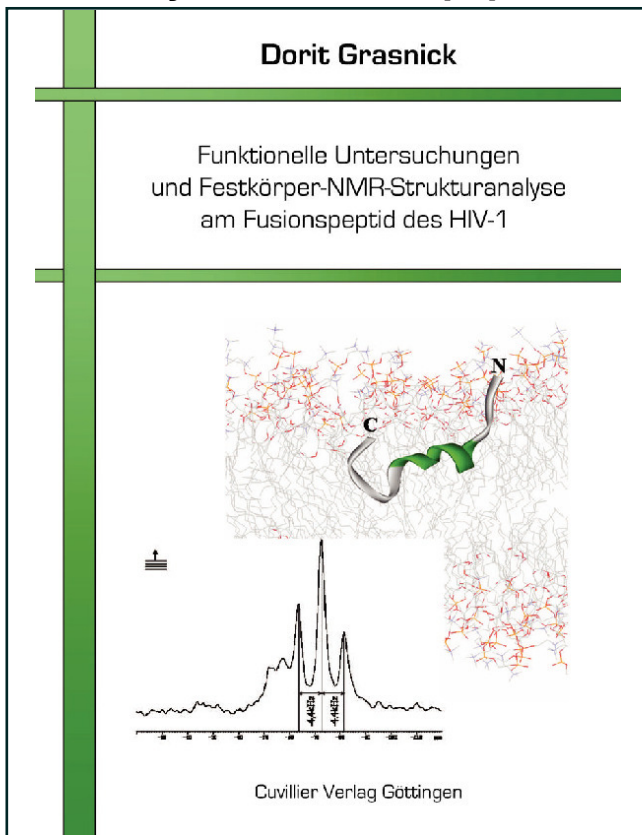




Dorit Grasnick (Autor)

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>

1 Einleitung

Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung des Fusionspeptids des HIV-1.

In den nächsten Abschnitten werden die Eigenschaften und die Funktionsweise dieses Peptids erläutert. Es folgt eine Zusammenfassung des bisherigen Wissensstands.

1.1 Die Fusion des HIV-1 mit der Wirtszelle

Die durch das HI-Virus (Human Immunodeficiency Virus) hervorgerufene Krankheit AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) ist nicht heilbar. Unbehandelt führt sie etwa zehn Jahre nach Ansteckung durch die Schwächung des Immunsystems zum Tode. Medikamente können bisher den Ausbruch der Krankheit nur verzögern, nicht verhindern. Zudem sind sie sehr teuer und stehen nur wenigen Patienten zur Verfügung. Weltweit waren Ende des Jahres 2005 über 40 Millionen Menschen infiziert. Die Zahl der Neuinfektionen steigt jedes Jahr stark an, besonders in Asien. Dies ist durch mangelnde Aufklärung und gesellschaftliche Gepflogenheiten zu erklären (www.who.int/en).

Das Virus entstand vermutlich durch Mutation aus dem, bei Affen vorkommenden Analog SIV (Simian Immunodeficiency Virus) und wurde erstmals 1959 im Kongo gefunden. Es gibt drei Typen des Virus: HIV-0, HIV-1 und HIV-2. Der am häufigsten auftretende ist HIV-1 (www.avert.org).

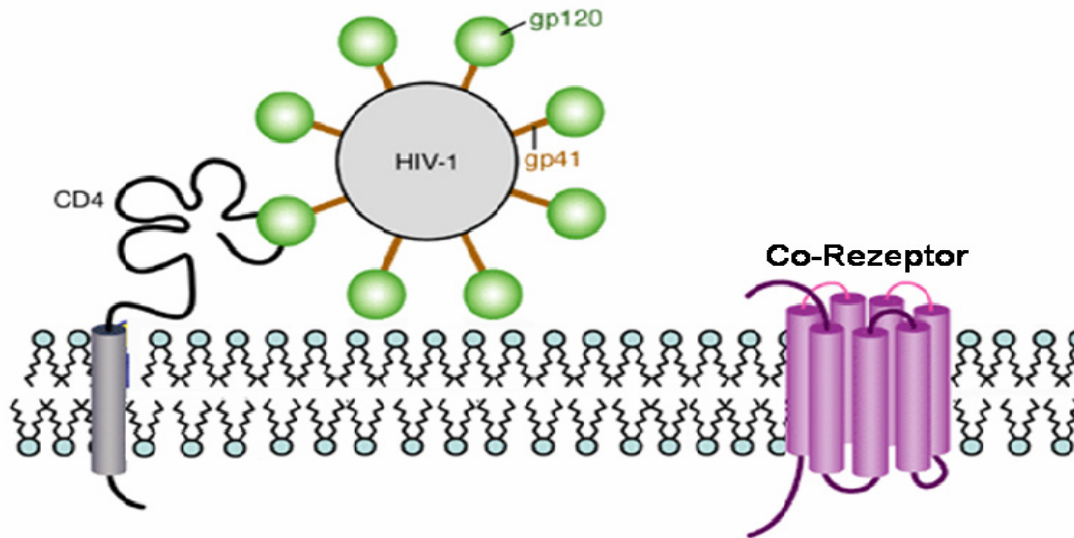


Abb. 1.1: Bindung des HIV-1 an die Wirtszellmembran (modifiziert nach Fantini 2002)

Ein wichtiger Schritt im Lebenszyklus des HIV ist die Verschmelzung der viralen Membranhülle mit der Wirtszelle (Lymphozyte). Diese gewährleistet die Einschleusung der Virus-RNA in das Zellinnere. Im Anschluss daran wird die virale RNA enzymatisch in DNA umgeschrieben und, nach Transport in den Zellkern, in das Genom der Zelle eingebaut. Die Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Zelle wird zur Synthese neuer Viren benutzt. Anschließend werden diese aus der infizierten Zelle in den Organismus freigesetzt (www.avert.org).

Die Fusion der Virenhülle mit der Membran der Wirtszelle wird durch Glykoproteine vermittelt, welche sich auf der Virenoberfläche befinden. Diese sind 72fach vorhanden und in trimeren, stachelartigen Strukturen angeordnet. Ihre Bezeichnung gp160 leitet sich von der molaren Masse von 160kDa ab. Das gp160 setzt sich aus zwei Einheiten zusammen: gp120 und gp41 (Abbildung 1.1). Diese haben molare Massen von 120 bzw. 41kDa. Sie werden bei der Bindung an die Zellmembran von einem Enzym der Wirtszelle, einer Protease, voneinander gespalten.

Das gp120 bindet an CD4-Rezeptoren auf der Wirtszellenoberfläche und im weiteren Verlauf auch an Co-Rezeptoren (Chemokin-Rezeptoren), welche aus sieben helikalen Segmenten bestehen (Abbildung 1.1) (Fantini 2002).

Durch die Bindung an diese Co-Rezeptoren ändert sich die Konformation des gp120 und das im Proteininneren verborgene gp41 erhält Zugang zur Membran der Wirtszelle. Das gp120 löst sich anschließend vollständig vom gp41 ab (Abbildung 1.2).

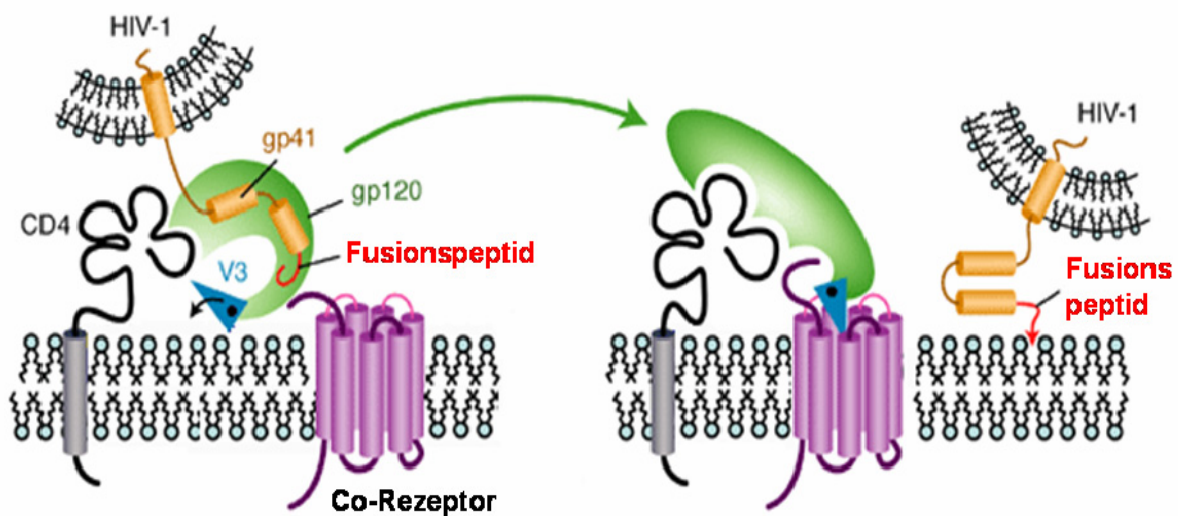


Abb. 1.2: Freisetzung des Fusionspeptids des HIV-1 und Insertion in die Wirtszellmembran (modifiziert nach Fantini 2002)

Im weiteren Verlauf ändert sich die Konformation des gp41. Es wird eine so genannte Haarnadel-Struktur aus zwei helikalen Segmenten gebildet. Diese bringt die beiden zu verschmelzenden Membranen in räumliche Nähe (Abbildung 1.2, rechts). Je drei solcher gp41-Haarnadeln binden aneinander, wobei ein Ensemble aus sechs Helices gebildet wird (Gallo 2003, Kliger 2000) (Abbildung 1.3).

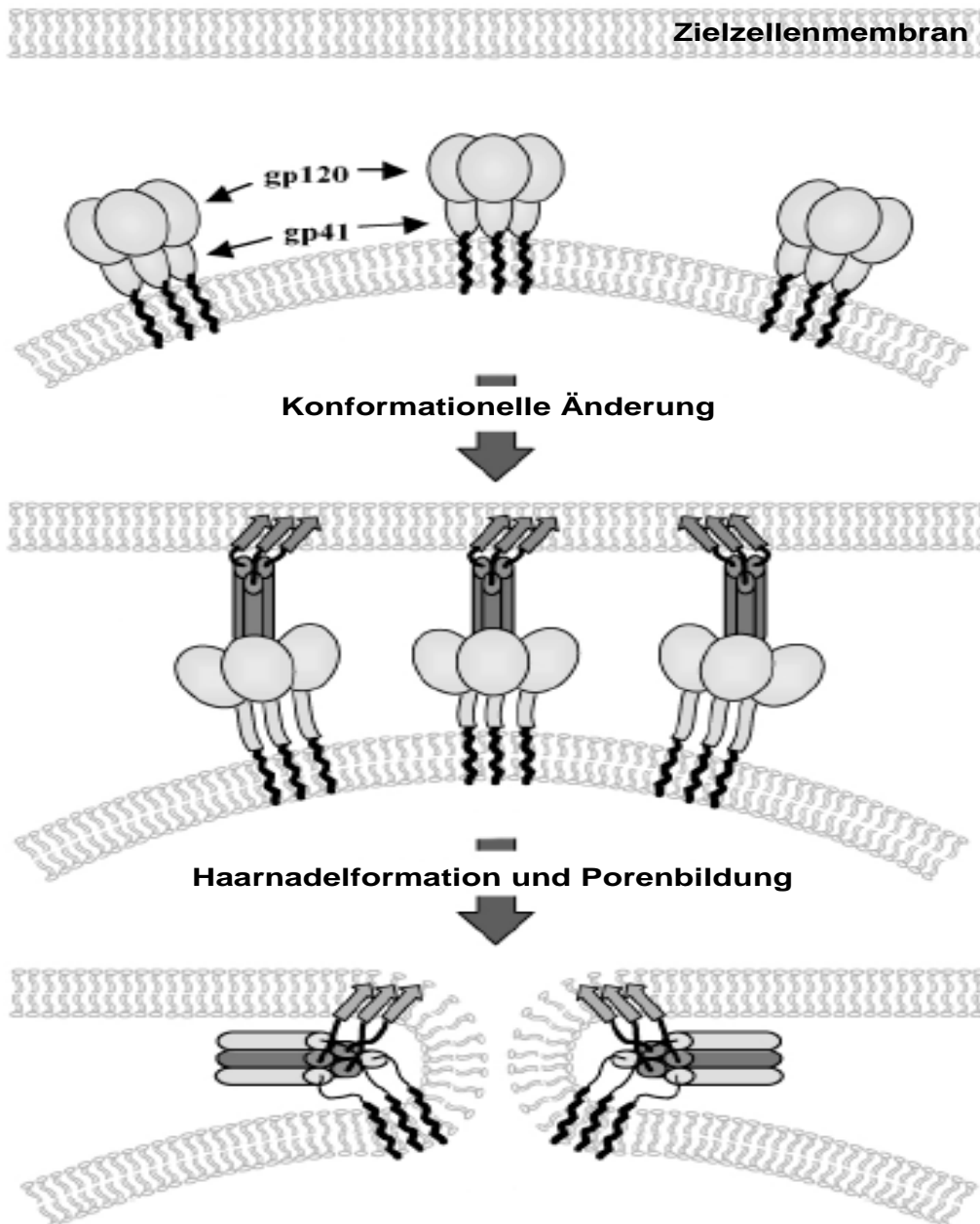


Abb. 1.3: Ausbildung der Haarnadelstruktur der trimeren gp41-Einheiten (modifiziert nach Sackett 2003)

Die Spaltung des gp41 vom gp120 geschieht an jener Stelle, an der sich die – für die Fusion von Virushülle und Wirtszellmembran verantwortliche – Aminosäuresequenz befindet. Diese Sequenz wird Fusionspeptid (FP) genannt. Dieses am neu entstandenen N-Terminus des gp41 frei gesetzte Fusionspeptid kann in die Wirtszellmembran eindringen und so die Verschmelzung mit der Virenhülle herbeiführen (Fantini 2002).

Viele Viren besitzen ein solches Fusionspeptid. Das FP ist die Aminosäuresequenz, die mindestens benötigt wird, um die Fusion von Virushülle und Wirtszellmembran herbeizuführen. Das FP des HIV-1 ist auch in isolierter Form aktiv und in der Lage zwei Zellmembranen miteinander zu verschmelzen. Dies kann für Untersuchungen an Lipidvesikeln *in vitro* genutzt werden. Das FP besteht aus etwa 23 Aminosäuren und besitzt eine äußerst hohe Hydrophobizität (grau unterlegte Aminosäuren). Es ist reich an Alanin- und Glycinresten.

AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS

Die vielen Glycinreste machen eine durchgängige α -helikale Struktur eher unwahrscheinlich. Diese kleinste aller Aminosäuren bewirkt ein hohes Maß an struktureller Flexibilität.

Die Sequenz des Fusionspeptids ist innerhalb der Virusfamilie sehr konserviert. Das so genannte FLG-Motiv (Phe-Leu-Gly-Phe-Leu-Gly, Aminosäuren 8-13) scheint eine wichtige Rolle bei der Fusion der Membranen zu spielen (Chang 1997a, Delahunty 1996). Das zweifache Auftreten der sterisch anspruchsvollen Aminosäuren Phenylalanin und Leucin in Verbindung mit Glycin stellt ein auffälliges Strukturmerkmal dar. Auch in den Sequenzen anderer fusogener Peptide wurde dieses Motiv, zumindest teilweise, gefunden (Abschnitt 1.4).

Die Struktur des Fusionspeptids innerhalb der Membran und der daraus resultierende Fusionsmechanismus sind eingehend untersucht worden. Dies wird in Abschnitt 1.2 genauer beschrieben. Ein allgemein akzeptiertes Modell der Peptid-Membran-Wechselwirkungen ist aber bislang nicht gefunden worden.

In Tabelle A im Anhang sind die Ergebnisse bisheriger funktioneller und struktureller Untersuchungen am Fusionspeptid des HIV-1 detailliert zusammengefasst. Auf diese wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

1.2 Die Struktur des Fusionspeptids des HIV-1

Strukturelle Untersuchungen des Fusionspeptids wurden von vielen Arbeitsgruppen durchgeführt, die Ergebnisse sind aber alles andere als eindeutig. Sie sind in Tabelle 1 zusammengefasst und werden im folgenden erläutert.

Unter der Annahme einer helikalen Struktur des Fusionspeptids wurden molekulardynamische Berechnungen mit der Wildtypsequenz und verschiedenen Mutanten durchgeführt (Wong 2003, Maddox 2002). Diese ergaben eine Insertion des Wildtyps in die Membran unter einem Winkel von ca. 40°. Die Mutanten insertierten unter steileren Winkeln bis hin zur Transmembranorientierung bzw. banden flach auf der Oberfläche der Membran. Die Gruppe um Weliky führte ¹³C- und ¹⁵N-Festkörper-NMR-Untersuchungen an Fusionspeptiden durch, welche zur Erhöhung der Löslichkeit mit zusätzlichen Lysinresten versehen waren. Diese Peptide lagen entweder monomer vor oder waren künstlich zu dimeren und trimeren Einheiten verknüpft (Yang 2001 und 2003a/b, Wasniewski 2004). Hierbei wurden in Abhängigkeit der Bedingungen sowohl helikale als auch Faltblattstrukturen gefunden. In orientierten Bilayern, welche negativ geladene Lipide enthielten, lagen sowohl α -helikale als auch β -faltblattartige Peptidstrukturen vor. Hierbei schienen sich die Helices gut in der Membran zu orientieren, die Faltblattstrukturen hingegen nicht. In einer der Wirtszellenmembran sehr ähnlichen komplexeren Lipidbilayerprobe nahm das Peptid eine oligomere Faltblattstruktur an. Hierbei war ebenfalls die Orientierung in der Membran schlecht.

Auch die Arbeitsgruppe um Shai bestätigte in IR- und CD-spektroskopischen Messungen die Variabilität der Sekundärstruktur. In verschiedenen Arbeiten an Lipidvesikeln wurde eine Faltblattstruktur für das Fusionspeptid postuliert (Pritsker 1998 und 1999, Gerber 2004, Sackett 2003). CD-Messungen in Trifluorethanol zeigten eine helikale Struktur (Kliger 1997).

In einer anderen Studie allerdings wurde in Lipidvesikeln eine insertierte Faltblattstruktur für den N-Terminus gefunden und eine auf der Vesikeloberfläche liegende α -Helix für den C-Terminus (Peisajovich 2000).

Mittels hochauflösender NMR in SDS-Mizellen und in wässriger Lösung wurden sowohl Helices und Faltblattstrukturen, als auch ein Typ I β -Turn im Bereich des FLG-Motivs und ungeordnete Strukturelemente nachgewiesen (Chang 1997a/b und 1999, Jaroniec 2005). Hierbei wurde in SDS auch eine leicht gebogene Helix postuliert (Jaroniec 2005).

Variierende Ergebnisse lieferten auch die Untersuchungen von Rafalski mit Anteilen negativ geladener Lipide in der Lipidmischung. Hier wurde mittels IR- und CD-Spektroskopie bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200 eine α -Helix gefunden und bei 1:30 eine Faltblattstruktur (Rafalski 1990).

Zum Teil widersprüchliche Ergebnisse haben Gordon et al. veröffentlicht. Für das mit IR-, CD-, ESR- und MD-Methoden untersuchte Fusionspeptid in einer Membrenumgebung wurde ein Bumerangmodell aufgestellt. Hierbei insertierte der N-Terminus in die Membran und der C-Terminus lag flach auf der Membranoberfläche auf (Gordon 1992). Dieses Strukturmodell wurde auch für andere fusogene Peptide vorgeschlagen (siehe Abschnitte 1.4 und 1.5). In einer anderen Veröffentlichung dieser Gruppe wurde für das Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:70 eine α -Helix-Struktur vorgeschlagen und für 1:10 eine Faltblattstruktur (Mobley 1999). In Hexafluorisopropanol wurde eine Faltblatt-Helix-Faltblatt-Struktur postuliert (Gordon 2002), in SDS-Mizellen eine α -Helix und in PBS-Lösung eine antiparallele trimere Faltblattstruktur (Gordon 2004). Diese Untersuchungen fanden mittels IR statt.

Brasseur et al. haben für das – in Lösung befindliche – Peptid mit Hilfe von IR-Untersuchungen eine Faltblattstruktur gefunden und für das an Lipidvesikel gebundene Peptid eine α -Helix (Martin 1993 und 1996).

Castano beobachtete mit IR-spektroskopischen Methoden sogar einen Übergang von α -Helix zu Faltblatt, der durch eine Kompression des Peptids hervorgerufen wurde (Castano 2005).

Tabelle 1: Sekundärstrukturen und Sequenzen verschiedener Fusionspeptidvarianten des HIV-1

Aminosäuresequenz	Struktur	Referenz
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	α -Helix, 38°	Maddox2002
AEGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	α -Helix, TM	
AVGIGALFLGYLGAAGSTMGARS	α -Helix, Insetiert	
AVGIGALFRGFLGAAGSTMGARS	α -Helix, Insetiert	
AVGIGALFLGFLGAAG	α -Helix, 44°	Wong 2003
AVVIGALFLGFLGAAG	α -Helix, 92°	
AVGIVALFLGFLGAAG	Bumerang	
AVGIGALFLVFLGAAG	α -Helix, 82°	
AVGIGALFRGFLGAAG	α -Helix, flach	
AEGIGALFLGFLGAAG	α -Helix, flach	
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	β -Sheet	Yang 2003a/b, 2001
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS KKK	β -Sheet/ α -Helix	Yang 2003b, Wasniewski 2004
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS KKKW	β -Sheet/ α -Helix	Yang 2003a, Wasniewski 2004
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL	β -Sheet	Pritsker 1999
AVGIGALFLGVLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL	β -Sheet	
AVGIGALFLGGLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL	β -Sheet	
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL	α -Helix	Kliger 1997
AEGIGALFLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL	α -Helix	
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL	α -Helix/ β -Sheet	Peisajovich 2000
AVGIGALFLGFLGAAG	α -Helix/ β -Sheet	
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL	α -Helix/ β - Sheet	Pritsker 1998

allD- AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL	α -Helix/ β -Sheet	
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL	β -Sheet	Gerber 2004
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL ^[1]	β -Sheet	
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARSCTLTVQARQL LSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQ ARIL	α -Helix/ β -Sheet	Sackett 2003
AVGIGALFLGGLGAAGSTMGARSCTLTVQARQL LSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQ ARIL	α -Helix/ β -Sheet	
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	Typ1 β -Turn	Chang 1997a
GALFLGFLGAAGSTMGARSCTLTVQARQLLSGI VQQQNNLLRAIEAQQHLL	Teilweise ungeordnet	Chang 1999
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	α -Helix/ β -Sheet	Chang 1997b
AVGIGALWLGFLGAAGSTMGARS	α -Helix/ β -Sheet	
PAVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQAD YKDDDDK	gebogene α -Helix	Jaroniec 2005
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	α -Helix bei 1:200; β -Sheet bei 1:30	Rafalski 1990
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	Bumerang: 40°/TM	Gordon 1992
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	β -Sheet/ α -Helix/ β -Sheet	Gordon 2002
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	α -Helix/ β -Sheet/ β -Turn	Mobley 1999
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	α -Helix/ β -Sheet/ β -Turn	Gordon 2004
AVGIGALFLGFLGAAG	α -Helix/ β -Sheet	Martin 1993
AVGIGALFLGFLGAAG	α -Helix/ β -Sheet	Martin 1996
AVGIGALFLGFLG	α -Helix/ β -Sheet	
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	α -Helix \rightarrow β -Sheet	Castano 2005

TM: Transmembranhelix

Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Mutationen sind fett hervorgehoben.

[1] die vier hervorgehobenen Aminosäuren liegen als D-Enantiomere vor