt AFM-Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus POPC nach der zweistündigen Inkubation mit 0,5 μM HIV-1 wt Nef im Durchfluss und anschließendem Spülen der Probe mit Puffer, um überschüssiges Protein zu entfernen. Die Zugabe des Proteins bewirkt eine starke Veränderung der Oberflächentopographie. Bei einer intakten Membran wäre eine glatte Oberfläche zu sehen. Hier jedoch wurde eine Vielzahl von punktuellen Erhebungen abgebildet (Abbildung 4.24 A).

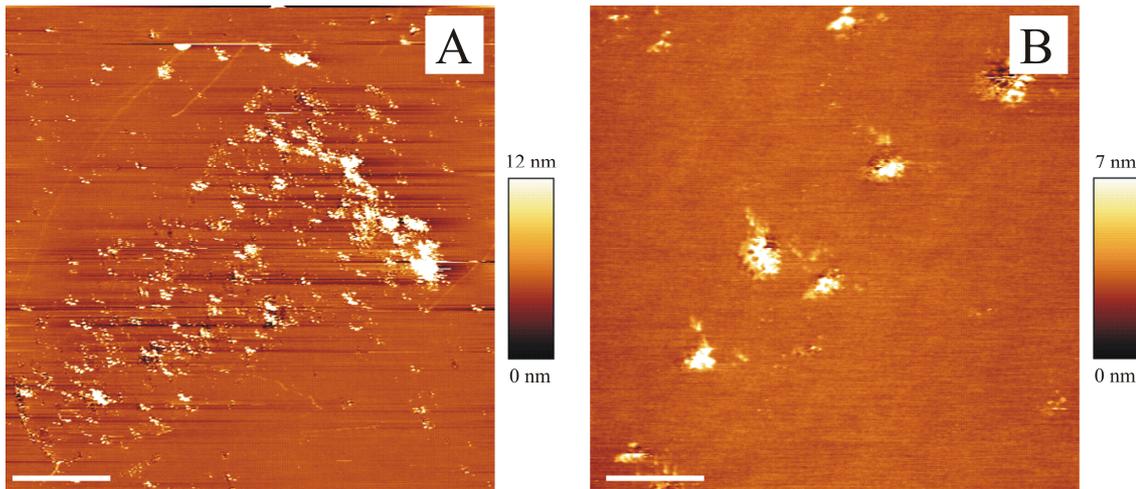


Abbildung 4.24: Topographische AFM-Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 µM wt Nef mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min bei Raumtemperatur. A: Maßstabsbalken: 7 µm, B: Maßstabsbalken: 1 µm. Die Aufnahmen wurden im *contact mode* aufgenommen. *cantilever*: CSC 38, Federkonstante: 0,03 N/m. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

In der in Abbildung 4.24 **B** gezeigten Vergrößerung lässt sich zudem eine Struktur dieser erhöhten Bereiche erkennen. Die Gestalt und Größe dieser Bereiche ähnelt stark den nichtfluoreszierenden Bereichen, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet wurden (vergleiche Abbildung 4.23 **A**). In Übereinstimmung mit dem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper konnte auch durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass wt Nef in den nichtfluoreszierenden Bereichen lokalisiert ist. Wie auch schon unter statischen Inkubationsbedingungen ließ sich die Topographie der Proben schwer abbilden. Das Protein kontaminierte beim Abtasten schnell den *cantilever* und verschmierte so die Abbildungen. Außerdem bewirkte auch hier eine zu hohe Kraft, mit der der *cantilever* die Probe abtastete, das Herunterdrücken oder Herausreißen von wt Nef aus der Membran.

HIV-1 Nef G2A

Die Experimente mit wt Nef zeigten, dass die Zugabe des Proteins auch unter dynamischen Inkubationsbedingungen in der Bildung von nichtfluoreszierenden Bereichen resultiert. Um den Einfluss des N-terminalen Myristoylankers zu untersuchen wurden im Folgenden Messungen mit nichtmyristoylierten Mutante HIV-1 Nef G2A durchgeführt. Zur Durchführung der Experimente wurden mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierte POPC-Membranen auf Siliziumdioxid durch Vesikelspreiten präpariert. Zeigten diese eine ho-

mogene TexasRed DHPE-Fluoreszenz, so waren sie vollständig ausgebildet und frei von Defekten. Sie konnten im Durchfluss mit einer konstanten Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min mit 0,5 μ M Nef G2A für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Um überschüssiges Protein zu entfernen, wurden die Proben danach mit Puffer gespült.

Das Hinzufügen des Proteins zu dem Durchflusssystem resultierte in der Entstehung von sehr vielen nichtfluoreszierenden Bereichen. Dass Nef G2A in diesen Bereichen lokalisiert ist, zeigte sich durch die anschließende zweistündige Inkubation mit einem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250) bei Raumtemperatur. In Abbildung 4.25 A ist die exemplarische Membranfluoreszenz einer solchen POPC-Membran nach der Inkubation mit Nef G2A und anschließender Inkubation mit dem Antikörper gezeigt. Die Fluoreszenz der Membran wurde durch die Zugabe des Antikörpers nicht verändert und es konnten immer noch viele nichtfluoreszierende Stellen visualisiert werden. Die Fluoreszenz des Antikörpers (Abbildung 4.25 B) konnte mit fast perfekter Überlagerung in den nichtfluoreszierenden Bereichen der POPC-Membran beobachtet werden.

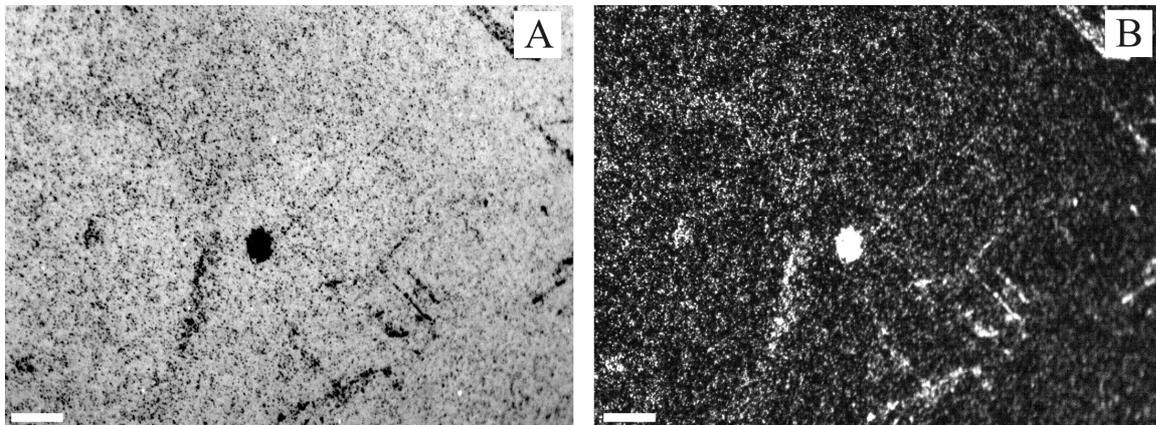


Abbildung 4.25: A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μ M Nef G2A mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min und zweistündiger Inkubation mit dem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250) bei Raumtemperatur. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der FITC-Fluoreszenz des Antikörpers von derselben Stelle. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Um die nach der Inkubation mit Nef G2A aufgenommenen Fluoreszenzbilder der POPC-Membran quantifizieren zu können, wurde mit Hilfe einer Pixelanalyse der Anteil der Fläche bestimmt, in dem keine fluoreszierenden Lipide mehr lokalisiert waren. Für Nef

G2A ergibt sich ein mittlerer Flächenanteil von $(6,4 \pm 2,4) \%$ ($n = 17$), welcher in der gleichen Größenordnung liegt wie der Wert der für wt Nef erzielt wurde.

Auch bei den Durchflusseexperimenten mit HIV-1 Nef G2A wurden die Proben, nachdem sie fluoreszenzmikroskopisch untersucht worden waren, mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops im *contact mode* abgebildet. In Abbildung 4.26 A ist ein repräsentatives Höhenbild einer POPC-Membran nach der Inkubation mit HIV-1 Nef G2A mit dazugehöriger Vergrößerung (Abbildung 4.26 B), dargestellt.

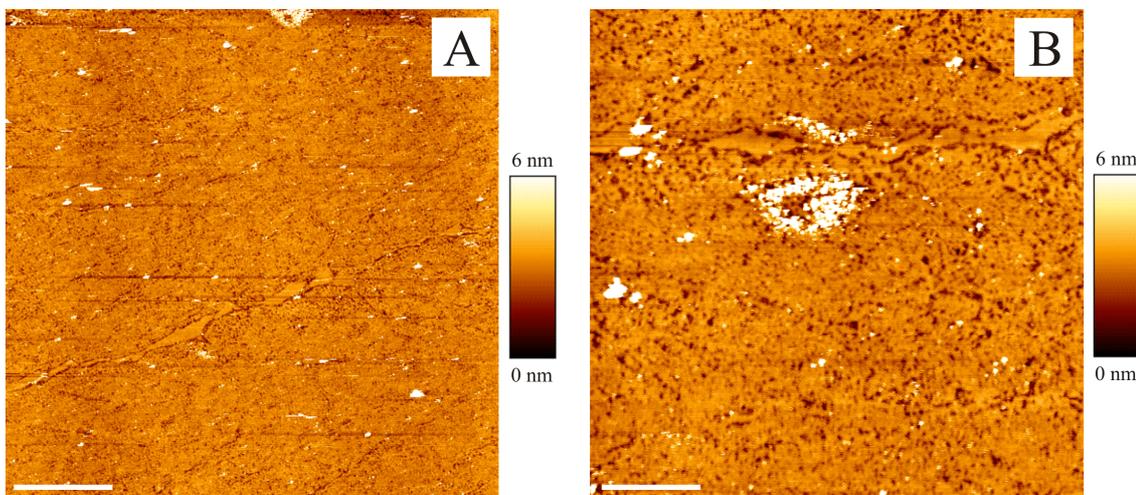


Abbildung 4.26: Topographische AFM-Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μM Nef G2A mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min bei Raumtemperatur. A: Maßstabsbalken: 6 μm , B: Maßstabsbalken 2 μm . Die Aufnahmen wurden im *contact mode* aufgenommen. *cantilever*: CSC 38, Federkonstante: 0,03 N/m. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Wie nach den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erwartet, konnte keine planare Membran abgebildet werden. Die Oberfläche war von einer Vielzahl von Vertiefungen übersät, die nur leicht tiefer waren als die Membranoberfläche. Die Form und Anordnung war auch hier den nichtfluoreszierenden Bereichen, welche mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert wurden, ähnlich. Zudem ließen sich auch Vertiefungen in Form von Streifen parallel zur Durchflussrichtung abbilden. Im Gegensatz zu den statischen Inkubationsbedingungen konnte keine Höhen abgebildet werden. Dies ist auf die schon angesprochenen Abbildungsprobleme zurückzuführen. Die Tiefe der Löcher spricht nicht für

Membrandefekte, welche 4-6 nm tief wären, sondern für durch leicht zu hohe Abtastkraft heruntergedrücktes Protein.

HIV-1 Nef KKAA

Nachdem die Zugaben von wt Nef sowie Nef G2A zu festkörperunterstützten POPC-Membranen in einer vergleichbaren Anzahl nichtfluoreszierender Bereiche resultierten, wurde nun der Einfluss des positiven Ladungsclusters auf die Interaktion des Proteins mit artifiziellen Membranen untersucht. Hierzu wurden Durchflusseexperimente mit der Doppelmutante Nef KKAA durchgeführt. Bei der Mutante Nef KKAA wurden zwei Lysine an den Positionen 4 und 7 durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt. Dadurch verringert sich die Anzahl der positiven Ladungen auf 5.

Zunächst wurden wieder POPC-Vesikel dotiert mit 0,1 mol% TexasRed DHPE, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, auf dem Substrat Siliziumdioxid gespreitet und die entstandenen Membranen anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop auf ihre Vollständigkeit hin überprüft. Zeigte sich eine homogene Membranfluoreszenz (siehe Abbildung 4.21 A), so konnten sie für die Durchflusseexperimente genutzt werden. Hierzu wurden sie für 2 h bei Raumtemperatur mit einer konstanten Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min mit 0,5 μ M Nef KKAA inkubiert. Danach wurden die POPC-Membranen mit Puffer gespült, um überschüssiges Protein zu entfernen. Statt einer homogenen TexasRed DHPE-Fluoreszenz wurde die Bildung von nichtfluoreszierenden Bereichen beobachtet, die zum Teil clusterartige Strukturen bildeten. Im Vergleich zum Wildtyp war die Anzahl dieser Bereiche jedoch geringer. Um herauszufinden, ob HIV-1 Nef KKAA in diesen dunklen Bereichen lokalisiert ist, wurde die Probe anschließend mit einem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250) bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Abbildung 4.27 A zeigt eine exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Membran nach der Inkubation mit Nef KKAA und anschließender Inkubation mit dem Antikörper. Die Struktur der nichtfluoreszierenden Membranbereiche wurde durch die Zugabe des Antikörpers nicht verändert.

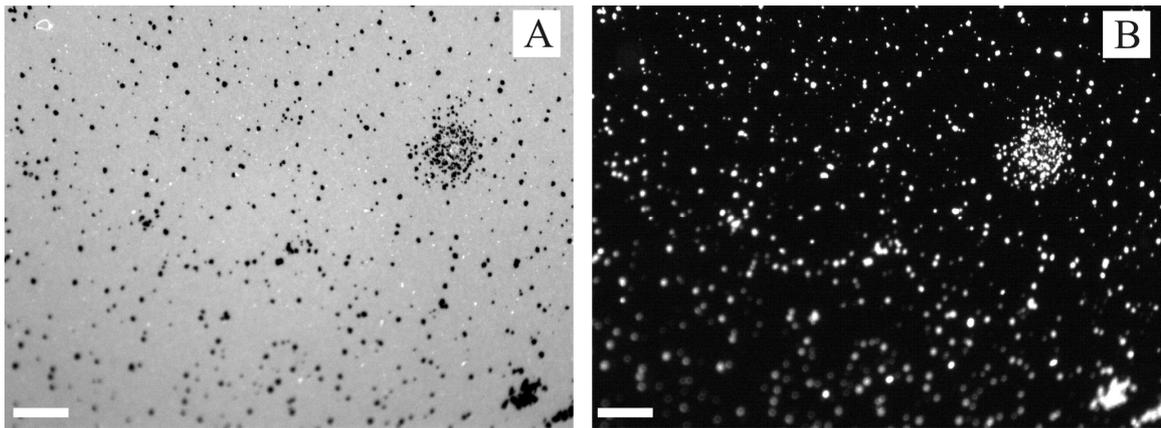


Abbildung 4.27: A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μM Nef KKAA mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min und zweistündiger Inkubation mit dem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250) bei Raumtemperatur. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der FITC-Fluoreszenz des Antikörpers von derselben Stelle. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μm .

Die Fluoreszenz des Antikörpers ist in Abbildung 4.27 **B** gezeigt und ist fast deckungsgleich mit den nichtfluoreszierenden Bereichen der Membranfluoreszenz. Um den prozentualen Flächenanteil dieser dunklen Bereiche zu bestimmen, wurde eine Pixelanalyse durchgeführt. Die Zugabe von 0,5 μM Protein in das Durchflusssystem führt zu $(1,7 \pm 1,1) \% (n = 36)$ nichtfluoreszierenden Fläche auf der POPC-Membran.

Nachdem die Proben mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops visualisiert wurden, wurde mittels AFM-Messungen versucht die Struktur der Membranveränderung abzubilden. Die Messungen wurden alle im *contact mode* durchgeführt. In Abbildung 4.28 ist die Topographie einer Membran bestehend aus POPC nach der zweistündigen Inkubation mit HIV-1 Nef KKAA gezeigt.

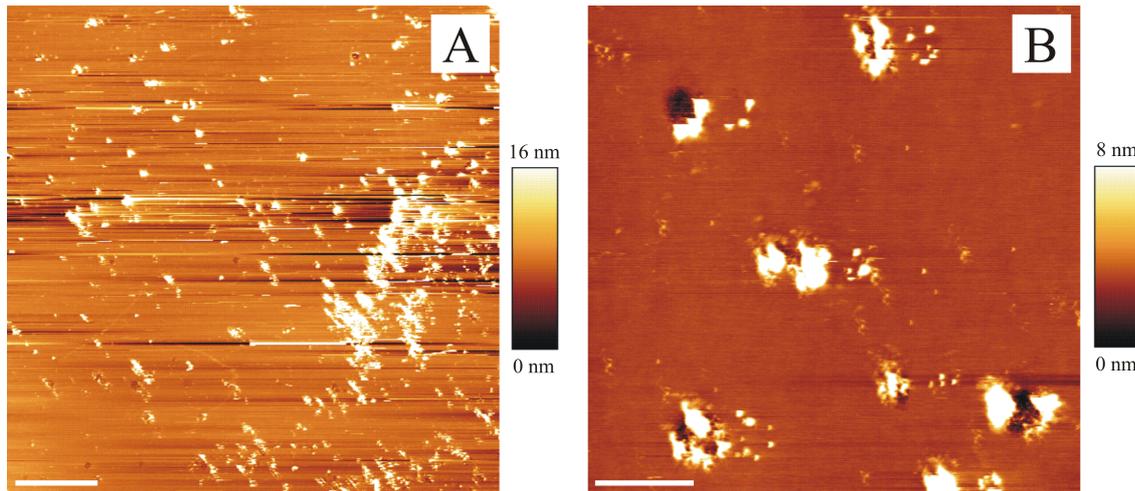


Abbildung 4.28: Topographische AFM-Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 µM Nef KKAA mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min bei Raumtemperatur A: Maßstabsbalken: 10 µm, B: Maßstabsbalken: 2 µm. Die Aufnahmen wurden im *contact mode* aufgenommen. *cantilever*: CSC 38, Federkonstante: 0,03 N/m. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Statt einer planaren intakten Membran wurden auf der Oberfläche viele Erhebungen, welche den nichtfluoreszierenden Bereichen glichen, abgebildet (Abbildung 4.28 A). Auch bei der Mutante Nef KKAA traten die schon beschriebenen Abbildungsprobleme auf. Besonders in der Vergrößerung des Bildausschnitts (Abbildung 4.28 B) werden diese deutlich. Durch eine etwas zu hohe bei der Abrasterung zwischen Messspitze und Probe wirkende Kraft wurde das Protein aus der Membran geschoben, weshalb neben der Erhebung auch eine Vertiefung abzubilden war. Auch kontaminierte das Protein leicht den *cantilever* und verschmierte so die Abbildung.

HIV-1 Nef R4A

Abschließend wurde untersucht, in wie weit sich eine weitere Reduzierung des positiven Ladungsclusters im N-Terminus von wt Nef auf die Wechselwirkung von Nef mit POPC-Membranen auswirkt. Hierzu wurden die Experimente unter den gleichen Bedingungen mit der Mutante Nef R4A durchgeführt. Bei diesem Protein wurden alle vier Arginine (Position 17, 19, 21, 22) auf der ersten α -Helix durch die ungeladene Aminosäure Alanin ersetzt und somit die Anzahl der positiven Ladungen auf 3 verringert.

Nachdem die POPC-Membranen gespreitet und auf ihre Qualität mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft worden waren, wurden sie für 2 h mit 0,5 µM Nef R4A im Durchfluss inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit Puffer gespült, um überschüs-

siges Protein zu entfernen. Die Membranfluoreszenz zeigte sich nach der Inkubation stark verändert. Neben helleren Punkten auf der Oberfläche, welche adsorbierten Vesikeln zugeordnet werden können, konnten auch nichtfluoreszierende Membranbereiche aufgenommen werden. Die Membranfluoreszenz veränderte sich auch nach anschließender Inkubation mit einem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper, welcher zur Lokalisierung des Proteins auf der Oberfläche zugegeben wurde, nicht. In Abbildung 4.29 A ist die Membranfluoreszenz einer solchen POPC-Membran dargestellt.

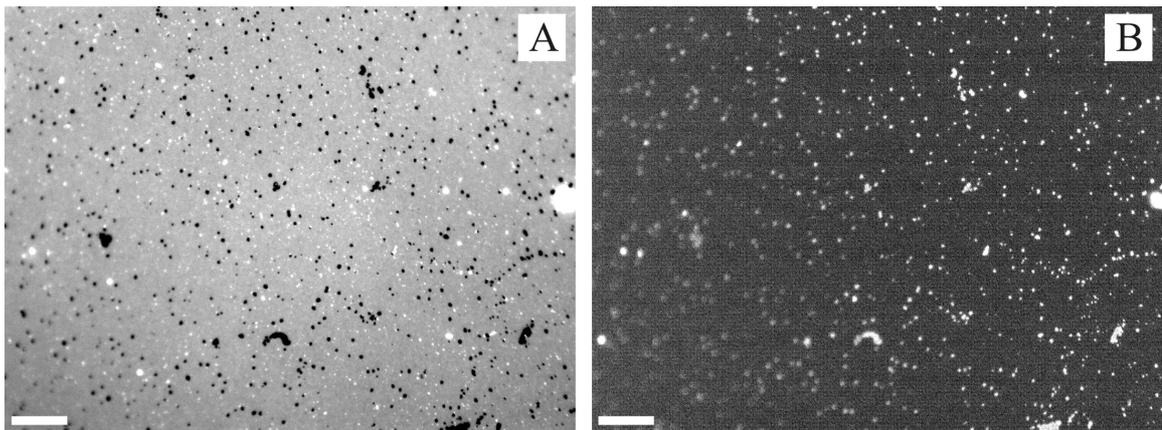


Abbildung 4.29: A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 µM Nef R4A mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min und zweistündiger Inkubation mit dem FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper (1:250) bei Raumtemperatur. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der FITC-Fluoreszenz des Antikörpers von derselben Stelle. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 µm.

Eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der FITC-Fluoreszenz des Antikörpers ist in Abbildung 4.29 B gezeigt. Die Fluoreszenz des Antikörpers überlagert sich mit den nichtfluoreszierenden Bereichen der Membranfluoreszenz und lokalisiert somit das Protein.

Zur Auswertung der erhaltenen Fluoreszenzbilder wurde eine detaillierte Pixelanalyse durchgeführt und so der prozentuale Flächenanteil bestimmt, welcher von den nichtfluoreszierenden Bereichen eingenommen wird. Für HIV-1 Nef R4A ergibt sich im Mittel ein Anteil von $(1,4 \pm 1,6) \%$ ($n = 32$) von nichtfluoreszierenden Bereichen, welcher geringer ist als der, der für wt Nef erzielt wurde.

Im Anschluss an die Charakterisierung der Probenoberfläche mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden dieselben Proben rasterkraftmikroskopisch untersucht. Die topographischen Aufnahmen entstanden im *contact mode*.

In Abbildung 4.30 **A** ist eine typische Höhenaufnahme einer POPC-Membran nach der Inkubation mit HIV-1 Nef R4A dargestellt. Eine Vergrößerung desselben Bildausschnitts zeigt Abbildung 4.30 **B**.

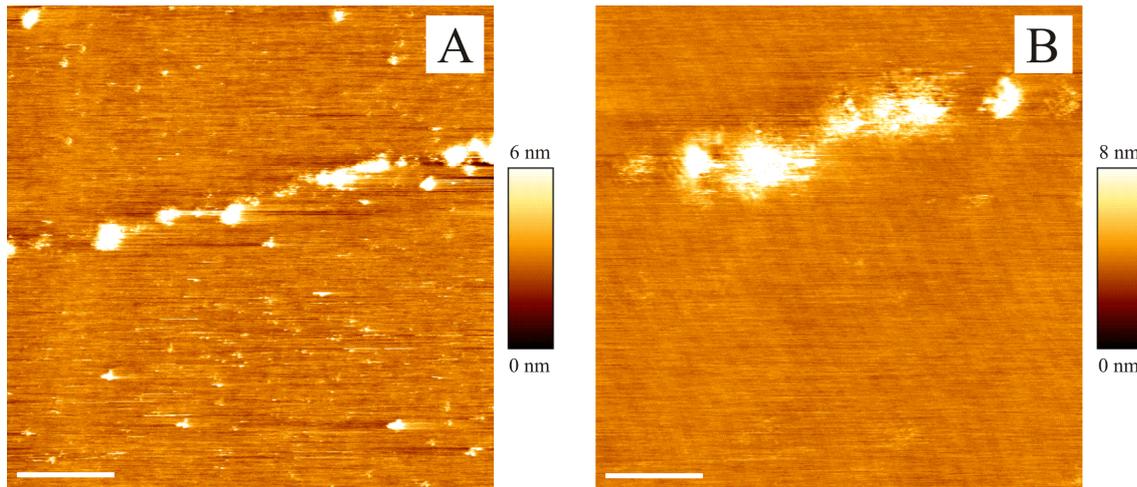


Abbildung 4.30: Topographische AFM-Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 µM Nef R4A mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min bei Raumtemperatur A: Maßstabsbalken: 5 µm, B: Maßstabsbalken: 1 µm. Die Aufnahmen wurden im *contact mode* aufgenommen. *cantilever*: CSC 38, Federkonstante: 0,03 N/m. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Auf der Oberfläche finden sich viele Erhebungen. Diese gleichen den nichtfluoreszierenden Bereichen in Form, Anzahl und Größe. So konnte durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden, dass Nef R4A in den nichtfluoreszierenden Bereichen der Membran lokalisiert ist.

4.5.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit artifiziellen festkörperunterstützten POPC-Membranen

Die Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit festkörperunterstützten POPC-Lipiddoppelschichten wurde im Rahmen dieser Arbeit unter zwei verschiedenen Inkubationsbedingungen untersucht.

Zunächst wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit 1,0 µM HIV-1 Nef inkubiert. Diese Experimente wurden mit wt Nef und Nef G2A durchgeführt. In beiden Fällen wurden nach der Inkubation mit dem jeweiligen Protein viele nichtfluoreszierende Bereiche in der Membranfluoreszenz detektiert. Mit Hilfe eines FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörpers konnte HIV-1 Nef in diesen Bereichen detektiert werden. Zur Quantifizierung der Membranfluoreszenzbilder wurde der Flächenanteil der nichtfluoreszierenden Bereiche bestimmt. Tabelle 4.6 fasst diese Ergebnisse zusammen.

Tabelle 4.6: Prozentualer Anteil der nichtfluoreszierenden Bereiche der POPC-Membranen nach der Inkubation über Nacht mit 1,0 µM wt oder 1,0 µM Nef G2A bei 4 °C. *n*: Anzahl der analysierten Fluoreszenzbilder.

Protein	Anteil der nichtfluoreszierenden Bereiche / %
HIV-1 wt Nef	4,5 ± 1,5 (<i>n</i> = 22)
HIV-1 Nef G2A	4,4 ± 2,6 (<i>n</i> = 19)

Nach der Inkubation der Lipiddoppelschicht bestehend aus POPC mit HIV-1 wt Nef konnte ein mittlerer Anteil von (4,5 ± 1,5) % an nichtfluoreszierenden Bereichen beobachtet werden. Für Nef G2A ergab sich ein ähnlicher Wert von (4,4 ± 2,6) %.

Zusätzlich zu den Fluoreszenzmikroskopiemessungen wurden dieselben Proben ebenfalls mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet, um die Struktur der nichtfluoreszierenden Bereiche mit einer höheren lateralen Auflösung zu visualisieren. Hier konnte HIV-1 Nef als Erhebung aus der Membranebene abgebildet werden. Die visualisierten Strukturen ähneln denen der nichtfluoreszierenden Bereiche und konnten so diesen zugeordnet werden. Um die mit dem Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskop erzielten Ergebnisse besser mit den aus Ellipsometriemessungen erhaltenen Daten vergleichen zu können, wurden festkörperunterstützte POPC-Membranen ebenfalls im Durchfluss mit 0,5 µM HIV-1 Nef für zwei Stunden bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Diese Messungen wurden neben dem Wildtyp Nef auch mit der N-terminal unmyristoylierten Mutante Nef G2A durchgeführt, um die Bedeutung des Membranankers zu untersuchen. Zudem wurde mit den Mutanten Nef KKAA und Nef R4A der Einfluss des positiven Ladungscusters charakterisiert.

Alle 4 Proteine bewirkten bei der Inkubation die Bildung von nichtfluoreszierenden Bereichen in der Membran. In diesen konnte wieder durch den FITC-konjugierten Antikör-

per HIV-1 Nef lokalisiert werden. Auch die unter Durchflussbedingungen erhaltenen Bilder der Membranfluoreszenz wurden einer Pixelanalyse unterzogen. In Tabelle 4.7 sind die daraus erhaltenen prozentualen Flächenanteile der nichtfluoreszierenden Bereiche für die einzelnen Proteine zusammengefasst.

Tabelle 4.7: Prozentualer Anteil der nichtfluoreszierenden Bereiche einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten POPC-Membran nach der Inkubation der Membranen für zwei Stunden mit 0,5 μ M wt Nef, Nef G2A, Nef KKAA oder Nef R4A im Durchflusssystem bei Raumtemperatur. Pumpgeschwindigkeit: 0,25 mL/min. *n*: Anzahl der analysierten Fluoreszenzbilder.

Protein	Anteil der nichtfluoreszierenden Bereiche / %
HIV-1 wt Nef	$5,8 \pm 1,8$ ($n = 43$)
HIV-1 Nef G2A	$6,4 \pm 2,4$ ($n = 17$)
HIV-1 Nef KKAA	$1,7 \pm 1,1$ ($n = 36$)
HIV-1 Nef R4A	$1,4 \pm 1,6$ ($n = 32$)

Für HIV-1 wt Nef wurde ein mittlerer Wert von ($5,8 \pm 1,8$) % für den Flächenanteil der dunklen Stellen erhalten. Die Inkubation der POPC-Membran mit HIV-1 Nef G2A resultierte in einer Bildung von ($6,4 \pm 2,4$) % nichtfluoreszierenden Bereichen, welche in derselben Größenordnung liegt wie der für wt Nef erzielte Wert. Die Reduzierung des positiven Ladungscusters im N-Terminus von HIV-1 Nef führte auch zu einer Verringerung der durch das Protein induzierten nichtfluoreszierenden Bereiche. Der mittlere Anteil war für die verwendeten Mutanten circa um den Faktor 4 kleiner. Für Nef KKAA wurde im Mittel ein Anteil von ($1,7 \pm 1,1$) % erhalten und für Nef R4A betrug dieser Anteil ($1,4 \pm 1,6$) %.

Auch hier wurden im Anschluss an die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dieselben Proben mit dem AFM vermessen. Hierbei wurden in allen Fällen die nichtfluoreszierenden Bereiche, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet wurden, Erhebungen auf der Probe, in denen das Protein lokalisiert ist, zugeordnet. Bei der Mutante Nef G2A wurden leichte Vertiefungen in der Membran detektiert.

Durch Kombination der hochauflösenden Methoden Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von festkörperunterstützten POPC-Membranen mit dem Protein in der Bildung von nichtfluoreszierenden Bereichen bezie-

ungsweise in einer Veränderung der Oberflächentopographie der Proben resultiert und das Protein in diesen nichtfluoreszierenden Bereichen lokalisiert ist. Diese Beobachtungen stützen die schon in den vorherigen Kapiteln aufgestellte Hypothese, dass Nef in der Lage ist die Stabilität von Membranen zu beeinflussen und Lipide aus dem Membranverband löst.

4.5.2 Visualisierung der Interaktion von HIV-1 Nef mit artifiziellen festkörperunterstützten Membranen bestehend aus POPC:POPS (4:1)

Wie schon erwähnt ist HIV-Nef in Wirtszellen auf der cytoplasmatischen Membranhälfte lokalisiert. Um diese Membranzusammensetzung nachzuahmen, wurde als Lipidmischung POPC:POPS im molaren Verhältnis von (4:1) gewählt. Mit dieser Lipidzusammensetzung konnte außerdem der Einfluss von negativ geladenen Lipiden auf die Wechselwirkung des Proteins mit Membranen untersucht werden. Zur Visualisierung der Membranen im Fluoreszenzmikroskop wurde auch dieses Lipidgemisch mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotiert. Zudem wurden die Proben mit dem Rasterkraftmikroskop charakterisiert. Durchgeführt wurden die Experimente mit diesem Membransystem stets unter Durchflussbedingungen. Untersucht wurde die membrandestabilisierende Wirkung mit den Proteinen HIV-1 wt Nef und seiner Mutante HIV-1 Nef R4A, um den Einfluss des positiven Ladungsclusters auf die Wechselwirkung mit negativ geladenen Membranen zu untersuchen.

4.5.2.1 Visualisierung der Interaktion von HIV-1 Nef mit artifiziellen festkörperunterstützten Membranen unter dynamischen Inkubationsbedingungen

Zur Durchführung der Experimente wurden als erstes Membranen bestehend aus POPC:POPS im molaren Verhältnis von (4:1) auf Siliziumdioxid in Anwesenheit von Calciumionen gespreitet (siehe Kapitel 3.2.4). Dann wurden die Proben mit calciumfreien Puffer gespült, um zum einen überschüssige Vesikel zu entfernen, zum anderen sollten auch die Calciumionen aus dem System entfernt werden, da diese sonst die negative Ladung der Membran abschirmen würden. Dann wurden die Lipiddoppelschichten mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. In den meisten Fällen zeigte sich nach dem Spreiten eine homogene Membranfluoreszenz (Abbildung 4.31 A), was für die Ausbildung einer defektfreien Lipiddoppelschicht spricht. Solche Membranen konnten im Durchfluss für

zwei Stunden mit $0,5 \mu\text{M}$ HIV-1 Nef inkubiert werden. Um auszuschließen, dass eventuelle Veränderungen der Membranfluoreszenz auf die Durchflussbedingungen zurückzuführen sind, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Hierzu wurde eine Membran unter den gleichen Bedingungen ohne Protein für zwei Stunden mit Puffer inkubiert. Danach zeigte sich keine Veränderung der Membranfluoreszenz (Abbildung 4.31 **B**).

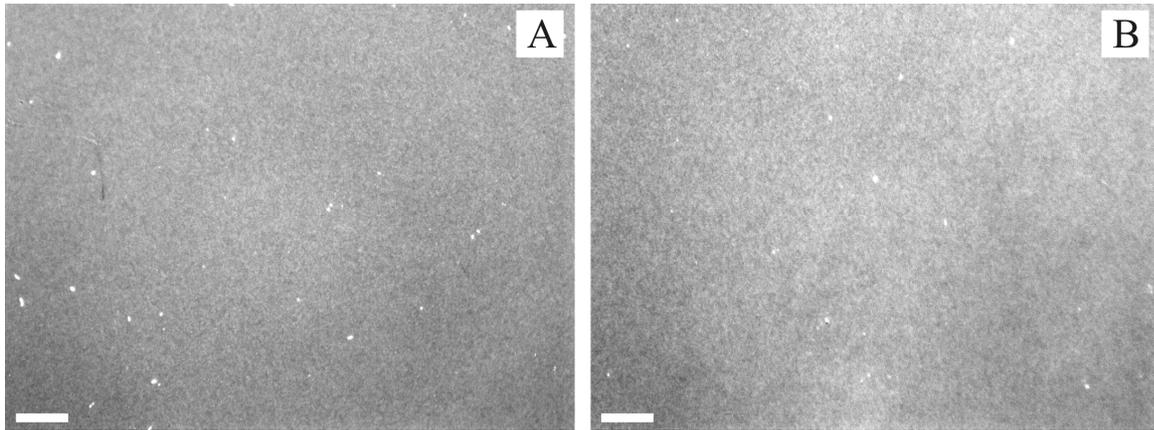


Abbildung 4.31: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer mit $0,1 \text{ mol}\%$ TexasRed DHPE dotierten Membran bestehend aus POPC:POPS (4:1). **A:** direkt nach dem Spreiten vor Proteinzugabe und **B:** Kontrollexperiment, bei dem die Membran ohne Protein für 2 h in der Durchflusszelle mit Puffer inkubiert wurde. Die Pumpgeschwindigkeit betrug $0,25 \text{ mL}/\text{min}$. Puffer: $20 \text{ mM TRIS}/\text{HCl}$, 100 mM NaCl , $\text{pH } 7,4$. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$.

Zum Teil waren nach dem Spreiten in der Fluoreszenz auch schwarze Bereiche sichtbar, die keine Membrandefekte darstellten, sondern mittels Rasterkraftmikroskopie als Membrandomänen identifiziert werden konnten. Form und Größe der Domänen konnte variieren. Zwei mögliche Beispiele sind in Abbildung 4.32 **A** und **B** dargestellt. Auch solche Membranen konnten, da sie defektfrei waren, mit Protein inkubiert werden.

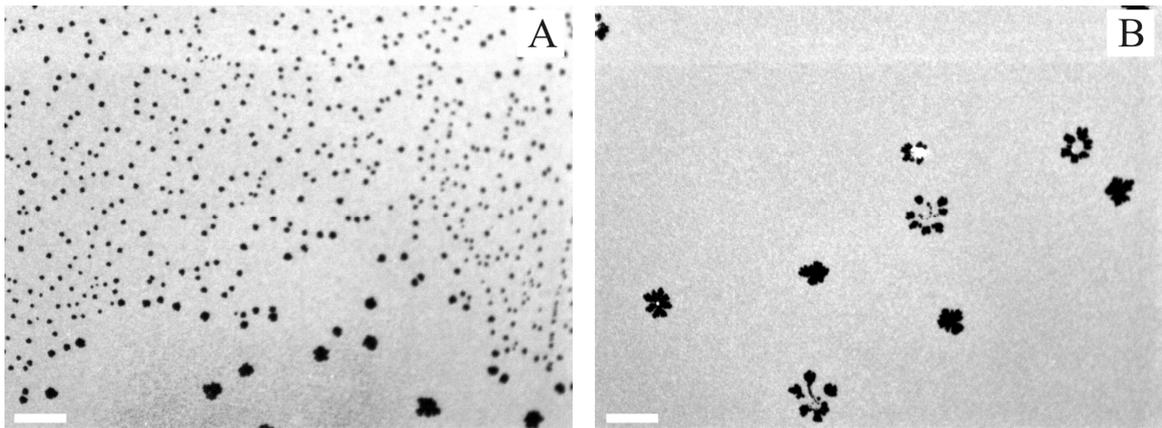


Abbildung 4.32: A/B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Membran bestehend aus POPC:POPS (4:1), die nach dem Spreiten und Spülen mit Puffer Domänen ausgebildet haben. Die Membran wurde zur Visualisierung mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotiert. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μm .

Zur genaueren Charakterisierung dieser Membranen wurden diese nach dem Spreiten mit dem AFM im *contact mode* abgebildet. Eine solche Membran ist in Abbildung 4.33 dargestellt. Waren direkt nach der Membranbildung in der Membranfluoreszenz keine Domänen sichtbar, so wurde auch im AFM eine planare Oberfläche abgebildet (Abbildung 4.33). Häufig induzierte aber das Abrastern der Oberfläche mit dem *cantilever* eine Domänenbildung. Dieser Vorgang ist in Abbildung 4.33 in zeitlicher Abfolge dargestellt. Im ersten Bild sind noch keine Domänen vorhanden, die Oberfläche ist sehr eben. Der Abtastvorgang wurde nach circa der Hälfte des Bildes, wegen der schlechten Abbildung, abgebrochen und neu begonnen. Das nachfolgende Bild ist circa 20 min später entstanden. Es haben sich bereits erste Domänen gebildet, die im Laufe der weiteren Abbildung der Probenoberfläche sowohl lateral als auch vertikal immer weiter anwachsen (drittes und viertes Bild in Abbildung 4.33). Dies indizieren auch die zu den Topographien gehörigen Höhenprofile. Die Domänen haben einen Durchmesser von etwa 5-10 μm und haben nach 60 min eine Höhe von $(1,5 \pm 0,3)$ nm erreicht. Die einzelnen Abbildungen der Oberflächentopographien sind im Abstand von circa 20 min entstanden. Die Domänen ließen sich auch bei anschließender Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop durch das Auftreten von großen nichtfluoreszierenden Bereichen wieder-finden (vergleiche Abbildung 4.32).

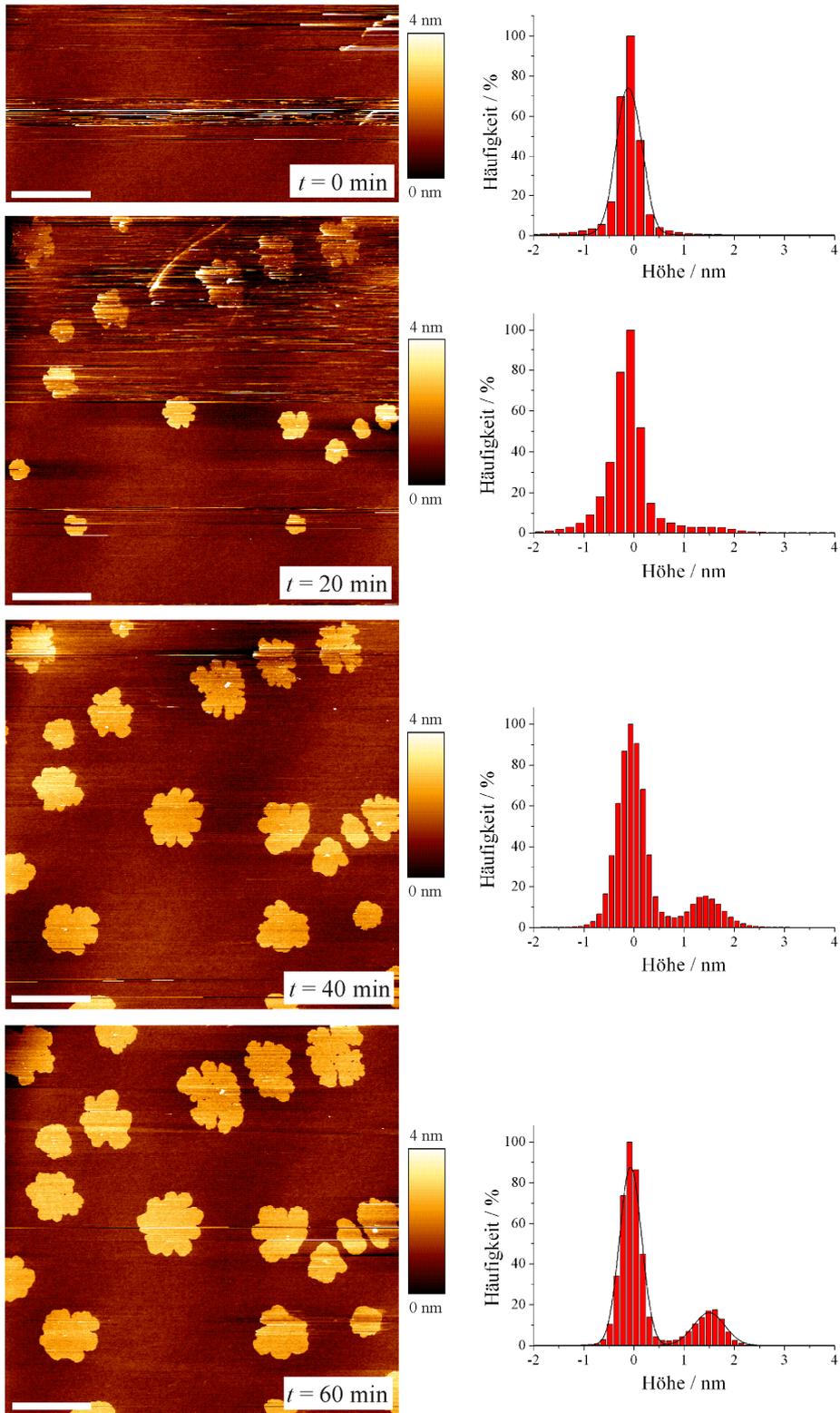


Abbildung 4.33: Topographische AFM-Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus POPC:POPS (4:1) direkt nach dem Spreiten mit dazugehörigem Höhenprofil. Die Domänenbildung ist zeitaufgelöst dargestellt. Die Messung wurde im *contact mode* durchgeführt. *cantilever*: CSC 38, Federkonstante: 0,03 N/m. Maßstabsbalken: 20 μ m. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4.

HIV-1 wt Nef

Um die Interaktion von HIV-1 wt Nef mit negativ geladenen Membranen zu untersuchen wurden festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten bestehend aus POPC:POPS im molaren Verhältnis von (4:1) dotiert mit 0,1 mol% TexasRed DHPE auf Siliziumdioxid präpariert und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops visualisiert. Waren die Membranen defektfrei, so wurden sie für zwei Stunden im Durchfluss mit 0,5 μM wt Nef bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Puffer gespült, um überschüssiges Protein zu entfernen. Die Probe wurde dann mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Hierbei konnten mehrere Phänomene beobachtet werden. Abbildung 4.34 fasst diese zusammen.

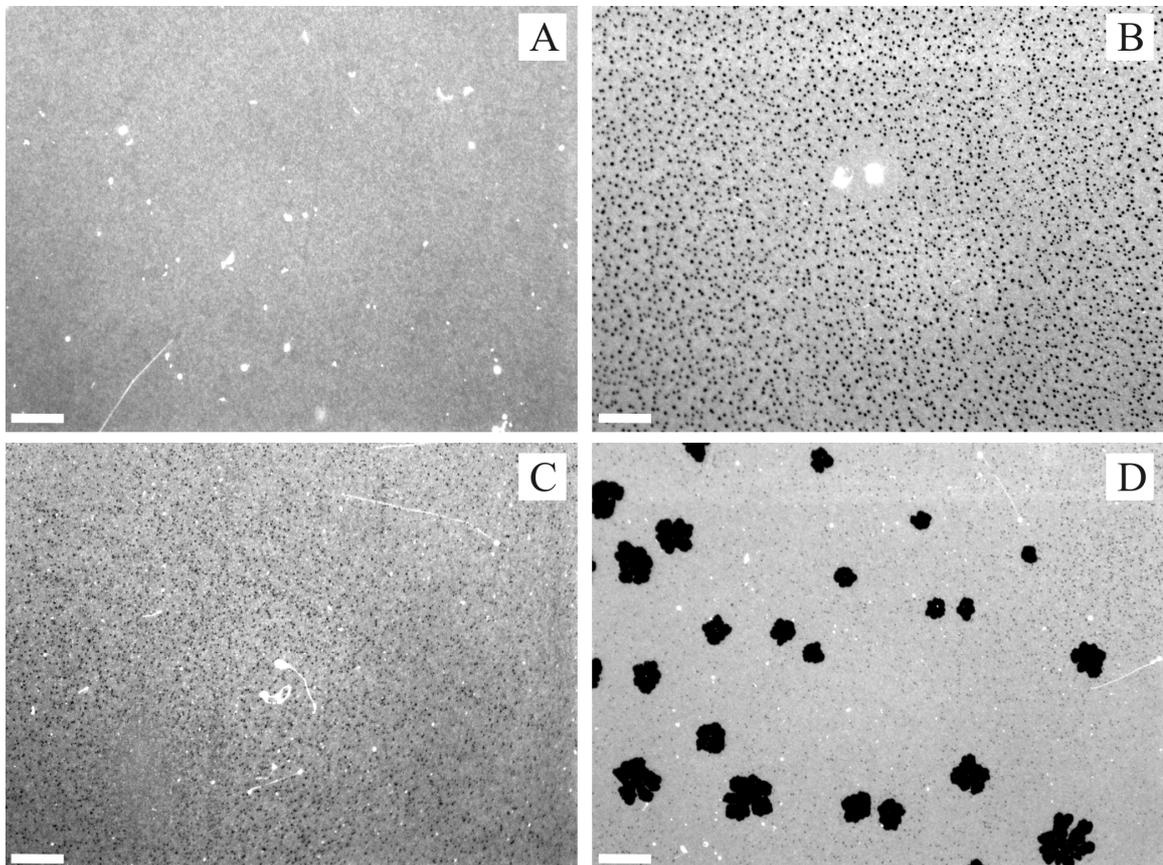


Abbildung 4.34: A/B/C/D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten Membran bestehend aus POPC:POPS (4:1) nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μM wt Nef bei Raumtemperatur im Durchflusssystem bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min. Maßstabsbalken: 20 μm . Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Bei manchen Proben konnte nach der Inkubation der Lipiddoppelschicht mit wt Nef keine Veränderung der Membran beobachtet werden. Die Membran leuchtete weiter homogen (Abbildung 4.34 **A**) oder im Falle von Domänenbildung vor der Inkubation mit Protein konnte auch hier keine Veränderung der Membranfluoreszenz detektiert werden (Abbildung 4.34 **B**). Dass es sich hierbei um Domänen handelte wurde auch in anschließenden Untersuchungen mit dem AFM gezeigt (vergleiche Abbildung 4.36). Die Bildung von nichtfluoreszierenden Bereichen induziert durch wt Nef konnte aber ebenfalls visualisiert werden. Teilweise ließen sich auch nichtfluoreszierende Streifen parallel zur Durchflussrichtung erkennen (Abbildung 4.34 **C**). Induzierte wt Nef die Bildung von diesen nichtfluoreszierenden Bereichen, unterschieden sich zum Teil schon verschiedene Stellen derselben Probe recht stark voneinander. Manche Bereiche der Probe waren fast vollständig intakt und nur wenige schwarze Flecken konnten visualisiert werden, an anderen Stellen der Probe waren sehr viele nichtfluoreszierende Bereiche zu sehen. Zudem bildeten sich während der Inkubationszeit Domänen aus. Auf dem in Abbildung 4.34 **D** gezeigten Fluoreszenzbild lassen sich neben den Domänen auch eine Vielzahl kleinerer nichtfluoreszierender Bereiche detektieren. Dies konnte auch durch rasterkraftmikroskopische Visualisierung der Membranoberfläche bestätigt werden (vergleiche Abbildung 4.36). Die helleren Punkte auf der Membranoberfläche sind Lipidvesikel, welche an der Membran haften. Sie ließen sich auch durch mehrfaches Spülen mit Puffer nicht entfernen.

Trotz der Inhomogenität der erhaltenen Fluoreszenzbilder wurde versucht diese zu quantifizieren. Wenn die Inkubation mit wt Nef die Bildung nichtfluoreszierender Bereiche induzierte, wurden die Fluoreszenzbilder einer Pixelanalyse unterzogen, um den prozentualen Anteil an nichtfluoreszierenden Bereichen zu bestimmen. Für wt Nef ergab sich hierbei ein Anteil von $(3,6 \pm 2,7) \%$ ($n = 21$). Der große Fehler spiegelt die oben erwähnte Heterogenität innerhalb einer Probe wider.

Der FITC-konjugierte Anti-His₆-tag-Antikörper konnte bei dieser Lipidmischung nicht zur Lokalisierung des Proteins auf der Probe verwendet werden, da er mit der Membran selbst wechselwirkte und homogen auf der Oberfläche verteilt war (Abbildung 4.36). Abbildung 4.35 **A** zeigt die TexasRed DHPE-Fluoreszenz einer Membran bestehend aus POPC:POPS (4:1) nach zweistündiger Inkubation mit dem FITC-konjugierten Antikörper. Die Membran fluoreszierte weiter homogen, die hellen Punkte können an die Membran adsorbierten Vesikeln zu geordnet werden. Abbildung 4.35 **B** zeigt die FITC-

Fluoreszenz des Antikörpers von derselben Probenstelle. Anhand der adsorbierten Vesikel lässt sich besonders gut die Überlagerung der Fluoreszenzen erkennen.

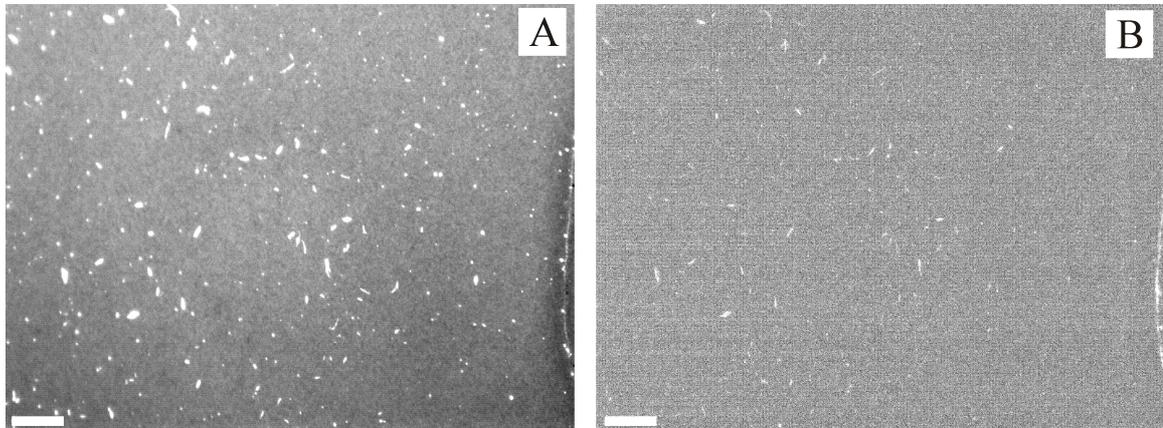


Abbildung 4.35: A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 0,1 mol/% TexasRed DHPE dotierten Membran bestehend aus POPC:POPS (4:1) nach zweistündiger Inkubation mit einem FITC-konjugierten (1:250). B: Fluoreszenz des Antikörpers von derselben Stelle. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μm .

Um die topographische Struktur der Probenoberfläche zu visualisieren, wurden die Proben mit Hilfe des AFMs charakterisiert. Die topographischen Aufnahmen wurden im *contact mode* erstellt.

In Abbildung 4.36 sind repräsentative AFM-Bilder einer Membran bestehend aus POPC:POPS im Verhältnis von (4:1) nach zweistündiger Inkubation mit HIV-1 wt Nef gezeigt. Konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop nach der Inkubation mit Protein keine Veränderung der Membranfluoreszenz detektiert werden (vergleiche Abbildung 4.34 A), so wurde auch mit dem Rasterkraftmikroskop eine planare Oberfläche abgebildet. Dies ist Abbildung 4.36 A dargestellt.

Wenn sich nach dem Spreiten der Vesikel bereits Domänen in der Membran gebildet hatten und nach der Inkubation mit Protein ebenfalls keine Veränderung der Membranfluoreszenz auftrat (vergleiche Abbildung 4.34 B), konnten die Domänen mit einer Höhe von 1,5 nm per AFM visualisiert werden. Allerdings waren die Proben mit Material kontaminiert, was eine Abbildung sehr schwierig machte. Ob es sich hierbei um Protein oder anderes Material handelte, konnte nicht festgestellt werden.

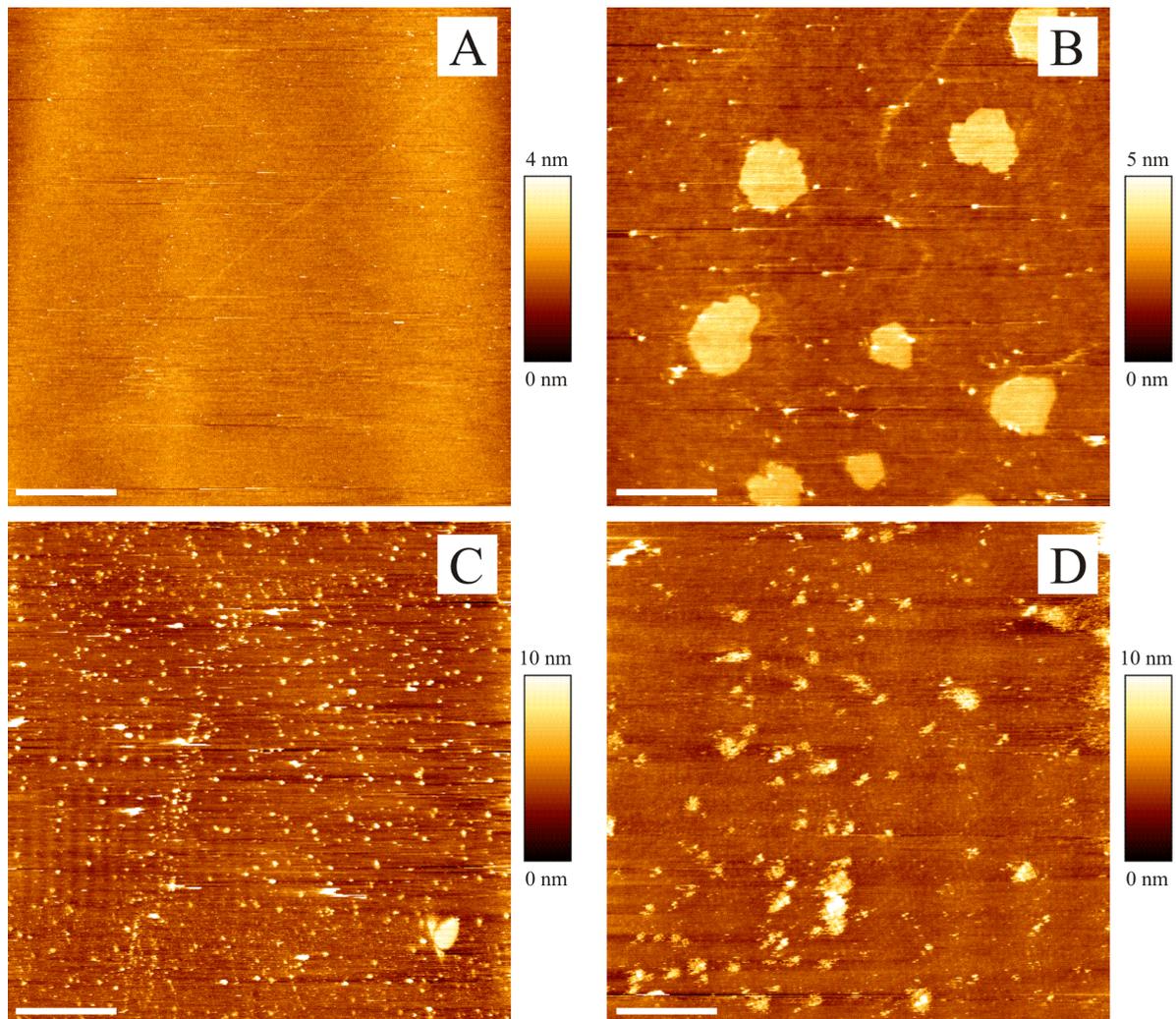


Abbildung 4.36: Topographische AFM-Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten Lipiddoppelschicht bestehend aus POPC:POPS (4:1) nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μM wt Nef bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min bei Raumtemperatur. A/C: Maßstabsbalken: 10 μm , B/D: Maßstabsbalken 2 μm . Die Aufnahmen wurden im *contact mode* aufgenommen. *cantilever*: CSC 38, Federkonstante: 0,03 N/m. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Des Weiteren ist in Abbildung 4.36 C eine topographische AFM-Aufnahme gezeigt, bei der nach der Inkubation mit wt Nef Erhebungen aus der Membranebene detektiert wurden. Eine Vergrößerung desselben Ausschnittes ist in Abbildung 4.36 D dar gestellt. Konnten solche Erhöhungen auf der Oberfläche abgebildet werden, so waren vorher unter dem Fluoreszenzmikroskop nichtfluoreszierende Bereiche sichtbar, die keine Domänen darstellten. Insgesamt war es sehr schwierig dieses Probensystem mittels Rasterkraftmikroskopie zu visualisieren. Neben den schon unter Kapitel 4.5.1 beschriebenen Problemen kam hier noch die spontane Domänenbildung während des Abbildungsvor-

gangs hinzu. Des Weiteren waren diese Proben trotz mehrfachen Spülens mit Puffer stärker mit Material kontaminiert als die POPC-Membranen. Dies verschmutzte leicht den *cantilever* und erschwerte somit die Abbildung der Oberfläche erheblich.

HIV-1 Nef R4A

Um den Einfluss des positiven Ladungscluster im N-Terminus von Nef auf die Wechselwirkung mit negativ geladenen Membranen zu untersuchen, wurden Experimente mit der Mutante Nef R4A durchgeführt. Lipiddoppelschichten bestehend aus POPC:POPS im molaren Verhältnis von (4:1) wurden, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, auf Siliziumdioxid gespreitet. Waren sie vollständig ausgebildet, so wurden sie für 2 h im Durchfluss bei einer konstanten Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min mit 0,5 μ M Nef R4A bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssiges Protein zu entfernen, wurden sie danach mit Puffer gespült. Anschließend wurde die Membranfluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dabei ergab sich wie schon bei wt Nef kein einheitliches Bild. Abbildung 4.37 gibt einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse. Zum einen konnte keine Veränderung der Membranfluoreszenz beobachtet werden. Die Membran zeigte weiterhin eine homogene Fluoreszenz (Abbildung 4.37 A). In einigen Fällen bildeten sich während der Inkubationszeit Domänen aus, ansonsten konnte aber keine Veränderung visualisiert werden (Abbildung 4.37 B). Zum anderen wurde aber auch die Bildung von nichtfluoreszierenden Bereichen induziert durch Nef R4A in der Membran beobachtet (Abbildung 4.37 C), die zum Teil auch clusterartige Strukturen bildeten (Abbildung 4.37 D). Diese Beobachtung konnte auch durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden.

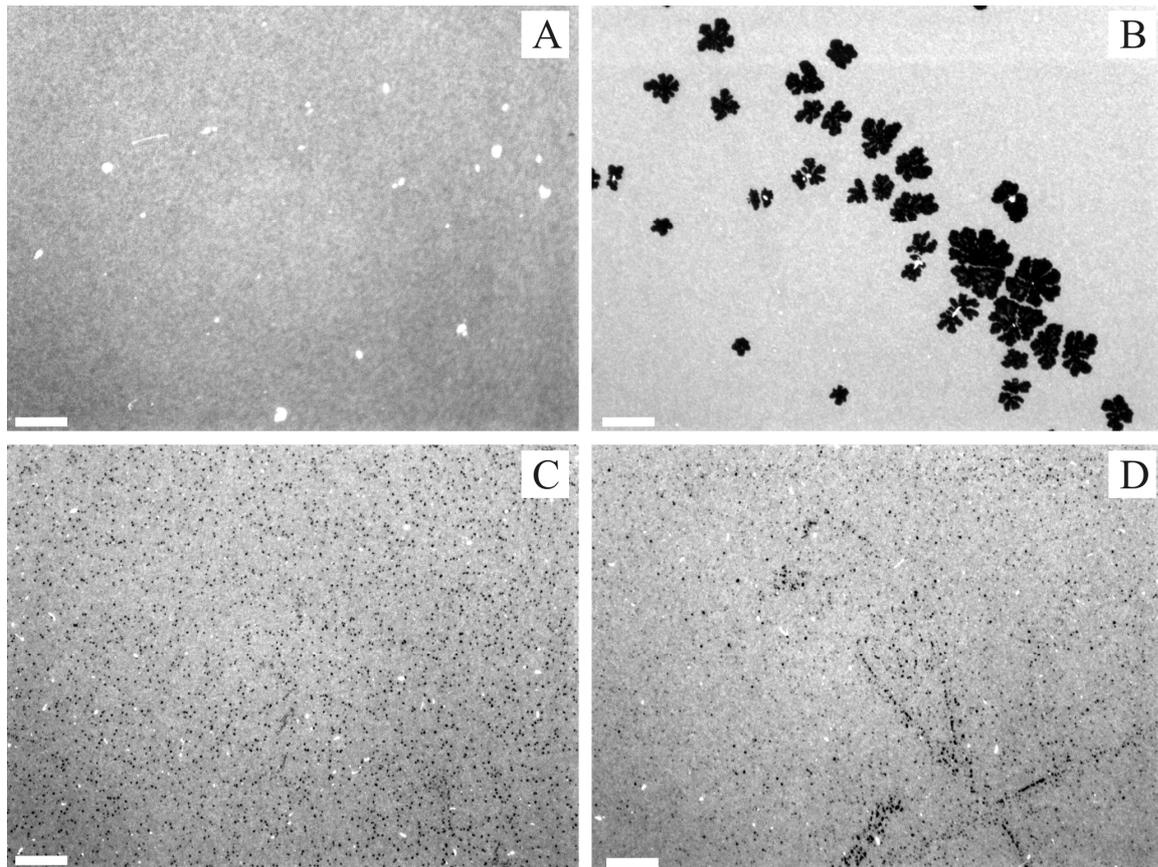


Abbildung 4.37: A/B/C/D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten Membran bestehend aus POPC:POPS 4:1 nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μ M Nef R4A bei Raumtemperatur im Durchflusssystem bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Die Proben, welche nach der Inkubation mit Protein nichtfluoreszierende Bereiche induziert durch HIV-1 Nef R4A aufwiesen, wurden zur Quantifizierung einer Pixelanalyse unterzogen. Hierbei wurde der Flächenanteil der nichtfluoreszierenden Stellen bestimmt. Für Nef R4A ergab sich hierbei ein mittlerer Anteil von $(2,5 \pm 1,5) \%$ ($n = 16$). Wie schon bei den Untersuchungen mit wt Nef zeigte sich auch bei den Proben, welche mit Nef R4A inkubiert worden waren und danach nichtfluoreszierende Bereiche, induziert durch das Protein, aufwiesen, eine Inhomogenität der Ergebnisse auf derselben Probe. An manchen Stellen interagierte Nef R4A sehr viel stärker mit der Membran als anderen. Dies spiegelt sich auch in dem großen Fehler wider.

Auch nach der Inkubation mit Nef R4A und der fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung, wurden dieselben Proben mittels AFM abgebildet. Wenn nach der Inkubation mit Nef R4A keine Veränderung der Membranfluoreszenz beobachtet werden konnte, so

wurde mit dem Rasterkraftmikroskop eine planare Membranoberfläche, vergleichbar mit Abbildung 4.36 A, abgebildet.

Des Weiteren trat der Fall auf, dass nach dem Inkubationszeitraum die Bildung von nichtfluoreszierenden Bereichen mit dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden konnten. Diese Bereiche konnten dann auch mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops abgebildet werden. Ein solches Beispiel ist in Abbildung 4.38 dargestellt.

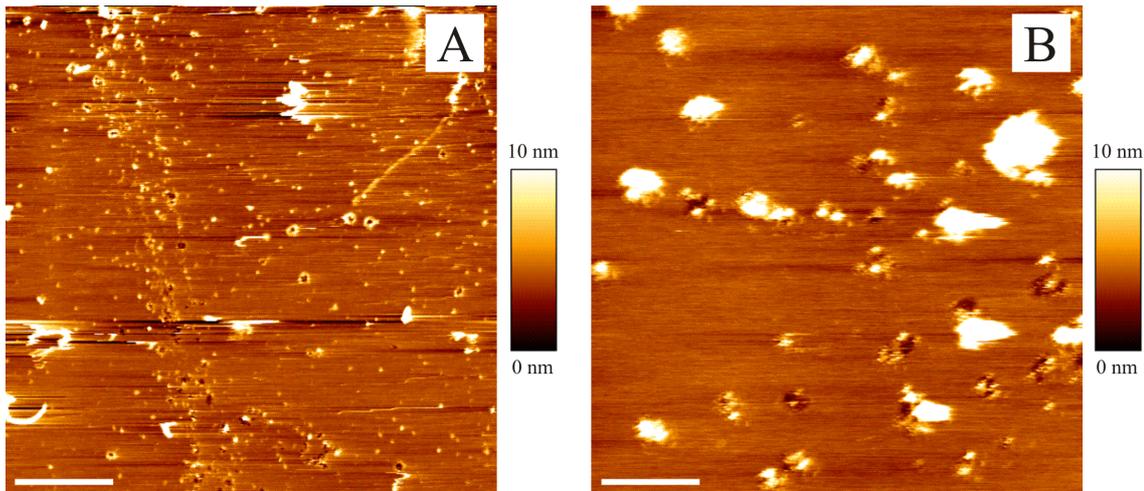


Abbildung 4.38: Topographische AFM-Aufnahmen einer mit 0,1 mol% TexasRed DHPE dotierten Lipiddoppelschicht bestehend aus POPC:POPS (4:1) nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 µM Nef R4A bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 mL/min bei Raumtemperatur. **A:** Maßstabsbalken: 10 µm, **B:** Maßstabsbalken 2 µm. Die Aufnahmen wurden im *contact mode* aufgenommen. *cantilever:* CSC 38, Federkonstante: 0,03 N/m. Puffer: 20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4.

Im ersten topographischen Bild (Abbildung 4.38 A) sind auch streifenartige Vertiefungen zu sehen, die auch schon in der Membranfluoreszenz sichtbar waren (vergleiche Abbildung 4.37 D). In Abbildung 4.38 B ist ein vergrößerter Ausschnitt der Probe dargestellt. Alle Aufnahmen wurden im *contact mode* erzielt. In beiden Bildern wird gut das schon erwähnte Abbildungsproblem, wenn die Probe mit einer leicht zu hohen Kraft abgerastert wird, sichtbar. Hierbei wird das Protein zum Teil heruntergedrückt und auch teilweise aus der Membran herausgezogen. Dies resultiert dann in Tiefen beziehungsweise, in Vertiefungen, die direkt neben Erhebungen lokalisiert sind.

Sowohl die Inkubation von festkörperunterstützten Membranen bestehend aus POPC:POPS (4:1) mit wt Nef als auch der Mutanten Nef R4A resultierte teilweise in der

Induzierung von nichtfluoreszierenden Bereichen. Mittels AFM-Technik konnte das jeweilige Protein in diesen Stellen lokalisiert werden. Diese Beobachtungen zeigen, wie schon die *Release*-Messungen an derselben Lipidmischung, dass HIV-1 Nef prinzipiell in der Lage ist auch die Stabilität von negativ geladenen Membranen zu beeinflussen. Allerdings muss aufgrund der Inhomogenität der erhaltenen Ergebnisse auf den festkörperunterstützten POPC:POPS (4:1)-Membranen die Quantifizierung dieses Effekts kritisch betrachtet werden.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Methoden die Wechselwirkung von *full length* HIV-1 Nef mit artifiziellen Membranen quantifiziert und visualisiert. Neben dem Einfluss des Myristoylankers am N-Terminus des Proteins auf die Interaktion mit Lipidmembranen wurde auch die Bedeutung des positiven Ladungsclusters untersucht. Hierzu wurden neben den Messungen mit dem Wildtyp Nef auch Experimente mit den Mutanten Nef G2A, welcher der N-terminale Lipidanker fehlt, sowie Nef KKAA und Nef R4A, welche eine verringerte positive Ladungsdichte besitzen, durchgeführt. Zudem wurde die Membranzusammensetzung variiert, um den Einfluss der Struktur und der Ladung verschiedener Lipide auf die Wechselwirkung mit HIV-1 Nef zu untersuchen. Zunächst sollen hier die Ergebnisse, welche mit Nef G2A erzielt wurden, denen von wt Nef gegenübergestellt und diskutiert werden. Im Anschluss soll der Einfluss des positiven Ladungsclusters diskutiert werden.

5.1 Untersuchung des Einflusses des N-terminalen Lipidankers von HIV-1 Nef auf die Wechselwirkung mit artifiziellen Membransystemen

In der Literatur wird postuliert, dass das HIV-1 Nef Protein mit Zellmembranen assoziiert sein muss, um seine Funktionen ausüben zu können. Daher wurde mittels eines Vesikel-cosedimentationsassays die Bindung der Proteine an unilamellare Vesikel untersucht. Allerdings konnte unabhängig von der Lipidzusammensetzung der Vesikel keine beziehungsweise keine stabile Bindung von HIV-1 wt Nef oder HIV-1 Nef G2A an Lipidmembranen festgestellt werden. Alle darauffolgenden Experimente, welche sowohl mit unilamellaren Lipidvesikeln als auch mit festkörperunterstützten Membranen durchgeführt wurden, deuten vielmehr daraufhin, dass sowohl HIV-1 wt Nef als auch Nef G2A in der Lage ist, die Struktur von Lipiddoppelschichten zu stören.

Dies zeigte sich bei *Release*-Messungen an unilamellaren Vesikeln in einer Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) aus diesen nach der Zugabe von HIV-1 Nef. In Abbildung 5.1 ist ein Überblick über die mittleren prozentualen Fluoreszenzintensitätsanstiege

nach Zugabe von entweder 0,02 μM wt Nef oder Nef G2A für alle verwendeten Lipidmischungen gegeben.

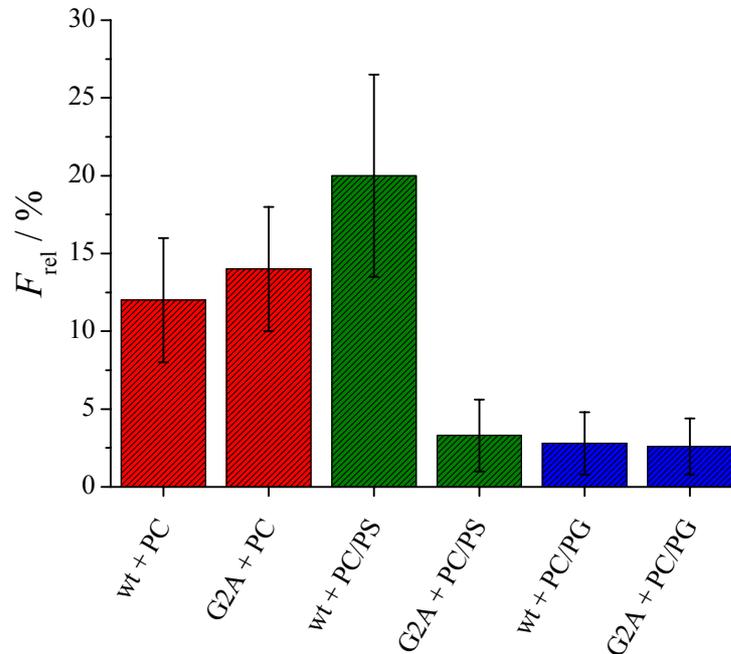


Abbildung 5.1: Übersicht über die gemittelten prozentualen Anstiege der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von entweder wt Nef oder Nef G2A zu unilamellaren Lipidvesikeln. Protein:Lipid-Verhältnis: 1:65.

Aus Abbildung 5.1 wird ersichtlich, dass die Freisetzung von CF aus POPC-Vesikeln (rote Balken in Abbildung 5.1) durch den Lipidanker des Proteins nicht beeinflusst wird. Dies ist auch bei der Lipidmischung POPC:POPG (4:1), welche die Lipidzusammensetzung der cytoplasmatischen Membranhälfte besser nachstellt als POPC, der Fall (blaue Balken in Abbildung 5.1). Hier sind die mittleren Anstiege des Fluoreszenzsignals, welche durch die Zugabe des Proteins induziert wurden, allerdings ungefähr um den Faktor 4,5 kleiner. Dies kann durch das Einbringen von negativer Ladung in die Membran erklärt werden. Wie schon in Kapitel 3.1.2 beschrieben, besitzt HIV-1 Nef innerhalb der ersten 26 N-terminalen Aminosäuren insgesamt sieben basische Aminosäuren in Form von Lysin und Arginin. Ist die Membran nun nicht mehr nur aus zwitterionischen Lipiden wie POPC aufgebaut, sondern enthält zusätzlich noch negativ geladene Lipide, so könnte Nef aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung stärker an die Membran binden und diese nicht mehr so stark destabilisieren. Dieses Phänomen wurde bereits von Ohki et al.⁸⁶

und Hinch et al.⁸⁷ bei *Release*-Messungen, welche mit Melittin durchgeführt wurden, beobachtet. Melittin ist ein aus 26 Aminosäuren aufgebautes Peptid mit einer molekularen Masse von 2850 Da und stellt den Hauptbestandteil des Bienengifts der westlichen Honigbiene dar. Es ist ein amphiphiles Peptid, welches insgesamt 6 basische Aminosäuren enthält. Von Melittin ist seit langem bekannt, dass es lytische Eigenschaften gegenüber Membranen besitzt.^{88, 89} Hinch et al. beobachteten, dass aus Vesikeln bestehend aus Phosphatidylcholin (PC) bei gleicher Konzentration Melittin um den Faktor 5 mehr CF freigesetzt wurde als aus Vesikeln bestehend aus Phosphatidylserin (PS). Ähnliches konnte auch Ohki et al. detektieren. Um aus PS-Vesikeln eine vergleichbare Menge CF wie aus PC-Vesikeln freizusetzen, mussten sie das Protein Lipid-Verhältnis um den Faktor 7 erhöhen.

Für die Lipidmischung POPC:POPS im molaren Verhältnis von (4:1) ergab sich entgegen der Erwartungen nach der Zugabe von wt Nef eine größere relative Fluoreszenzintensitätszunahme als die, die für wt Nef bei POPC-Vesikeln erzielt wurde. Dies zeigt, dass das Einbringen von negativer Ladung in die Lipiddoppelschicht nicht zwangsläufig in einer Verringerung der Freisetzung von CF resultieren muss. So wird zum Beispiel bei einer ganzen Reihe von antimikrobiell wirksamen tryptophan- und argininreichen Peptiden (zum Beispiel Indolicidin oder Tritrpticin) gerade durch das Einbringen von negativ geladenen Lipiden in Vesikel deren Fähigkeit Membranen zu destabilisieren erheblich gesteigert.^{90, 91} *Release*-Messungen mit diesen Peptiden zeigten, dass bei Verwendung von partiell negativ geladenen Vesikeln der lytische Effekt der Peptide viel größer ist als bei Vesikeln, die aus zwitterionischen Lipiden aufgebaut sind. Als Erklärung für diese Beobachtung wurde postuliert, dass diese Peptide sehr viel stärker in negativ geladene Membranen inserieren und so deren lytischer Effekt verstärkt wird. Warum sich bei wt Nef allerdings ein so großer Aktivitätsunterschied zwischen Vesikeln bestehend aus POPC:POPG (4:1) oder POPC:POPS (4:1) ergibt, bleibt ungeklärt. Bei wt Nef scheint die Interaktion mit negativ geladenen Lipiden stark vom strukturellen Aufbau der Kopfgruppe abzuhängen.

Die für wt Nef mit allen Lipidmischungen erzielten Ergebnisse stimmen gut mit Beobachtungen überein, die Holger Gerlach (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) in seiner Dissertation veröffentlichte.⁹² Er untersuchte mittels Fluoreszenz-*Stopped-Flow* Experimenten auf einer sehr kleinen Zeitskala mittels FRET-Effekt zwischen den Tryptophanen des Proteins und einem fluoreszenzmarkiertem Lipid (β -DPH-HPC) die Bindung von HIV-1 wt Nef an unilamellare Vesikel. Bei zwitterionischen Vesikeln beste-

hend aus DOPC: β -DPH-HPC (96:4) oder DOPC:DOPE: β -DPH-HPC (66:30:4) konnte er keine Bindung zwischen Nef und den Vesikeln beobachten. Bei Vesikeln bestehend aus DOPC:DOPG: β -DPH-HPC in verschiedenen molaren Verhältnissen konnte er hingegen eine Wechselwirkung in Form einer Bindung detektieren. Durch sogenannte PIP-Strip Experimente untersuchte er genauer den Einfluss der Lipidzusammensetzung der Vesikel auf die Bindung von Nef. PIP-Strips sind aus Nitrozellulosemembranen aufgebaut, die mit verschiedenen Lipiden dotiert sind. Mittels dieser PIP-Strips kann die Bindung von Proteinen an Lipide abgeschätzt werden. Auch hier zeigte sich, dass für ungeladene Lipide keine Bindung detektiert werden konnte. Vielmehr stellte er fest, dass negativ geladene Lipide für eine Interaktion des Proteins mit Membranen notwendig sind. Erstaunlicherweise stellte er aber bei dem einfach negativ geladenen Lipid POPS keine Bindung fest. Im Umkehrschluss lässt sich festhalten, dass er bei den Lipidzusammensetzungen eine Bindung von wt Nef detektieren konnte, die in den *Release*-Messungen kaum zu einer Freisetzung von CF führten. Induzierte wt Nef eine Membrandestabilisierung, die zu einem großen Austritt von CF führte, konnte er keine Bindung beobachten.

Einzig bei der Vesikelzusammensetzung POPC:POPS (4:1) scheint der Myristoylanker die Wechselwirkung zu beeinflussen, wie die *Release*-Messungen mit Nef G2A verglichen mit denen mit wt Nef zeigen (grüne Balken in Abbildung 5.1). Bei dieser Lipidmischung induzierte wt Nef eine circa sechsfach stärkere Freisetzung von CF als Nef G2A bei gleicher Konzentration. Für POPC:POPS (4:1) stimmt der mittlere prozentuale Anstieg der Fluoreszenzintensität für Nef G2A aber gut mit dem überein, welcher bei der Lipidmischung POPC:POPG (4:1) erzielt wurde. Abschließend lässt sich für die durchgeführten *Release*-Messungen festhalten, dass abgesehen von der Lipidmischung POPC:POPS (4:1) der Lipidanker des Proteins nicht der entscheidende Faktor für die Freisetzung von Farbstoff aus Lipidvesikeln ist. Des Weiteren zeigt sich, dass das Einbringen von negativer Ladung allein nicht zu einem Aktivitätsverlust von wt Nef führt, sondern vielmehr die Struktur der Kopfgruppe des Lipids eine entscheidende Rolle spielt. Dass HIV-1 Nef in der Lage sein könnte, Membranen zu destabilisieren und eventuell lytische Eigenschaften haben könnte, wurde bereits Mitte der 1990er Jahre diskutiert. Bei Experimenten mit Lipidvesikeln wurde 1994 von Curtain et al. ähnliches beobachtet.⁸¹ Sie führten Lichtstreuexperimente und Membranfusionsstudien mit Hilfe kleiner unilamellarer Vesikel bestehend aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) durch. Nach der Zugabe von nichtmyristoyliertem Nef sowie N-terminalen Nef-Fragmenten konnten sie sowohl eine Erhöhung der Streuung beobachten, als auch ein

lipid-mixing bei den Membranfusionsstudien detektieren. Diese Messungen fanden allerdings nicht unter physiologischen Bedingungen statt, sondern bei 42 °C, da DPPC bei Raumtemperatur in der Gelphase vorliegt und eine Hauptphasenumwandlungstemperatur von 41 °C besitzt. Die Messtemperatur von 42 °C ist als kritisch zu betrachten, da es Studien gibt, die belegen, dass HIV-1 Nef ab einer Temperatur von 44 °C beginnt zu denaturieren.⁹³

Des Weiteren konnten Fujii et al.⁹⁴ zeigen, dass die Zugabe von HIV-1 Nef zu CD4⁺ Zellen in niedrigen Konzentrationen das Wachstum der Zellen inhibiert und bei höheren Konzentrationen gar cytotoxisch wirkt. In weiteren Studien konnten Azad und Mitarbeiter beobachten, dass N-terminale Fragmente von Nef nach Zugabe zum Zelltod von Hefezellen und bakteriellen Zellen führen.^{95, 96} Die N-terminalen Fragmente bestanden mindestens aus den ersten 22 Aminosäuren des N-Terminus. Waren diese Fragmente zusätzlich N-terminal myristoyliert, so führten sie zum vollständigen Tod der Zellkolonien, während nichtmyristoylierte Fragmente lediglich 80 % der Zellen töteten. In einem anderen Zellaussay dieser Gruppe konnte beobachtet werden, dass die schon erwähnten Fragmente des Proteins ebenfalls auf CD4⁺ Zellen und *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) hämolytisch und cytotoxisch wirken.⁹⁷ In diesem Assay beobachteten sie, ähnlich zu den in dieser Arbeit durchgeführten *Release*-Messungen an Lipidvesikeln, die Freisetzung von Milchsäuredehydrogenase (LDH) aus den Zellen. Sie konnten zeigen, dass die myristoylierten Fragmente eine sehr viel höhere Aktivität gegenüber den Zellen zeigten als die entsprechenden nichtmyristoylierten. Dass das N-terminale Fragment von HIV-1 Nef überhaupt diese Fähigkeiten besitzt, führten sie auf die Ähnlichkeit der Peptidstruktur mit dem bekannten membranaktiven Peptid Melittin zurück.⁹⁸ NMR-Strukturuntersuchungen derselben Gruppe mit N-terminalen Nef-Fragmenten, die aus den ersten 26 Aminosäuren bestehen, zeigten, dass diese Fragmente wie Melittin in der Lage sind, eine amphiphile α -Helix in unpolarer, membranähnlicher Umgebung auszubilden. Allerdings ist diese weniger definiert als die α -helicale Struktur von Melittin.⁹⁹

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden im Gegensatz zu den erwähnten Studien mit dem *full length* Protein durchgeführt und nicht mit künstlich erzeugten amphiphilen Peptiden, wie sie die N-terminalen Fragmente des Proteins bilden. Auch konnte in den *Release*-Messungen lediglich beobachtet werden, dass das Protein zu einer transienten Membrandestabilisierung der Vesikel führt und nicht lytische Eigenschaften besitzt, was zu einer vollständigen Freisetzung des 5(6)-Carboxyfluoresceins führen würde.

Dass HIV-1 Nef in der Lage ist, Lipiddoppelschichten zu destabilisieren, zeigte sich auch in QCM-Experimenten mit artifiziellen festkörperunterstützten Membranen. Sowohl für Messungen mit wt Nef als auch mit der unmyristoylierten Mutante Nef G2A konnte für Membranen bestehend aus Oktanthiol als untere und POPC als obere Monoschicht ein Anstieg der Resonanzfrequenz des Quarzes beobachtet werden. Laut Gleichung 3.5 ist ein Anstieg der Frequenz mit einer Massenabnahme der auf dem Quarz aufgetragenen Schicht verbunden. Da das System nur aus Membran und zugegebenem Protein besteht, ist anzunehmen, dass durch Nef Lipide aus dem Membranverband der oberen beweglichen Monoschicht gelöst werden. Bei den durchgeführten Messungen zeigte sich allerdings kein einheitliches Bild für unter identischen Bedingungen durchgeführte Experimente. Dies ist vermutlich eher auf das Proben- beziehungsweise Membransystem zurückzuführen als auf eine nicht einheitliche Interaktion des Proteins mit der Lipiddoppelschicht.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten QCM-Messungen wurde das Membransystem aus zwei unterschiedlichen Monoschichten aufgebaut. Die untere bestand aus der Thiolverbindung Oktanthiol, welche an die Goldoberfläche über einen selbstorganisierenden Prozess chemisorbiert ist. Diese Monoschicht ist sehr rigide. So ist bekannt, dass eine auf Gold (Au(111)) chemisorbierte Oktanthiolmonoschicht in einer dicht gepackten kristallinen Phase vorliegt.^{100, 101} Die obere Monoschicht wird durch das Spreiten von Lipidvesikeln mit gewünschter Zusammensetzung erzeugt. Ein solches Membransystem ist zur Untersuchung von Proteinadsorption an Membranen geeignet. Wenn ein Protein wie HIV-1 Nef nicht an die Membran bindet, sondern Lipide aus dem Membranverbund löst, ist dieses System kritisch zu betrachten, da anzunehmen ist, dass die Bindung von Nef über eine periphere hinausgeht. Die kristallartige Struktur der Oktanthiolschicht verhindert möglicherweise die Integration von Nef in die Membran. Durch die Chemisorption der Thiole an die Goldoberfläche ist es dem Protein wahrscheinlich auch nicht möglich Teile der unteren Monoschicht herauszulösen. Es ist denkbar, dass die Rigidität der unteren Monoschicht zum Teil eine Interaktion des Proteins mit der Membran verhindert. Dies könnte erklären, warum in einigen Fällen ein Anstieg, in anderen dagegen gar keine Änderung der Resonanzfrequenz zu beobachten war.

Da in der Literatur postuliert wird, dass eine Subpopulation von HIV-1 Nef in *lipid rafts* lokalisiert ist, wurden neben Lipiddoppelschichten bestehend aus OT/POPC auch Messungen mit Lipiddoppelschichten bestehend aus OT/(POPC:SM:Chol 2:1:1), welche die *lipid rafts* nachstellen, mit wt Nef durchgeführt. Beide Membransysteme lieferten das

gleiche Ergebnis. Auch bei dieser Lipidmischung konnte ein Anstieg der Resonanzfrequenz nach Zugabe von HIV-1 wt Nef beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass Lipide aus dem Membranverbund der oberen Monoschicht herausgelöst werden. In der Hälfte der Fälle, bei denen die *raft*-ähnliche Lipidmischung verwendet wurde, nahm nach der zweiten Proteinzugabe die Resonanzfrequenz ab. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich das Protein oder micellare Strukturen, welche sich aus Lipiden und Protein zusammensetzen, in die entstandenen Löcher in der oberen Monoschicht einlagern und somit die Masse auf dem Quarz erhöhen und zu einer Frequenzerniedrigung führen.

Auffällig ist bei fast allen QCM-Messungen, dass der durch HIV-1 Nef induzierte Frequenzanstieg sehr viel größer ist als der, der sich theoretisch für die komplette Ablösung der oberen Lipidmonoschicht berechnen lässt. Für einen starren, dünnen, gleichmäßig verteilten Film ergibt sich folgender linearer Zusammenhang zwischen Massen- und Frequenzänderung:

$$\Delta m = -\frac{C_f}{n} \Delta f \quad (5.1)$$

mit n : Zahl der Oberschwingung. Für einen 5 MHz Quarz verwendeten Pfeiffer et al.¹⁰² 2008 einen Wert für die Sauerbreykonstante (C_f) von $17,7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$, welcher bereits 1959 von Sauerbrey veröffentlicht wurde. Unter Verwendung dieser Konstante ergibt sich für POPC als obere Monoschicht bei vollständiger Ablösung eine maximale Frequenzänderung von 10,2 Hz und für die Lipidmischung POPC:SM:Chol (2:1:1) ein maximaler Frequenzanstieg von 8,9 Hz.

Diese Berechnung berücksichtigt jedoch nicht, dass auch Dichte und Viskosität des umgebenden Mediums einen Einfluss auf die integrale Schichtwägemempfindlichkeit haben. Janshoff et al.¹⁰³ bestimmten mittels Kupferabscheidung auf dem Quarz in Flüssigkeiten die Konstante zu $C_f = 27,8 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$. Wird dieser Wert zur Berechnung der Änderung der Resonanzfrequenz genutzt, so ergibt sich ein $\Delta f_{\text{max}} = 6,5 \text{ Hz}$ bei vollständiger Ablösung der oberen Monoschicht bestehend aus POPC, für SM:POPC:Chol (2:1:1) ergibt sich $\Delta f_{\text{max}} = 5,6 \text{ Hz}$. Unabhängig von gewählten C_f liegen die berechneten Δf_{max} -Werte in der gleichen Größenordnung, weichen aber stark von den experimentell beobachteten ab. Im Experiment lagen die beobachteten Frequenzerhöhungen zwischen 10-50 Hz. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine vollständige Ablösung der oberen Monoschicht unwahrscheinlich ist, wie die Ergebnisse, die mittels Ellipsometrie, Fluoreszenz- und

Rasterkraftmikroskopie erhalten wurden, bestätigen. Das heißt, der starke Frequenzanstieg muss durch andere Faktoren hervorgerufen werden. So spielt neben der Massenänderung auf dem Schwingquarz auch die Rauigkeit der Oberfläche eine Rolle.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Ist die Oberfläche des Schwingquarzes rau, so wird die durch die Schwingung verursachte Bewegung der Flüssigkeit komplexer als bei einer glatten Oberfläche. Durch die Disassemblierung der Lipide in der Membran durch HIV-1 Nef wird die Oberfläche rauer. Zudem spielen viskoelastische Effekte eine große Rolle. Beim Herauslösen der Lipide aus der oberen Monoschicht bilden sich wahrscheinlich micellare Strukturen, die aus Protein und Lipid bestehen. Diese Strukturen haben im Gegensatz zu der rigiden Lipiddoppelschicht viskoelastische Eigenschaften. Während ein auf dem Quarz aufgebrachteter steifer Film keine Auswirkungen auf Resonanzfrequenz hat, stellt ein viskoelastischer Film einen gekoppelten Oszillator dar.¹⁰⁷ Durch die Quarzschwingung kann Energie in das System dissipieren und so die Frequenz der Schwingung beeinflussen, ohne dass eine Massenänderung stattgefunden hat. Dass viskoelastische Filme zu einer Erniedrigung der Resonanzfrequenz der Quarzschwingung führen, zeigten Höök und Kasemo.¹⁰⁸ Sie verfolgten den Prozess des Spreitens von Vesikeln auf Siliziumdioxid mit Hilfe der QCM-D-Technik. Nach der Vesikelzugabe detektierten sie eine Frequenzerniedrigung und einen Anstieg in der Dissipation. Sie führten dies auf die Anlagerung der Vesikel an die Oberfläche zurück, welche dort eine viskoelastische Schicht bilden. Durch das Spreiten der Vesikel stieg die Resonanzfrequenz an und die Dissipation ging bis fast auf null zurück, da sich eine rigide Membran bildete. Dies bedeutet für die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, dass die Einlagerung von viskoelastischen, micellaren Strukturen bestehend aus Protein und aus dem Membranverbund herausgelöstem Lipid in den meisten Fällen unwahrscheinlich ist, da dies eine Erniedrigung der Resonanzfrequenz zur Folge hätte. Weitere Faktoren, die die Frequenz der Quarzschwingung beeinflussen, sind die Hydrophobie der Oberfläche und die an die Oberfläche gekoppelten Wasserschichten. Bei einer hydrophilen Oberfläche sind die Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken an diese gekoppelt und werden zur Schwingung angeregt. Diese Wasserschichten stellen einen viskoelastischen Film dar und können eine 4-1000fach höhere Viskosität haben als die aus der *bulk* Phase.^{109, 110} Es wurde außerdem bestimmt, dass das gekoppelte Wasser zu einer 1,5-4fachen Überbestimmung der eigentlichen Massenabscheidung führen kann.¹¹¹⁻¹¹⁴ Wird nun während der Messung ein Wechsel von einer hydrophilen zu einer hydrophoben Oberfläche vollzogen, so werden die Wassermoleküle höher geordnet, sind aber durch das Fehlen von Wasserstoffbrücken von der Oberfläche entkoppelt. Dies be-

deutet, dass die Wassermoleküle keine viskoelastische Schicht mehr bilden und somit eine Erhöhung der Frequenz der Quarzschwingung zu beobachten ist. Durch das Entfernen von Lipiden aus der oberen Monoschicht werden die hydrophoben Teile der unteren Monoschicht exponiert und treten in Kontakt mit Puffer. Es ist zu vermuten, dass der stellenweise Wechsel von hydrophiler zu hydrophober Oberfläche die Frequenz der Quarzschwingung maßgeblich beeinflusst und somit der durch HIV-1 Nef induzierte Massenverlust überbestimmt wird. Da all diese Faktoren neben der eigentlichen Protein-Membran-Wechselwirkung die Resonanzfrequenz beeinflussen, kann zwar das eigentliche Phänomen der Membrandestabilisierung beobachtet werden, eine Quantifizierung dieses Effekts ist anhand der vorliegenden Messdaten jedoch nicht möglich.

Daher wurde zur Beobachtung und Quantifizierung der Interaktion von HIV-1 Nef mit Lipiddoppelschichten das Membransystem gewechselt. Alle folgenden Experimente wurden mit Membranen durchgeführt, die durch das Spreiten von LUVs auf Siliziumdioxid präpariert wurden. Der Vorteil der so erzeugten Lipiddoppelschichten liegt in der höheren Flexibilität und Mobilität. Zudem sind beide Monoschichten der Membran aus Phospholipiden aufgebaut und stellen so natürliche Membranen besser nach als OT/Lipid-Doppelschichten. Zur Quantifizierung der Wechselwirkung des Proteins mit Membranen wurden unter anderem Ellipsometriemessungen durchgeführt. Vergleichbar zur QCM-Technik können mittels Ellipsometriemessungen Adsorptions- und Desorptionsprozesse zeitaufgelöst verfolgt werden. Hierbei werden Veränderungen in der Schichtdicke des Systems detektiert. Die oben genannten Faktoren beeinflussen die Ellipsometriemessungen nicht. Die Zugabe des Proteins resultierte in einer Verringerung der Gesamtschichtdicke des Systems. In Abbildung 5.2 ist eine Übersicht über die Schichtdickenänderungen der auf SiO_2 gespreiteten POPC-Membranen gegeben.

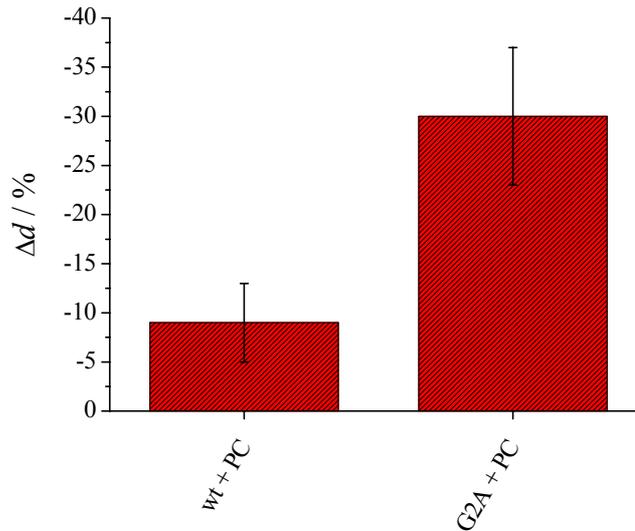


Abbildung 5.2: Übersicht über die prozentuale Schichtdickenabnahme der Membran nach Zugabe von 0,5 μM Protein.

Auch aus den Ellipsometrimessungen wird deutlich, dass der Myristoylankers des Proteins nicht entscheidend für die Interaktion von Nef mit Lipiddoppelschichten ist. Die QCM- und Ellipsometrimessungen zeigen aber, unabhängig von gewählten Membransystem, dass die Zugabe von Nef in einem Materialverlust resultiert. Somit stützen diese Ergebnisse die nach den *Release*-Messungen und deren Einordnung in die Literatur formulierte Hypothese, dass HIV-1 Nef in der Lage ist die Struktur von Membranen zu stören.

Mit Hilfe der fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischen Experimente wurde die Destabilisierung der Membranen visualisiert. Es wurde nicht nur die Rolle des N-terminalen Myristoylankers charakterisiert, sondern auch der Einfluss der Proteinkonzentration sowie die Bedeutung der Inkubationsbedingungen auf die Membrandestabilisierung.

In Abbildung 5.3 ist ein Überblick über den mittleren Anteil nichtfluoreszierender Membranbereiche nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von wt Nef gezeigt.

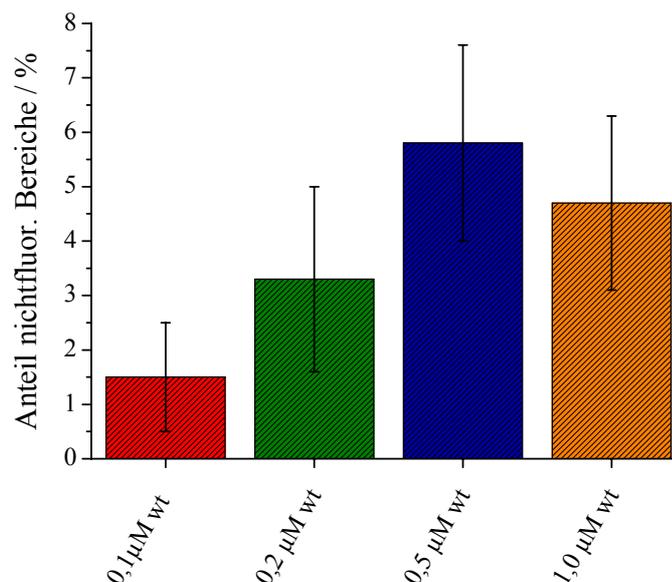


Abbildung 5.3: Übersicht über die Anteile nichtfluoreszierender Bereiche nach der Zugabe von wt Nef zu POPC-Membranen bei verschiedenen Konzentrationen unter dynamischen Inkubationsbedingungen.

Schon eine Proteinkonzentration von 0,1 µM wt Nef führt zu einer Destabilisierung der Membran und zum Abtragen von Lipiden aus dieser. Der mittlere Anteil nichtfluoreszierender Bereiche steigt mit zunehmender Proteinkonzentration bis auf 0,5 µM an. Eine weitere Erhöhung der Konzentration führt nicht zu einem weiteren Verlust von Lipiden aus der Membran. Die Fluoreszenzaufnahmen der TexasRed DHPE markierten Membranen (vergleiche Abbildung 4.21) zeigen, dass noch große Teile der Membran intakt sind. Es ist in der Literatur bekannt, dass nur ein Teil (~ 40%) der gesamten Nef-Population in Zellen an der Plasmamembran lokalisiert ist.^{25, 77, 115, 116} Der restliche Teil der Proteinpolygon befindet sich im Cytosol der Zelle. Ob es ein Gleichgewicht zwischen diesen Populationen gibt, ist nicht bekannt. Arold und Bauer vermuten, dass im Cytosol der Zelle HIV-1 Nef nach der Translation in einer sogenannten *closed conformation* vorliegt.²⁷ Bei dieser liegt die Myristoylsäure des N-Terminus in der Kerndomäne des Proteins versteckt und somit ist das Membranbindungsmotiv des Proteins nicht frei zugänglich. Die *closed conformation* könnte Nef vor enzymatischen Abbauprozessen der flexiblen Proteinregionen in der Zelle schützen. Dies könnte erklären, warum ein Teil von Nef im Cytosol lokalisiert ist.

Zellen und Zellmembranen stellen natürlich ein sehr viel komplexeres System dar als das in dieser Arbeit verwendete Modellsystem. Allerdings ist es durchaus denkbar, dass Nef

auch *in vitro* zum Teil in der *closed conformation* vorliegt und so große Teile des Proteins gar nicht mit der Membran in Wechselwirkung treten.

Neben dem Einfluss der Proteinkonzentration wurde mittels fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischer Experimente der Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Membrandestabilisierung untersucht. In Abbildung 5.4 ist der mittlere Anteil der nichtfluoreszierenden Membranbereiche dargestellt, die für wt Nef und Nef G2A unter statischen und dynamischen Inkubationsbedingungen erzielt wurden.

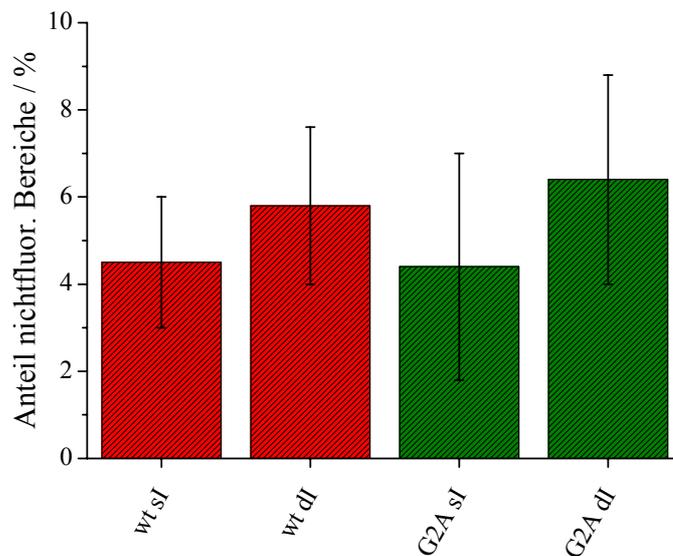


Abbildung 5.4: Übersicht über die mittleren Anteile nichtfluoreszierender Bereiche nach der Zugabe von entweder 1,0 μM Protein unter statischen (sl) beziehungsweise 0,5 μM Protein unter dynamischen Inkubationsbedingungen (dl).

Die Messungen unter statischen Bedingungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 1,0 μM durchgeführt, die unter dynamischen Bedingungen dagegen mit einer Konzentration von 0,5 μM . Zum einen wurde diese Proteinkonzentration gewählt, da sie schon bei den Ellipsometriemessungen verwendet wurde und somit einen besseren Vergleich erlaubt, zum anderen wurde bei dieser Konzentration der höchste Anteil an nichtfluoreszierenden Bereichen bestimmt. Bei den statischen Inkubationsbedingungen wurde mit einer Konzentration von 1,0 μM gearbeitet, da sich diese als notwendig für eine Interaktion zwischen Protein und Membran herausstellte. Eine kleinere Konzentration führte zu sehr geringen Membrandestabilisierungen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei der Inkubation der Membranen unter dynamischen Bedingungen konnte die Inkubationszeit stark verkürzt werden, da das Protein durch die konstante Pumpgeschwindigkeit direkt an die Oberfläche transportiert wird. Hier konnten bereits nach zwei Stunden viele nichtfluoreszierende Bereiche detektiert werden, während unter statischen Bedingungen nach gleicher Inkubationszeit noch keine Veränderung der Membranfluoreszenz beobachtet werden konnte. Unter diesen Bedingungen waren Veränderungen erst nach der Inkubation über Nacht detektierbar, da das Protein nur durch Diffusion an die Membranoberfläche transportiert wird, was einen langsamen Prozess darstellt. Allerdings beweist diese Inkubationsmethode, dass die beobachteten Veränderungen der Membran nicht aus den Durchflussbedingungen, sondern aus der Protein-Membran-Wechselwirkung resultieren.

Unter beiden Inkubationsbedingungen konnte bei Experimenten mit dem Fluoreszenzmikroskop durch den FITC-konjugierten Anti-His₆-tag-Antikörper eine Bindung des Proteins detektiert werden. Dies widerspricht den Ergebnissen aus dem Vesikelcosedimentationsassay. Zudem wurde in den *Release*-Messungen nur eine partielle Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Störungen der Membran induziert durch Nef transient sind. Bei einer stabilen Bildung von Löchern in der Membran, wie es die nichtfluoreszierenden Bereiche suggerieren, würde ein vollständiges Auslaufen der Vesikel erwartet werden. Diese Unterschiede sind auf das unterschiedliche Membransystem zurückzuführen. Bei den festkörperunterstützten Membranen dient Siliziumdioxid als Substrat, bei den Lipidvesikeln ist kein Substrat vorhanden. Siliziumdioxid ist partiell negativ geladen und bildet somit eine artifizielle Adsorptionsstelle für das Protein aufgrund der vielen basischen Aminosäuren im N-Terminus. Mittels Ellipsometriemessungen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Nef zu einem reinen Siliziumdioxidplättchen zu einem starken Anstieg der Schichtdicke führt (Ergebnisse sind nicht gezeigt). Durch das Abtragen von Lipiden aus der Membran werden außerdem noch hydrophobe Teile der Lipiddoppelschicht exponiert und bilden so eine weitere artifizielle Adsorptionsstelle für die hydrophoben Bereiche des Proteins. In Vesikeln sind diese künstlichen Adsorptionsstellen nicht präsent. Es ist möglich, dass das Substrat die Störungen der Membran stabilisiert. So ist denkbar, dass die betrachteten Strukturen in den festkörperunterstützten Membranen als eine Art eingefrorener Zustand betrachtet werden müssen. Dies würde auch erklären, warum bei den Membranen auf Siliziumdioxid

HIV-1 Nef in den Membrandefekten lokalisiert ist, während bei den Vesikelcosedimentationsassays keine Bindung beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich aus allen mit wt Nef und Nef G2A durchgeführten Experimenten schließen, dass der Verlust des N-terminalen Myristoylankers nicht die Wechselwirkung des Proteins mit Membranen unterbindet. Vielmehr zeigte sich, abgesehen von den *Release*-Messungen mit der Lipidmischung POPC:POPS (4:1), dass die Fettsäure nicht den entscheidenden Parameter darstellt. Nef G2A war wie wt Nef in der Lage die Stabilität der Membranstruktur zu stören und Lipide aus dem Membranverbund zu lösen. Bei den präsentierten Ellipsometrieergebnissen führte die nichtmyristoylierte Mutante sogar zu einer stärkeren Membrandestabilisierung, was in einer größeren Erniedrigung der Gesamtschichtdicke des Systems resultierte. Dies lässt vermuten, dass es noch andere Struktur motive des Proteins geben muss, die die Wechselwirkung des Proteins mit Membranen beeinflussen.

In der Literatur wird davon ausgegangen, dass ein Myristoylanker, welcher den kürzestmöglichen Lipidanker von Proteinen repräsentiert, nicht ausreicht, um Proteine stabil in der Plasmamembran zu verankern.¹¹⁷⁻¹¹⁹ So wurde die freie Enthalpie ΔG für die Bindung zwischen myristoylierten Peptiden und elektrisch neutralen Phospholipidvesikeln zu 8 kcal/mol bestimmt. Dies entspricht einer effektiven Dissoziationskonstante von 10^{-4} M.^{120, 121} Zudem wurde gezeigt, dass für jede zusätzliche CH_2 -Gruppe, die zu der Fettsäurekette hinzugefügt wird, die Bindungsenergie um 0,8 kcal/mol steigt.¹²⁰ 8 kcal/mol sind nicht ausreichend, um ein Protein stabil in der Membran zu verankern. Es wird vermutet, dass weitere Mechanismen zusätzlich zur Myristoylierung nötig sind, um modifizierte Proteine stabil an der Plasmamembran zu assoziieren. Eine Möglichkeit, um die Affinität der Proteine zu Membranen zu erhöhen, wäre einen weiteren Lipidanker einzuführen. Dies ist zum Beispiel bei Proteinen der Scr-Protein-Familie der Fall, die neben einem N-terminalen Myristoylanker einen Palmitoylanker besitzen.¹¹⁸ Auch ist eine zusätzliche elektrostatische Wechselwirkung von Proteinteilen mit den Kopfgruppen der Membranlipide denkbar.

Die Rolle des Myristoylankers von HIV-1 Nef wird auch in der Literatur kontrovers diskutiert. In frühen Studien wurde gezeigt, dass Nef N-terminal myristoyliert sein muss, um mit der Plasmamembran assoziiert zu sein und seine biologischen Funktionen ausüben zu können.^{10, 24, 32, 76, 116, 122} Dabei wurde postuliert, dass der N-terminale Membrananker von essentieller Bedeutung ist. 2006 wurden jedoch sowohl von Bentham et al.²⁵ als auch von Fackler et al.²⁶ Studien veröffentlicht, die zeigen, dass auch die nichtmyristoylierte Form

von Nef mit Membranen assoziiert sein kann und funktionell ist. Wie schon in Kapitel 3.1.2 erwähnt, besitzt HIV-1 Nef innerhalb der ersten 26 N-terminalen Aminosäuren insgesamt sieben basische Aminosäuren. Im N-Terminus wurde zudem in der argininreichen Region eine Neigung zur Bildung einer α -helikalen Struktur gefunden. Es wird vermutet, dass diese vermehrten positiven Ladungen die Assoziation von HIV-1 Nef mit der Plasmamembran erleichtern und stabilisieren.²⁸ Zudem ist in der Literatur bekannt, dass HIV-1 Nef in Zellen mit einer Lck Tyrosinkinase und einer Serinkinase in einem Proteinkomplex assoziiert ist.^{27, 123} Diese Proteine sind ebenfalls mit der Plasmamembran verbunden und können so eventuell HIV-1 Nef-Membran-Wechselwirkungen *in vivo* stabilisieren. In artifiziellen Systemen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, sind keine weiteren Proteine an die Membran gebunden. Deshalb wurde im Weiteren der Einfluss des basischen Ladungscusters von HIV-1 Nef analysiert.

5.2 Untersuchung des Einflusses des positiven Ladungscusters im N-Terminus von HIV-1 Nef auf die Wechselwirkung mit artifiziellen Membransystemen

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt und diskutiert, dass der N-terminale Membrananker von HIV-1 Nef nicht der entscheidende Faktor bei der beobachteten Protein-Membran-Wechselwirkung ist. Daher wurde der Fokus auf die Rolle des positiven Ladungscusters gelegt. Um diesen zu untersuchen, wurde mit zwei verschiedenen Mutanten, Nef KKAA und Nef R4A, gearbeitet. Bei Nef KKAA wurde durch den Austausch zweier Lysine gegen Alanin die Ladungsdichte um zwei verringert, bei Nef R4A wurden insgesamt vier Arginine gegen Alanin ausgetauscht. Somit trägt diese Mutante nur noch drei positive Ladungen.

In den Vesikelcosedimentationsassays konnte, wie schon für wt Nef keine stabile Bindung von Nef KKAA oder Nef R4A detektiert werden. In den *Release*-Messungen zeigte sich hingegen ein deutlicher Unterschied in der Aktivität der einzelnen Proteine. In Abbildung 5.5 ist ein Überblick über die mittleren prozentualen Fluoreszenzintensitätsanstiege nach Zugabe von 0,02 μ M wt Nef, Nef KKAA oder Nef R4A für alle verwendeten Lipidmischungen gegeben.

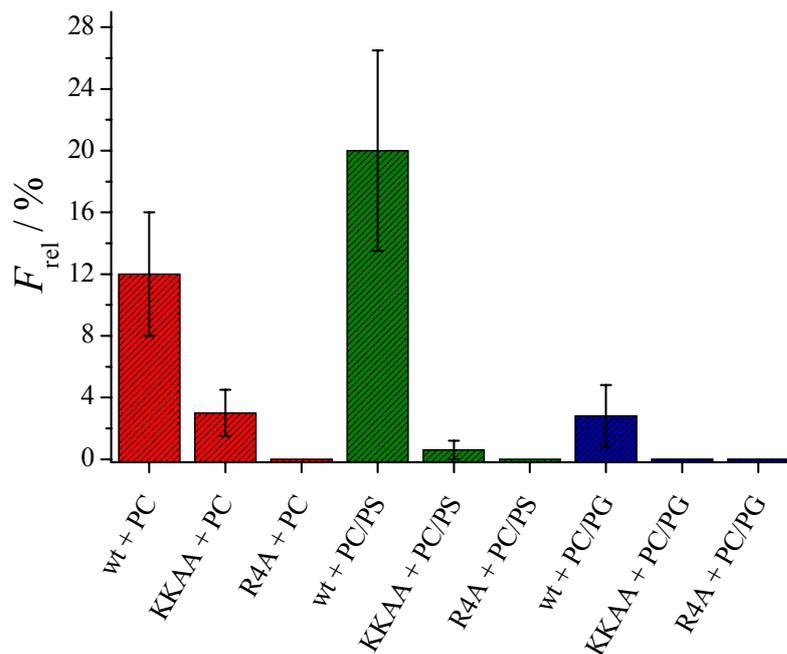


Abbildung 5.5: Übersicht über die gemittelten prozentualen Anstiege der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von wt Nef, Nef KKAA und Nef R4A zu unilamellaren Lipidvesikeln. Protein:Lipid-Verhältnis: 1:65.

Bei allen Lipidmischungen führte die Zugabe von wt Nef zu unilamellaren Lipidvesikeln zu einem deutlich höheren mittleren Anstieg des Fluoreszenzsignals. Die Zugabe der Mutante Nef KKAA führte nur bei POPC-Vesikeln zu einer Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein. Negative Ladung in den Lipiddoppelschichten bewirkte, dass die Zugabe von Nef KKAA zu keinem Austritt des Farbstoffs führte. HIV-1 Nef R4A führte bei keiner der untersuchten Lipidmischungen zu einer Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein.

Dass eine Verringerung der positiven Ladungen im N-Terminus die Wechselwirkung des Proteins mit artifiziellen Membransystemen beeinflusst, zeigten auch die fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischen Ergebnisse. Diese wurden für HIV-1 Nef KKAA und HIV-1 Nef R4A stets unter dynamischen Inkubationsbedingungen durchgeführt. In Abbildung 5.6 ist eine Übersicht über den mittleren prozentualen Anteil nichtfluoreszierender Bereiche gegeben, welche nach der Inkubation der Membranen mit wt Nef, Nef KKAA oder Nef R4A beobachtet werden konnten.

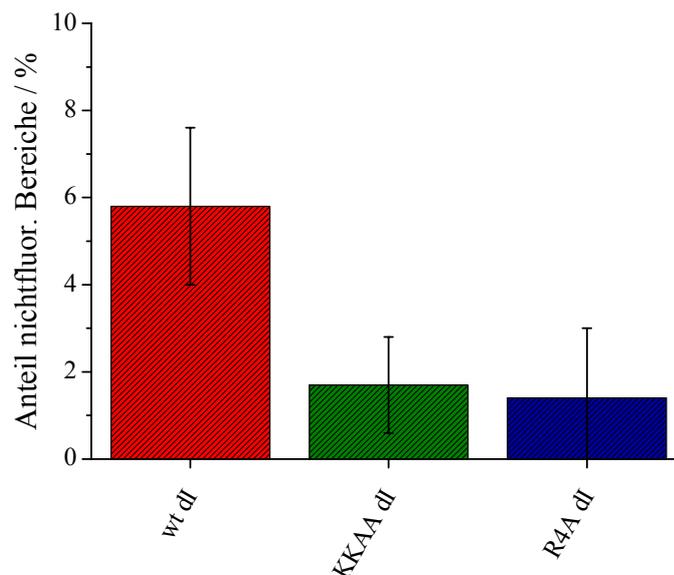


Abbildung 5.6: Übersicht über die Anteile nichtfluoreszierender Bereiche nach der Zugabe von wt Nef, Nef KKAA oder Nef R4A zu Membranen bestehend aus POPC unter dynamischen Inkubationsbedingungen (dl).

Aus Abbildung 5.6 ist ersichtlich, dass wt Nef zu einem 3-4fach höheren Anteil an nichtfluoreszierenden Membranbereichen führt als Nef KKAA oder Nef R4A. Die Werte für Nef KKAA und Nef R4A liegen in der gleichen Größenordnung. Allerdings ist der Fehler bei Nef R4A größer als der eigentlich erzielte Anteil an dunklen Stellen auf der Membran. Dies resultiert aus der starken Streuung der Messergebnisse. In manchen Fällen konnte fast keine Modulation der POPC-Membranen in TexasRed DHPE-Fluoreszenzbildern beobachtet werden, in anderen Fällen konnte eine deutliche Destabilisierung der Lipiddoppelschichten mit resultierenden nichtfluoreszierenden Bereichen detektiert werden. Zum Teil zeigte sich auch auf derselben Probe ein heterogenes Bild.

Auffällig ist bei einem Vergleich der *Release*-Messungen an POPC-Vesikeln mit den fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischen Versuchen an Lipiddoppelschichten bestehend aus POPC, dass die beiden Mutanten, vor allem Nef R4A, an festkörperunterstützten Membranen eine stärkere destabilisierende Wirkung auf die Membranen haben als bei Lipidvesikeln. Bei den *Release*-Messungen resultierte die Zugabe von Nef KKAA in einer um den Faktor 4 verringerten Freisetzung von CF im Vergleich zu wt Nef, bei den fluoreszenzmikroskopischen Experimenten war der mittlere prozentuale Anteil an nichtfluoreszierenden Bereichen nur um den Faktor 3 geringer. Deutlicher ist der Unterschied bei Nef R4A. Das Protein zeigte bei den *Release*-Messungen keine Wechselwirkung mit

den Lipidvesikeln, die zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignal führten, resultierte aber auf festkörperunterstützten Membranen in der Entstehung von nichtfluoreszierenden Bereichen, deren mittlerer Flächenanteil im Vergleich zu wt Nef um den Faktor 4 geringer war. Diese unterschiedlichen Beobachtungen lassen sich durch die unterschiedlichen Membransysteme erklären.

Bei *Release*-Messungen wird die Freisetzung eines Fluorophors aus Lipidvesikeln detektiert. Damit dieser aus den Vesikeln austreten kann, muss die Membrandestabilisierung, welche durch das Protein induziert wird, eine bestimmte Porengröße erreichen. Da bei den *Release*-Messungen mit den Mutanten Nef KKAA und Nef R4A wenig beziehungsweise gar kein Austritt von 5(6)-Carboxyfluorescein beobachtet werden konnte, die Experimente mit festkörperunterstützten Membranen aber zeigten, dass beide Proteine in der Lage sind Lipide aus dem Membranverbund zu lösen, liegt die Vermutung nahe, dass Nef KKAA und Nef R4A auch die Lipiddoppelschichten von Vesikeln destabilisieren, die resultierende Porengröße in der Membran aber kleiner ist als bei wt Nef. So kann nur sehr wenig oder gar kein Farbstoff freigesetzt werden.

Neben Lipidanker und basischen Aminosäuren tragen zu einer stabilen Membran-Protein-Wechselwirkung auch aromatische Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin bei.^{124, 125} Im Gegensatz zu den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, die mit den Kopfgruppen der Lipide interagieren, sind aromatische Aminosäuren an der Grenzfläche zwischen den hydrophoben Fettsäureketten und den hydrophilen Kopfgruppen lokalisiert und stabilisieren so die Wechselwirkung. Im N-Terminus von Nef sind aromatische Aminosäuren in Form von Tryptophan an Positionen 5 und 13 lokalisiert. Diese Tryptophane könnten den Mutanten Nef KKAA und Nef R4A, trotz reduzierter positiver Ladung, Stabilität in der Membran verleihen. Dass Tryptophan die Protein-Membran-Wechselwirkung stark beeinflusst, zeigte auch Holger Gerlach in seiner Dissertation, als er Fluoreszenz-*Stopped-Flow* Experimente mit einer Nef-Mutante durchführte, bei der die Tryptophane durch Alanin ersetzt worden waren. Diese Mutante zeigte eine stark eingeschränkte Bindefähigkeit an Lipidvesikel. War neben Tryptophanen auch noch der basische Arginin-Cluster durch Alanin ersetzt, zeigte das Protein kaum noch eine Wechselwirkung mit Vesikeln.⁹² Neben der Interaktion der aromatischen Aminosäuren mit der Membran muss allerdings auch berücksichtigt werden, dass bei festkörperunterstützten Membranen, wie in Kapitel 5.1 beschrieben, das Substrat Siliziumdioxid eine artifizielle Adsorptionsstelle für HIV-1 Nef bildet. Dies ist bei den Experimenten mit Lipidvesikeln nicht gegeben.

Für die fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen zur Visualisierung der Störung der Membranstabilität wurden neben Lipiddoppelschichten bestehend aus POPC auch die Lipidmischung POPC:POPS im molaren Verhältnis von (4:1) verwendet, um die natürliche Membranumgebung von Nef nachzustellen und den Einfluss von negativ geladenen Lipiden auf die Wechselwirkung mit dem Protein zu untersuchen. Diese Experimente wurden nicht mit allen vier Nef-Proteinen durchgeführt, sondern nur mit wt Nef und Nef R4A, da von diesen die größtmöglichen Aktivitätsunterschiede erwartet wurden. Die Messungen wurden alle unter dynamischen Inkubationsbedingungen durchgeführt. Die Experimente lieferten aber für keines der untersuchten Proteine ein einheitliches Bild. Sowohl wt Nef als auch Nef R4A waren teilweise in der Lage, die Membran zu destabilisieren, was sich in der Bildung von nichtfluoreszierenden Bereichen zeigte. Zum Teil konnte aber auch gar keine Wechselwirkung beobachtet werden. Induzierte Nef eine Entstehung von nichtfluoreszierenden Bereichen in der Membran, wurden die aufgenommenen Fluoreszenzbilder einer Pixelanalyse unterzogen, um den Flächenanteil dieser Bereiche zu bestimmen. Ein Überblick über den mittleren prozentualen Flächenanteil ist in Abbildung 5.7 gegeben.

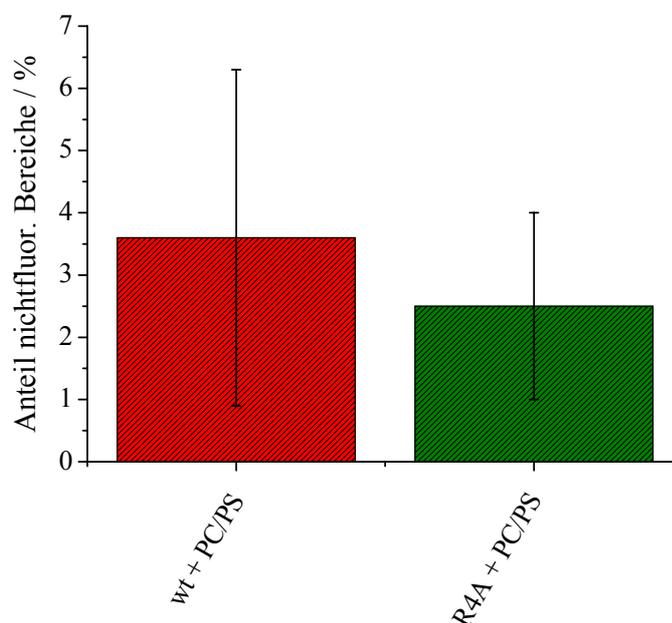


Abbildung 5.7: Übersicht über die Anteile nichtfluoreszierender Bereiche nach der Zugabe von wt Nef oder Nef R4A zu Membranen bestehend aus POPC:POPS (4:1) unter dynamischen Inkubationsbedingungen.

Auch bei dieser Lipidmischung scheint es die Tendenz zu geben, dass wt Nef in größerem Maße als Nef R4A zu einer Membrandestabilisierung zu führen scheint, die verbunden ist mit dem Herauslösen von Lipiden aus der Membran. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass beide Proteine überhaupt nur in 50 % der Fälle die Entstehung von nichtfluoreszierenden Bereichen in der Membran induzierten. Aufgrund dieser Inhomogenität der Messergebnisse können diese Daten nur bedingt denen von POPC-Membranen gegenübergestellt werden. Prinzipiell konnte aber gezeigt werden, dass Nef generell auch in der Lage ist, die Stabilität von negativ geladenen Membranen zu beeinflussen und auch Lipide aus solchen Lipiddoppelschichten herausreißen kann. Dass sich bei dieser Lipidmischung ein so heterogenes Ergebnisbild ergibt, könnte unter anderem mit der Membranpräparation zusammenhängen. Wie in Kapitel 4.5.2 erwähnt, wurden die Vesikel in Gegenwart von Calciumionen gespreitet. Da diese Ionen die negative Ladung von POPS abschirmen und somit die Wechselwirkung der negativ geladenen Lipide mit dem positiven Ladungscluster von HIV-1 Nef verhindern würden, wurden die Membranen nach dem Spreiten intensiv mit calciumfreiem Puffer gespült. Allerdings ist es möglich, dass trotz des Spülens zum Teil Calciumionen an POPS koordiniert blieben und somit das Messergebnis beeinflussen. In Vorversuchen wurden die Proben mit EGTA-haltigem Puffer gespült, um die Ca^{2+} -Ionen vollständig zu entfernen. Allerdings wurde hierbei festgestellt, dass das Spülen mit diesem Puffer die Membran teilweise wieder vom Substrat löste, da das EGTA auch die Ionen, welche das Substrat und POPS verbrücken, komplexierte. Auch die Bildung von PS-Lipiddomänen in der Membran deutet darauf hin, dass in der Pufferlösung noch Ca^{2+} -Ionen anwesend sind. Dass Calciumionen eine laterale Phasenseparation in Lipidvesikeln bestehend aus PC- und PS-Lipiden verschiedener Zusammensetzung induzieren, wurde bereits 1984 von Silvius und Gagné mittels *differential scanning calorimetry* (DSC) untersucht.¹²⁶ Die Lipide einer Mischung hatten dabei stets dieselbe Kettenlänge. Bei keiner der verwendeten Lipidmischungen konnten sie in Abwesenheit von Calciumionen eine Phasenseparation detektieren, während die Präsenz der Ionen zu einer Phasenseparation führte. Später konnten sie diese Ergebnisse auch mittels Fluoreszenzstudien bestätigen.¹²⁷ Hierfür markierten sie die PC-Lipide an der Seitenkette mit einem Fluorophor und die PS-Lipide mit dem dazugehörigen Fluoreszenzlöcher. In Abwesenheit von Calciumionen wurde die Fluoreszenz gelöscht. Wurden dem Puffer Ca^{2+} -Ionen hinzugefügt, beobachteten sie einen Anstieg der Intensität des Fluoreszenzsignals. Daraus schlossen sie, dass Calciumionen zu einer Entmischung der Lipide führen. Menke et al.¹²⁸ konnten eine Phasenseparation in auf Glim-

mer immobilisierten Membranen bestehend aus POPC:POPS (4:1) in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops visualisieren. Sie bestimmten die Höhe der POPS-Domänen zu 0,4-1,0 nm, der Durchmesser der Domänen betrug 20-100 nm. Auch in den in dieser Arbeit untersuchten festkörperunterstützten Membranen lagerte sich unter den verbleibenden Calciumionen POPS zu steiferen Domänen, welche den Fluorophor TexasRed DHPE ausschlossen, zusammen. Daher erschienen die Domänen in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dunkel und beim Abrastern der Oberfläche mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops ($1,5 \pm 0,3$) nm höher. Die in dieser Arbeit visualisierten Domänen sind etwas höher und sehr viel größer als die von Menke et al. Es ist denkbar, dass das verwendete Substrat einen Einfluss auf Form und Größe der Domänen hat, in dieser Arbeit wurde Siliziumdioxid verwendet, während Menke et al. die Lipiddoppelschichten auf Glimmer immobilisierten.

Abgesehen von diesen Problemen bei festkörperunterstützten Membranen bestehend aus POPC:POPS (4:1) deuten sowohl die *Release*-Messungen als auch die fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen darauf hin, dass dem N-terminalen positiven Ladungscluster eine größere Bedeutung bei der membrandestabilisierenden Wirkung des Protein mit Lipiddoppelschichten zukommt als dem Myristoylanker.

Dass die Anzahl der basischen Aminosäuren die Stabilität der Interaktion von Proteinen mit Membranen beeinflusst, wurde auch von Arbuzova et al. gezeigt.¹²⁹ Sie führten Vesikelcosedimentationsassays mit LUVs, welche mit Sucrose gefüllt waren, und Peptiden aus der Gerüstregion von Caveolin (Aminosäuren 92-101) und der Effektorregion von MARCKS (*myristoylated alanine rich C kinase substrate*) (Aminosäuren 151-175) durch. Beide Peptide enthalten 5 aromatische Aminosäuren, aber unterschiedlich viele basische Aminosäuren. MARCKS(151-175) enthält insgesamt 13 positive Ladungen, während Caveolin(92-101) nur drei positive Ladungen besitzt. Sie fanden speziell bei partiell negativ geladenen Vesikeln, dass MARCKS(151-175) viel stärker an die Membran bindet als Caveolin(92-101). Sie führten dies auf die unterschiedlich hohe positive Ladungsdichte zurück.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich die Tendenz, dass Nef KKAA zu einer stärkeren Membrandestabilisierung führt als Nef R4A. Dies könnte auf die unterschiedlich hohe Anzahl an basischen Aminosäuren zurückzuführen sein. Allerdings wurde nicht nur die Ladungsdichte der Mutanten verändert, sondern es wurden auch unterschiedliche Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht. Bei Nef KKAA wurden zwei Lysine ausgetauscht und bei Nef R4A ausschließlich Arginine. Dies könnte auch

darauf hinweisen, dass nicht nur die Eliminierung von positiven Ladungen, sondern auch die nach dem Austausch resultierende Aminosäuresequenz die Wechselwirkung beeinflusst. Dies konnte bei tryptophan- und argininreichen antimikrobiellen Peptiden gezeigt werden. Bei Lactoferricinpeptiden konnte durch gezielte Mutationen gezeigt werden, dass Arginine und Tryptophane eine entscheidende Rolle bei der hämolytischen Aktivität gegenüber menschlichen roten Blutkörperchen und der antibakteriellen Aktivität gegenüber *E. coli* und *S. aureus* spielen. Selbst der Austausch von Arginin gegen die ebenfalls basische Aminosäure Lysin und die Mutation von Tryptophan zu den ebenfalls aromatischen Aminosäuren Tyrosin oder Phenylalanin resultierte in einer Reduzierung der lytischen Aktivität der Peptide.^{130, 131} Dieses Phänomen konnte nicht nur bei Lactoferricinpeptiden beobachtet werden, auch bei anderen tryptophan- und argininreichen antimikrobiellen Peptiden führten Mutationen zum gleichen Effekt. So konnten zum Beispiel Blondelle und Houghten in kombinatorisch-chemischen Studien von antimikrobiellen Hexapeptiden beobachten, dass Hexapeptide, die reich an Tryptophan und Arginin sind, eine höhere antimikrobielle Wirkung gegenüber verschiedenen Bakterienstämmen haben als Peptide, die analoge Aminosäuren enthalten.¹³²

Nicht nur bei antimikrobiellen Peptiden spielt das Zusammenspiel von Arginin und Tryptophan eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit Membranen, auch die meisten *cell penetrating peptides* (CPPs) weisen einen hohen Anteil an diesen Aminosäuren auf. So konnte bei dem CPP Penetratin durch molekulardynamische Simulationen die Wichtigkeit der Wechselwirkung der Tryptophane (Position 48 und 56) mit Arginin (Position 52) für die Aktivität des Proteins geklärt werden.¹³³ Die Besonderheit der Tryptophan-Arginin-Wechselwirkung liegt in einer möglichen Kationen- π -Wechselwirkung zwischen den Seitenketten der Aminosäuren.^{134, 135} Prinzipiell ist auch die basische Aminosäure Lysin zu solch einer Wechselwirkung mit Tryptophan befähigt, allerdings kann Arginin im Gegensatz zu Lysin zusätzlich zum π -stacking mit Tryptophan noch als Wasserstoffbrückendonator dienen und so gleichzeitig mit den Kopfgruppen der Lipide wechselwirken. Dies stärkt die Protein-Membran-Interaktion und könnte erklären, warum in antimikrobiellen Peptiden Arginin eine größere Bedeutung zukommt als Lysin. Da im N-Terminus von HIV-1 Nef ebenfalls zwei Tryptophane lokalisiert sind, könnte eine ähnliche Arginin-Tryptophan-Wechselwirkung zusätzlich zu der Gesamtladungsstruktur vermutet werden, welche den Aktivitätsunterschied zwischen Nef KKAA und Nef R4A erklären würde.

Dass bei HIV-1 Nef die N-terminalen Arginine ebenfalls eine entscheidende Rolle bei den Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern in der Zelle spielen, wurde von Bentham et al. beobachtet.²⁵ Sie bestimmten zum einen den Anteil an HIV-1 Nef, der an der Plasmamembran lokalisiert ist, und zum anderen den Einfluss von Mutationen auf die Fähigkeit CD4-Moleküle downzuregulieren. Sie fanden, dass durch den Austausch der basischen Lysine an den Positionen 4 und 7 sowohl die Membranbindung, als auch die Downregulation von CD4 nur geringfügig beeinflusst werden. Der Arginincluster an den Positionen 17, 19, 21, 22 hingegen spielt eine entscheidende Rolle. Sowohl der an der Plasmamembran lokalisierte Teil des Proteins war stark reduziert als auch die Fähigkeit dieser Mutante, den Abbau von CD4-Rezeptoren zu induzieren. Eine weitere Mutante, bei der alle basischen Aminosäuren im N-Terminus gegen neutrale ausgetauscht wurden, zeigte sich gar inaktiv. Dass die N-terminalen Lysine von Nef keine entscheidende Rolle bei der *Downregulation* von CD4 spielen, wurde auch von Aiken et al. beschrieben.¹³⁶ Auch H. Gerlach untersuchte in seiner Dissertation den Einfluss von Mutationen auf die Fähigkeit von Nef mit Membranen zu assoziieren.⁹² Er stellte dabei fest, dass diese Fähigkeit von Nef R4A im Vergleich zum Wildtyp stark verringert ist. Insgesamt konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass eine Verringerung der positiven Ladungsdichte im N-Terminus des Proteins zu einer Reduzierung der membrandestabilisierenden Eigenschaften von HIV-1 Nef führt.

5.3 Einordnung in den physiologischen Kontext

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass anstatt einer Bindung von HIV-1 Nef an artifizielle Membransysteme eine Störung der Membranstruktur detektiert werden konnte. Der N-terminale Membrananker in Form einer Myristoylsäure spielt dabei nicht die entscheidende Rolle, vielmehr werden die Wechselwirkungen mit Membranen durch den basischen Ladungscluster in N-Terminus des Proteins beeinflusst. Frühere Studien zeigten, dass der myristoylierte Wildtyp eine kompaktere Struktur aufweist als die unmyristoylierte Mutante.²⁸ Es wurde vermutet, dass die Fettsäure mit der Kerndomäne assoziiert (*closed conformation*) ist, während bei Abwesenheit der N-Terminus flexibel vorliegt. Da es HIV-1 Nef möglich ist, die *closed conformation* einzunehmen, liegt die Vermutung nahe, dass es in den hydrophoben Bereichen der Kerndomäne des Proteins eine Lipidbindungsstelle geben könnte. 2007 zeigten Hoffmann et al., dass Nef seinen my-

ristoylierten N-Terminus binden kann.¹³⁷ Hierfür führten sie Fluoreszenztitrationsstudien mit HIV-1 Nef und Nef-Fragmenten (Aminosäuren 2-7) durch, die entweder myristoyliert oder unmyristoyliert waren. Nur das myristoylierte Fragment konnte gebunden werden. Sie formulierten dies als ersten Beweis für eine Lipidbindungsstelle. Kürzlich zeigten auch Röntgenstrukturuntersuchungen der Arbeitsgruppe von PD Dr. M. Geyer (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund), dass die Kerndomäne von HIV-1 Nef eine hydrophobe Tasche besitzt, in der entweder der eigene Membrananker oder auch andere Lipide gebunden werden können (Ergebnisse noch nicht veröffentlicht).

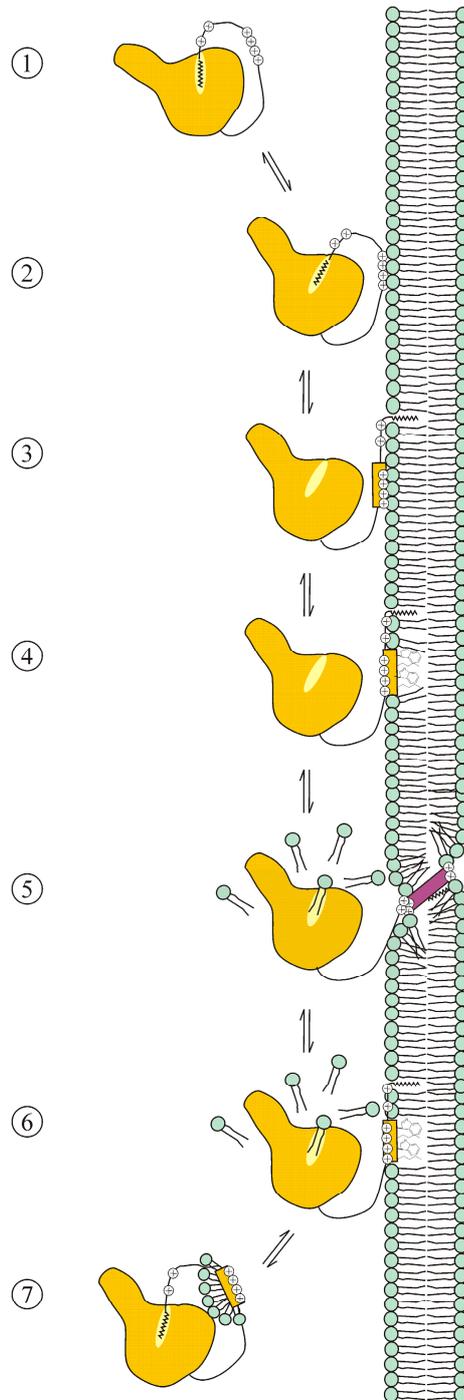
Die in dieser Arbeit dargestellten Wechselwirkungen des Proteins mit Lipiddoppelschichten wurden an artifiziellen Membransystemen beobachtet. Zellen stellen ein sehr viel komplexeres System dar, daher können die erhaltenen Ergebnisse nur bedingt übertragen werden. Allerdings liegt der Vorteil der artifiziellen Membransysteme gerade in ihrer Einfachheit. Im Gegensatz zu Zellmembranen erlauben sie die gezielte Untersuchung der Protein-Membran-Wechselwirkung ohne die Interaktion mit anderen Zellbestandteilen, wie zum Beispiel anderen Membranproteinen oder Protein-Cytoskelett-Wechselwirkungen. Außerdem kann die Lipidzusammensetzung der Membranen auf die natürliche Umgebung des Proteins abgestimmt und variiert werden, um den Einfluss einzelner Lipide zu untersuchen. Allerdings muss beachtet werden, dass HIV-1 Nef in Zellen auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert ist, das heißt an Membranen mit keiner Krümmung oder mit leicht negativer Krümmung. In den hier durchgeführten Vesikelexperimenten wurden LUVs mit einem Durchmesser von 100 nm verwendet, welche sehr viel kleiner sind als Zellen und deren Lipiddoppelschichten somit auch sehr viel stärker gekrümmt sind. Außerdem wurde Nef zu der Vesikellösung gegeben und interagiert somit mit Membranen positiver Krümmung. Es könnte denkbar sein, dass Nef über clustern oder andere Mechanismen dieser „falschen“ Membrankrümmung versucht entgegenzuwirken. Dadurch steht die Lipidmembran unter einer zusätzlichen Spannung, was sich in einer Destabilisierung und damit verbundenen Freisetzung von CF äußern könnte. In lebenden menschlichen Zellen führt die Expression von HIV-1 Nef nicht zum Zelltod durch Störungen der Membranstruktur. Trotzdem lässt diese Fähigkeit darauf schließen, dass Nef in der Lage sein könnte, Eigenschaften von Membranen zu beeinflussen beziehungsweise zu verändern. Fackler und Mitarbeiter¹³⁸ beobachteten, dass HIV-1 Nef während der Virionenproduktion in T-Lymphozyten deren *raft*-Charakter erhöht, indem der Anteil an ungesättigten Phosphocholinlipiden signifikant reduziert und Sphingomyelin angereichert wurde. Bereits früher wurde vermutet, dass Nef nicht nur mit Proteinen der

Wirtszellen interagiert, sondern auch die Biosynthese und den Transport von speziellen Lipiden, wie zum Beispiel Cholesterin, beeinflusst.^{139, 140} Dies konnten Fackler und Mitarbeiter jedoch nicht bestätigen; sie fanden, dass Nef den Gehalt an Cholesterin und Phosphoglycerolipiden nicht maßgeblich beeinflusst. Es zeigt aber, dass der Einfluss von Nef auf die Lipidzusammensetzung von Zellmembranen und Virionen keine gänzlich neue Fragestellung darstellt, jedoch noch viel zum Verständnis der Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit Membranen beigetragen werden muss.

5.4 Modell der Interaktion von HIV-1 Nef mit artifiziellen Membranen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von HIV-1 Nef mit artifiziellen Lipiddoppelschichten untersucht. Die Rolle von strukturellen Eigenschaften im N-Terminus des Proteins und der Einfluss der Membranzusammensetzung wurden charakterisiert. Es wird ein Modell aufgestellt, welches die destabilisierende Wirkung von HIV-1 auf Membranstrukturen beschreibt. Das Modell (Abbildung 5.8) basiert auf dem von Arold und Baur²⁷ sowie auf dem von Holger Gerlach⁹², welches er in seiner Dissertation vorschlug, und ergänzt diese. Nach der Translation liegt HIV-1 Nef in der *closed conformation* im Cytosol der Zelle vor (1). Die initiale Assoziation von Nef an Membranen erfolgt über Wechselwirkung der basischen Aminosäuren des N-Terminus mit den Kopfgruppen der Lipide (2). Die Interaktion bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins. Zum einen wird der Myristoylanker aus der hydrophoben Tasche der Kerndomäne freigegeben und insertiert in die Membran, zum anderen wird die Ausbildung einer kurzen amphipatischen α -Helix in der argininreichen Region induziert (3). Im einen weiteren Schritt wird vermutet, dass diese α -Helix tiefer in die Membran insertiert, wobei die basischen Aminosäuren mit den Kopfgruppen, die unpolaren mit den hydrophoben Resten und die aromatische Aminosäure Tryptophan mit der Grenzfläche zwischen den Kopfgruppen und den hydrophoben Ketten der Lipide interagieren (4). Barnham et al.⁹⁹ zeigten, dass die ersten 25 Aminosäuren des N-Terminus von Nef in unpolarer, membranähnlicher Umgebung eine amphipatische α -Helix ausbilden können. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass HIV-1 Nef membrandestabilisierende Wirkung hat und Lipide aus dem Membranverbund lösen kann. Daher wird angenommen, dass sich diese 25 Aminosäuren umfassende α -Helix in der Membran ausbildet, diese durchspannt und in einer Störung der Membranstruktur resultiert. Dabei herausgelöstes Lipid kann mit der

hydrophoben Tasche der Kerndomäne des Proteins interagieren (5). Durch Vesikelco-
 sedimentationsassays wurde gezeigt, dass die Wechselwirkung von Nef mit Membranen
 nicht stabil ist. Daher vermuten wir, dass zwischen den Schritten (3), (4) und (5) ein nicht
 näher geklärtes Gleichgewicht vorliegt und HIV-1 mit Lipiden, welche mit hydrophoben
 Teilen des Proteins interagieren, von der Membran dissoziiert (6, 7).



**Abbildung 5.8: Modell der HIV-1 Nef-Membran-Interaktion, welches die beobachtete Membrande-
 stabilisierung und den größeren Einfluss des positiven Ladungsclusters erklärt.**

Neben den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen stützen auch die von Holger Gerlach durchgeführten Fluoreszenz-*Stopped-Flow* Experimente den vorgeschlagenen Interaktionsmechanismus des Proteins mit Membranen. Nach der Assoziation von Nef an Lipiddoppelschichten konnte er einen FRET-Effekt beobachten, der über die Zeit stabil war. Würde das Protein nach dem Herauslösen von Lipiden aus dem Membranverbund nicht weiter mit diesen wechselwirken, so könnte kein FRET-Effekt mehr detektiert werden.

Das vorgeschlagene Modell ist auch in der Lage zu erklären, warum der positive Ladungscluster im N-Terminus von Nef eine wichtigere Rolle bei der Membrandestabilisierung spielt als der Myristoylanker. Im Gegensatz zu dem Lipidanker sind die basischen Aminosäuren essentiell für die Ausbildung der amphipatischen α -Helix bestehend aus den Aminosäuren 1-25. Ist die Anzahl dieser Aminosäuren verringert, wird nicht nur die initiale Assoziation des Proteins an Membranen erschwert, sondern auch die Ausbildung, der in Schritt (5) dargestellten Struktur und die damit verbundene Disassemblierung der Lipide in der Membran.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Interaktion des HIV-1 Nef Proteins mit artifiziellen Membransystemen. In der Literatur wurde in den 1990ern postuliert, dass der N-terminale Lipidanker für die Wechselwirkung des Proteins mit Membranen essentiell ist. Allerdings wurden in letzter Zeit Studien veröffentlicht, die zeigen, dass auch das unmyristoylierte Protein mit Membranen assoziiert sein kann. Somit muss es noch andere Struktur motive geben, die die Wechselwirkung maßgeblich beeinflussen. Daher wurde in dieser Arbeit zum einen der Einfluss des N-terminalen Myristoylankers untersucht und zum anderen der Einfluss des positiven Ladungscusters im N-Terminus des Proteins. Hierzu wurden neben den Messungen mit wt Nef auch Messungen mit der unmyristoylierten Mutante Nef G2A sowie mit Mutanten mit reduzierter positiver Ladungsdichte Nef KKAA und Nef R4A durchgeführt.

Überraschenderweise konnte sowohl bei Experimenten an unilamellaren Lipidvesikeln als auch bei Experimenten mit festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten keine Bindung des Proteins an Membranen beobachtet werden. Vielmehr lassen die Untersuchungen darauf schließen, dass das Protein in der Lage ist, die Stabilität von Lipiddoppelschichten zu stören und Lipide aus dem Membranverbund herauszulösen. Dies zeigte sich bei den *Release*-Messungen in einer Freisetzung des Farbstoffs 5(6)-Carboxyfluorescein. Bei den QCM-Experimenten konnte ein Anstieg der Resonanzfrequenz der Schwingquarzes und bei den Ellipsometriemessungen eine Verringerung der Schichtdicke des Membransystems beobachtet werden. Mittels der hochauflösenden bildgebenden Methoden Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie konnte diese Störung der Struktur von Lipiddoppelschichten visualisiert werden. Durch den Einsatz eines FITC-konjugierten Antikörpers konnte gezeigt werden, dass HIV-1 Nef in den gestörten Bereichen der Membran lokalisiert ist. Mittels rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen konnte das Protein ebenfalls in den Membrandefekten visualisiert werden.

Abgesehen von den *Release*-Messungen mit der Lipidmischung POPC:POPS (4:1) zeigte sich bei den Experimenten, dass der N-terminale Lipidanker des Proteins die Interaktion mit artifiziellen Membranen nicht maßgeblich beeinflusst. Sowohl an Lipidvesikeln als auch an festkörperunterstützten Membranen lagen die von Nef G2A induzierten Störungen in der Organisation der Lipiddoppelschichten in der gleichen Größenordnung wie die von wt Nef verursachten. Eine Verringerung des positiven Ladungscusters im N-Terminus des Proteins beeinflusst die Wechselwirkung mit Membranen stark. Dies

zeigten die Untersuchungen mit den Mutanten Nef KKAA und Nef R4A. Diese Mutanten destabilisierten die untersuchten Membransysteme in viel geringerem Umfang als wt Nef. Die Mutanten Nef KKAA führte dabei noch zu einer etwas größeren Störung der Membranstruktur als Nef R4A. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass Nef KKAA im Gegensatz zu Nef R4A mit nur noch 3 positiven Ladungen noch 5 positive Ladungen besitzt, zum anderen könnte es auch zeigen, dass die N-terminalen Arginine eine wichtigere Rolle bei der Wechselwirkung mit Membranen spielen als die Lysine.

In Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls der Einfluss der Lipidzusammensetzung von Membranen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das Einbringen von negativer Ladungsdichte in die Membranen zu einer Verringerung der Aktivität des Proteins führt. Allerdings scheint vor allem bei wt Nef mehr die Struktur der Kopfgruppe des Lipids die Interaktion zu beeinflussen als die Ladung selbst.

7 Literaturverzeichnis

1. Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220, (4599), 868-871.
2. Gallo, R. C.; Salahuddin, S. Z.; Popovic, M.; Shearer, G. M.; Kaplan, M.; Haynes, B. F.; Palker, T. J.; Redfield, R.; Oleske, J.; Safai, B., Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **1984**, 224, (4648), 500-503.
3. WHO, 2008 Report on the global AIDS epidemic, Executive summary. www.unaids.org **2008**.
4. Temin, H. M.; Mizutani, S., RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Biotechnology* **1970**, 24, 51-56.
5. Baltimore, D., Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature* **1970**, 226, 1209-1211.
6. Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U., *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag: 2003.
7. Frankel, A. D.; Young, J. A., HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry* **1998**, 67, 1-25.
8. Zündorf, I.; Dingermann, T., Nur wenn man den Feind kennt, kann man ihn richtig bekämpfen, Struktur des HI-Virus. *Pharmazie in unserer Zeit* **2001**, 30, (3), 202-207.
9. Fackler, O. T.; Geyer, M., Neue Strategien für die Bekämpfung von HIV: Der Aktivität des Nef-Proteins auf der Spur. *Biologie in unserer Zeit* **2002**, 32, (2), 90-100.
10. Geyer, M.; Fackler, O. T.; Matija Peterlin, B., Structure-function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Reports* **2001**, 2, (7), 580-585.
11. Piguet, V.; Trono, D., The Nef protein of primate lentiviruses. *Reviews in Medical Virology* **1999**, 9, 111-120.
12. Ahmad, N.; Venkatesan, S., Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* **1988**, 241, (4872), 1481-1485.

13. Luciw, P. A.; Cheng-Mayer, C.; Levy, J. A., Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* **1987**, 84, (5), 1434-1438.
14. Terwilliger, E.; Sodroski, J. G.; Rosen, C. A.; Haseltine, W. A., Effects of mutations within the 3' orf open reading frame region of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) on replication and cytopathogenicity. *Journal of Virology* **1986**, 60, (2), 754-760.
15. Cheng-Mayer, C.; Iannello, P.; Shaw, K.; Luciw, P. A.; Levy, J. A., Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science* **1989**, 246, (4937), 1629-1632.
16. Kestler, H. W., 3rd; Ringler, D. J.; Mori, K.; Panicali, D. L.; Sehgal, P. K.; Daniel, M. D.; Desrosiers, R. C., Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **1991**, 65, (4), 651-662.
17. Kirchhoff, F.; Greenough, T. C.; Brettler, D. B.; Sullivan, J. L.; Desrosiers, R. C., Absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine* **1995**, 332, 228-232.
18. Deacon, N. J.; Tsykin, A.; Solomon, A.; Smith, K.; Ludford-Menting, M.; Hooker, D. J.; McPhee, D. A.; Greenway, A. L.; Ellett, A.; Chatfield, C.; Lawson, V. A.; Crowe, S.; Maerz, A.; Sonza, S.; Learmont, J.; Sullivan, J. S.; Cunningham, A.; Dwyer, D.; Downton, D.; Mills, J., Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **1995**, 270, (5238), 988-991.
19. Lee, C. H.; Saksela, K.; Mirza, U. A.; Chait, B. T.; Kuriyan, J., Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell* **1996**, 85, (6), 931-942.
20. Arold, S.; Franken, P.; Strub, M. P.; Hoh, F.; Benichou, S.; Benarous, R.; Dumas, C., The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signaling. *Structure* **1997**, 5, (10), 1361-1372.

21. Grzesiek, S.; Bax, A.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Hu, J. S.; Kaufman, J.; Palmer, I.; Stahl, S. J.; Wingfield, P. T., The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase. *Natural Structural Biology* **1996**, 3, (4), 340-345.
22. Grzesiek, S.; Bax, A.; Hu, J. S.; Kaufman, J.; Palmer, I.; Stahl, S. J.; Tjandra, N.; Wingfield, P. T., Refined solution structure and backbone dynamics of HIV-1 Nef. *Protein Science* **1997**, 6, (6), 1248-1263.
23. Grzesiek, S.; Stahl, S. J.; Wingfield, P. T.; Bax, A., The CD4 determinant for down-regulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* **1996**, 35, (32), 10256-10261.
24. Niederman, T. M. J.; Hastings, R. W.; Ratner, L., Myristoylation-enhanced binding of the HIV-1 Nef protein to T cell skeletal matrix. *Virology* **1993**, 197, 420-425.
25. Bentham, M.; Mazaleyrat, S.; Harris, M., Role of myristoylation and N-terminal basic residues in membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein. *Journal of General Virology* **2006**, 87, (Pt 3), 563-571.
26. Fackler, O. T.; Moris, A.; Tibroni, N.; Giese, S. I.; Glass, B.; Schwartz, O.; Krauslich, H. G., Functional characterization of HIV-1 Nef mutants in the context of viral infection. *Virology* **2006**, 351, (2), 322-339.
27. Arold, S. T.; Baur, A. S., Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends in Biochemical Sciences* **2001**, 26, (6), 356-363.
28. Geyer, M.; Munte, C. E.; Schorr, J.; Kellner, R.; Kalbitzer, H. R., Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *Journal of Molecular Biology* **1999**, 289, (1), 123-138.
29. Kirchhoff, F.; Schindler, M.; Specht, A.; Arhel, N.; Munch, J., Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cellular and Molecular Life Science* **2008**, 65, (17), 2621-2636.
30. Maddon, P. J.; Dalgleish, A. G.; McDougal, J. S.; Clapham, P. R.; Weiss, R. A.; Axel, R., The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **1986**, 47, (3), 333-348.
31. Lama, J., The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. *Current HIV Research* **2003**, 1, (2), 167-184.

32. Aiken, C.; Konner, J.; Landau, N. R.; Lenburg, M. E.; Trono, D., Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **1994**, 76, (5), 853-864.
33. Bresnahan, P. A.; Yonemoto, W.; Ferrell, S.; Williams-Herman, D.; Geleziunas, R.; Greene, W. C., A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Current Biology* **1998**, 8, (22), 1235-1238.
34. Chen, B. K.; Gandhi, R. T.; Baltimore, D., CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef. *Journal of Virology* **1996**, 70, (9), 6044-6053.
35. Cortes, M. J.; Wong-Staal, F.; Lama, J., Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, (3), 1770-1779.
36. Lama, J.; Mangasarian, A.; Trono, D., Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Current Biology* **1999**, 9, (12), 622-631.
37. Schwartz, O.; Marechal, V.; Le Gall, S.; Lemonnier, F.; Heard, J. M., Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine* **1996**, 2, (3), 338-342.
38. Akari, H.; Arold, S.; Fukumori, T.; Okazaki, T.; Strebel, K.; Adachi, A., Nef-induced major histocompatibility complex class I down-regulation is functionally dissociated from its virion incorporation, enhancement of viral infectivity, and CD4 down-regulation. *Journal of Virology* **2000**, 74, (6), 2907-2912.
39. Collins, K. L.; Chen, B. K.; Kalams, S. A.; Walker, B. D.; Baltimore, D., HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **1998**, 391, (6665), 397-401.
40. Cohen, G. B.; Gandhi, R. T.; Davis, D. M.; Mandelboim, O.; Chen, B. K.; Strominger, J. L.; Baltimore, D., The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* **1999**, 10, (6), 661-671.
41. Schwartz, O.; Marechal, V.; Danos, O.; Heard, J. M., Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *Journal of Virology* **1995**, 69, (7), 4053-4059.

42. Harris, M., HIV: a new role for Nef in the spread of HIV. *Current Biology* **1999**, *9*, (12), R459-R461.
43. Breuer, S.; Gerlach, H.; Kolaric, B.; Urbanke, C.; Opitz, N.; Geyer, M., Biochemical indication for myristoylation-dependent conformational changes in HIV-1 Nef. *Biochemistry* **2006**, *45*, (7), 2339-2349.
44. Boll, A. Untersuchung der Wechselwirkung von HIV-1 Nef mit artifiziellen Membransystemen. Diplomarbeit, 2007.
45. Atkins, P. W., *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH: 2001.
46. Schwarz, G.; Robert, C. H., Pore formation kinetics in membranes, determined from the release of marker molecules out of liposomes or cells. *Biophysical Journal* **1990**, *58*, (3), 577-583.
47. Steinem, C., Pore-suspending membranes on highly ordered porous alumina and porous silicon substrates: preparation, characterization, and application. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* **2008**, *7*, 59-78.
48. Ende, D.; Mangold, K.-M., Impedanzspektroskopie. *Chemie unserer Zeit* **1993**, *27*, (3), 134-140.
49. Herrig, A.; Janke, M.; Austermann, J.; Gerke, V.; Janshoff, A.; Steinem, C., Co-operative adsorption of ezrin on PIP2-containing membranes. *Biochemistry* **2006**, *45*, (43), 13025-13034.
50. Kastl, K.; Menke, M.; Luthgens, E.; Faiss, S.; Gerke, V.; Janshoff, A.; Steinem, C., Partially reversible adsorption of annexin A1 on POPC/POPS bilayers investigated by QCM measurements, SFM, and DMC simulations. *Chembiochem* **2006**, *7*, (1), 106-115.
51. Kastl, K.; Ross, M.; Gerke, V.; Steinem, C., Kinetics and thermodynamics of annexin A1 binding to solid-supported membranes: a QCM study. *Biochemistry* **2002**, *41*, (31), 10087-10094.
52. Janshoff, A.; Galla, H. J.; Steinem, C., Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors? *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, (22), 4004-4032.
53. Sauerbrey, G., Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **1959**, *155*, 206-222.
54. Kanazawa, K. K.; Gordon, J. G., Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 1770-1771.

55. Azzam, R. M. A.; Bashara, N. M., *Ellipsometry and polarized light*. 4. Paperback ed.; Elsevier: Amsterdam, 1999.
56. Vedam, K., Spectroscopic ellipsometry: a historical overview. *Thin Solid Films* **1998**, 313-314, 1-9.
57. Jin, G.; Jansson, R.; Arwin, H., Imaging ellipsometry revisited: developments for visualization of thin transparent layers on silicon substrates. *Review of Scientific Instruments* **1996**, 67, 2930-2936.
58. Drude, P., Über die Reflexion und Brechung ebener Lichtwellen beim Durchgang durch eine mit Oberflächenschichten behaftete planparallele Platte. *Wiedemanns Annalen der Physik und Chemie* **1891**, 43, 126-157.
59. Drude, P., *Theory of optics*. Longmans, Green & Co., New York: 1901.
60. Reiter, R.; Motschmann, H.; Orendi, H.; Nemetz, A.; Knoll, W., Ellipsometric microscopy. Imaging monomolecular surfactant layers at the air-water interface. *Langmuir* **1992**, 8, 1784-1788.
61. Schuy, S.; Faiss, S.; Yoder, N. C.; Kalsani, V.; Kumar, K.; Janshoff, A.; Vogel, R., Structure and thermotropic phase behavior of fluorinated phospholipid bilayers: a combined attenuated total reflection FTIR spectroscopy and imaging ellipsometry study. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, 112, (28), 8250-8256.
62. Reimhult, E.; Zach, M.; Hook, F.; Kasemo, B., A multitechnique study of liposome adsorption on Au and lipid bilayer formation on SiO₂. *Langmuir* **2006**, 22, (7), 3313-3319.
63. Elwing, H., Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research. *Biomaterials* **1998**, 19, (4-5), 397-406.
64. Malmsten, M., Ellipsometry studies of protein adsorption at lipid surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, 168, (1), 247-254.
65. Tompkins, H. G., *A user's guide to Ellipsometry*. Academic Press, Inc. San Diego: 1993.
66. Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E., Surface studies by scanning tunneling microscopy *Physical Review Letters* **1982**, 49, 57-61.
67. Binnig, G.; Quate, C.; Gerber, C., Atomic force microscopy. *Physical Review Letters* **1986**, 56, 930-933.
68. Marti, O.; Drake, B.; Hansma, P. K., Atomic force microscopy of liquid-covered surfaces: atomic resolution images. *Applied Physics Letters* **1987**, 51, 484-486.

69. Hansma, P. K.; Cleveland, J. P.; Radmacher, M.; Prater, C. B.; Massie, J.; Fukugona, L.; Gurley, J.; Elings, V., Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Applied Physics Letters* **1994**, *64*, 1738-1740.
70. Putman, C. A.; van der Werf, K. O.; de Grooth, B. G.; van Hulst, N. F.; Greve, J., Tapping mode atomic force microscopy in liquid. *Applied Physics Letters* **1994**, *64*, 2454-2456.
71. Lee, G. U.; Chrisey, L. A.; Colton, R. J., Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science* **1994**, *266*, (5186), 771-773.
72. Rief, M.; Gautel, M.; Oesterhelt, F.; Fernandez, J. M.; Gaub, H. E., Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **1997**, *276*, (5315), 1109-1112.
73. Parot, P.; Dufrene, Y. F.; Hinterdorfer, P.; Le Grimellec, C.; Navajas, D.; Pellequer, J. L.; Scheuring, S., Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. *Journal of Molecular Recognition* **2007**, *20*, (6), 418-431.
74. Ando, T.; Uchihashi, T.; Kodera, N.; Yamamoto, D.; Miyagi, A.; Taniguchi, M.; Yamashita, H., High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes. *Pflugers Archiv* **2008**, *456*, (1), 211-225.
75. Hawkes, P. W.; Spence, J. C. H., *Science of microscopy*. Springer: 2007; Vol. II.
76. Kaminchik, J.; Margalit, R.; Yaish, S.; Drummer, H.; Amit, B.; Sarver, N.; Gorecki, M.; Panet, A., Cellular distribution of HIV type 1 Nef protein: identification of domains in Nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. *AIDS Research and Human Retroviruses* **1994**, *10*, (8), 1003-1010.
77. Giese, S. I.; Woerz, I.; Homann, S.; Triboni, N.; Geyer, M.; Fackler, O. T., Specific and distinct determinants mediate membrane binding and lipid raft incorporation of HIV-1 (SF2) Nef. *Journal of Virology* **2006**, *78*, 4085-4097.
78. Wang, J. K.; Kiyokawa, E.; Verdin, E.; Trono, D., The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 394-399.
79. Zheng, Y. H.; Plemenitas, A.; Linnemann, T.; Fackler, O. T.; Peterlin, B. M., Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Current Biology* **2001**, *11*, 876-879.
80. Alexander, M.; Bor, Y. C.; Ravichandran, K. S.; Hammarskjold, M. L.; Rekosh, D., Human immunodeficiency virus type I Nef associates with lipid rafts to down-modulate cell surface CD4 and class I major histocompatibility complex expression and to increase viral infectivity *Journal of Virology* **2004**, *78*, 1685-1696.

81. Curtain, C. C.; Separovic, F.; Rivett, D.; Kirkpatrick, A.; Waring, A. J.; Gordon, L. M.; Azad, A. A., Fusogenic activity of amino-terminal region of HIV type 1 Nef protein. *AIDS Research and Human Retroviruses* **1994**, 10, (10), 1231-1240.
82. Arbuzova, A.; Schwarz, G., Pore-forming action of mastoparan peptides on liposomes: a quantitative analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1420, (1-2), 139-152.
83. Rex, S.; Schwarz, G., Quantitative studies on the melittin-induced leakage mechanism of lipid vesicles. *Biochemistry* **1998**, 37, (8), 2336-2345.
84. Schwarz, G.; Zong, R. T.; Popescu, T., Kinetics of melittin induced pore formation in the membrane of lipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* **1992**, 1110, (1), 97-104.
85. Plant, A., L., Self-Assembled Phospholipid/Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold. *Langmuir* **1993**, 9, (11), 2764-2767.
86. Ohki, S.; Marcus, E.; Sukumaran, D. K.; Arnold, K., Interaction of melittin with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1994**, 1194, (2), 223-232.
87. Hinch, D. K.; Crowe, J. H., The lytic activity of the bee venom peptide melittin is strongly reduced by the presence of negatively charged phospholipids or chloroplast galactolipids in the membranes of phosphatidylcholine large unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* **1996**, 1284, (2), 162-170.
88. Sessa, G.; Freer, J. H.; Colacicco, G.; Weissmann, G., Interaction of a Lytic Polypeptide, Melittin, with Lipid Membrane Systems. *Journal of Biological Chemistry* **1969**, 244, (10), 3575-3582.
89. Popplewell, J. F.; Swann, M. J.; Freeman, N. J.; McDonnell, C.; Ford, R. C., Quantifying the effects of melittin on liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, 1768, (1), 13-20.
90. Schibli, D. J.; Epan, R. F.; Vogel, H. J.; Epan, R. M., Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions. *Biochemistry and Cell Biology* **2002**, 80, (5), 667-677.
91. Chan, D. I.; Prenner, E. J.; Vogel, H. J., Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, 1758, (9), 1184-1202.
92. Gerlach, H. Analyse der Membranbindung von HIV-1 Nef_{SF2}. Dortmund, 2008.

93. Freund, J.; Kellner, R.; Houthaeve, T.; Kalbitzer, H. R., Stability and proteolytic domains of Nef protein from human immunodeficiency virus (HIV) type 1. *European Journal of Biochemistry* **1994**, 221, (2), 811-819.
94. Fujii, Y.; Otake, K.; Tashiro, M.; Adachi, A., Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein on the cell surface is cytotoxic for human CD4+ T cells. *FEBS Letters* **1996**, 393, (1), 105-108.
95. Macreadie, I. G.; Fernley, R.; Castelli, L. A.; Lucantoni, A.; White, J.; Azad, A., Expression of HIV-1 nef in yeast causes membrane perturbation and release of the myristylated Nef protein. *Journal of Biomedical Sciences* **1998**, 5, (3), 203-210.
96. Macreadie, I. G.; Lowe, M. G.; Curtain, C. C.; Hewish, D.; Azad, A. A., Cytotoxicity resulting from addition of HIV-1 Nef N-terminal peptides to yeast and bacterial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, 232, (3), 707-711.
97. Curtain, C. C.; Lowe, M. G.; Arunagiri, C. K.; Mobley, P. W.; Macreadie, I. G.; Azad, A. A., Cytotoxic activity of the amino-terminal region of HIV type 1 Nef protein. *AIDS Research and Human Retroviruses* **1997**, 13, (14), 1213-1220.
98. Curtain, C. C.; Lowe, M. G.; Macreadie, I. G.; Gentle, I. R.; Lawrie, G. A.; Azad, A. A., Structural requirements for the cytotoxicity of the N-terminal region of HIV type 1 Nef. *AIDS Research and Human Retroviruses* **1998**, 14, (17), 1543-1551.
99. Barnham, K. J.; Monks, S. A.; Hinds, M. G.; Azad, A. A.; Norton, R. S., Solution structure of a polypeptide from the N terminus of the HIV protein Nef. *Biochemistry* **1997**, 36, 5970-5980.
100. Poirier, G. E. T., M. J., The c(4x2) superlattice of n-alkanthiol monolayer self-assembled on Au(111). *Langmuir* **1994**, 10, (9), 2853-2856.
101. Fenter, P.; Eisenberger, P.; Liang, K. S., Chain-length dependence of the structures and phases of CH₃(CH₂)_{n-1} SH self-assembled on Au(111). *Physical Review Letters* **1993**, 70, (16), 2447-2450.
102. Pfeiffer, I.; Seantier, B.; Petronis, S.; Sutherland, D.; Kasemo, B.; Zach, M., Influence of nanotopography on phospholipid bilayer formation on silicon dioxide. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, 112, (16), 5175-5181.
103. Janshoff, A.; Steinem, C.; Sieber, M.; Galla, H. J., Specific binding of peanut agglutinin to GM1-doped solid supported lipid bilayers investigated by shear wave resonator measurements. *European Biophysical Journal* **1996**, 25, (2), 105-113.

104. Daikhin, L.; Gileadi, E.; Katz, G.; Tsionsky, V.; Urbakh, M.; Zagidulin, D., Influence of roughness on the admittance of the quartz crystal microbalance immersed in liquids. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (3), 554-561.
105. Urbakh, M.; Daikhin, L., Roughness effect on the frequency of a quartz-crystal resonator in contact with a liquid. *Physical Review B: Condensed Matter* **1994**, 49, (7), 4866-4870.
106. Urbakh, M.; Daikhin, L., Influence of the surface morphology on the quartz crystal microbalance response in a fluid. *Langmuir* **1994**, 10, 2836-2841.
107. Höök, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H., Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (24), 5796-804.
108. Höök, F.; Kasemo, B., *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*. 2006; Vol. 5.
109. Yang, M.; Thompson, M., Surface morphology and response of the thickness-shear mode acoustic wave sensor in liquids. *Langmuir* **1993**, 9, 1990-1994.
110. Yang, M.; Thompson, M., Interfacial properties and response of the thickness-shear-mode acoustic wave sensor in liquids. *Langmuir* **1993**, 9, 802-811.
111. Caruso, F.; Furlong, D. N.; Kingshott, P., Characterization of Ferritin Adsorption onto Gold. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, 186, (1), 129-140.
112. Muratsugu, M.; Ohta, F.; Miya, Y.; Hosokawa, T.; Kurosawa, S.; Kamo, N.; Ikeda, H., Quartz crystal microbalance for the detection of microgram quantities of human serum albumin: relationship between the frequency change and the mass of protein adsorbed. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, (20), 2933-2937.
113. Fawcett, N. C.; Craven, R. D.; Zhang, P.; Evans, J. A., QCM response to solvated, tethered macromolecules. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, (14), 2876-2889.
114. Rickert, J.; Weiss, T.; Gopel, W., Self-assembled monolayers for chemical sensors: molecular recognition by immobilized supramolecular structures. *Sensors and Actuators B* **1996**, 31, (1-2), 45-50.
115. Coates, K.; Cooke, S. J.; Mann, D. A.; Harris, M. P. G., Protein kinase C-mediated phosphorylation of HIV-1 nef in human cell lines. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 12289-12294.

116. Fackler, O. T.; Kienzle, N.; Kremmer, E.; Boese, A.; Schramm, B.; Klimkait, T.; Kucherer, C.; Mueller-Lantzsch, N., Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization. *European Journal of Biochemistry* **1997**, 247, 843-851.
117. Yalovsky, S.; Rodr Guez-Concepcion, M.; Gruissem, W., Lipid modifications of proteins - slipping in and out of membranes. *Trends in Plant Science* **1999**, 4, (11), 439-445.
118. Bhatnagar, R. S.; Gordon, J. I., Understanding covalent modifications of proteins by lipids: where cell biology and biophysics mingle. *Trends in Cell Biology* **1997**, 7, (1), 14-20.
119. Resh, M. D., Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal* **1996**, 8, (6), 403-412.
120. Peitzsch, R. M.; McLaughlin, S., Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **1993**, 32, (39), 10436-10443.
121. Buser, C. A.; Sigal, C. T.; Resh, M. D.; McLaughlin, S., Membrane binding of myristylated peptides corresponding to the NH₂ terminus of Src. *Biochemistry* **1994**, 33, (44), 13093-13101.
122. Harris, M., The role of myristoylation in the interactions between human immunodeficiency virus type I Nef and cellular proteins. *Biochemical Society Transactions* **1995**, 23, (3), 557-561.
123. Baur, A. S.; Sass, G.; Laffert, B.; Willbold, D.; Cheng-Mayer, C.; Peterlin, B. M., The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. *Immunity* **1997**, 6, 283-291.
124. Killian, J. A.; von Heijne, G., How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends in Biochemical Sciences* **2000**, 25, (9), 429-434.
125. Yau, W. M.; Wimley, W. C.; Gawrisch, K.; White, S. H., The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* **1998**, 37, (42), 14713-14718.
126. Silvius, J. R.; Gagné, J., Calcium-induced fusion and lateral phase separations in Phosphatidylcholine-Phosphatidylserine vesicles. Correlation by calorimetric and fusion measurements. *Biochemistry* **1984**, 23, 3241-3247.

127. Silvius, J. R., Calcium-induced lipid phase separations and interactions of phosphatidylcholine/anionic phospholipid vesicles. Fluorescence studies using carbazole-labeled and brominated phospholipids. *Biochemistry* **1990**, 29, (12), 2930-2938.
128. Menke, M.; Gerke, V.; Steinem, C., Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* **2005**, 44, (46), 15296-15303.
129. Arbuzova, A.; Wang, L.; Wang, J.; Hangyas-Mihalyne, G.; Murray, D.; Honig, B.; McLaughlin, S., Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry* **2000**, 39, (33), 10330-10339.
130. Kang, J. H.; Lee, M. K.; Kim, K. L.; Hahm, K. S., Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1996**, 48, (4), 357-363.
131. Vogel, H. J.; Schibli, D. J.; Jing, W.; Lohmeier-Vogel, E. M.; Epanand, R. F.; Epanand, R. M., Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. *Biochemistry and Cell Biology* **2002**, 80, (1), 49-63.
132. Blondelle, S. E.; Houghten, R. A., Novel antimicrobial compounds identified using synthetic combinatorial library technology. *Trends in Biotechnology* **1996**, 14, (2), 60-65.
133. Lensink, M. F.; Christiaens, B.; Vandekerckhove, J.; Prochiantz, A.; Rosseneu, M., Penetratin-membrane association: W48/R52/W56 shield the peptide from the aqueous phase. *Biophysical Journal* **2005**, 88, (2), 939-952.
134. Mitchell, J. B.; Nandi, C. L.; McDonald, I. K.; Thornton, J. M.; Price, S. L., Amino/aromatic interactions in proteins: is the evidence stacked against hydrogen bonding? *Journal of Molecular Biology* **1994**, 239, (2), 315-331.
135. Aliste, M. P.; MacCallum, J. L.; Tieleman, D. P., Molecular dynamics simulations of pentapeptides at interfaces: salt bridge and cation-pi interactions. *Biochemistry* **2003**, 42, (30), 8976-8987.
136. Aiken, C.; Krause, L.; Chen, Y. L.; Trono, D., Mutational analysis of HIV-1 Nef: identification of two mutants that are temperature-sensitive for CD4 downregulation. *Virology* **1996**, 217, (1), 293-300.

137. Hoffmann, S.; Jonas, E.; König, S.; Preusser-Kunze, A.; Willbold, D., Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 binds its own myristoylated N-terminus. *Biological Chemistry* **2007**, 388, (2), 181-183.
138. Brügger, B.; Krautkramer, E.; Tibroni, N.; Munte, C. E.; Rauch, S.; Leibrecht, I.; Glass, B.; Breuer, S.; Geyer, M.; Krausslich, H. G.; Kalbitzer, H. R.; Wieland, F. T.; Fackler, O. T., Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein modulates the lipid composition of virions and host cell membrane microdomains. *Retrovirology* **2007**, 4, 70.
139. Zheng, Y. H.; Plemenitas, A.; Fielding, C. J.; Peterlin, B. M., Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, (14), 8460-8465.
140. van 't Wout, A. B.; Swain, J. V.; Schindler, M.; Rao, U.; Pathmajeyan, M. S.; Mullins, J. I.; Kirchhoff, F., Nef induces multiple genes involved in cholesterol synthesis and uptake in human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *Journal of Virology* **2005**, 79, (15), 10053-10058.

8 Anhang

8.1 Symbolverzeichnis

λ	Wellenlänge
Δ	ellipsometrischer Winkel
Ψ	ellipsometrischer Winkel
β	optische Weglänge
ϕ	Phasenverschiebung
ρ	Dichte
ω	Kreisfrequenz
μ	Schermodul
η	Viskosität
ε_0	elektrische Feldkonstante
ε_r	relative Dielektrizitätskonstante des hydrophoben Teils der Membran
A	Fläche
B	magnetischen Feldvektor
C_f	Sauerbreykonstante
$C_{m/el}$	Kapazität der Membran beziehungsweise des Elektrolyten
d	Dicke
$E^{S/P}$	elektrischer Feldvektor
f	Frequenz
F	Kraft
$F_{rel/0/max}$	Fluoreszenzintensität
G	Entalpie
I	Strom
k	Wellenvektor
M	molare Masse
m	Masse
n	Brechungsindex
$r^{1/2}$	Fresnelkoeffizient
R_{eq}	Gleichgewichtsabstand

$R_{m/el}$	Widerstand der Membran beziehungsweise des Elektrolyten
$R^{S/P}$	Reflektionskoeffizient
$S_{0/1}$	elektronischer Grundzustand beziehungsweise erster angeregter Zustand
t	Zeit
T_M	Hauptphasenumwandlungstemperatur
U	Spannung
V	Potential
Z	Impedanz

8.2 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
APS	Ammoniumpersulfat
CA	Capsid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CF	5(6)-Carboxyfluorescein
Chol	Cholesterin
CPPs	<i>cell penetrating peptides</i>
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
dI	dynamische Inkubationsbedingungen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho- <i>rac</i> -(1-glycerin)]
DOPS	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-(phospho-L-serin)
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DSC	<i>differential scanning calometry</i>
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EIS	elektrochemische Impedanzspektroskopie
<i>env</i>	<i>envelop</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>gag</i>	<i>group specific antigen</i>

HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
IN	Intergrase
LDH	Milchsäuredehydrogenase
LFM	<i>lateral force microscopy</i>
LUVs	<i>large unilamellar vesicles</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
MA	Matrix
MARCKS	<i>myristoylated alanine rich C kinase substrate</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NC	Nukleocapsid
NK	<i>natural killer cell</i>
OT	Oktanthiol
P	Pellet
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
<i>pol</i>	<i>polymerase</i>
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho- <i>rac</i> -(1-glycerin)]
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-(phospho-L-serine)
PC	Phosphatidylcholin
PR	Protease
PS	Phosphatidylserin
QCM	Quarzmikrowaagetechnik
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sI	statische Inkubationsbedingungen
SM	Sphingomyelin
SUVs	<i>small unilamellar vesicles</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü	Überstand
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp

8.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid-Bisacrylamid (30 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniak (25 %)	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>cantilever</i> CSC 37	Mikromasch, Tallin (Estland)
<i>cantilever</i> CSC38	Mikromasch, Tallin (Estland)
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Cholesterin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol, reinst	Merck, Darmstadt
FITC-konjugierter Anti- His ₆ -tag-Antikörper	ICL, Inc., Newberg (USA)
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol, reinst	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mucosal®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Polycarbonatmembran	Avestin, Ottawa (Kanada)
POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
POPS	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
POPG	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure	USB, Cleveland (USA)
SDS	Merck, Darmstadt
Sephadex™ G-25 DNA Grade	Biotech Ab, Uppsala (schweden)
Sigma-Marker (wide range)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Silberleitlack	Conrad Elektronik, Wernberg

Siliziumträger (ohne Oxid)	Si-Mat, Landsberg/Lech
Siliziumträger (100 nm Oxid)	CrysTec, Berlin
Sphingomyelin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TexasRed DHPE	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

8.4 Materialien

Eppendorfpipetten	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzküvette	Starna GmbH, Pfungstadt
Kalrez® Dichtringe	DuPont
5 MHz-AT-cut Quarze	KVG, Neckarbischofsheim
Platindraht	Good Fellow, Cambridge, UK
Trocknungsrahmen für Gele	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

8.5 Geräte

Ellipsometer

EP3	Nanofilm Surface Analysis, Göttingen
-----	--------------------------------------

Fluoreszenzmikroskop

Axiotech Vario	Carl Zeiss, Jena
Filtersatz 44	Carl Zeiss, Jena
(BP 475/40, FT 500, BP 530/50)	Carl Zeiss, Jena
(BP 560/40, FT 585, BP 630/75)	
Objektiv Achromplan	Carl Zeiss, Jena
(40x/n.A. 0,8 W)	

Gelelektrophoreseapparatur

PerfectBlue Twin S	Peqlab, Erlangen
Spannungsquelle Consort E85	Peqlab, Erlangen

Impedanzspektrometer

SI 1260 Solartron Instruments, Farnborough, UK

Fluoreszenzspektrometer

FB-6500 Spektrofluorometer Jasco, Gotha

Quarzmikrowaage

Frequenzzähler 53181 HP, San Diego, USA

Netzteil E3630A HP, San Diego, USA

Oszillatorschaltkreis (TTL SN74LS124N) Texas Instruments, Dallas, USA

Peristaltikpumpe Ismatec, Wertheim

Rasterkraftmikroskop

Nanowizard I JPK Instruments, Berlin

Nanowizard II, BioAFM JPK Instruments, Berlin

Zentrifugen

Ultrazentrifuge Optima™ L-90K Beckman Coulter , Krefeld

Galaxy Mini VWR, Darmstadt

Sonstiges

Feinwaage CP 225D Sartorius, Göttingen

Heizplatte Heidolph MR 3001 K

LiposoFast® Gerät Aventin, Ottawa (Kanada)

pH-Meter *Calimatic 766* Knick, Berlin

Plasmareiniger Harrick, New York (USA)

Reinstwasseranlage, *Milli Elix 5* Millipore, Eschborn

Schüttler *Reax Top* Heidolph, Schwabach

Thermomixer compact Eppendorf, Hamburg

Tip-Sonifier Sonoplus HD2070 Bandelin, Berlin

Ultraschallbad Sonorex Bandelin, Berlin

Vakuumtrockenschrank Binder, Tuttlingen

Wippschüttler ST5 CAT, Staufen

Wasserbad E11 Dinkelberg analytics, Neu-Ulm

8.6 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: SCHEMATISCHER AUFBAU DES HIV-GENOMS UND VIRIONS.	2
ABBILDUNG 1.2: SEKUNDÄRSTRUKTUR VON HIV-1 NEF, SOWIE DIE STRUKTURMOTIVE, DIE FÜR DIE FUNKTIONEN VON NEF VON BEDEUTUNG SIND.	4
ABBILDUNG 1.3: ÜBERBLICK ÜBER DIE VERSCHIEDENEN KONFORMATIONEN, DIE HIV-1 NEF IN DER ZELLE EINNEHMEN KANN.	6
ABBILDUNG 3.1 AMINOSÄURESEQUENZ DES N-TERMINUS VON WT NEF BZW. DER MUTANTEN NEF G2A, NEF KKAA UND NEF R4A IM EINBUCHSTABENCODE.	13
ABBILDUNG 3.2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ENERGIEZUSTÄNDE VON S_0 UND S_1 MIT SCHWINGUNGSZUSTÄNDEN (0,1,2).	19
ABBILDUNG 3.3: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES SPEKTRALFLUOROMETERS.	19
ABBILDUNG 3.4: STRUKTURFORMELN VON A: 5(6)-CARBOXYFLUORESCEIN UND B: TRITONX-100.	20
ABBILDUNG 3.5: <i>RELEASE</i> -MESSUNG AN POPC-VESIKELN MIT 100 MM CF, ZUGABE VON HIV-1 WT NEF UND TRITONX-100 ERREICHT. A: ORIGINALDATENSATZ UND B: NORMIERTER DATENSATZ.	21
ABBILDUNG 3.6: A ERSATZSCHALTBILD FÜR EINE MIT PUFFER ÜBERSCHICHTETE LIPIDDOPPELSCHICHT UND B: FÜR DAS VEREINFACHTE SYSTEM, GELTEND FÜR HOHE MEMBRANWIDERSTÄNDE.	22
ABBILDUNG 3.7: SIMULIERTES BODE-DIAGRAMM FÜR DAS IN ABBILDUNG 3.6 B DARGESTELLTE ERSATZSCHALTBILD.	23
ABBILDUNG 3.8: SCHEMATISCHER AUFBAU EINER QUARZMIKROWAAGE.	26
ABBILDUNG 3.9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON A: LINEAR POLARISIERTEM LICHT, B: ZIRKULAR POLARISIERTEM LICHT, C/D: ELLIPTISCH POLARISIERTEM LICHT.	28
ABBILDUNG 3.10: REFLEXION UND BRECHUNG EINES LICHTSTRAHLS AN ZWEI GRENZFLÄCHEN.	29
ABBILDUNG 3.11: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES ELLIPSOMETERS.	30
ABBILDUNG 3.12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MODELLS, WELCHES ZUR BERECHNUNG DER MEMBRANSCHICHTDICKE VERWENDET WURDE, MIT DEN ZUGEHÖRIGEN SCHICHTDICKEN UND BRECHUNGSINDICES.	31
ABBILDUNG 3.13: SCHEMAT. AUFBAU EINES AUFLICHTFLUORESZENZMIKROSKOPS.	32
ABBILDUNG 3.14: STRUKTURFORMEL VON TEXASRED DHPE.	33
ABBILDUNG 3.15: STRUKTURFORMEL VON FITC.	34
ABBILDUNG 3.16: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES RASTERKRAFTMIKROSKOPS.	36
ABBILDUNG 3.17: LENNARD-JONES-POTENTIAL UND DIE DARAUS ABGELEITETE KRAFT ALS FUNKTION DES SPITZE-PROBE-ABSTANDS.	37
ABBILDUNG 3.18 A: <i>CANTILEVER</i> TORSION AUFGRUND VON MATERIALUNTERSCHIEDEN, B: TOPOGRAPHISCH BEDINGTE LATERALE VERBIEGUNG DES <i>CANTILEVERS</i>	38
ABBILDUNG 3.19: MÖGLICHE ABBILDUNGSFEHLER BEIM AFM-MESSEN.	40

ABBILDUNG 4.1: ANALYSE DES VESIKELCOSEDIMENTATIONSASSAYS VON POPC-VESIKELN MIT WT NEF UND NEF G2A PER SDS-PAGE.	44
ABBILDUNG 4.2: ANALYSE DES VESIKELCOSEDIMENTATIONSASSAYS VON VESIKELN BESTEHEND AUS POPC:SM:CHOL (2:1:1) MIT WT NEF UND NEF G2A PER SDS-PAGE.	46
ABBILDUNG 4.3: ANALYSE DES VESIKELCOSEDIMENTATIONSASSAYS VON VESIKELN BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1) MIT WT NEF UND NEF G2A (A), BEZIEHUNGSWEISE MIT NEF KKAA UND NEF R4A (B) PER SDS-PAGE.	48
ABBILDUNG 4.4: FREISETZUNG VON CF AUS UNILAMELLAREN POPC-VESIKELN (1,3 μ M) NACH ZUGABE VON A: WT NEF, B: NEF G2A, C: NEF KKAA, D: NEF R4A.	51
ABBILDUNG 4.5: FREISETZUNG VON CF AUS UNILAMELLAREN POPC:POPS (4:1) VESIKELN (1,3 μ M) NACH ZUGABE VON A: WT NEF, B: NEF G2A, C: NEF KKAA, D: NEF R4A.	53
ABBILDUNG 4.6: FREISETZUNG VON CF AUS UNILAMELLAREN POPC:POPG (4:1) VESIKELN (1,3 μ M) NACH ZUGABE VON A: WT NEF, B: NEF G2A, C: NEF KKAA, D: NEF R4A.	55
ABBILDUNG 4.7: IMPEDANZSPEKTURM EINER OT-MONOSCHICHT (■,●) UND (OT/POPC)-DOPPELSCHICHT (■,●).	58
ABBILDUNG 4.8: EXEMPLARISCHE QCM-MESSUNGEN AN OT/POPC-DOPPELSCHICHTEN. NACH DER ZUGABE VON HIV-1 WT NEF.	59
ABBILDUNG 4.9: ZEITLICHER VERLAUF DER RESONANZFREQUENZÄNDERUNG BEI DER ZUGABE VON HIV-1 NEF G2A.	60
ABBILDUNG 4.10: ZWEI EXEMPLARISCHE QCM-MESSUNGEN AN OT/(POPC:SM-CHOL 2:1:1)-DOPPELSCHICHTEN. NACH ZUGABE VON HIV-1 WT NEF.	62
ABBILDUNG 4.11: A: ZEITLICHE ÄNDERUNGEN DER ELLIPSOMETRISCHEN WINKEL DELTA UND PSI NACH ZUGABE VON POPC-VESIKELN (0,2 MG/ML) UND ANSCHLIEBENDEM SPÜLEN MIT PUFFER. B: AUS DELTA UND PSI ÜBER EIN MODELL BERECHNETE SCHICHTDICKENÄNDERUNGEN WÄHREND DES VESIKELSPREITPROZESSES.	64
ABBILDUNG 4.12: ELLIPSOMETRIEMESSUNG AN EINER POPC-MEMBRAN NACH ZUGABE VON 0,5 μ M HIV-1 WT NEF UND ANSCHLIEBENDEM SPÜLEN MIT PUFFER.	65
ABBILDUNG 4.13: ELLIPSOMETRIEMESSUNG AN EINER POPC-MEMBRAN NACH ZUGABE VON 0,5 μ M HIV-1 NEF G2A UND ANSCHLIEBENDEM SPÜLEN MIT PUFFER.	65
ABBILDUNG 4.14 : FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN A: DIREKT NACH DEM SPREITEN UND B: KONTROLLEXPERIMENT. C: TOPOGRAPHISCHE AFM-AUFNAHMEN EINER POPC-MEMBRAN VOR PROTEINZUGABE UND D: KONTROLLEXPERIMENT.	69
ABBILDUNG 4.15: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH DER INKUBATION MIT 1,0 μ M WT NEF ÜBER NACHT BEI 4 °C.	70

ABBILDUNG 4.16: A: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH DER INKUBATION MIT 1,0 μ M WT NEF ÜBER NACHT BEI 4 °C UND ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT DEM FITC-KONJUGIERTEN ANTI-HIS ₆ -TAG-ANTIKÖRPER (1:250) BEI RAUMTEMPERATUR. B: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER FITC-FLUORESZENZ DES ANTIKÖRPERS VON DERSELBEN STELLE.	71
ABBILDUNG 4.17: A: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER MIT 0,1 MOL/% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT EINEM FITC-KONJUGIERTEN ANTI-HIS ₆ -TAG-ANTIKÖRPER (1:250). B: DIESELBE STELLE DER MEMBRAN DURCH DEN FILTERSATZ AUFGENOMMEN, IN DEM DIE FLUORESZENZ DES ANTIKÖRPERS ZU SEHEN IST.	72
ABBILDUNG 4.18: TOPOGRAPHISCHE AFM-AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH DER INKUBATION MIT 1,0 μ M WT NEF ÜBER NACHT BEI 4 °C.	73
ABBILDUNG 4.19: A: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH DER INKUBATION MIT 1,0 μ M NEF G2A ÜBER NACHT BEI 4 °C UND ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT DEM FITC-KONJUGIERTEN ANTI-HIS ₆ -TAG-ANTIKÖRPER (1:250) BEI RAUMTEMPERATUR. B: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER FITC-FLUORESZENZ DES ANTIKÖRPERS VON DERSELBEN STELLE.	74
ABBILDUNG 4.20: TOPOGRAPHISCHE AFM-AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH DER INKUBATION MIT 1,0 μ M NEF G2A ÜBER NACHT BEI 4 °C.	75
ABBILDUNG 4.21: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN. A: DIREKT NACH DEM SPREITEN UND B: KONTROLLEXPERIMENT, BEI DEM DIE MEMBRAN OHNE PROTEIN FÜR 2 H IN DER DURCHFLUSSZELLE MIT PUFFER INKUBIERT WURDE.	77
ABBILDUNG 4.22: REPRÄSENTATIVE FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH DER ZWEISTÜNDIGEN INKUBATION MIT A: 0,1 μ M, B: 0,2 μ M, C: 0,5 μ M, D: 1,0 μ M HIV-1 WT NEF IM DURCHFLUSSSYSTEM.	78
ABBILDUNG 4.23: A: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M WT NEF MIT EINER PUMPGESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN UND ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT DEM FITC-KONJUGIERTEN ANTI-HIS ₆ -TAG-ANTIKÖRPER (1:250) BEI RAUMTEMPERATUR. B: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER FITC-FLUORESZENZ DES ANTIKÖRPERS VON DERSELBEN STELLE.	80

ABBILDUNG 4.24: TOPOGRAPHISCHE AFM-AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M WT NEF MIT EINER PUMPGESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN.....	81
ABBILDUNG 4.25: A: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M NEF G2A MIT EINER PUMPGESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN UND ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT DEM FITC-KONJUGIERTEN ANTI-HIS ₆ -TAG-ANTIKÖRPER (1:250) BEI RAUMTEMPERATUR. B: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER FITC-FLUORESZENZ DES ANTIKÖRPERS VON DERSELBEN STELLE.	82
ABBILDUNG 4.26: TOPOGRAPHISCHE AFM-AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH ZWEITSTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M NEF G2A MIT EINER PUMP-GESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN.....	83
ABBILDUNG 4.27: A: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M NEF KKA A MIT EINER PUMPGESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN UND ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT DEM FITC-KONJUGIERTEN ANTI-HIS ₆ -TAG-ANTIKÖRPER (1:250) BEI RAUMTEMPERATUR. B: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER FITC-FLUORESZENZ DES ANTIKÖRPERS VON DERSELBEN STELLE.	85
ABBILDUNG 4.28: TOPOGRAPHISCHE AFM-AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH ZWEITSTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M NEF KKA A MIT EINER PUMP-GESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN.....	86
ABBILDUNG 4.29: A: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M NEF R4A MIT EINER PUMPGESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN UND ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT DEM FITC-KONJUGIERTEN ANTI-HIS ₆ -TAG-ANTIKÖRPER (1:250) BEI RAUMTEMPERATUR. B: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER FITC-FLUORESZENZ DES ANTIKÖRPERS VON DERSELBEN STELLE.	87
ABBILDUNG 4.30: TOPOGRAPHISCHE AFM-AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN POPC-MEMBRAN NACH ZWEITSTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M NEF R4A MIT EINER PUMP-GESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN.....	88
ABBILDUNG 4.31: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN MEMBRAN BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1). A: DIREKT NACH DEM SPREITEN VOR PROTEINZUGABE UND B: KONTROLLEXPERIMENT, BEI DEM DIE MEMBRAN OHNE PROTEIN FÜR 2 H IN DER DURCHFLUSSZELLE MIT PUFFER INKUBIERT WURDE.....	92
ABBILDUNG 4.32: A/B: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN EINER MEMBRAN BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1), DIE NACH DEM SPREITEN UND SPÜLEN MIT PUFFER DOMÄNEN AUSGEBILDET HABEN.....	93

ABBILDUNG 4.33: TOPOGRAPHISCHE AFM-AUFNAHMEN EINER LIPIDDOPPELSCHICHT BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1) DIREKT NACH DEM SPREITEN MIT DAZUGEHÖRIGEM HÖHENPROFIL. DIE DOMÄNENBILDUNG IST ZEITAUFGELÖST DARGESTELLT.....	94
ABBILDUNG 4.34: A/B/C/D: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN MEMBRAN BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1) NACH ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M WT NEF BEI RAUMTEMPERATUR IM DURCHFLUSSSYSTEM BEI EINER PUMPGESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN.....	95
ABBILDUNG 4.35: A: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER MIT 0,1 MOL/% TEXASRED DHPE DOTIERTEN MEMBRAN BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1) NACH ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT EINEM FITC-KONJUGIERTEN (1:250). B: FLUORESZENZ DES ANTIKÖRPERS VON DERSELBEN STELLE.....	97
ABBILDUNG 4.36: TOPOGRAPHISCHE AFM-AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN LIPIDDOPPELSCHICHT BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1) NACH ZWEITSTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M WT NEF BEI EINER PUMPGESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN BEI RAUMTEMPERATUR.....	98
ABBILDUNG 4.37: A/B/C/D: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN MEMBRAN BESTEHEND AUS POPC:POPS 4:1 NACH ZWEISTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M NEF R4A BEI RAUMTEMPERATUR IM DURCHFLUSSSYSTEM BEI EINER PUMPGESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN.....	100
ABBILDUNG 4.38: TOPOGRAPHISCHE AFM-AUFNAHMEN EINER MIT 0,1 MOL% TEXASRED DHPE DOTIERTEN LIPIDDOPPELSCHICHT BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1) NACH ZWEITSTÜNDIGER INKUBATION MIT 0,5 μ M NEF R4A BEI EINER PUMPGESCHWINDIGKEIT VON 0,25 ML/MIN BEI RAUMTEMPERATUR.....	101
ABBILDUNG 5.1: ÜBERSICHT ÜBER DIE GEMITTELTEN PROZENTUALEN ANSTIEGE DER FLUORESZENZINTENSITÄT NACH ZUGABE VON ENTWEDER WT NEF ODER NEF G2A ZU UNILAMELLAREN LIPIDVESIKELN.....	104
ABBILDUNG 5.2: ÜBERSICHT ÜBER DIE PROZENTUALE SCHICHTDICKENABNAHME DER MEMBRAN NACH ZUGABE VON 0,5 μ M PROTEIN.....	112
ABBILDUNG 5.3: ÜBERSICHT ÜBER DIE ANTEILE NICHTFLUORESZIERENDER BEREICHE NACH DER ZUGABE VON WT NEF ZU POPC-MEMBRANEN BEI VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN UNTER DYNAMISCHEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN.....	113
ABBILDUNG 5.4: ÜBERSICHT ÜBER DIE MITTLEREN ANTEILE NICHTFLUORESZIERENDER BEREICHE NACH DER ZUGABE VON ENTWEDER 1,0 μ M PROTEIN UNTER STATISCHEN (SI) BEZIEHUNGSWEISE 0,5 μ M PROTEIN UNTER DYNAMISCHEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN (DI).....	114
ABBILDUNG 5.5: ÜBERSICHT ÜBER DIE GEMITTELTEN PROZENTUALEN ANSTIEGE DER FLUORESZENZINTENSITÄT NACH ZUGABE VON WT NEF, NEF KKA A UND NEF R4A ZU UNILAMELLAREN LIPIDVESIKELN.....	118

ABBILDUNG 5.6: ÜBERSICHT ÜBER DIE ANTEILE NICHTFLUORESZIERENDER BEREICHE NACH DER ZUGABE VON WT NEF, NEF KKAA ODER NEF R4A ZU MEMBRANEN BESTEHEND AUS POPC UNTER DYNAMISCHEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN (DI).	119
ABBILDUNG 5.7: ÜBERSICHT ÜBER DIE ANTEILE NICHTFLUORESZIERENDER BEREICHE NACH DER ZUGABE VON WT NEF ODER NEF R4A ZU MEMBRANEN BESTEHEND AUS POPC:POPS (4:1) UNTER DYNAMISCHEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN.....	121
ABBILDUNG 5.8: MODELL DER HIV-1 NEF-MEMBRAN-INTERAKTION, WELCHES DIE BEOBACHTETE MEMBRANDESTABILISIERUNG UND DEN GRÖßEREN EINFLUSS DES POSITIVEN LADUNGSCLUSTERS ERKLÄRT.....	128

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben auf ganz unterschiedliche Weise verschiedene Menschen beigetragen, denen ich an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte:

- Als erstes und ganz besonders Prof. Dr. Claudia Steinem für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft. Die Bearbeitung dieses Themas hat mir sehr viel Freude bereitet,
- Prof. Dr. Jörg Schroeder für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit,
- meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Oliver T. Fackler (Department für Virologie, Universität Heidelberg) und PD Dr. Matthias Geyer (MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund) für die stete Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung der Proteine,
- ganz besonders Gretel und Sonja für die exklusive „VIP“-Betreuung und die daraus gewonnenen Erkenntnisse über die Interaktion des Proteins mit Membranen. Es hat mir viel Spaß gemacht mit euch zusammenzuarbeiten,
- den technischen Angestellten für die unersetzliche Hilfe im Labor. Ein besonders dickes Dankeschön geht hierbei an Jutta, die mich besonders in den letzten Zügen dieser Arbeit tatkräftig unterstützt hat,
- Anja, Gretel, Sabine und Dany für das fleißige und gewissenhafte Korrigieren dieser Arbeit,
- allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für das super Arbeitsklima und die lustigen Kaffeeraumgespräche,
- den Mitgliedern des AK Janshoff für die gute Zusammenarbeit und die unvergessenen AK-Ausflüge,
- Anja, dass sie es über drei Jahre mit mir in einem Labor ertragen hat, es immer wieder geschafft hat mich zu motivieren und ganz besonders dafür, dass sie meinen musikalischen Horizont extrem erweitert hat,
- Anja, Barbara, Eva und Gretel für die Freundschaft auch abseits der Arbeit. Unsere Kochabende werden mir fehlen,
- allen meinen Freunden, ob in Mainz, Göttingen oder irgendwo in Deutschland, für die nichtwissenschaftliche Ablenkung,
- Johannes einfach für alles,
- meiner Familie für ihre immerwährende Liebe und Unterstützung.

Veröffentlichungen

Szilluweit, R., Boll, A., Lukowski, S. Gerlach, H., Fackler, O. T., Geyer, M., Steinem, C., HIV-1 Nef perturbs artificial membranes: investigation of the contribution of the myristoyl anchor, *Biophysical Journal* **2009**, in press

Poster

“On the formation of microdomains in artificial membrane systems mimicking lipid rafts”

Workshop on Dynamics of artificial and biological membranes, März 2006, Gomadingen

“Interaction of HIV-1 Nef protein and artificial membrane systems”

Jahrestagung der Deutschen Biophysikalischen Gesellschaft, September 2006, Mainz

“Interaction of HIV-1 Nef protein and artificial membrane systems”

Europäischer Biophysik Kongress (EBSA), Juli 2007, London (UK)

“Lipid disordering in artificial membrane systems induced by full length HIV-1 Nef”

International Workshop of mechanical and electrical properties of artificial and cellular membranes, April 2008, Gomadingen

„Untersuchung der Wechselwirkungen der HIV-Proteine HIV-1 Nef und HIV-1 Tat mit artifiziellen Membransystemen“

Göttinger Chemie-Forum, Juli 2008, Göttingen

Lebenslauf

Ruth Szilluweit

geboren am 24. Oktober 1980

Schulbildung

09/1987-07/1991	Hermann Löns-Grundschule; Wiesbaden
09/1991-07/1997	Helene Lange-Schule (IGS); Wiesbaden
09/1997-06/2000	Martin Niemöller-Schule (Oberstufengymnasium); Wiesbaden
13/06/2000	Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,3)

Studium

10/2000-09/2005	Studium der Chemie (Diplom) an der Universität Mainz
16/09/2002	Diplomvorprüfung im Fach Chemie (Note: 1,6)
11/2003-02/2004	Studium der Chemie an der Nottingham Trent University, England
01/2005-09/2005	Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andreas Janshoff Thema: <i>Strukturuntersuchungen von superspiralisierter DNA mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops</i>
29/09/2005	Diplom im Fach Chemie (Note: 1,0)

Dissertation

11/2005-03/2006	Beginn der Dissertation am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg
seit 04/2006	Dissertation am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen Betreuerin: Prof. Dr. Claudia Steinem

Förderungen

04/2005-09/2005	Förderstipendium der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz für die Diplomarbeit
-----------------	--

