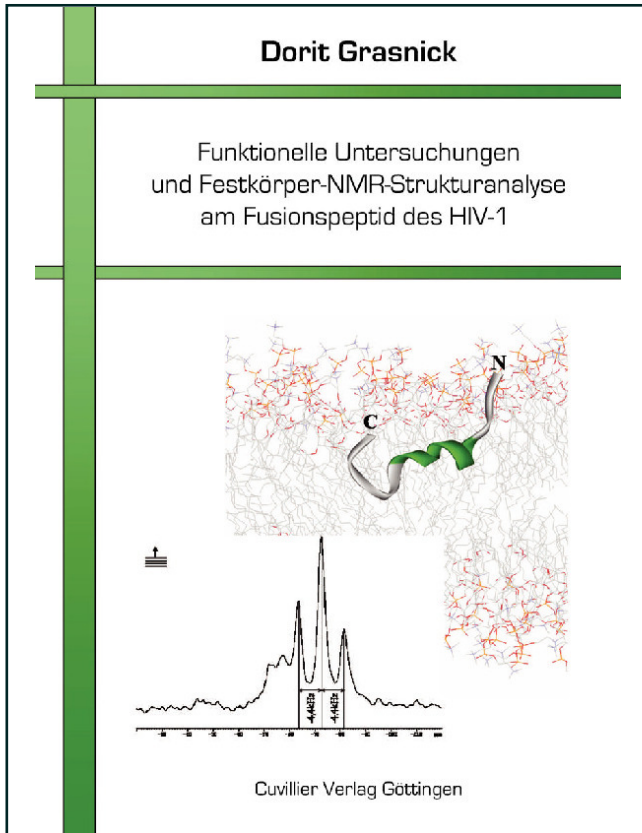




Dorit Grasnick (Autor)

Funktionelle Untersuchungen und Festkörper-NMR-Strukturanalyse am Fusionspeptid des HIV-1



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2098>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
TABELLENVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 DIE FUSION DES HIV-1 MIT DER WIRTSZELLE	9
1.2 DIE STRUKTUR DES FUSIONSPEPTIDS DES HIV-1	14
1.3 DIE FUSOGENE AKTIVITÄT DES FUSIONSPEPTIDS DES HIV-1	18
1.4 ANDERE VIRALE FUSIONSPEPTIDE	21
1.5 NICHT-VIRALE FUSIONSPEPTIDE	24
2 MOTIVATION UND AUFGABENSTELLUNG DIESER ARBEIT	27
3 BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN METHODEN	29
3.1 FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE	29
3.1.1 Prinzip der Festphasenpeptidsynthese	29
3.1.2 Schutzgruppen	31
3.1.3 Aktivierung und Peptidkupplung	32
3.1.4 Razemisierung von 4-CF ₃ -Phenylglycin	34
3.2 RP-HPLC-ANALYSE UND AUFREINIGUNG DER PEPTIDE	35
3.3 IDENTIFIZIERUNG ENANTIOMERER AMINOSÄUREN	35
3.4 CIRCULARER DICHOISMUS	37
3.5 LIPID-MIXING	40
3.6 DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG	41
3.7 FESTKÖRPER-NMR	42
3.7.1 Die chemische Verschiebung	44
3.7.2 Die Dipol-Dipol-Kopplung	48
3.7.3 Die Quadrupolkopplung	50
3.7.4 Datenaufnahme	51
3.7.5 Relaxationszeiten	53
3.7.6 Methoden der Festkörper-NMR	53
4 EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG	57
4.1 FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE	57
4.1.1 Synthese von FP23 und markierter Varianten	57
4.1.2 Anbringen der Fmoc-Schutzgruppe	59
4.1.3 Abspaltung des Peptids vom Harz	60
4.2 RP-HPLC-ANALYSE UND AUFREINIGUNG DER PEPTIDE	61
4.3 IDENTIFIZIERUNG ENANTIOMERER AMINOSÄUREN	62
4.3.1 Acetylierung von Aminosäuren	62
4.3.2 Enzymatische Separation der D- und L-Enantiomere	63

4.3.3	<i>Derivatisierung freier Aminosäuren mit Marfeys Reagenz</i>	63
4.3.4	<i>Hydrolyse von Peptiden und Derivatisierung mit Marfeys Reagenz</i>	64
4.3.5	<i>RP-HPLC-Analyse der derivatisierten Aminosäuren</i>	64
4.4	CIRCULARER DICHOISMUS	65
4.5	LIPID-MIXING	65
4.6	DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG	66
4.7	FESTKÖRPER-NMR	66
4.7.1	<i>Orientierte Proben</i>	66
4.7.2	<i>Multilamellare Vesikel</i>	68
4.7.3	<i>NMR-Spektroskopie</i>	69
5	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER PEPTIDE	70
5.1	FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE	70
5.2	RP-HPLC-AUFREINIGUNG UND EPIMEREN-TRENNUNG	72
5.3	ZUORDNUNG DER KONFIGURATIONEN DER PEPTIDEPIMERE	81
5.3.1	<i>Enzymatische Aufspaltung</i>	81
5.3.2	<i>Zuordnung der Retentionszeiten der Aminosäuren</i>	83
5.3.3	<i>Konfiguration von L7CF₃-Phg/1 und L7CF₃-Phg/2</i>	84
5.3.4	<i>Konfiguration von F8CF₃-Phg/1 und F8CF₃-Phg/2</i>	86
5.3.5	<i>Konfiguration von L9CF₃-Phg/1 und L9CF₃-Phg/2</i>	88
5.3.6	<i>Konfiguration von F11CF₃-Phg/1 und F11CF₃-Phg/2</i>	90
5.3.7	<i>Konfiguration von L12CF₃-Phg/1 und L12CF₃-Phg/2</i>	92
5.3.8	<i>Zusammenfassung der ermittelten Konfigurationen</i>	94
5.4	SEKUNDÄRSTRUKTURBESTIMMUNG MIT CD-SPEKTROSKOPIE	95
5.5	BESTÄTIGUNG DER FUSOGENEN AKTIVITÄT DURCH LIPID-MIXING	97
5.6	BESTÄTIGUNG DER AKTIVITÄT MIT DYNAMISCHER LICHTSTREUUNG	99
6	ERGEBNISSE DER NMR-UNTERSUCHUNGEN	100
6.1	³¹ P-NMR: OPTIMIERUNG DER PROBENHERSTELLUNG	100
6.1.1	<i>Konstante Materialmenge pro Glasplättchen</i>	100
6.1.2	<i>Konstantes Lösungsvolumen</i>	103
6.2	¹⁹ F-NMR: DIPOLAUFSPALTUNG DES 4-CF ₃ -PHENYLGLYCINS	105
6.2.1	<i>In POPC/POPG 4:1</i>	105
6.2.2	<i>In DMPC</i>	115
6.3	² H-NMR: QUADRUPOLAUFSPALTUNG DES D ₃ -ALANINS	123
6.4	AUSWERTUNG DER NMR-DATEN MITTELS STARRER STRUKTURPARAMETER	124
6.5	AUSWERTUNG DER NMR-DATEN MITTELS MOLEKULARDYNAMIK	137
7	DISKUSSION UND AUSBLICK	140
7.1	PEPTIDSYNTHESE UND AUFREINIGUNG	140
7.2	KONFIGURATIONSZUORDNUNG	143

7.3 CD-SPEKTROSKOPIE UND AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	144
7.4 NMR-UNTERSUCHUNGEN UND STRUKTURANPASSUNGEN	147
7.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	152
8 ZUSAMMENFASSUNG	153
9 LITERATUR.....	155
INTERNET-LITERATUR	168
10 ANHANG.....	169
TABELLE A	169
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	176
BUCHSTABENCODES DER AMINOSÄUREN:	180
GERÄTELISTE	181
CHEMIKALIENLISTE	182
LEBENS LAUF	184