

**Der Membrananker des pestiviralen Glykoproteins E^{rns}
Untersuchungen zur Lipidbindungsspezifität und Struktur**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl. Biochem. Daniel Aberle
aus Stuttgart

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

15.02.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thilo Stehle

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gregor Meyers

für die Familie

Sic parvis magna – Sir Francis Drake

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	6
VORBEMERKUNGEN	9
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
ZUSAMMENFASSUNG	15
SUMMARY	16
1.0 Einleitung	17
1.1 Virologische Grundlagen.....	17
1.1.1 Pestivirus.....	17
1.1.2 BVDV (Bovine virale Diarrhoe Virus)	21
1.1.3 Das Glykoprotein E ^{rns}	23
1.2 Physikalische Grundlagen	25
1.2.1 Zirkulardichroismus (CD) Spektroskopie	25
1.2.2 Orientierte Zirkulardichroismus (OCD) Spektroskopie	31
1.2.3 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)	33
1.3 Zielsetzung	39
2.0 Material	40
2.1 Geräte.....	40
2.2 Chemikalien.....	42
2.3 Medien, Lösungen und Puffer	44
2.4 Biologische Materialien	48
2.4.1 Enzyme, Proteine, Größenmarker	48
2.4.2 Bakterienstämme	48
2.4.3 Antikörper	49
2.5 Oligonukleotide	49
2.5.1 für die Sequenzierung	49
2.5.2 für die Klonierung.....	50
2.6 Plasmide	53
2.6.1 Im Labor vorhandene bzw. kommerziell erworbene Plasmide.....	53
2.6.2 Selbst hergestellte Plasmide	53
2.7 Aminosäuresequenz der exprimierten Proteine	57
2.8 Vorgefertigte Komplettsysteme	59
2.9 Sonstige Materialien	59
2.10 Verwendete Software	60
3.0 Methoden.....	61
3.1 Molekularbiologische Methoden	61
3.1.1 Auf Nukleinsäuren basierende Methoden.....	61
3.1.1.1 Methoden basierend auf der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	61
3.1.1.1.1 Standard-PCR	61
3.1.1.1.2 Quik Change [®] -PCR.....	62
3.1.1.1.3 Fusions-PCR	63
3.1.1.1.4 PCR mittels Superoligonukleotid	63
3.1.1.2 Agarosegelelektrophorese	64
3.1.1.3 Präparative Agarosegelelektrophorese	65
3.1.1.4 Restriktionsenzymspaltung	65
3.1.1.5 Dephosphorylierung von DNA	65

3.1.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	66
3.1.1.7	DNA-Sequenzierung	66
3.1.2	Mikrobiologische Methoden	68
3.1.2.1	Herstellung von Agarplatten	68
3.1.2.2	Herstellung von kompetenten Bakterien.....	68
3.1.2.3	Hitzeschock-Transformation.....	68
3.1.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	68
3.1.2.4.1	Im kleinen Maßstab	69
3.1.2.4.2	Im großen Maßstab	69
3.2	Proteinbiochemische Methoden	70
3.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	70
3.2.2	Coomassie Färbung	71
3.2.3	Western Blot	71
3.2.3.1	Transfer der Proteine auf Nitrozellulose Membran	71
3.2.3.2	Ponceau Färbung.....	71
3.2.3.3	Immunodetektion der Proteine	71
3.2.4	Proteinaufreinigung für den Lipidpulldownassay	72
3.2.4.1	Proteinexpression im kleinen Maßstab.....	72
3.2.4.2	Aufreinigung mittels Ni-NTA Spin Säulen	72
3.2.4.3	Ultrafiltration	73
3.2.4.4	Lipid „pulldown assay“	73
3.2.4.4.1	Herstellung der Vesikel.....	73
3.2.4.4.2	Lipid „pulldown assay“	73
3.2.4.4.3	Auswertung des Lipid „pulldown assay“	74
3.2.5	Aufreinigung von Peptiden für die CD und NMR-Messungen.....	74
3.2.5.1	Proteinexpression im Minimalmedium.....	74
3.2.5.2	Lyse der Bakterien	74
3.2.5.3	Proteinreinigung mittels FPLC Ni-NTA Säulen.....	75
3.2.5.4	Ultrafiltration	75
3.2.5.5	Proteolytische Abspaltung des N-terminalen tags	75
3.2.5.6	Aufreinigung mittels Reverse-Phase-HPLC	76
3.2.5.7	Lyophilisation	76
3.3	Biophysikalische Methoden.....	77
3.3.1	Reinheitsbestimmung der exprimierten Proteine mittels MALDI-TOF	77
3.3.2	Zirkulardichroismus-Messungen (CD).....	77
3.3.2.1	Herstellung von Mizellen für die CD-Messung	77
3.3.2.2	Herstellung von Vesikeln für die CD-Messung.....	77
3.3.2.3	CD-Messung.....	78
3.3.2.4	Auswertung der CD-Messungen.....	78
3.3.2.4.1	Qualitativ (Spektriform)	78
3.3.2.4.2	Quantitativ	79
3.3.2.5	Orientierte Zirkulardichroismus Messungen (OCD)	79
3.3.3	Kernmagnetresonanz Messungen (NMR)	80
3.3.3.1	Probenvorbereitung für die NMR-Messung	80
3.3.3.2	NMR-Messung.....	80
3.3.3.2.1	CLEANEX-PM-Pulssequenz	80
3.3.3.2.2	Relaxationsmessungen	81
3.3.3.3	NMR-Auswertung.....	81
4.0	Ergebnisse	82
4.1	Analysen der Lipidinteraktion des E ^{rms} -Ankers	82
4.1.1	Untersuchung der Lipidbindungsspezifität des E ^{rms} -Ankers	83
4.1.1.1	Messung der Lipidspezifität des E ^{rms} -Ankers.....	83
4.1.1.2	Zeitabhängigkeit der Lipidbindung	85
4.1.1.3	Temperaturabhängigkeit der Lipidbindung	85
4.1.1.4	Einfluss der Lipidfluidität	87
4.1.1.5	Einfluss von mehrfach negativ geladenen Lipiden	88
4.1.1.6	Einfluss von Mizellen auf die Lipidbindung	89
4.1.1.7	Einfluss der Vesikelform auf die Lipidbindung.....	90
4.1.1.8	Einfluss von biologischen Lipidmischungen auf die Lipidbindung	92
4.1.1.9	Einfluss der Proteinladung auf die Lipidbindung	93

4.1.2	Vergleich mit anderen bekannten amphipatischen Helices	96
4.1.3	Untersuchung von im biologisch System wirksamen Mutationen	98
4.1.4	Analyse des Einflusses der amphipatischen Eigenschaft des E ^{rns} -Ankers auf die Lipidbindung	100
4.1.5	Untersuchung von Teilstücken	105
4.1.6	Verlängerung des E ^{rns} -Ankers mittels Aminosäuren aus der N-terminalen Region von E1	112
4.1.7	Bemerkung zur den Lipidbindungsexperimente	114
4.2	Analyse der Sekundärstruktur des E ^{rns} -Ankers mittels CD-Spektroskopie.....	115
4.2.1	Strukturanalyse des gesamten E ^{rns} -Ankers	115
4.2.2	Vergleichende Strukturanalyse des E ^{rns} -Ankers von BVDV und CSFV	118
4.2.3	CD-Analyse verschiedener E ^{rns} -Ankerbereiche in bizellhaltiger Lösung.....	121
4.2.4	CD-Analyse des Signalpeptidasespaltbereiches	124
4.2.5	Analyse der Helixorientierung (OCD-Spektroskopie).....	126
4.3	Analyse der Sekundärstruktur mittels NMR-Spektroskopie.....	130
4.3.1	Messung der Amid-Wasser-Protonenaustauschrates verschiedener C-terminaler E ^{rns} -Ankerfragmente	130
4.3.2	Sekundärstrukturbestimmung des C-terminalen E ^{rns} -Ankerfragmentes.....	139
4.3.3	Stabilität der Helixfaltung in der Membran	141
5.0	Diskussion	143
5.1	Basisinteraktion mit Lipiden	144
5.2	Globale Struktur des E ^{rns} -Ankers.....	148
5.3	Lokale Struktur des E ^{rns} -Ankers.....	152
5.4	Faltungsmodell des E ^{rns} -Ankers	154
5.5	Vergleich mit anderen amphipatischen Helices	158
5.6	Fazit und Ausblick.....	160
6.0	Anhang	163
6.1	Plasmidsequenzen.....	163
6.1.1	Plasmid pd29G	163
6.1.2	Plasmid pd29G-STOPP	163
6.1.3	Plasmid pd46	164
6.2	Verwendete Lipide	164
6.3	MALDI-TOF-Spektren.....	166
6.3.1	Erns-1 (¹⁵ N/ ¹³ C)	166
6.3.2	Erns-1-1 (¹⁵ N)	167
6.3.3	Erns-4 (¹⁵ N)	168
6.3.4	Erns-5 (¹⁵ N)	169
6.3.5	Erns-6-4 (¹⁵ N)	170
6.3.6	Erns-1+10AS (¹⁵ N)	171
6.4	Weitere NMR-Spektren.....	172
6.4.1	¹ H- ¹⁵ N-HSQC- und CLEANEX-Spektrum von E ^{rns} -4.....	172
6.4.2	¹ H- ¹⁵ N-HSQC- und CLEANEX-Spektrum von E ^{rns} -5.....	173
6.4.3	¹ H- ¹⁵ N-HSQC- und CLEANEX-Spektrum von E ^{rns} -2-1.....	174
6.4.4	Intramolekulare ¹ H- ¹ H-NOESY-Kontakte des C-Terminus von E ^{rns} -1.....	175
TABELLENVERZEICHNIS		176
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		176
LITERATURVERZEICHNIS		178
LEBENS LAUF		184
DANKSAGUNG		185

Vorbemerkungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Burrack, S., Aberle, D., Bürck, J., Ulrich, A.S. and Meyers, G. 2012. A new type of intracellular retention signal identified in a pestivirus structural glycoprotein. *FASEB J.***26**:3292-3305.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
A	Alanin (Ala)
A	Ampere
Ac	Acetat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDV	„border disease virus“
bidest.	bidestilliertes H ₂ O
BMV	„brome mosaic virus“
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
BVDV	„bovine viral diarrhea virus“
bzw.	beziehungsweise
c	centi–
C	Cystein (Cys)
C	Cytosin
ca.	circa
CD	Zirkulardichroismus
CLEANEX	„clean chemical exchange“
cm	Zentimeter
cp	zytopathogen
CSFV	„classical swine fever virus“, Virus der klassische Schweinepest
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
D	Aspartat (Asp)
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	„envelop“
E	Glutamat (Glu)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Endkonz.	Endkonzentration
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	“et aliter“ (und andere)
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin (Phe)
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Glycin (Gly)
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin (His)
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
HPLC	„high performance liquid chromatography“
HRP	Meerrettich-Peroxidase
I	Ileisoleucin (Ile)
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
ind.	Induziert
IRES	„internal ribosome entry site“
k	Kilo
K	Lysin (Lys)
Kan	Kanamycin

kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KIT	Karlsruher Institut of Technology
L	Leucin (Leu)
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Meter
M	Methionin (Met)
m	Milli-
M	molar (mol/l)
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI TOF	„matrix assistance laser desorption ionisation – time of flight“
MD	„mucosal disease“
min	Minute
Mol	molar
MRE	“mean residue ellipticity”
MW	Molekulargewicht
N	Asparagin (Asp)
n	nano-
n.m.	nicht möglich
ncp	nicht zytopathogen
NMR	„nuclear magnetic resonance“
NOE	„nuclear overhauser effect“
NOESY	„nuclear overhauser enhancement spectroscopy“
NRMSD	„normalized root mean-squares deviation“
NS	Nicht-Strukturprotein
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
NTR	„non translated region“
o.a	oben angegeben
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	„open reading frame“
p	pico-
P	Prolin (Pro)

P	Pellet, (Sediment)
PA	Phosphatidylsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	persistent Infiziert
PI	Phosphatidylinositol
PO	Peroxidase
ppm	„parts per million“
PS	Phosphatidylserin
Q	Glutamin (Gln)
R	Arginin (Arg)
R	Rest
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin (Ser)
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Sed.	Sediment
SM	Sphingomyeline
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ss	einzelsträngig
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
T	Threonin (Thr)
T	Thymidin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
TOCSY	„total correlation spectroscopy“
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Aktivitätseinheit (bei Enzymen)
U	Uracil
Ü	Überstand
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Valin (Val)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vergl.	vergleiche
verw.	verwendet
Vol.	Volumen
vs.	Versus
W	Tryptophan (Trp)
w/v	Gewicht pro Volumen %
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin (Tyr)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μ	Mikro-

Zusammenfassung

Das Glykoprotein E^{rns} ist ein 42-48 kDa großes, essentielles Strukturprotein und zudem ein bedeutender Virulenzfaktor von Pestiviren. Für die letztgenannte Funktion ist die intrinsische RNase-Aktivität von E^{rns} verantwortlich, die auch für die Ausbildung einer Persistenz im Fötus benötigt wird, sowie das für die Homodimerisierung erforderliche Cystein 171. Es wird davon ausgegangen, dass die enzymatische Aktivität von E^{rns} ein wesentlicher Faktor für die Repression der angeborenen Immunantwort nach einer Pestivirusinfektion darstellt. Den bisherigen Hypothesen zufolge ist dazu die seit längerem bekannte partielle Sekretion des E^{rns} von Bedeutung, da größere Mengen an sekretiertem E^{rns} im Blut infizierter Tiere detektiert werden können. Die partielle Sekretion des E^{rns} wird mit der besonderen Membranverankerung dieses Proteins in Zusammenhang gebracht. E^{rns} ist nicht über eine Transmembranregion am Viruspartikel verankert, sondern über eine amphipatische Helix. Nach den bisher vorliegenden Daten ist diese Struktur neben der Verankerung auch für die intrazelluläre Lokalisation des Proteins und seine Freisetzung aus dem Polyprotein durch die zelluläre Signalpeptidase verantwortlich, für die ansonsten nur Substrate bekannt sind, bei denen die Spaltstelle direkt auf eine Transmembranregion folgt. Somit vereint der E^{rns} -Membrananker mehrere wichtige Funktionen in einem relativ kleinen Sequenzabschnitt, nämlich die Membranverankerung, die ungewöhnliche Signalpeptidasespaltstelle sowie die Steuerung des Sekretion/Retentionsmechanismus. Um diese vielfältigen Eigenschaften des Proteins besser verstehen zu können, ist die Ermittlung der Struktur des Membranankers im Kontakt mit der Lipidmembran von entscheidender Bedeutung.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen die Bindung des E^{rns} -Membranankers an Lipide in einem *in vitro* System untersucht und zum anderen die Struktur und die Orientierung des Membranankers in der Membran näher analysiert. Dabei konnte entdeckt werden, dass der E^{rns} -Membrananker spezifisch an negativ geladene Lipide bindet, die positive Gesamtladung des Proteins dafür aber nicht verantwortlich ist. Auch die meisten Fragmente des E^{rns} -Membranankers wiesen eine spezifische Bindung an negativ geladene Lipide auf. Zudem wiesen Mutationen, die im biologischen System eine drastische Auswirkung auf die Membranbindung und die Sekretionsrate hatten, keine Änderung in der Lipidbindungsfähigkeit auf. Somit müssen diese Mutationen im biologischen System andere Effekte abseits der reinen Membranbindung auslösen, um für ihren Phänotyp zu sorgen.

Durch CD-Analysen konnte die erwartete starke helikale Faltung des E^{rns} -Membranankers bestätigt werden. Im Gegensatz zur erwarteten planaren Orientierung der helikal gefalteten Bereiche ergaben orientierte CD-Analysen, dass sich der E^{rns} -Membrananker nicht planar, sondern leicht schräg zur Membranoberfläche orientiert.

Durch NMR-Analysen des C-terminalen Bereiches des E^{rns} -Membranankers in einem Bizellensystem konnte anschließend die helikal gefaltete Region näher eingegrenzt werden. Zudem gelang es, über die Messung der Protonenaustauschrate der NH-Gruppe den Wasserkontakt der Aminosäuren zu bestimmen. Ungewöhnlicherweise zeigte die helikal gefaltete, amphipatische Region in weiten Teilen keinen Wasserkontakt, so dass sich ein größerer Abschnitt der Helix in der Lipidphase der Membran befinden muss. Eine solche Membranverankerung wurde bisher noch in keinem weiteren Protein entdeckt.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten ergaben einen ersten Anhaltspunkt über die biochemische Funktion und Wirkweise des E^{rns} -Membranankers und bilden die Grundlage für weitere Analysen an diesem faszinierenden Protein.

Summary

The glycoprotein E^{rns} represents one of the four structural proteins of pestiviruses. It is not only an essential component of the virion but also a virulence factor of these viruses. It has an intrinsic RNase activity which is required for establishment of persistent infection in fetuses. It has been suggested that this RNase activity is important to suppress the innate immune response of the host. We and others have put forward the hypothesis that the latter function of E^{rns} correlates with the known partial secretion of the protein.

Secretion of the E^{rns} protein is caused by its atypical membrane anchor which is folded as an amphipathic helix. Our previously obtained data show that the E^{rns} membrane anchor not only manages the membrane binding of the protein but also influences the retention/secretion of the protein and achieves the cleavage of the E^{rns} protein from the polyprotein by the cellular signal peptidase, which normally cleaves only downstream of a transmembrane helix. In summary, the E^{rns} membrane anchor combines several important functions in a short stretch of sequence, namely membrane anchor, unusual signal peptidase cleavage site and control of the retention/secretion ratio. The molecular mechanisms behind these functions can only be understood when the structure and the membrane binding ability of this region is elucidated.

For that reason the membrane binding ability of the E^{rns} membrane anchor was analyzed in an *in vitro* system. In addition, the secondary structure of the E^{rns} membrane anchor was determined in a membrane mimicking environment. The E^{rns} membrane anchor showed a strong and specific binding to negatively charged lipids which didn't depend on the positive charge of the protein anchor. In addition the E^{rns} membrane anchor was separated into different parts and mostly all fragments showed the same binding ability. Furthermore, mutations which led to a dramatic increase in the secretion rate in cell culture experiments didn't show any significant difference in the lipid binding compared to the wild typ. Therefore the biological effects of these mutations couldn't depend on changes in membrane binding efficiency but should be correlated with other features of the E^{rns} membrane anchor. To have a look on the structure of the membrane anchor we used CD Spectroscopy to determinate the secondary structure. As expected, the membrane anchor showed a strong helical folding. But the orientation of the helical region was not as expected because orientated CD Spectroscopy indicated that the helical region slightly inclines into the membrane.

For further understanding of the membrane anchor we used NMR Spectroscopy to obtain a deeper insight into the structure of the c-terminal end of the membrane anchor. To this end we determined the positions of the amino acids in a bicelle system by measuring the proton exchanging rate of the NH group. This technique approach allowed to distinguish between an amino acid which is located in the membrane and surrounded by lipids from an amino acid which is located in the solvents and surrounded by water. A surprising result of these analyses was that a large part of the amphipathic helix is located in the membrane and not as expected at the membrane-water interface. Such a type of membrane anchor is described here for the first time.

This present work offers new insight into the biochemical and structural function of the E^{rns} membrane anchor which will provide a better understanding of this fascinating protein and its biological functions.

1.0 Einleitung

1.1 Virologische Grundlagen

Viren nehmen in der Natur eine Sonderstellung ein, da sie in einem Bereich zwischen belebter und unbelebter Materie existieren. Sie besitzen keinen Energiestoffwechsel und keine Ribosomen und sind deswegen auf die Ressourcen und die Proteinsynthesefähigkeit einer Wirtszelle angewiesen. Um ihre Verbreitung und Vermehrung sicherzustellen, bilden Viren mit ihren Strukturproteinen Partikel aus, in denen die genetische Information vermittelt durch die viralen Proteine sicher zur nächsten Wirtszelle transportiert wird. Das virale Partikel schützt das Genom und sorgt für eine Bindung an eine geeignete Wirtszelle und in einem späteren Schritt für eine Freisetzung der genetischen Information in der Wirtszelle. Durch zelluläre und virale Faktoren kommt es anschließend zu einer Replikation der viralen, genetischen Information in der infizierten Zelle und zur Bildung von neuen Viruspartikeln. Diese können dann weitere Zellen infizieren. Im Laufe der Evolution hat die Wirtszelle das angeborene Immunsystem entwickelt, um diesen Vorgang erkennen und stoppen zu können. Auch die Viren waren nicht untätig und haben im Laufe der Zeit verschiedenen Antagonisten des angeborenen Immunsystems entwickelt, damit eine erfolgreiche Replikation und Ausbreitung im infizierten Wirt trotz des angeborenen Immunsystems sichergestellt werden kann. Die Evolution von Abwehr- und Gegenabwehrmechanismen geht immer weiter und kann als nie endender Kampf zwischen Virus und Wirtszelle angesehen werden.

1.1.1 Pestivirus

Zusammen mit den Flaviviren, den Hepaciviren und dem kürzlich neu etablierten Genus *Pegivirus* gehören die Pestiviren zur Familie der *Flaviviridae* (lat. flavus = Gelb) [1]. Die Klassifizierung der *Flaviviridae* in die verschiedenen Genera erfolgte aufgrund der evolutionären Verwandtschaft der Viren, die durch Vergleich der Sequenz der RNA-abhängigen RNA-Polymerase ermittelt wurde. Gemeinsame Charakteristika aller Mitglieder dieser Familie sind die umhüllten Viruspartikel, das einzelsträngige RNA-Genom mit positiver Polarität und die Genexpressionsstrategie mittels Translation eines einzigen langen Polyproteins, wobei sich die Strukturproteine im N-terminalen Bereich und die Nichtstrukturproteine im C-terminalen Bereich des Polyproteins befinden. Die Aufnahme der Viren in der Zelle erfolgt durch eine rezeptorvermittelte Endozytose, die durch die viralen Oberflächenproteine ausgelöst wird [2, 3]. Anschließend induziert voraussichtlich der niedrige pH Wert im Endosom eine Fusion der Virusmembran mit der Endosomenmembran und führt somit zur Freisetzung der verpackten RNA ins Zytosol. Da das virale Genom eine positive Polarität aufweist, kann es direkt als mRNA fungieren. Bei der Translation wird ein Polyprotein hergestellt, das co- und posttranslational durch zelluläre und virale Protease in die einzelnen Virusproteine gespalten wird. Die Plusstrang-RNA dient anschließend als Matrize für die Replikation. Neu gebildete Plusstrang-RNA wird dann in Viruspartikel verpackt und diese werden aus der Zelle ausgeschleust.

Zum Genus *Flaviviren* gehören viele bekannte human- und tierpathogene Viren, wie das West-Nil-Virus, das Gelbfiebervirus oder der vor allem in Süddeutschland vorkommende Erreger der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME). Der einzige Vertreter des Genus *Hepacivirus* ist das humanpathogene Hepatitis C Virus (HCV). Mit diesem Virus sind weltweit über 130-170 Millionen Menschen persistent infiziert [4], wobei die persistenten HCV Infektionen sehr häufig zu Fibrosen und

Zirrhosen der Leber und schlussendlich zu Leberkrebs führen [5]. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten ist bis jetzt nur in wenigen speziellen Fällen eine Heilung persistenter infizierter Patienten möglich. Das Genus *Pegivirus* enthält die Gruppe der GB Viren, zu der auch das bei immunsupprimierten Menschen gefundene GB-C gehört. Im Genus *Pestivirus* werden nur tierpathogene Erreger zusammengefasst, das wirtschaftlich ausgesprochen bedeutende Virus der klassischen Schweinepest (classical swine fever virus, CSFV), das „border disease“ Virus (BDV) des Schafes und das Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV), welches Grundlage der vorliegenden Arbeit ist.

Pestiviren zeigen mit den Hepaciviren eine größere Übereinstimmung in ihrer Genomstruktur und in ihrem Translationsinitiationsmechanismus als mit den Flaviviren. Das trifft auch auf die Molekularbiologie dieser Viren zu.

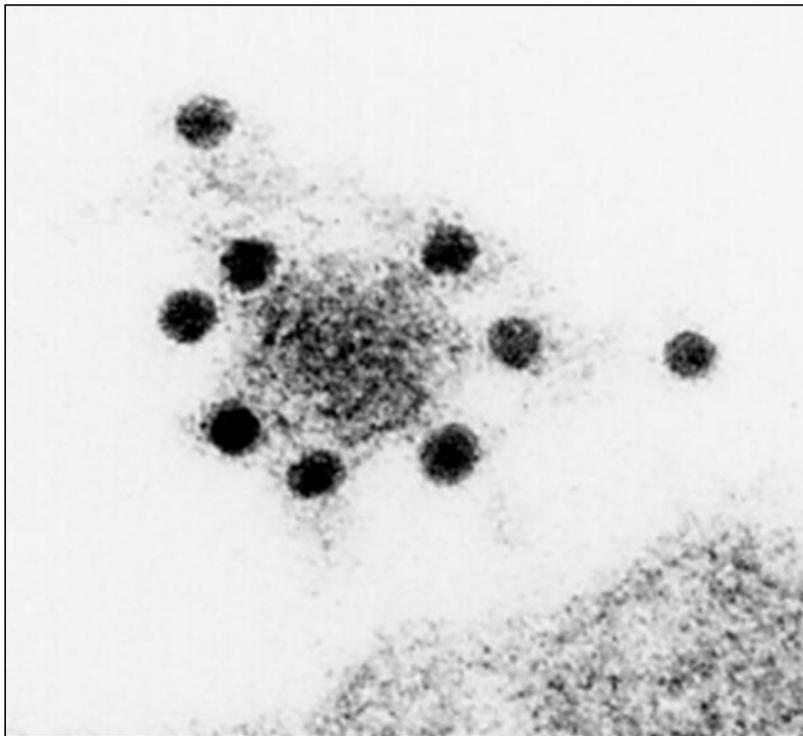


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines BVDV Partikels

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines BVDV CP7 Partikels, das mit einem mit Gold markiertem Antikörper gegen das virale Glykoprotein E^{ms} behandelt wurde [6].

Das Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV) bildet membranumhüllte ca. 40-60 nm große Partikel (siehe Abbildung 1). Bei Aufreinigung dieser Partikel können die vier Strukturproteine, das Kapsid (C), das Glykoprotein E^{ms} (ribonuclease secreted), das Glykoprotein E1 und das Glykoprotein E2 detektiert werden. Dabei sitzen die Glykoproteine E^{ms} , E1 und E2 auf bzw. in der Membran, die die Partikel umschließt, wohingegen das Kapsidprotein im Partikel zu finden ist. Jedoch bildet das Kapsidprotein kein herkömmliches Kapsid aus, da die virale RNA nicht wie bei anderen Viren von einem rigiden, regelmäßig strukturierten Kapsid umhüllt vorliegt, sondern lediglich mit dem Kapsidprotein assoziiert ist. Äußert überraschend war der kürzlich publizierte Befund, dass Viren ohne Kapsidprotein, jedoch mit Mutationen in anderen viralen Proteinen, fähig sind, infektiöse Nachkommen zu produzieren [7]. Das Kapsid führt zu einer Stabilisierung der RNA und schützt die RNA

anscheinend vor der Erkennung durch zelluläre Faktoren bzw. verhindert ihre Degradation [7]. Die Glykoproteine sind für die Bindung an und den Eintritt in die Zelle verantwortlich. Es können neutralisierende Antikörper gegen E^{rn}s und E2 gebildet werden.

Das virale Genom besteht aus einer einzelsträngigen, positiv orientierten RNA mit einer Größe von ungefähr 12,3 kb, die 5' und 3' nicht translatierte Regionen (NTR) enthält. Da das virale Genom eine positive Polarität aufweist kann es direkt als mRNA fungieren, wobei die Translation über eine IRES (*internal ribosome entry side*) gestartet wird, da die RNA über keine Cap-Struktur verfügt. Bei der Translation wird ein Polyprotein von über 4000 Aminosäuren hergestellt, das anschließend durch zelluläre und virale Proteasen in die einzelnen Proteine zerlegt wird (Abbildung 2). Dabei enthält der N-terminale Bereich des Polyproteins die vier Strukturproteine C, E^{rn}s, E1 und E2 und die Nicht-Strukturproteine p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B finden sich im C-terminalen Bereich. Ein weiteres Nicht-Strukturprotein, das N^{pro}, bildet das N-terminale Ende des Polyproteins [8-10].

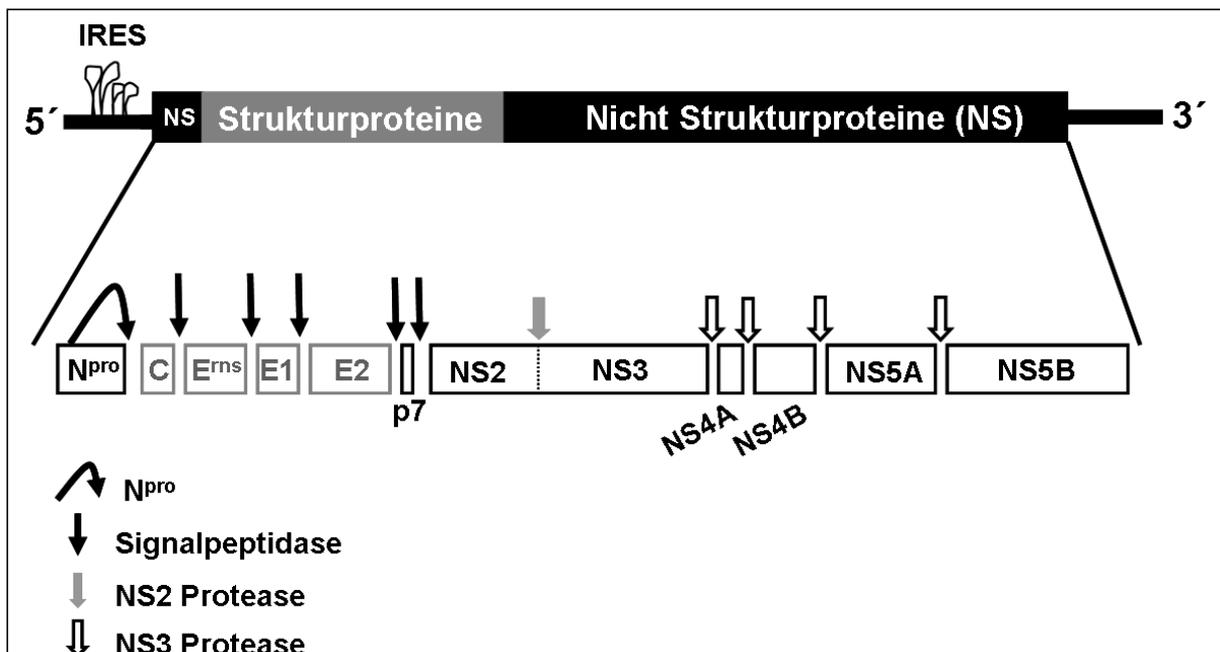


Abbildung 2: Genomorganisation von Pestiviren

Schematische Darstellung der Genomorganisation bei Pestiviren. Die Struktur im 5' Bereich repräsentiert die IRES (*internal ribosome entry side*) und determiniert den Startpunkt der Translation. Darunter sind die einzelnen viralen Proteine, die das Polyprotein kodiert, proportional zu ihrer Größe wiedergegeben. Dabei ist die autokatalytische Spaltung von N^{pro} durch einen gekrümmten schwarzen Pfeil dargestellt. Zwischen den vier Strukturproteinen und dem p7 Protein ist die Signalpeptidasespaltung mittels eines schwarzen Pfeils gezeigt, die autokatalytische Spaltung von NS2-3 durch die NS2-Protease ist durch einen grauen Pfeil und die Spaltung der anderen Nicht-Strukturproteine durch die NS3/4A-Protease ist durch einen schwarz umrandeten Pfeil dargestellt.

N^{pro} ist eine Autoprotease, die sich selbständig vom Kapsid abspaltet. Es induziert einen Abbau des zellulären Faktors IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) durch das Proteasom, wobei dieser Vorgang nicht durch die Proteaseaktivität des N^{pro} verursacht wird. IRF3 ist eine wichtige Schaltstelle im Signalweg zur Erkennung von intrazellulär vorliegender viraler RNA. Virale RNA wird durch

verschiedene zelluläre Proteine z.B. RIG-I (*retinoic acid inducible gene 1*) oder Mda-5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*), durch die Zelle entdeckt und führt zur Aktivierung spezifischer Signalwege. Bei Aktivierung des Signalweges wird IRF3 phosphoryliert, wodurch eine Dimerisierung eingeleitet wird, die zur Translokation von IRF3 in den Zellkern führt. Dort wirkt das dimerisierte IRF3 als Transkriptionsfaktor und aktiviert u.a. die IFN- α (*Interferon- α*) und IFN- β (*Interferon- β*) Produktion, wodurch der antivirale Status der Zelle aktiviert wird. Durch einen mittels N^{pro} eingeleiteten Abbau von IRF3 kann die Zelle somit keine intrazellulär vorliegende virale RNA mehr detektieren, wodurch das Virus einen Wachstumsvorteil erhält [11-13]. N^{pro} ist als einziges pestivirales Protein nicht essenziell, ein Fehlen des Proteins führt jedoch zu einem attenuierten Virus. Im Polyprotein folgen im Anschluss an N^{pro} die viralen Strukturproteine C, E^{ns}, E1 und E2, die durch die zelluläre Signalpeptidase voneinander getrennt werden. Dabei stellt das Ende der Kapsidproteinsequenz eine Signalsequenz dar, die für eine Translokation des nachfolgenden Abschnitts des Polyproteins ins ER sorgt. Im Polyprotein folgen translozierte Sequenzen, die an mehreren Stellen durch Stopp-Transfer und weitere Signalsequenzen unterbrochen werden. Die letzte bekannte Stopp-Transfer Sequenz liegt im NS2-Protein. Somit befinden sich die viralen Glykoproteine mit Ausnahme kurzer Membranankersequenzen im ER Lumen, wohingegen sich die anderen viralen Proteine im Zytosol befinden.

Das p7 Protein folgt im Polyprotein den Strukturproteinen und leitet somit die für die Nichtstrukturproteine kodierende Region ein. Von p7 wird angenommen, dass es wie das entsprechende Protein im HCV oligomerisiert und dadurch einen Ionenkanal ausbildet. Es wird diskutiert, dass p7 an der Freisetzung der Viruspartikel beteiligt ist oder eine Funktion bei der Freisetzung der RNA aus dem Partikel hat. Dazu müsste das Protein jedoch im Viruspartikel zu finden sein. Bisherige Daten zeigen jedoch, dass p7 zu den Nichtstrukturproteinen gehört. Das Protein NS2 spaltet, reguliert über den zellulären Faktor JIV (J-domain protein interacting with viral protein), das Vorläuferprotein NS2-3 in die einzelnen Proteine NS2 und NS3 [14, 15]. Diese Spaltung ist essenziell für die Replikation von Pestiviren, da freies NS3, jedoch nicht das Vorläuferprotein NS2-3, für die RNA-Replikation benötigt wird. Somit entscheidet die Menge an freiem NS3 darüber, wie hoch die virale Replikationsrate ausfällt [16]. NS3 besitzt neben seiner für die Replikation wichtige Funktion als RNA-Helikase zusätzlich eine Serinproteaseaktivität, die zusammen mit dem Kofaktor NS4A alle weiteren im Polyprotein nachfolgenden Proteine spaltet. Über NS4B und NS5A ist noch nicht sehr viel bekannt jedoch wird angenommen, dass sie ähnliche Funktionen wie die entsprechenden HCV Proteine haben. Somit wird angenommen, dass NS4A entscheidend daran beteiligt ist den Replikationskomplex an intrazelluläre Membranstrukturen zu assemblieren und NS5A verschiedene Funktionen hat wie z.B. Inhibierung der Interferonantwort sowie als Teil des Replikationskomplexes Interaktionen mit zellulären Proteinen zu vermitteln. NS5B ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase des Virus. Alle Nichtstrukturproteine von NS3 bis NS5A werden für eine Replikation der Viren benötigt. Dabei ist eine *trans*-Komplementierung nur von NS5A möglich, alle anderen Proteine müssen in *cis* vorliegen.

1.1.2 BVDV (Bovine virale Diarrhoe Virus)

Das BVD-Virus infiziert hauptsächlich Rinder und ruft im Feld sehr variable Krankheitsverläufe mit einer großen Bandbreite an Symptomen hervor. In den meisten Fällen verläuft die BVDV Infektion asymptomatisch oder geht mit Symptomen einer milden Infektion der oberen Atemwege einher. Es kann jedoch in Einzelfällen auch zu starken Symptomen im Bereich des Verdauungstrakts, der blutbildenden Organe, der Atemwege und der Geschlechtsorgane kommen. Nach überstandener Infektion entwickelt das Tier Antikörper gegen mehrere virale Proteine, die zu einer lebenslangen Immunität gegen Neuinfektionen führen. Dies trifft aber nur für BVD Viren der gleichen Spezies zu. BVDV lässt sich im Gegensatz zu dem nahe verwandten Pestivirus CSFV (*classical swine fever virus*, *Virus der klassischen Schweinepest*), das nur als eine Spezies vorkommt, durch Sequenz- und Antigenunterschiede in zwei Spezies unterteilen: BVDV Typ 1 und Typ 2 [17]. Die Spezies BVDV 1 kann weiter in die Genotypen 1a und 1b differenziert werden. Die Sequenzhomologie zwischen CSFV und den zwei BVDV Spezies liegen zwischen 60-70%. Jede BVDV Spezies kann wiederum in einzelne Feldisolate aufgliedert werden, wobei zwischen den Isolaten jeder Spezies eine Homologie zwischen 80-96% registriert werden kann.

Eine Besonderheit von Pestiviren ist, dass sie als zwei Biotypen vorkommen können. Dabei unterscheidet man zytopathogene Viren (cp), die in einem Zellkultursystem zur Lyse der Zellen führen und nicht-zytopathogene Viren (ncp), die in der Zellkultur ohne erkennbare Auswirkungen auf die Zelle replizieren. Die molekularbiologische Basis für die Ausbildung dieses Phänotyps liegt in der veränderten Steuerung der NS2-3 Spaltung verborgen. Bei ncp-Viren ist die Spaltung streng geregelt und findet dadurch nur in den ersten 8h nach Infektion statt. Dies liegt an dem zellulären Kofaktor JIV, der für die Spaltung von NS2-3 benötigt wird. JIV kommt in der Zelle nur in sehr geringen Mengen vor und ihm werden Funktionen als Protein Chaperon nachgesagt. Wenn die vorhandene Menge an JIV in der Zelle erschöpft ist, findet keine Spaltung von NS2-3 mehr statt, so dass das für die RNA-Replikation erforderliche NS3 Protein nicht mehr nachgeliefert wird und deshalb die Replikation heruntergeregelt wird. Durch diesen Mechanismus wird die Replikation des Virus an die Expression eines zellulären Faktors gekoppelt. Da JIV nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird, stellt sich eine niedrige Basisreplikationsrate ein, die dem Virus erlaubt, sich in den Zellen zu vermehren, ohne diesem Wirt zu schaden. Die cp Viren haben es durch Mutation nun geschafft, NS3 von diesem Faktor unabhängig zu generieren. Dadurch kommt NS3 in große Mengen frei vor, was zu einer ungesteuerten Replikation in der Zelle führt. Durch die großen Mengen an viraler RNA reichen die immunsupprimierenden Maßnahmen des Virus wie z.B. der Abbau von IRF3 nicht mehr aus, und es kommt bei den cp-Viren zu einer Interferonantwort der Zelle, die schlussendlich zur Zerstörung der Zelle führt. Um ihre Replikation von JIV unabhängig zu machen, haben die cp-Viren interessante Methoden entwickelt. Viele dieser Erreger haben den für die Interaktion wichtigen Bereich von JIV in ihr eigenes Genom integriert, so dass sie nicht mehr auf das zelluläre JIV angewiesen sind. Mit Abstand die häufigste „cp Veränderung“ ist die Integration einer Sequenz, die für Ubiquitin kodiert. Durch die Inserierung dieser Sequenz zwischen NS2 und NS3 stellt das NS2-3 Protein nun ein Ziel für zelluläre Proteasen dar und wird von diesen prozessiert.

Pestiviren haben einen faszinierenden Mechanismus zur Etablierung einer lang anhaltenden Persistenz entwickelt, wodurch sie wirtschaftlich ausgesprochen bedeutend und von hohem wissenschaftlichem Interesse sind [18]. Die größte Gefahr einer BVDV Infektion stellt nämlich nicht die akute Infektion der Rinder dar, sondern entsteht bei der Infektion von trächtigen Rindern [19-21]. Bei einer Infektion eines naiven trächtigen Rindes gegen Ende des ersten Trächtigkeitsdrittels mit einem ncp-Virus kann der Erreger über die Plazenta des Muttertieres in den Fötus gelangen. Dieser

Zeitpunkt liegt vor dem Zeitraum, in dem im Fötus der Lernprozess des Immunsystems stattfindet, Selbst-Antigene nicht zu erkennen, damit später eine Unterscheidung zwischen Selbst- und nicht Selbst-Antigen erfolgen kann [22]. Die frühzeitige Infektion hat zur Folge, dass die viralen Proteine als Selbst-Antigene klassifiziert werden, weswegen keine adaptive Immunantwort (Antikörper, zytotoxische CD8-Killerzellen) gegen diese Proteine erfolgen kann. Da Pestiviren zusätzlich über Mechanismen verfügen, mit denen die angeborene Immunantwort unterdrückt wird, ist das Immunsystem des Fötus nicht mehr fähig das Virus zu bekämpfen: Dies führt zu einer persistenten Infektion des Fötus, die auch nach der Geburt fortbesteht. Findet die Infektion dagegen zu einem früheren Zeitpunkt statt, führt dies zum Abort des Fötus, während bei Infektionen zu einem späteren Zeitpunkt entweder eine Eliminierung des Virus erfolgt, oder aber Aborte oder Totgeburten auftreten. Nach erfolgter persistenter Infektion des Fötus wird das Kalb geboren und zeigt zunächst meist keine Auffälligkeiten. Bei direktem Vergleich mit gleichaltrigen Kälbern sind jedoch oft Wachstumsnachteile zu entdecken, weswegen diese Kälber auch als „Kümmerer“ bezeichnet werden. Auch das Immunsystem der persistent infizierten (PI) Kälber ist voll ausgebildet und aktiv, so dass sie andere Krankheitserreger bekämpfen können. Jedoch scheiden sie täglich große Mengen an Viren aus und führen somit zu einer Infektion von ganzen Tierbeständen. Zudem kommt es bei einer Trächtigkeit anderer Tiere der Herde wiederum zu persistent infizierten Kälbern, so dass ein Anteil von 0,5 – 2 % der neugeborenen Kälber persistent infiziert ist. Der beschriebene Mechanismus der Persistenzausbildung kann nur von ncp-Viren ausgelöst werden. Cp-Viren schädigen durch den Verlust der Replikationskontrolle den Wirt zu sehr, so dass es zu keiner Persistenz kommen kann, sondern die Infektion zu Aborten führt [23, 24].

Für die Unterdrückung der angeborenen Immunantwort im PI-Tier sind zwei virale Proteine von entscheidender Bedeutung. Diese beiden Proteine konnten bis jetzt nur bei Pestiviren gefunden werden, was die Besonderheit dieses Mechanismus weiter herausstellt. Für die Hemmung des angeborenen Immunsystems ist zum einen das Protein N^{pro} verantwortlich, das wie oben angesprochen die intrazelluläre Immunantwort durch die Einleitung des Abbaus von IRF3 hemmt [11]. Zum anderen ist das Glykoprotein E^{ns} wichtig, auf das im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird. Bei einer Deletion von N^{pro} und bestimmten Mutationen im E^{ns} kommt es zu keiner Infektion des Fötus, so dass keine Persistenz ausgebildet werden kann. Selbst bei einer direkten Infektion des Fötus mit diesen Viren konnte keine Persistenz beobachtet werden. Die Viren replizieren zwar im Fötus, doch die Infektion führte zum Abort [25, 26].

Zwischen 6 Monaten und 2 Jahren nach der Geburt kann das PI-Tier an „Mucosal Disease“ (MD) erkranken. Diese Krankheit führt zu einer Zersetzung der Schleimhäute was u.a. blutige Durchfälle zur Folge hat. Ausgelöst wird diese Krankheit durch die Mutation des persistierenden ncp-Virus zu einem cp-Virus oder in seltenen Fällen durch eine neue „Überinfektion“ des Wirtes mit einem verwandten cp-Virus. Da sich dieses Virus stärker im Wirt vermehrt, und das Immunsystem es nicht bekämpfen kann, kommt es zu einer massiven Zerstörung von Zellen, was innerhalb von ca. 2 Wochen zum Tod des Tieres führt. Durch die Ausbildung lang anhaltender Persistenz und gleichzeitiger Ausscheidung großer Virusmengen gelingt es dem BVDV sehr erfolgreich über einen langen Zeitraum in der Population zu verbleiben. Das Auftreten von MD in Folge der Mutation zu cp-Viren ist damit eher als „evolutionärer Unfall“ anzusehen [20].

1.1.3 Das Glykoprotein E^{rns}

E^{rns} ist das erste virale Glykoprotein im Polyprotein. Zusammen mit dem Glykoprotein E2 stellt es das Hauptantigen des Virus dar, so dass neutralisierende Antikörper gegen E^{rns} und E2 in infizierten Tieren gebildet werden [27]. E^{rns} besteht aus 227 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von ca. 42 - 48 kDa. Wie viele andere virale Glykoproteine ist E^{rns} stark glykosyliert, um vom Immunsystem nicht so gut entdeckt zu werden. Der Zuckeranteil macht über 50% der molekularen Masse aus, wobei die Zuckerreste über 9 potentielle N-Glykosylierungsstellen mit dem Protein verbunden sind. Zudem gibt es Hinweise auf O-Glykosylierungen. E^{rns} enthält je nach Virusstamm 8 - 9 Cysteine, wobei die ersten 8 Cysteine intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden, die die 3D-Struktur stabilisieren. Über das 9. Cystein 171 (441 im Polyprotein), das als einziges Cystein nicht in allen Pestiviren konserviert ist, kann sich ein Homodimer mit einer molekularen Masse von ca. 97 kDa bilden. Die Dimerisierung ist wichtig für die Funktion von E^{rns} als Virulenzmarker, da Viren die eine künstliche Deletion dieses Cysteins aufweisen, im Wirt attenuiert sind [28].

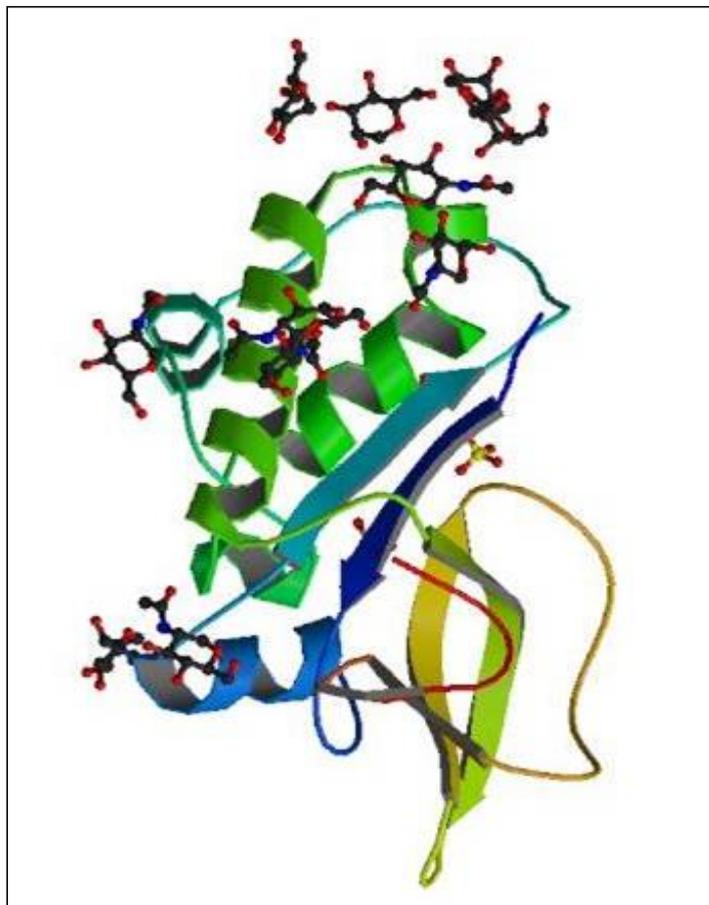


Abbildung 3: 3D-Struktur des N-Terminus von E^{rns}
Struktur der ersten 167 Aminosäuren von E^{rns} des BVDV Stammes CP7 [29].

Eine weitere Besonderheit von E^{rns} ist, dass es eine RNase Aktivität besitzt, was für ein RNA Virus sehr ungewöhnlich ist [30, 31]. Die Struktur der ersten 167 Aminosäuren von E^{rns} konnte mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst werden (siehe Abbildung 3) [29]. Dabei wurde entdeckt, dass die Faltung der RNase Domäne von E^{rns} einer T2-RNase entspricht. Die T2-RNase Familie ist, evolutionär

gesehen, eine alte und überall vorkommende RNase Familie. Vertreter dieser Familie wurden in Pflanzen, Bakterien und Tieren gefunden [32]. Die Funktionen von vielen dieser RNasen sind noch nicht vollständig aufgeklärt, ihnen wird jedoch ein breites Wirkspektrum zugesprochen. Die RNase Funktion von E^{rns} ist wichtig für die Wirkung von E^{rns} als Virulenzfaktor, da Viren, bei denen das aktive Zentrum der RNase mutiert wurde, eine Attenuierung im Wirt, jedoch in einem Zellkultursystem keinen Wachstumsnachteil zeigen. Zusätzlich konnte in einem Zellkultursystem gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von gereinigtem E^{rns} im Zellkulturüberstand die Zugabe von extrazellulärer RNA kein Interferonsignal der Zelle mehr auslösen kann, jedoch intrazelluläre dsRNA immer noch zu einer Interferonantwort führt [33, 34]. Dies ist in soweit aufschlussreich, als E^{rns} , wie der Name („envelope protein RNase secreted) schon andeutet, in einem geringen Prozentsatz von der infizierten Zelle sekretiert wird. Bei CSFV-infizierten Schweinen und bei BVDV-infizierten Rindern kann E^{rns} in relativ großen Mengen im Blut nachgewiesen werden, wobei auch freies, nicht an das virale Partikel gebundenes E^{rns} , detektiert werden kann. Dabei treten Unterschiede in der Sekretionsrate bei den einzelnen Viren auf. E^{rns} ist jedoch auch Teil des Virions und ist für die Bildung von infektiösen Partikeln unersetzbar.

E^{rns} kann in Zellen und in viralen Partikeln als Membranprotein detektiert werden, wobei die Membranbindung durch den C-Terminus verursacht wird. Die Membranbindung ist dabei nicht so stabil wie man es für eine Transmembranhelix erwarten würde [35]. Bei der Annahme einer helikalen Faltung bildet sich eine amphipatische Helix aus. Amphipatische Helices kommen in einigen zellulären und bakteriellen Proteinen vor und dienen als Sensoren für die Membrankrümmung, zur Einleitung einer Membrankrümmung und als Porenbildner bei antibiotisch wirkenden Peptiden [36]. Der amphipatische Charakter des C-terminalen Bereiches von E^{rns} ist wichtig für die Membranbindung, da eine Insertion eines Alanins in die C-terminale Region und die daraus resultierende Zerstörung des amphipatischen Charakters zu einer gesteigerten Sekretionsrate und zu einer schlechteren Membranbindung des Proteins führt [37, 38]. Eine Änderung in der Sekretionsrate kann auch durch den einzelnen Austausch von bestimmten Aminosäuren in diesem Bereich erzeugt werden.

Der N- und der C-Terminus von E^{rns} werden durch die Spaltung des Signalpeptides durch die zelluläre Signalpeptidase freigesetzt [39]. Die Spaltung zwischen E^{rns} und E1 läuft in der Zelle zeitverzögert ab. Somit kann ein E^{rns} -E1 Zwischenprodukt detektiert werden. Interessanterweise wird auch dieser Prozessierungsschritt durch die Signalpeptidase durchgeführt. Dies ist erstaunlich, da die Signalpeptidase normalerweise nur nach einer Transmembranhelix spaltet, während der C-Terminus von E^{rns} sich voraussichtlich zu einer amphipatische Helix faltet und dann eine Orientierung parallel zur Membranoberfläche einnimmt. Somit erfüllt der C-Terminus von E^{rns} , der auch als E^{rns} -Anker bezeichnet wird, mehrere Aufgaben. Er ist für die Membranverankerung des Proteins zuständig, trägt die Information für die Steuerung der Sekretion, bildet die Struktur für die Signalpeptidasespaltstelle aus und beinhaltet ein Cystein, durch das die Dimerisierung von E^{rns} erfolgen kann.

Diese unterschiedlichen Anforderungen an die C-terminale Region stehen im direkter funktionellen Zusammenhang mit den verschiedenen Funktionen des E^{rns} -Proteins. Die Strukturbestimmung dieses Bereiches sollte zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise des E^{rns} -Ankers führen.

1.2 Physikalische Grundlagen

Um die Struktur des E^{ms}-Ankers bestimmen zu können, wurden verschiedene biophysikalische Methoden verwendet. Ziel war es, ein umfassendes Bild der E^{ms}-Ankerstruktur zu erhalten. Zum einen wurde dazu die Zirkulardichroismus (CD) Spektroskopie und zum anderen die Kernmagnetresonanz (NMR) Spektroskopie benutzt. Durch beide Methoden können Strukturinformationen über Biomoleküle gewonnen werden. So kann durch die CD-Spektroskopie mit relativ wenig Messaufwand die globale Struktur eines Peptides analysiert werden, wohingegen durch NMR Messung eine detailliertere Strukturbestimmung möglich ist, der Messaufwand jedoch bei dieser Methode auch ungemein aufwändiger ist. Da sich die Methoden gut ergänzen, kann durch die Kombination beider Methoden ein umfassenderes Bild der vorliegenden Struktur erhalten werden.

1.2.1 Zirkulardichroismus (CD) Spektroskopie

Alle Aminosäuren bis auf Glycin sind durch ihre Chiralität, welche im asymmetrischen C_α Atom begründet liegt, optisch aktiv. Das bedeutet, dass sie eine rechts und links zirkular polarisierte elektromagnetische Welle unterschiedlich brechen und absorbieren. Dies führt bei einer linear polarisierten elektromagnetischen Welle, die aus zwei gegenläufigen rechts und links zirkular polarisierten Lichtwellen aufgebaut ist, zu einer Drehung der Polarisationssebene. Dieses Phänomen der optischen Aktivität wurde schon früh im Jahre 1811 von Arago entdeckt [40]. Jedoch erst 1848 fand Louis Pasteur [41] heraus, dass dieser Effekt auf einer molekularen Eigenschaft von Substanzen basiert, zu einer Zeit in der eine dreidimensionale Struktur von Molekülen noch undenkbar war. Van't Hoff [42] und Le Bel [43] machten dann im Jahre 1874 die Entdeckung, dass diese Stoffeigenschaft durch nicht symmetrische Substituenten am Kohlenstoffatom verursacht wird, wodurch die Strukturchemie begründet wurde. Es war jedoch noch ein weiter Weg, bis analytische Methoden wie die optische Rotationsdispersion (ORD) oder die Zirkulardichroismus (CD) Spektroskopie entwickelt werden konnten, die auf dieser physikalischen Eigenschaft beruhen.

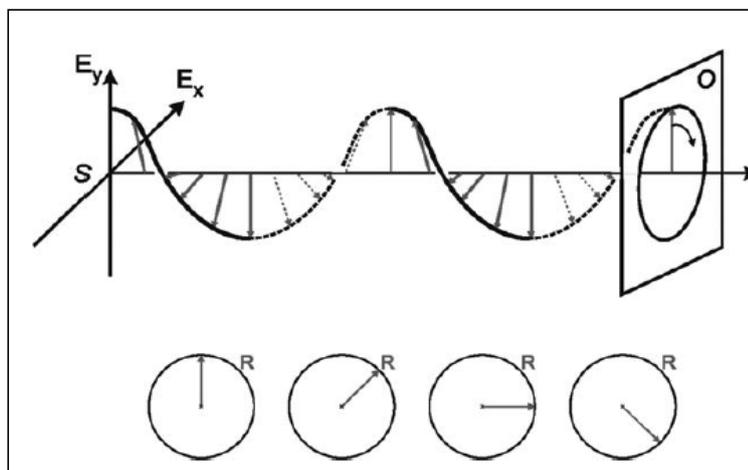


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer rechts zirkular polarisierten Lichtwelle

Schematische Darstellung des Verlaufs einer rechts zirkular polarisierten Lichtwelle im Raum entlang der Lichtausbreitungsrichtung (z-Achse). Der untere Abschnitt repräsentiert den zeitlichen Verlauf des Elektromagnetischen Vektors in der Ebene O [44].

Für die CD-Spektroskopie wird zirkular polarisiertes Licht verwendet, das als Überlagerung zweier senkrecht zueinander stehender, linear polarisierter Lichtwellen mit einer Phasenverschiebung von 90° betrachtet werden kann. Man unterscheidet zwischen einer links zirkular polarisierten Lichtwelle, mit der Phasenverschiebung $+90^\circ$ und einer rechts zirkular polarisierten Lichtwelle, mit der Phasenverschiebung -90° (siehe Abbildung 4).

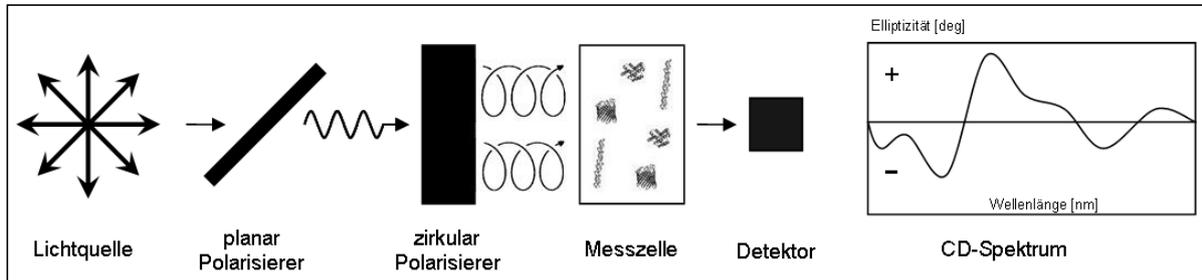


Abbildung 5: Schematischer Ablauf einer CD-Messung

Die unpolarisierte elektromagnetische Lichtwelle wird zuerst linear polarisiert (planar Polarisierer) und anschließend zirkular polarisiert (zirkular Polarisierer). Nach dem Durchschreiten der Messzelle wird die unterschiedliche Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht gemessen und als Differenzabsorption in Abhängigkeit der Wellenlänge angegeben (CD-Spektrum).

Für die CD-Messung wird das unpolarisierte Licht zuerst mittels eines Quarzglases linear polarisiert (siehe Abbildung 5). Das linear polarisierte Licht wird anschließend über einen CD-Modulator (photoelastischer Modulator) in eine links und rechts zirkular polarisierte Lichtwelle umgewandelt. Der CD-Modulator besteht aus einem piezoelastischen Quarzkristall, der an ein elektrisches 50 kHz Wechselfeld angeschlossen ist. Das elektrische Feld induziert in dem Kristall eine strukturelle Änderung, wodurch er als achromatische $\lambda/4$ -Platte wirkt und entweder rechts oder links zirkular polarisiertes Licht durchlässt. Das zirkular polarisierte Licht passiert anschließend die Messzelle, die aus einer Quarzglasküvette mit der chiralen Probe besteht und wird anschließend von einem Photomultiplier detektiert [45]. Da optisch aktive Substanzen eine unterschiedliche Absorption zwischen rechts und links zirkular polarisiertem Licht aufweisen, kann diese über die Berechnung der Elliptizität Θ bestimmt werden. Anschließend wird die Differenz der auf den mittleren Aminosäurerest bezogenen molaren Elliptizität $[\Theta]_{\text{MRE}}$ (MRE= engl. mean residue ellipticity) von rechts und links zirkularisiertem Licht ($\epsilon_L - \epsilon_R$), berechnet und als Wert für jede gemessene Wellenlänge angegeben [45].

Um die Spektren von Biomolekülen untereinander vergleichen zu können, werden die CD-Daten als die auf den mittleren Aminosäurerest bezogene molare Elliptizität $[\Theta]_{\text{MRE}}$ angegeben, wozu die Konzentration der Probenlösung bekannt sein muss. Dies führt dazu, dass eine genaue Konzentrationsbestimmung der Probe ein kritischer Punkt der CD-Analyse ist.

$$[\Theta]_{\text{MRE}} = \frac{\Theta * M_{\text{Protein}}}{n_{\text{Protein}} * C_{\text{Protein}} * l * 10^2}; \quad \left[\frac{\text{deg} * \text{cm}^2}{\text{decimol}} \right]$$

Θ	= Elliptizität	[mdeg]
n_{Protein}	= Anzahl der Peptidbindungen	
C_{Protein}	= Proteinkonzentration	[g ml ⁻¹]
M_{Protein}	= molare Masse des Proteins	[g mol ⁻¹]
l	= opt. Schichtdicke	[cm]
$[\Theta]_{\text{MRE}}$	= auf den mittleren Aminosäurerest bezogene molare Elliptizität	[deg cm ² decimol ⁻¹]

Um nun CD-Analysen von Biomolekülen aufnehmen zu können, wird eine optisch aktive Komponente in einem Protein benötigt, die mit der Sekundärstruktur korreliert ist. Die meisten Chromophore in den Aminosäuren zeigen nur geringe CD-Effekte, die Peptidbindung zeigt jedoch im fernen UV Bereich (280 – 190 nm) eine starke Absorption bei ca. 200 nm. 1961 identifizierte Doty [46] schon den Elektronenübergang der Peptidbindung als den Ursprung der optischen Aktivität bei Proteinen und ordnete dann die drei im Spektrum erscheinenden Elektronenbanden den Elektronenübergängen zu. In diesem Spektralbereich absorbieren jedoch auch Chloridionen, verschiedene Lösungsmittelmoleküle oder der Luftsauerstoff. Deshalb muss bei einer CD-Messung darauf geachtet werden, dass das Lösungsmittel im gewählten Messbereich nicht oder zumindest nur schwach absorbiert.

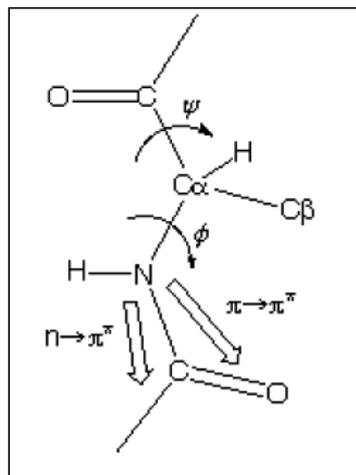


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Peptidbindung

Darstellung der Peptidbindung und des $n \rightarrow \pi^*$ bzw. $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergangs. Die Lage und die Intensität des Übergangs hängen von den Torsionswinkeln ψ und ϕ ab, die wiederum von der Sekundärstruktur beeinflusst sind [45].

Die Peptidbindung kann im fernen UV angeregt werden, was zu einem Übergang der n- oder π -Elektronen in ein antibindendes Orbital (π^*) führt (siehe Abbildung 6). Beim $n \rightarrow \pi^*$ Übergang kommt es zu einem Übergang eines Elektrons von einem nicht bindenden Orbital des

Carbonylsauerstoffs in ein antibindendes Orbital, bei einer Wellenlänge von ca. 222 nm. Der $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang, von einem π -Elektron des Carbonylatoms in ein antibindendes Orbital, ist entartet. Dadurch sind zwei Übergänge möglich. Ein $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang ist senkrecht zur Molekülachse polarisiert und liegt bei ca. 192 nm und der andere $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang ist waagrecht zur Molekülachse polarisiert und liegt bei ca. 209 nm (siehe Abbildung 7). In Abbildung 8 ist die Ausrichtung der Übergänge bezogen auf die Achsen eines helikal gefalteten Proteins gezeigt. Die genaue Lage und die Intensität dieser drei Übergänge hängen von den Torsionswinkeln ψ und Φ ab, die wiederum von der Sekundärstruktur beeinflusst sind. Somit kann aus der Lage und den Intensitäten der Übergänge ein Rückschluss auf die Torsionswinkel gezogen werden und daraus kann auf die Sekundärstruktur des Proteins zurückgeschlossen werden [44, 47].

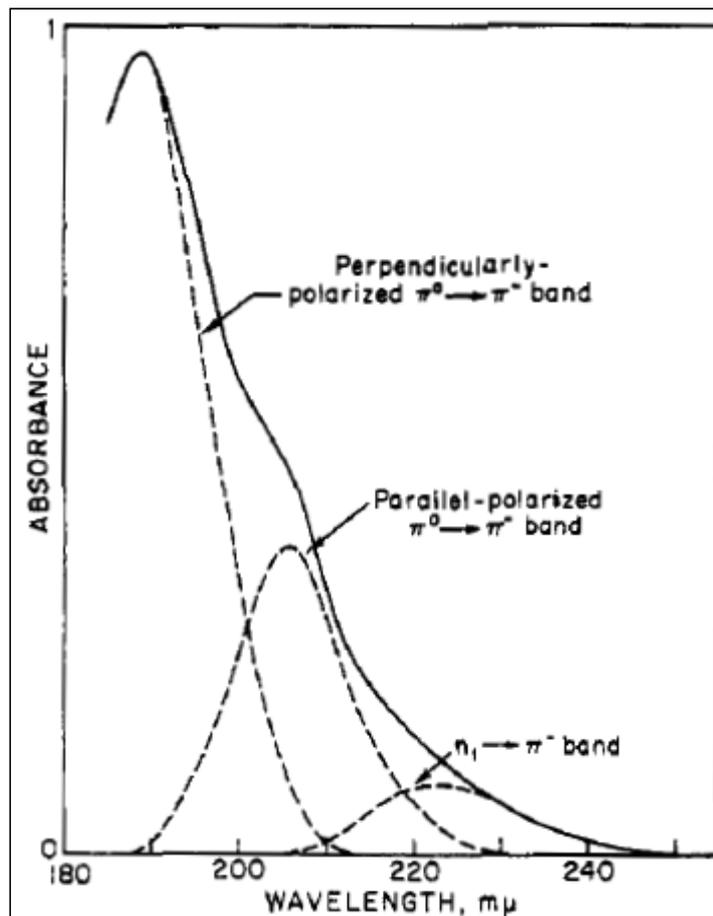


Abbildung 7: Absorptionsspektrum und Elektronenübergänge der Peptidbindung eines helikal gefalteten Peptides

Zuordnung der Elektronenübergänge der Peptidbindung zu den Banden des Absorptionsspektrums von helikal gefaltetem Poly- γ -methyl-L-glutamat. Dabei ist gestrichelt der Beitrag der einzelnen Übergänge zum Absorptionsspektrum gezeigt [47].

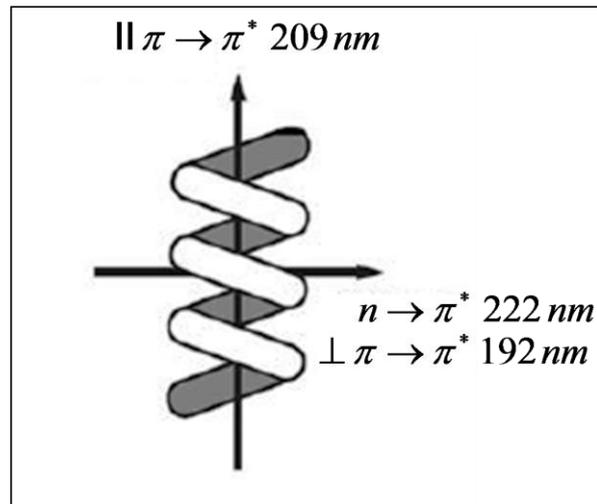


Abbildung 8: Orientierung der Elektronenübergänge der Peptidbindung im fernen UV

Schematische Darstellung der Orientierung der Elektronenübergänge der Peptidbindung im fernen UV, bezogen auf die Molekülachse eines helikal gefalteten Proteins. Der $n \rightarrow \pi^*$ Übergang bei ca. 222 nm und der $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang bei ca. 192 nm sind senkrecht zur Molekülachse orientiert. Der $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang bei 209 nm verläuft dagegen parallel zur Molekülachse. Verändert nach [44].

Da durch die Faltung des Proteins nur wenige Torsionswinkel überhaupt stabil sind, ergibt sich ein spezielles Muster in einem CD-Spektrum, wodurch die Faltung leicht identifiziert werden kann. In Abbildung 9 sind Beispiele für CD-Spektren dargestellt, die spezielle Faltungen von Proteinen repräsentieren. Ein α -helikal gefaltetes Protein zeigt ein Maximum bei ca. 192 nm und zwei Minima bei 209 und 222 nm. Zudem ist die Intensität des Maximums doppelt so groß wie die des Minimums bei 209 nm. Ein Protein, das hauptsächlich aus β -Faltblättern besteht, besitzt dagegen ein Maximum bei 197 nm und ein Minimum bei ca. 216 nm. Wenn das Protein völlig ungefaltet ist, ergeben sich ein Minimum bei 198 nm und über den gesamten fern-UV-Spektralbereich nur negative Elliptizitäten.

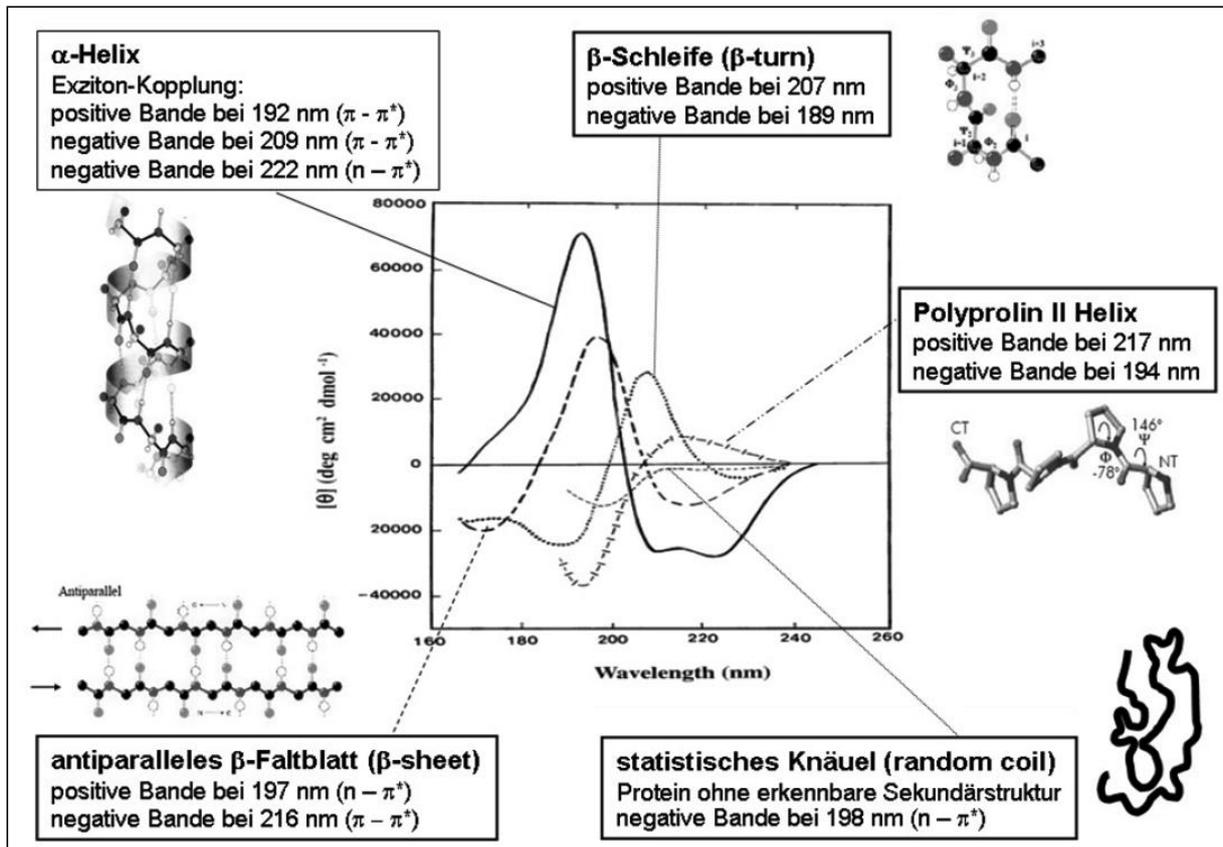


Abbildung 9: Darstellung von verschiedenen Basis-Sekundärstrukturen im CD-Spektrum

Beispiel von CD-Spektren eines α -helikal gefalteten Proteins (durchgezogene Linie), eines antiparallelen β -Faltplattes (gestrichelte Linie), einer β -Schleife (gepunktete Linie), eines ungefalteten Proteins (fein gestrichelte Linie) und einer Polyprolin II-Helix (gestrichelte Linie mit Querstrichen). verändert nach [45].

Meistens sind in Proteinen jedoch mehrere Sekundärstrukturelemente gemeinsam vertreten, wodurch Linearkombinationen der verschiedenen Spektrformen auftreten, die schwer zu analysieren sind. Zur „Zerlegung“ gemessener CD-Spektren werden Computerprogramme verwendet, die die Spektren eines unbekanntes Proteins dekonvolvieren und eine Sekundärstrukturvorhersage durchführen und somit die wahrscheinlichste Zusammensetzung der Struktur errechnen (Anteile der in Abbildung 9 gezeigten Basis-Sekundärstrukturelemente). Dazu werden die gemessenen CD-Spektren mit Referenzspektren von Proteinen mit bekannter Kristallstruktur verglichen. Durch unterschiedliche statistische und mathematische Methoden versuchen diese Algorithmen dann mittels einer Kurvenanpassung das gemessene CD-Spektrum möglichst gut zu beschreiben [48].

1.2.2 Orientierte Zirkulardichroismus (OCD) Spektroskopie

Durch die OCD-Spektroskopie kann die Lage einer Helix bezogen auf die Lipidoberfläche analysiert werden. Dies ist möglich, da bei der OCD die Messung nicht in einer Lösung stattfindet, in der die Proteine frei diffundieren können, sondern die Polypeptide an planaren Lipidstapeln angelagert werden. Dadurch wird eine Orientierung der Proteine, bezogen auf die Lipidoberfläche, erreicht, die anschließend analysiert werden kann.

In Abbildung 10 ist eine OCD-Messkammer dargestellt. Die Probe, bestehend aus Lipidschichten mit dem zu analysierenden Protein, befindet sich dabei auf einem Quarzglasplättchen. Um Artefakte durch Lineardichroismus und Doppelbrechung zu vermeiden, wird die Probe bei verschiedenen Winkeln um die Strahlachse gemessen [49, 50].

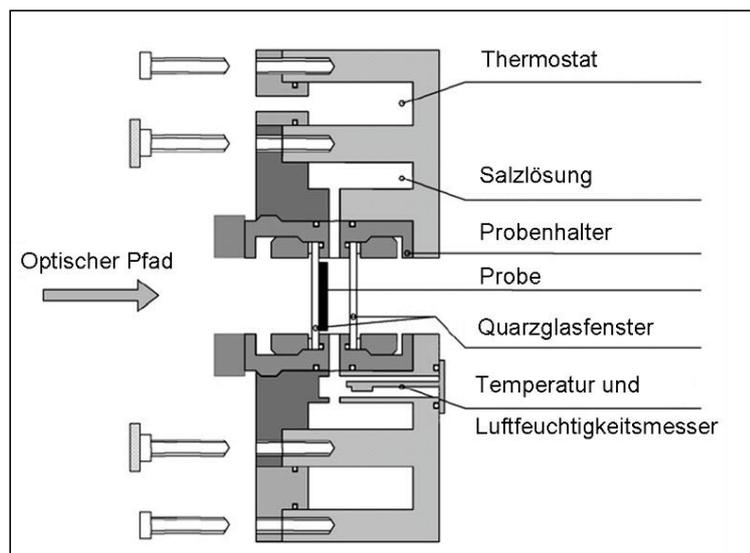


Abbildung 10: Aufbau OCD-Messzelle

Schematischer Aufbau der für die Messungen eingesetzten OCD-Messzelle. Die zirkular polarisierte elektromagnetische Strahlung (Optischer Pfad) wird dabei senkrecht auf ein Quarzglasfenster geleitet, in dem sich die Probe befindet. Über eine Salzlösung (gesättigte K_2SO_4 -Lsg.) wird eine konstante Luftfeuchtigkeit von 98% und eine konstante Temperatur z.B. von $30^\circ C$ aufrechterhalten. (verändert nach [49])

Eine Wechselwirkung von Materie mit elektromagnetischer Strahlung ist nur dann möglich, wenn das Übergangintegral ungleich null ist. Deswegen kann eine Wechselwirkung zwischen der zirkular polarisierten Lichtwelle und der Peptidbindung nur dann stattfinden, wenn der Feldvektor der elektromagnetischen Strahlung und der Übergangsvektor der Peptidbindung nicht senkrecht zueinander verlaufen. Da die Orientierungsrichtung der elektromagnetischen Strahlung durch den Versuchsaufbau vorgegeben ist, hängt die Intensität des Übergangs alleine von der Orientierung der Helix ab. Liegt die α -Helix als Transmembranhelix vor, also senkrecht zur Membranoberfläche, dann verläuft sie bei der OCD-Messung parallel zum Lichtstrahl. Ist dies der Fall, dann steht der Vektor des parallelen $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergangs senkrecht zum Feldvektor der elektromagnetischen Lichtwelle (vgl. Abbildung 8) und es kann zu keiner Wechselwirkung kommen. Ist die α -Helix dagegen parallel zur Lipidschicht orientiert, wie man es für eine amphipatische Helix erwarten würde, dann stehen die

Vektoren parallel zueinander und alle drei Übergänge können mit der elektromagnetischen Strahlung wechselwirken und dadurch im CD-Spektrum eine Bande erzeugen.

Somit kann aus der Intensität des parallelen $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergangs und damit aus der Bande bei 208 nm, auf eine Orientierung der Helix bezogen auf die Membranoberfläche geschlossen werden.

In Abbildung 11 ist ein Beispiel für ein OCD-Spektrum einer parallel und einer senkrecht zur Membranoberfläche angeordneten Helix sowie Zwischenzustände gezeigt. Man erkennt deutlich, dass mit zunehmender Änderung der Ausrichtung der α -Helix vom parallelen zum senkrechten Zustand, die negative Intensität der Bande bei 208 nm abnimmt und somit die Anregung des parallelen $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergangs nicht mehr so gut erfolgen kann. Dadurch gibt die Bande bei ca. 208 nm einen Aufschluss darüber, in welcher Orientierung die α -Helix bezogen auf die Membranoberfläche vorliegt. Über einen Vergleich des OCD-Spektrums mit Komponenten-Spektren, bei denen das Licht senkrecht bzw. parallel zur Helixachse eingestrahlt wird oder über Referenzproteine ähnlich wie bei der CD-Spektroskopie, kann der Orientierungsparameter der Helix berechnet werden [51].

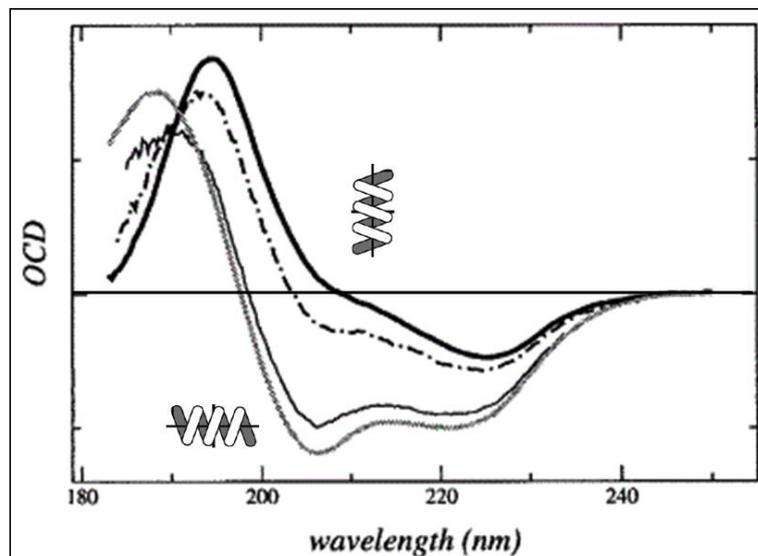


Abbildung 11: Veränderung des OCD-Spektrums in Abhängigkeit von der Helixorientierung

OCD-Spektren verschiedener α -Helices mit unterschiedlicher Orientierung zur Membranoberfläche. Dabei symbolisiert die obere, durchgezogene schwarze Linie eine Transmembranelix und die untere graue Linie eine parallel zur Membranoberfläche verlaufende Helix. Die beiden anderen Spektren symbolisieren Zwischenzustände zwischen den beiden eben genannten und somit bezogen auf die Membranoberfläche schräg in der Membran verlaufende Helices. Die Bande bei ca. 208 nm ist bei der parallel zur Membranoberfläche angeordneten Helix deutlich ausgeprägt, dagegen lässt sich bei der senkrecht angeordneten Helix keine Bande detektieren. (verändert nach [52])

1.2.3 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Neben der Masse, der elektrischen Ladung und dem Magnetismus ist der Atomspin die vierte physikalische Eigenschaft eines Atoms. Die Masse des Atoms wird hauptsächlich durch den Atomkern bestimmt, wobei die Masse der Ausgangspunkt für viele weitere physikalische Größen wie z.B. die Wärmekapazität oder die Viskosität ist. Die elektrische Ladung ist ausschlaggebend für die Bindung der Elektronen an die Atome und ist somit für die chemischen Eigenschaften der Atome verantwortlich. Der Magnetismus des Atomkerns erlaubt eine Interaktion mit einem magnetischen Feld. Da diese Kraft jedoch sehr schwach ist, besitzt sie nur eine geringe Bedeutung. Der Spin beschreibt eine Eigenschaft eines Atoms, die physikalisch als Eigendrehimpuls, ähnlich wie bei Planeten im Universum, beschrieben wird. Der Magnetismus und der Spin haben keinen Einfluss auf die chemischen oder physikalischen Eigenschaften des Atoms. Sie interagieren jedoch mit internen magnetischen Feldern, die z.B. von Elektronen oder anderen Atomkernen erzeugt werden, und externen magnetischen Feldern z.B. einer Messapparatur.

Der Kernspin eines Atoms entsteht durch die Anordnung der im Kern enthaltenen Protonen und Neutronen und spiegelt somit den molekularen Aufbau des Atomkerns wider. Da in der Bio-NMR nur Temperaturen im Bereich der Raumtemperatur eingesetzt werden, ist nur der energetische Grundzustand des Atomkerns bedeutend und damit auch nur dessen Kernspin. Die Träger des Spins sind die Quarks, aus denen die Protonen und Neutronen bestehen. Dabei trägt jedes der Quarks einen Kernspin von $\frac{1}{2}$. Durch die Kombination der drei Quarks im Neutron (2x down 1x up Quark) oder Proton (2x up 1x down Quark) resultiert daraus im Grundzustand sowohl für das Neutron als auch für das Proton ein Spin von $\frac{1}{2}$.

Die Anordnung der Neutronen und Protonen im Atomkern kann nicht berechnet werden, weswegen der Kernspin eines Atoms nicht vorhergesagt werden kann. Sein Wert kann jedoch eingeschränkt werden, da bei einer gleichen Anzahl an Neutronen und Protonen nur ganzzahlige Kernspins (z.B. 0, 1, 2, 3, ...) entstehen können bzw. bei einer unterschiedlichen Anzahl an Protonen und Neutronen nur halbzahlige Kernspins (z.B. $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{2}$, $\frac{5}{2}$, ...). Dies führt dazu, dass Isotope, die die gleiche Anzahl an Protonen im Kern haben, jedoch eine unterschiedliche Anzahl an Neutronen, einen abweichenden Kernspin besitzen. Die Bestimmung des Kernspins eines Isotops kann indirekt über die Wechselwirkung des Atomkerns mit anderen Drehimpulsen erfolgen. Ein Beispiel ist die Wechselwirkung des Kernspins mit der Rotation des Moleküls, wobei deutlich wird, dass das physikalische Modell eines Eigendrehimpulses für den Kernspin nicht ganz unrealistisch ist. Über die aus der Wechselwirkung entstehende Hyperfeinstruktur im Rotationsspektrum, kann auf den Wert des Kernspins zurückgeschlossen werden.

Ein Kern mit einem Spin von I besitzt $(2I + 1)$ Zustände, die durch die magnetische Quantenzahl m beschrieben werden. Dabei kann m die Werte $I, I-1, \dots, -I$ annehmen. Die Zustände sind dabei entartet, d.h. sie besitzen die gleiche Energie. Bei Anlegung eines äußeren Magnetfeldes kommt es aufgrund der unterschiedlichen Orientierung der verschiedenen Zustände im Raum in Abhängigkeit des äußeren Magnetfeldes zur Entartung der Energieniveaus. Daraus resultiert eine Aufspaltung der Energieniveaus in die $(2I + 1)$ Zustände. Diese Aufspaltung der Energieniveaus wird als Zeeman-Effekt bezeichnet. In Abbildung 12 ist das Beispiel des Zeeman-Effekts für einen $I = \frac{1}{2}$ Kern zu sehen. Durch die Aufspaltung eines $I = \frac{1}{2}$ Kerns ergeben sich die zwei mögliche Spinzustände $m = +\frac{1}{2}$ (α -Spin, Kernspin parallel zum äußeren Magnetfeld) bzw. $m = -\frac{1}{2}$ (β -Spin, Kernspin antiparallel zum äußeren Magnetfeld). Der Kernspin präzediert dabei um die Magnetfeldachse (Z). Durch die Quantelung sind nur diese zwei Spinzustände möglich und keine Zwischenzustände. Das Vorzeichen des

gyromagnetischen Verhältnisses (γ), eine Stoffkonstante, die beschreibt, wie gut der Kern mit elektromagnetischer Strahlung wechselwirken kann, gibt dabei an, ob die parallele (positiver Wert) oder die antiparallele (negativer Wert) Orientierung zum äußeren Magnetfeld zu einem energetisch niedrigeren Zustand führt. Da die beiden Spinzustände eine unterschiedliche Energie besitzen, führt dies zu einem Besetzungsunterschied nach der Boltzmann-Verteilung. Dadurch werden die energieärmeren Zustände stärker besetzt als die energiereicheren. Die Besetzungsunterschiede zwischen dem α - und β -Spin sind jedoch relativ klein, so dass nur ungefähr jeder 10000 Kern einen Unterschied in der Besetzung zeigt, wobei das Besetzungsverhältnis von der Temperatur und dem Magnetfeld abhängt. Auf diesem kleinen Unterschied in dem Besetzungsverhältnis beruht nun die NMR-Spektroskopie.

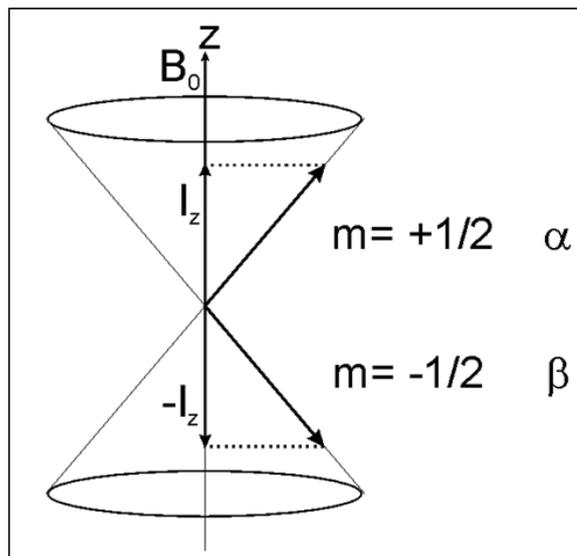


Abbildung 12: Zeeman-Effekt für einen $I = \frac{1}{2}$ Kern

Aufspaltung der Energieniveaus eines $I = \frac{1}{2}$ Kern (z.B. ^1H) bei Anlegung eines äußeren Magnetfelds in die beiden Spinzustände α ($m = +\frac{1}{2}$) und β ($m = -\frac{1}{2}$). Der Energieunterschied zwischen den Spinzuständen hängt von der Stärke des äußeren Magnetfelds ab.

Die Energiedifferenz zwischen den verschiedenen Spinzuständen hängt vom äußeren Magnetfeld ab. Je stärker das Magnetfeld ist, desto größer ist auch der Energieunterschied zwischen den Spinzuständen. Daher ergibt sich für die Energiedifferenz zwischen dem α - und β -Spin eines $I = \frac{1}{2}$ Atomkerns folgende Gleichung:

$$\Delta E_m = -m \cdot \hbar \cdot \gamma \cdot B_0$$

ΔE_m	= Energiedifferenz	[J]
m	= magnetische Kernquantenzahl	
\hbar	= Plancksche Wirkungsquantum / 2π	[J s]
γ	= gyromagnetisches Verhältnis	[s ⁻¹ T ⁻¹]
B_0	= äußeres Magnetfeld	[T]

Wird diese Energiedifferenz durch die Einstrahlung von elektromagnetischer Strahlung ($\Delta E = h \cdot \nu_0$) erreicht, kommt es zur Resonanz und dadurch zum Übergang eines Atomkerns in den angeregten Spinzustand. Dabei findet die Wechselwirkung des Kerns im Gegensatz zu den meisten Spektroskopiearten nicht mit dem elektrischen sondern mit dem magnetischen Anteil der elektromagnetischen Welle statt. Isotope mit einem Kernspin von 0 zeigen keine Aufspaltung im Magnetfeld und können damit auch nicht mit der elektromagnetischen Strahlung wechselwirken. In der Bio-NMR werden meist nur Kerne mit einem Kernspin von $\frac{1}{2}$ verwendet, wie ^1H , ^{13}C , ^{15}N oder ^{31}P , da Kerne mit einem Kernspin größer als $\frac{1}{2}$ komplexere Spektren ergeben, die schwieriger zu interpretieren sind. So besitzen diese Kerne z.B. keine sphärische Form des Atomkerns mehr, sondern die Form eines Ellipsoids. Die Atomkerne besitzen dadurch zusätzlich zum magnetischen Dipolmoment ein elektrisches Quadrupolmoment. Dadurch werden Prozesse verursacht, die zu einer Abschwächung und gleichzeitiger Unschärfe des Messsignals führen.

Durch den Besetzungsunterschied der α - und β -Spins lässt sich beim Anlegen eines äußeren magnetischen Feldes eine zusätzliche schwache Magnetisierung in Feldrichtung (z) detektieren. Dabei präzediert der magnetische Moment mit der Larmor-Frequenz ($\omega_0 = -\gamma \cdot B_0$) in Richtung des statischen Magnetfeldes. Mit diesem magnetischen Moment kann nun NMR-Spektroskopie betrieben werden. Dazu wird bei dieser Spektroskopiemethode jedoch nicht jede einzelne Frequenz separat eingestrahlt, sondern es werden Pulse verwendet, die alle Frequenzen enthalten.

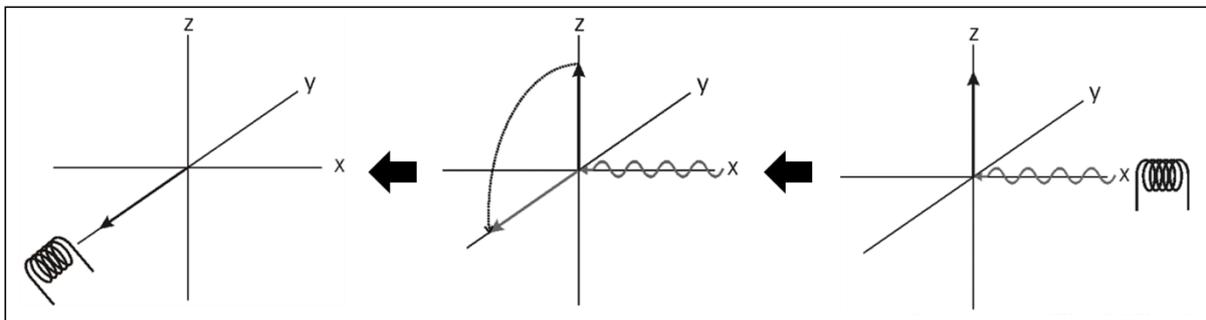


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer NMR-Messung.

Ein Hochfrequenzpuls (oszillierender grauer Pfeil) wird von einer Sendespule in x-Richtung ausgesendet (rechtes Bild) und führt zur Drehung des Magnetisierungsvektors (schwarzer Pfeil) des Spinsystems in die xy-Ebene (mittleres Bild). Dort wird die Quermagnetisierung (schwarzer Pfeil) durch eine Empfangsspule (linkes Bild) detektiert.

Bei einem NMR-Experiment sendet eine Sendespule einen Hochfrequenzpuls (oszillierender grauer Pfeil) in x-Richtung aus (siehe Abbildung 13). Entspricht nun eine der Frequenzen im eingestrahlten Puls der Larmor-Frequenz des Systems, kommt es zu einer Resonanz und dadurch zu einer Anregung des NMR-Übergangs. Dies führt zu einer Drehung des Magnetisierungsvektors (schwarzer Pfeil) um die x-Achse in die xy-Ebene. Die Stärke der Drehung hängt dabei von der Intensität und der Länge des Hochfrequenzpulses ab. Je länger und stärker der Puls ist, umso stärker ist auch die Drehung. Die Stärke der Drehung der Quermagnetisierung aus der z-Achse in die xy-Ebene wird als Impulswinkel angegeben. In der Bio-NMR werden meist nur Pulse von 90° , aus denen eine Drehung der Quermagnetisierung auf die xy-Ebene resultiert, sowie 180° Pulse, die eine Drehung der Quermagnetisierung in die -z-Richtung bewirken, verwendet.

Durch das Umklappen der Quermagnetisierung bei einem 90° Puls liegt keine Magnetisierung entlang der z-Achse mehr vor. Somit existiert auch kein Besetzungsunterschied zwischen den beiden Spinzuständen mehr. Nach der Anregung durch die elektromagnetische Lichtwelle oszilliert die Magnetisierung in der xy-Ebene und gleichzeitig versucht das System den Gleichgewichtszustand wieder zu erreichen (Relaxation), wodurch sich die Quermagnetisierung langsam aus der xy-Ebene wieder zurück in die z-Ebene dreht. Dieser Vorgang wird von der Empfängerspule an der -y-Achse aufgezeichnet. Das Signal wird als „Free Induction Decay“ (FID) bezeichnet und fällt im Laufe der Messung exponentiell ab. Dieses FID Signal beinhaltet alle gemessenen Frequenzen des Spinsystems. Durch eine Fouriertransformation kann nun dieses Signal in seine einzelnen Frequenzen zerlegt werden (siehe Abbildung 14), die den Larmor-Frequenzen der einzelnen Spinsysteme entsprechen.

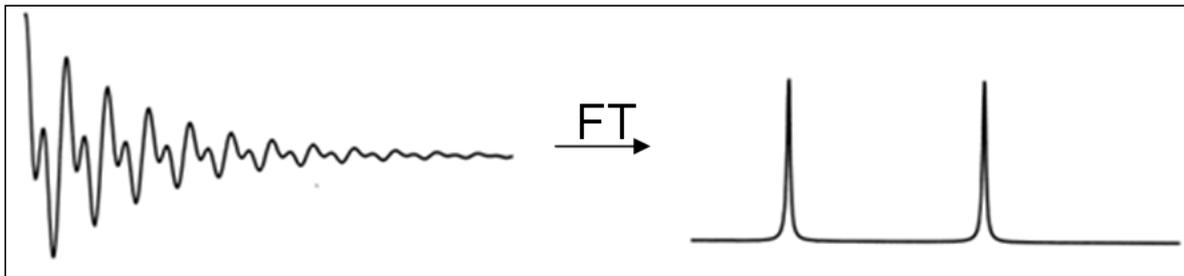


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Fouriertransformation

Eine Fouriertransformation konvertiert eine Zeitfunktion (z.B. FID Signal; links) in eine Frequenzfunktion (rechts).

In der NMR-Spektroskopie werden oft Experimente durchgeführt, bei denen neben der Zeitdomäne des FID Signals noch eine oder mehrere weitere Zeitdomänen berücksichtigt werden müssen. Je nach Anzahl der Zeitdomänen, werden die Experimente z.B. als 2D (zwei Zeitdomänen) Experiment bezeichnet. In Abbildung 15 ist ein Beispiel für ein 2D Experiment gezeigt. Das Experiment besteht aus zwei Pulsen, zwischen denen eine Wartezeit (t_1) liegt. Diese Pulssequenz wird mehrere Male angewandt, wobei die Wartezeit t_1 zwischen jedem Experiment variiert wird. Dadurch ergibt sich für jedes einzelne Experiment ein unterschiedliches FID Signal. Die FID Signale werden anschließend kombiniert, was in Abbildung 16 gezeigt ist, und prozessiert.

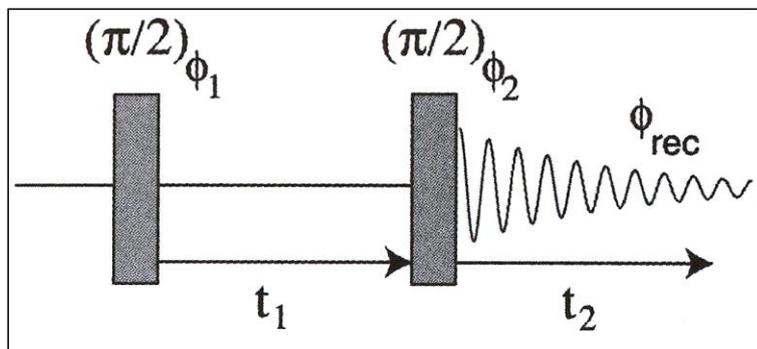


Abbildung 15: Beispiel für ein 2D Puls Experiment

Schematische Darstellung eines 2D Puls experimentes mit zwei Zeitdomänen. Die Zeitdomäne t_1 entspricht der Wartezeit zwischen den zwei Pulsen, die zwischen den verschiedenen Messungen variiert wird. Die Zeitdomäne t_2 entspricht dem FID Signal, das von der Empfangsspule gemessen wird. Die Hochfrequenzpulse sind als graue Balken dargestellt. Grafik entnommen aus [53].

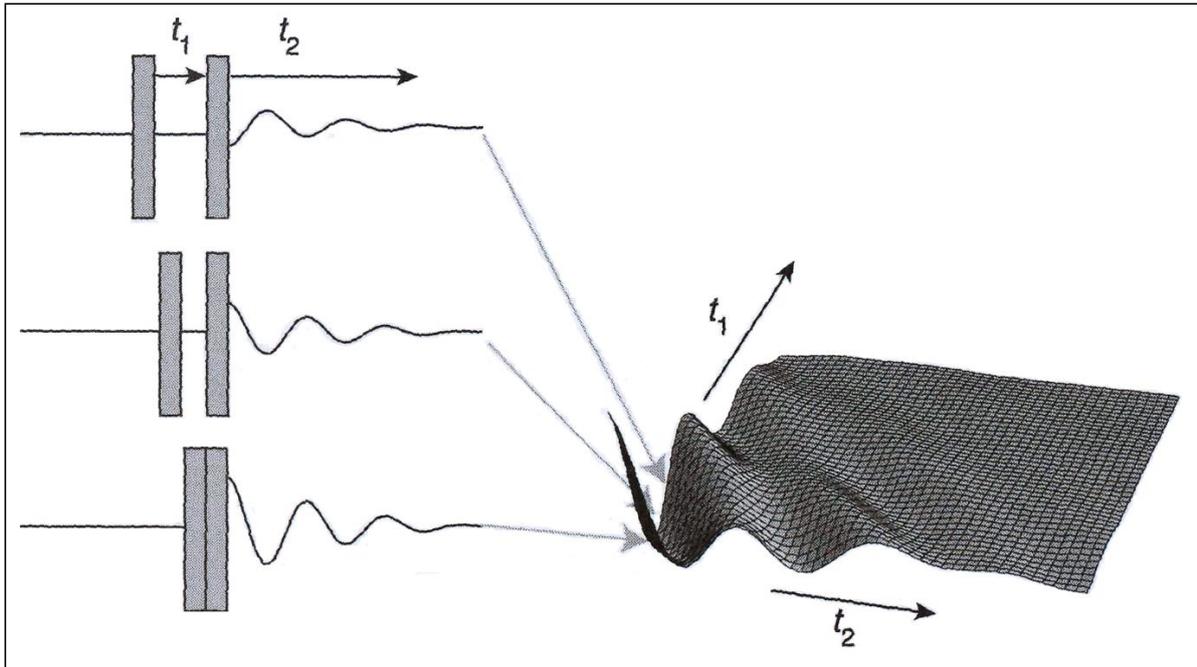


Abbildung 16: Kombination mehrerer einzelner NMR Experimente zu einem 2D Spektrum.

Kombination mehrerer 1D Spektren zu einem 2 D Spektrum. Die Hochfrequenzpulse sind als graue Balken dargestellt. Zwischen den Experimenten wurde die Wartezeit (t_1) variiert, was durch den Abstand der beiden Pulse angedeutet wird. Grafik entnommen aus [53].

Die gemessene Larmor-Frequenz des Atomkerns wird, wie oben angegeben, durch das einwirkende Magnetfeld beeinflusst. Zusätzlich zum statischen Magnetfeld ergibt sich durch das Magnetfeld der umgebenden Elektronen bzw. anderen Atomkernen ein lokal leicht verändertes, effektives Magnetfeld. Dadurch wird die Larmor-Frequenz des Atomkerns in charakteristischer Weise von der Umgebung beeinflusst. Obwohl dieser Einfluss sehr gering ist, bewirkt er dennoch, dass ein messbarer Unterschied zwischen den Atomkernen zu detektieren ist, wenn sie sich in einer unterschiedlichen Umgebung befinden. Um verschiedene Messsysteme vergleichen zu können, muss das Signal für das jeweilige System normiert werden. Dazu wird eine Referenzsubstanz [meist Trimethylsilan, in Wasser Trimethylsilylpropionsäure (TSP)] gemessen und die dabei gemessene Larmor-Frequenz mit der der Probe in Beziehung gesetzt. Die resultierende Größe wird als chemische Verschiebung δ bezeichnet und in ppm („parts per million“) angegeben.

$$\delta = \frac{\omega_{\text{Signal}} - \omega_{\text{Referenz}}}{\omega_{\text{Referenz}}} * 10^6 \text{ ppm}$$

Anhand der chemischen Verschiebung ist es nun möglich, eine Aussage über die chemische Umgebung eines Kerns zu machen. Dabei zeigen bestimmte Atome bzw. Atomgruppen charakteristische Verschiebungen, die in Tabellenwerken erfasst sind.

Für die Relaxation stehen dem Spinsystem mehrere Möglichkeiten zu Verfügung. Es wird dabei zwischen der longitudinalen Relaxationszeit (Spin-Gitter Relaxation), die als T_1 bezeichnet wird und der transversalen Relaxationszeit (Spin-Spin Relaxation), die als T_2 abgekürzt wird, unterschieden.

Bei der longitudinalen Relaxationszeit kommt es zu einer Relaxation in Richtung des äußeren Feldes, durch die Abgabe von Energie an die Umgebung. Dadurch findet eine Rückkehr des Spinsystems in den Gleichgewichtszustand (Boltzmannverteilung) statt. Bei der transversalen Relaxationszeit kommt es dagegen zu einem Verlust der Kohärenz der Spins. Durch den Puls stehen alle Spins in einer Phasenbeziehung zueinander. Mit der Zeit kommt es jedoch zu einer Wechselwirkung von Atomkernen im angeregten Zustand und Atomkernen im Grundzustand und es findet ein Austausch der Spinzustände statt. Da dies ein spontaner Prozess ist, verläuft er nicht in Phase. Dadurch verlieren die Kernspins, die ursprünglich phasenkohärent präzidierten, ihre Phasenbeziehung und Fächern in der xy -Ebene auf. Somit handelt es sich bei der transversalen Relaxationszeit um einen Entropieprozess, bei dem das Besetzungsverhältnis zwischen den Spinzuständen, im Gegensatz zur longitudinalen Relaxationszeit, unverändert bleibt.

Damit eine Relaxation der Atomspins überhaupt stattfinden kann, müssen sich in der unmittelbaren Umgebung der Atome fluktuierende magnetische Felder mit der entsprechenden Resonanzfrequenz und ausreichender Intensität befinden. Diese magnetischen Felder werden z.B. durch magnetische Dipole verursacht, die von anderen Atomkernen in der molekularen Umgebung erzeugt werden. Durch die molekulare Bewegung der Atome resultiert daraus eine Fluktuation des magnetischen Feldes. Dabei unterscheidet man zwischen intramolekularen und intermolekularen benachbarten Kernen. Bei intramolekularen Nachbarn ändert sich ständig die relative Orientierung des Kerns, wohingegen sich bei intermolekularen Nachbarn die relative Orientierung und der Abstand der Atome zueinander ändern. Da diese Mechanismen einen Einfluss auf die kernmagnetischen Relaxationszeiten haben, können durch die Messung der Relaxationszeiten Informationen über die Molekülbewegung gewonnen werden.

In der NMR-Spektroskopie wird zwischen zwei wesentlichen Mechanismen unterschieden, durch die unterschiedliche Strukturinformationen über Biomoleküle gewonnen werden können. Zum einen ist es die skalare Kopplung, die z.B. bei den TOCSY Experimenten von Bedeutung ist und zum anderen die Dipol-Dipol Kopplung, die z.B. bei den NOESY Experimenten ausschlaggebend ist. Die skalare Kopplung ist eine Spin-Spin Wechselwirkung, die über die vom Atomkern gebundenen Elektronen vermittelt wird. Über die Elektronen werden Magnetisierungen zwischen kovalent gebundenen Kernen ausgetauscht. Dies führt zu einer charakteristischen Aufspaltung im prozessierten NMR-Spektrum. Durch die skalare Kopplung ist es möglich, gezielt Magnetisierungen auf einzelne Atome zu übertragen. Die Reichweite der Übertragung beträgt dabei ungefähr drei Elektronenbindungen. Deswegen können durch diese Kopplung kovalent gebundene Nachbaratome untersucht werden. Da diese Kopplung über die Bindungselektronen erfolgt, wird sie auch als indirekte Kopplung bezeichnet. Bei der Dipol-Dipol-Kopplung findet die magnetische Dipol-Dipol Wechselwirkung der Atomkerne über den Raum, d.h. durch das Magnetfeld am Kernort, statt. Deswegen muss keine kovalente Bindung zwischen den Atomen existieren. Dadurch kann mit dieser direkten Kopplung Informationen über die räumliche Nähe der Atomkerne gewonnen werden und demzufolge auf die räumliche Struktur des Moleküls geschlossen werden.

1.3 Zielsetzung

Das Glykoprotein E^{rns} von Pestiviren ist ein multifunktionales Protein, das für die Vermehrung und die Virulenz der Erreger von entscheidender Bedeutung ist. Wesentliche Eigenschaften des Proteins wie die intrazelluläre Retention, die proteolytische Prozessierung und die partielle Sekretion sind offensichtlich mit seinem ungewöhnlichen Membrananker verbunden. Um die Eigenschaften und Funktion dieses Proteins besser verstehen zu können, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Lipidbindungsfähigkeit und die räumliche Struktur dieses Bereiches näher aufgeklärt werden.

2.0 Material

2.1 Geräte

AB Hitachi 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABI-PRISM 377 DNA-Sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Analysenwaage Satorius Analytic	Analytic Satorius, Göttingen
Blotkammer Mini Trans Blot	Biorad, München
Eismaschine AF 10	Scotsman Ice Systems, USA
Entwicklungsmaschine Konica QX-70	Konica, Hohenbrunn
Filmkassetten	Agfa-Gevaert, Köln
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC	Vacuubrand, Wertheim
FPLC-System	
LKB GradiFrac	Pharmacia Biotech, Freiburg
LKB Control Unit UV-1	Pharmacia Biotech, Freiburg
LKB Optical Unit UV-1	Pharmacia Biotech, Freiburg
LKB Pump P-1	Pharmacia Biotech, Freiburg
LKB REC102	Pharmacia Biotech, Freiburg
Geldokumentationssystem Quantum	peqlab, Erlangen
Gelelektrophoresekammer horizontal	Feinmechanik, FLI-Tübingen
Gilson-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Glasgefäße	Schott, Mainz
Gradientenmischer für Polyacrylamidgele	Feinmechanik, FLI Tübingen
Gradifrag TM Fraktionssammler	GE Healthcare, München
Heizblock BIOBLOCK SCIENTIFIC CODE 92675	Thermolyne Corp, U
Heiz-Magnetrührer IKAMAG RET-GS	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau
HPLC-System	
Fraktionssammler Foxy Jr.	ISCO
BT9520 IN UV/Vis Detektor	Eppendorf, Hamburg
BT9200 Titan HPLC Pumpe	Eppendorf, Hamburg
Schreiber LKB Rec 101	Pharmacia Biotech, Freiburg
DEGASYS DG 1310	
Inkubator B5050	Heraeus, Hanau
Kühlfalle	Bachofer, Reutlingen
Kühlzentrifuge 5402, 5810R	Eppendorf, Hamburg

Lichtschirm	Rex Meßinstrumentebau, Erlangen
Lyophilisator ALPHA I-6	Christ, Osterode am Harz
Lyophilisator Steuergerät HED10	Christ, Osterode am Harz
Microcomputer Electrophorese power supply	Renner, Darmstadt
Mikrowellengerät HMG 640B	Bosch, Gerlingen
Mini PROTEAN Tetra Cell System	Biorad, München
Minifuge 2, RF	Heraeus, Hanau
PCR-Gerät GeneAmp 9600	Perkin Elmer, USA
PCR-Gerät Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
pH-Meter Calimatic	Knick, Berlin
Pipetboy acu	Tecnomara, Fernwald
Power Supply PS500XT	Hoefer, USA
Power-Supply PS500XT DC	Hoefer, USA
Rotlichtlampe	Kindermann
Rotoren JA 10, 17	Beckman Coulter, München
Rotoren TLA 45, 55	Beckman Coulter, München
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, UK
Schüttelinkubator G25	New Brunswick Scientific, USA
Schütteltisch The Belly Dancer	Fröbel Labortechnik, Lindau
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau
Schweißgerät	Bachofer, Reutlingen
Schwenktisch/ Wippschüttler Rockomat	Tecnomara, Fernwald
Sonifier B-12	Branson Sonic Power Company, USA
Sonifier Cell Disruptor B-15	Branson Sonic Power Company, USA
SpeedVac Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Spektralphotometer Ultraspec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilbank FlowSafe [®] B-[MaxPro] ² -130	Berner International, Elmshorn
Sterilbank Safe2020	Thermo Scientific, Langenselbold
Thermodrucker P93D	Mitsubishi electric, Ratingen
Thermomix 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermostatic Circulator 2219 Multitemp II	LKB Bromma, Schweden
Transilluminator (302 nm)	Vetter, Wiesloch
Triple Timer	Conrad, Hirschau
Ultrazentrifuge TL 100	Beckman Coulter, München
Ultrazentrifuge TL 100	Beckmann, München
Vakuumpumpe	Edwards, England

Vortex Vibrofix VF1	Bachofer, Reutlingen
Waage Mettler PM2000	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad GFL	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserbad HAAKE D8	Bachofer, Reutlingen
Wasserbad Julabo U3	Bachofer, Reutlingen
Wasserbadschüttler Gyrotory G76	New Brunswick Scientific, USA
Zentrifuge 5415C,D und 5424	Eppendorf, Hamburg

2.2 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC)	Avanti Polar Lipids, USA
1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine-1,1,2,2-d4 N,N,N trimethyl-d9 (DHPC)	Avanti Polar Lipids, USA
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylacid (DMPA)	Avanti Polar Lipids, USA
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC)	Avanti Polar Lipids, USA
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine-1,1,2,2-d4 N,N,N trimethyl-d9 (DMPC)	Avanti Polar Lipids, USA
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin (DMPE)	Avanti Polar Lipids, USA
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (DMPG)	Avanti Polar Lipids, USA
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylserin (DMPS)	Avanti Polar Lipids, USA
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Roche Applied Science, Mannheim
1,4-Piperazindiethansulfonsäure, PIPES	USB, Cleveland
¹³ C6 D-Glukose	Cambridge Isotope Laboratories, Inc, USA
¹⁵ N Ammoniumchlorid (¹⁵ NH ₄ Cl)	ISOTECH TM , Sigma-Aldrich, USA
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetonitril (CH ₃ CN)	Merck, Darmstadt
Acridinorange	Serva, Heidelberg
Acrylamid 40 % (29:1)	AppliChem, Darmstadt
Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe

Aluminiumsulfat (14-18)Hydrat	Fluka, Buchs
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, München
Ammoniumpersulphat (APS)	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Becton ,Dickinson, USA
Bacto-Hefeextrakt	Becton ,Dickinson, USA
Bacto-Trypton	Becton ,Dickinson, USA
Bovine Serum Albumin Fraktion V (BSA)	New England Biolabs, Schwalbach
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid-2-hydrat (CaCl ₂ (2 H ₂ O))	Merck, Darmstadt
Complete Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	DABCO Sigma, München
Desoxy-Nukleotidtriphosphat (dNTP)	Amersham Biosciences, Freiburg
D-Glukose	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dodecylphosphocholine (DPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisensulfat-7-hydrat (FeSO ₄ (7 H ₂ O))	Sigma, München
Essigsäure	Hoechst, Dortmund
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
GelRed ^{IM}	Biotrend, Köln
Glycerin (87 %)	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl)	Fluka, Buchs
HiDi ^{IM}	Applied Biosystems, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG)	Roche Diagnostics GmbH
Kaliumacetat	Riedel-de-Haën, Seeze
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Fluka, Buchs
Luminol	Fluka, Buchs
L-α-Phosphatidylinositol (aus Soja)	Avanti Polar Lipids, USA
Magermilchpulver	Neuform, Herrenberg
Magnesiumchlorid, MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt

Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)(Pellets)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Orange G	Fluka, Buchs
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Salzsäure (HCl)	Riedel-de-Haën, Seeze
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
Sphingomyelin (aus Hühnerei)	Avanti Polar Lipids, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, München
Thiamin	Sigma, München
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, München
Trifluorethanol	Sigma, München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Invitrogen, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid-7-hydrat (ZnCl ₂ (7 H ₂ O))	Fluka, Buchs

2.3 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser aus einer Millipore Anlage angesetzt.

Blockpuffer	5 % (w/v)	Magermilchpulver in PBS-T
CaCl ₂ -Lösung	10 mM	Pipes pH 7,1
	60 mM	CaCl ₂
	15 %	Glycerin
Coomassie	5 % (w/v)	Aluminiumsulfat (14-18) Hydrat
	10 % (v/v)	Ethanol (96 %)
	2 % (v/v)	ortho-Phosphorsäure
	0,02 % (w/v)	CBB-G250

Coomassie Entfärber	10 % (v/v)	Ethanol (96 %)
	2 % (v/v)	ortho-Phosphorsäure
DNaseI -Lösung	10 mg/l	DNaseI in TE
dNTP-Mix	10 mM	dATP
	10 mM	dCTP
	10 mM	dGTP
	10 mM	dTTP
Elul	50 mM	NaH ₂ PO ₄ pH 8,0
	0,3 M	NaCl
	300 mM	Imidazol
FR-Puffer	0,125 % (w/v)	Orange G
	15 % (w/v)	Ficoll 400
	5 x	TAE
GelRed-Lösung	0,03% (v/v)	GelRed
	0,1 M	NaCl
Jagow-Anodenpuffer (10x)	2 M	Tris pH 8,9
Jagow-Gelpuffer (3X)	3 M	Tris pH 8,45
	0,3% (w/v)	SDS
Jagow-Kathodenpuffer (10x)	1 M	Tris pH 8,25
	1 M	Tricin
	1 % (w/v)	SDS
Lämmli-Puffer (10x)	0,25 M	Tris pH 8,3
	1,925 M	Glycin
LB+++ -Medium	10 mM	KCl
	20 mM	MgSO ₄
		In LB-Medium
LB-Agar	15 g/l	Bacto™ Agar in LB-Medium
LB-Kana-Medium	100 mg/ml	Kanamycin in LB-Medium
LB-Medium	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Bacto-Yeast-Extrakt
	5 g	NaCl
		auf 1 l Wasser
Lipidassaypuffer	10 mM	KH ₂ PO ₄ pH 7,4
	100 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl

Lys	50 mM	NaH ₂ PO ₄ pH 8,0
	0,3 M	NaCl
	30 mM	Imidazol
Lysispuffer+(1)	1 Tablette	Complete Inhibitor
	1 Spatelspitze	Lysozym
	10 µl	DNase I
		in 12,5 ml Puffer Lys
Lysispuffer+(2)	6 %	TrintonX-100 in Puffer Lys
M9 Salze	60 g/l	Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
	30 g/l	KH ₂ HPO ₄
	5 g/l	NaCl
Minimalmedium	100 ml	M9 Salze
	25 ml	20 % ¹³ C D-Glukose
	5 ml	Basal Medium Eagle Vitamin Solution
	10 ml	100 g/l ¹⁵ NH ₄ Cl
	2 ml	1 M MgSO ₄
	1 ml	15 mg/ml FeSO ₄ in 1 M HCl
	0,5 ml	15 mg/ml ZnCl ₂
	0,2 ml	5 mg/ml Thiamin
	0,1 ml	0,5 M CaCl ₂
	500 µl	10 g/l Kanamycin
		auf 1 l Wasser (pH 7,3)
NMR-Messpuffer:	50 mM	KH ₂ PO ₄ pH 6,8
	50 mM	NaCl
PBS	0,5 mM	MgCl ₂
	0,9 mM	CaCl ₂
	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	7,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	PBS-T	0,01 % (v/v)
Ponceau-S-Lösung	2,5 g/l	Ponceau S
	40 % (v/v)	Methanol
	1,5 % (v/v)	Essigsäure

RNase A -Lösung	10 mg/l	RNase A in TE
SDS-Probenpuffer	62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
	10 % (w/v)	SDS
	30 % (v/v)	Glycerin (87 %)
	15 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
	0,012 % (w/v)	Bromphenolblau
Solution I	50 mM	Tris pH 8,0
	10 mM	EDTA
	50 mM	Glucose
Solution II	0,2 M	NaOH
	1 % (v/v)	Triton X-100
Solution III	3 M	NaAcetat pH 4,8
System A	0,055 % (v/v)	Trifluoracetat
System B	0,055 % (v/v)	Trifluoracetat
	80 % (v/v)	Acetonitril
TAE	40 mM	Tris pH 7,8
	5 mM	Natriumacetat
	1 mM	EDTA
TE(10x)	100 mM	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
TEV-Spaltpuffer (20x)	1 M	Tris pH 8,0
	10 mM	EDTA
	20 mM	DTT
Transferpuffer	18 % (v/v)	Methanol in Lämmli-puffer
Wash $\frac{1}{2}$	50 mM	NaH ₂ PO ₄ pH 8,0
	0,3 M	NaCl
	50 mM	Imidazol
WashI	50 mM	NaH ₂ PO ₄ pH 8,0
	0,3 M	NaCl
	100 mM	Imidazol

2.4 Biologische Materialien

2.4.1 Enzyme, Proteine, Größenmarker

1kb Plus DNA Marker	Invitrogen, Karlsruhe
AcTEV TM -Protease	Invitrogen, USA
Alkalische Phosphatase (CIAP)	Roche, Mannheim
DNase I	New England Biolabs, Schwalbach
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Schwalbach
Lysozyme (chicken egg white)	Serva, Heidelberg
PageRuler TM prestained protein standard	Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-Polymerase	Promega ,Mannheim
Pfx-Polymerase (Accuprime)	Invitrogen, USA
Polymerase I	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
	Fermentas, St. Leon-Rot
	Stratagen, USA
RNase A	Serva, Heidelberg
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach

2.4.2 Bakterienstämme

Für die Amplifikation der Plasmide wurde der *E.coli* Bakterienstamm Top 10 F' und für die Proteinexpression wurde der Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS verwendet.

Top 10 F': mcrA, D(mcrBC-hsdRMS-mrr), end A1, recA1, relA1, gyrA96, F80lacZDM15, deoR, nupG, araD139, F(lacIq, Tn10(Tetr)), galU, DlacX74, galK, D(ara-leu)7697

BL21(DE3)pLysS': F', ompT, hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal, dcm, (DE3)pLysS (Cam^R)

2.4.3 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für *Western Blot* Analysen (siehe 3.2.3) in der angegebenen Verdünnung eingesetzt.

Bezeichnung	Zielsequenz	Organismus	Verdünnung	Herkunft
Polyklonale Antikörper				
c-Term Mix	E ^{ms}	Kaninchen	1:500	eigene Herstellung
Baculo E0	C-Terminus E ^{ms}	Kaninchen	1:500	eigene Herstellung
K81	C-Terminus E ^{ms}	Kaninchen	1:500	eigene Herstellung
monoklonale Antikörper				
Tetra His	Tetra Histidin	Maus	1:200	Qiagen, USA
Penta His	Penta Histidin	Maus	1:200	Qiagen, USA
Ab1187-HRP	Hexa-Histidin	Kaninchen	1:1000	Abcam, GB
sekundäre Antikörper				
Anti-Kaninchen-PO	Kaninchen-IgG	Ziege	1:20000	Dianova, Hamburg
Anti-Mouse-PO	Maus-IgG	Ziege	1:10000	Dianova, Hamburg

2.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide für die Sequenzierung und die Plasmidsynthese wurden von Metabion (München) bezogen und vom Hersteller frei von Schutzgruppen, voll entsalzt und lyophilisiert geliefert. Standardmäßig wurde eine Stammlösung der Oligonukleotide mit einer Konzentration von 1 nmol/μl hergestellt. Daraus wurden anschließend die Arbeitslösungen gebildet. Für die Sequenzierung wurde die Stammlösung 1:200 (5 pmol/μl) und für die Klonierung 1:100 (10 pmol/μl) verdünnt.

2.5.1 für die Sequenzierung

Primer	Sequenz	Position	Orientierung
da28	GTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAG	Ribosom Bindungsstelle	+ strang
da35	TTAATACGACTCACTATAGGG	T7 Promotor	+ strang
da62	GGATCGAGATCTCGATCCCG	Sequenz vor T7 Promotor	+ strang
PCL2	GGGAAAGCCGGCGAACGTGGC	3' PCI	- strang

2.5.2 für die Klonierung

Primer	Sequenz
da84	GCGCATTATCTGGCGGATGGCATGACC
da85	GGTCATGCCATCCGCCAGATAATGCGC
da86	GCGCATTATCTGCTGGATGGCATGACC
da87	GGTCATGCCATCCAGCAGATAATGCGC
da88	CATGACCAACAGCGCGGAAAGCGCGCGTC
da89	GACGCGCGCTTTCCGCGCTGTTGGTCATG
da90	CTGGGCCGTCAGGCGGGCATTCTGGGC
da91	GCCCAGAATGCCCGCCTGACGGCCCAG
da92	CTGGGCCGTCAGATTGGCATTCTGGGC
da93	GCCCAGAATGCCAATCTGACGGCCCAG
da94	CCTGTATTTTCAGTAATAAATGGCCAAAGAGC
da95	GCTCTTTGGCCATTTATTACTGAAAATACAGG
da98	CCTGTATTTTCAGGGCCGTCAGGGGACCGC
da99	GCGGTCCCCTGACGGCCCTGAAAATACAGG
da100	AGCAAAACCTGGTTTGGCTAATAACTCGAGCACCACCACC
da101	GGTGGTGGTGCTCGAGTTATTAGCCAAACCAGGTTTTGCT
da102	GAAAACAAAAGCAAAACCTAATAACTCGAGCACCACCACC
da103	GGTGGTGGTGCTCGAGTTATTAGGTTTTGCTTTTGTTTTTC
da104	CCTGTATTTTCAGGGCACTAGTGTGATTCAGGA
da105	TCCTGAATCACACTAGTGCCCTGAAAATACAGG
da106	GCCTGGAAAGCGCGCTTAATAAACC GCGAAACTGAC
da107	GTCAGTTTCGCGGTTTATTAACGCGCGCTTTCCAGGC
da108	CTGGGCATTCTGGGCGCGGCGCTGGAAAAC
da109	GTTTTCCAGCGCCGCGCCAGAATGCCAG
da110	CTGGAAAACGCGAGCGCGACCTGGTTTGGCGC
da111	GCGCCAAACCAGGTCGCGCTCGCGTTTTCCAG
da112	CAGCACTGTATCTGGCAGATGGTATGACC
da113	GGTCATACCATCTGCCAGATACAGTGCTG
da114	GTATGACCAATACCGCAGAAAATGCACGTC
da115	GACGTGCATTTTCTGCGGTATTGGTCATAC
da116	GGCTGGGTCGTCAGGCAAGCACCGCAGGT
da117	ACCTGCGGTGCTTGCCTGACGACCCAGCC
da127	CATGGAAAAAAAAGGCTTTCTGAAACGTCTGTTTGGCGGCTAAC
da128	TCGAGTTAGCCGCCAAACAGACGTTTCAGAAAGCCTTTTTTTTC
da129f1	CATGGGCCTGGTGGCGTTTGGCGCTGACCCTGAACCTGTA
da129f2	TCAGAAATATGAAAACTGACCGTGCTGCGTTAATAAC
da129r1	CAGCGCAAACGCCACCAGGCC

da129r2 GGTCAGTTTTTTCATATTTCTGATACAGGTTTCAGGGT
da129r3 TCGAGTTATTAACGCAGCAC
da132 GCATTCTGGGCAAAAAATAATAACTCGAGCACCAC
da133 GTGGTGCTCGAGTTATTATTTTTTTGCCAGAATGC
da138 GGATACCGCGCATGCGTATCTGGTGGATGG
da139 CCATCCACCAGATACGCATGCGCGGTATCC
da140 CCTGGAAAGCGCGGCGCGTCAGGGGACCGC
da141 GCGGTCCCCTGACGCGCCGCGCTTTCCAGG
da142 CTGACAACTTGGGCGCTGGGCCGTCAGC
da143 GCTGACGGCCCAGCGCCCAAGTTGTCAG
da146 CAGGATACCGCGCCGTATCTGGTGGATGG
da147 CCATCCACCAGATACGGCGCGGTATCCTG
da148 CAACAGCCTGGAAAGCCCAGCGTCAGGGGACCG
da149 CCGTCCCCTGACGCGGGCTTTCCAGGCTGTTG
da150 CGCGAAACTGACAACTCCGCTGGGCCGTCAGC
da151 GCTGACGGCCCAGCGGAGTTGTCAGTTTCGCG
da152 CAGGATACCGCGCATCCGTATCTGGTGGATGGCATG
da153 CATGCCATCCACCAGATACGGATGCGCGGTATCCTG
da154 CAGCCTGGAAAGCGCGCCGCGTCAGGGGACCGC
da155 CGCGGTCCCCTGACGCGGCGCGCTTTCCAGGCTG
da156 GCGAAACTGACAACTTGGCCGCTGGGCCGTCAGCTGGG
da157 CCCAGCTGACGGCCCAGCGGCCAAGTTGTCAGTTTCGC
da158 CTGTATTTTCAGGGCTATCTGGTGGATGGC
da159 GCCATCCACCAGATAGCCCTGAAAATACAG
da160 GAAACTGACAACTTGGTAACTCGAGCACC
da161 GGTGCTCGAGTTACCAAGTTGTCAGTTTC
da164 GGGCCGTCAGCTGCCGATTCTGGGCAAAAAAC
da165 GTTTTTTTGCCAGAATCGGCAGCTGACGGCCC
da166 GGGCCGTCAGCTGGGCCGATTCTGGGCAAAAAAC
da167 GTTTTTTTGCCAGAATCGGGCCCAGCTGACGGCCC
da170 GGCAAAAAACTGGAAGATAAAAGCAAAACCTGG
da171 CCAGGTTTTGCTTTTATCTTCCAGTTTTTTTGGC
da172 GGCAAAAAACTGGAACAGAAAAGCAAAACCTGG
da173 CCAGGTTTTGCTTTTCTGTTCCAGTTTTTTTGGC
da174 CTTGGCTGGGCCGTGAACTGGGCATTCTGGGC
da175 GCCCAGAATGCCCAGTTCACGGCCCAGCCAAG
da176 GGGCCGTCAGCTGGGCGGTGGTGGTATTCTGGGCAAAAAAC
da177 GTTTTTTTGCCAGAATACCACCACCGCCCAGCTGACGGCCC
da178 GGTGGTGGTGGTCCGGGTGGTGGTATTCTGGGCAAAAAAC
da189 GGGCAAAAAACTGGAACCGAAAAGCAAAACCTGG
da190 CCAGGTTTTGCTTTTTCGGTTCCAGTTTTTTTGGCC
da205 GAACGTCAGCTGGAAATTCTGGAAAAAAACTGGAAAAC

da206b TTCCAGAATTTCCAGCTGACGTTCCAGCCAAGTTGTC
da207 CATTCTGGGCAAAAACTGCTGAACAAAAGCAAAACCTG
da208 CAGGTTTTGCTTTTGTTCAGCAGTTTTTTGCCCAGAATG
da209 CATTCTGGGCAAAAACTGCAGAACAAAAGCAAAACCTG
da210 CAGGTTTTGCTTTTGTTCAGTTTTTTGCCCAGAATG
da211b CATTCTGGGCAAAAACTGGGCAACAAAAGCAAAACCTG
da212b CAGGTTTTGCTTTTGTTCAGTTTTTTGCCCAGAATG
da213 GTTTGGCGCGTATGCGGCGTAATAACTCGAGCACCACC
da214 GGTGGTGCTCGAGTTATTACGCCGCATACGCGCCAAAC
da215 GTTTGGCGCGTATGCGGCGAGCCCGTATTAATAACTCGAGCACCACC
da216 GGTGGTGCTCGAGTTATTAATACGGGCTCGCCGCATACGCGCCAAAC
da217 GCGGCGAGCCCGTATTGCGAAGTGTAAATAACTCGAGCACCACC
da218 GGTGGTGCTCGAGTTATTACACTTCGCAATACGGGCTCGCCGC
da221 CCCGTATTGCGAAGTGGAACGCTAATAACTCGAGCACCACC
da222 GGTGGTGCTCGAGTTATTAGCGTTCCACTTCGCAATACGGG
da223 CCCGTATTGCGAAGTGGAACGCAAATAATAACTCGAGCACCACC
da224 GGTGGTGCTCGAGTTATTATTTGCGTTCCACTTCGCAATACGGG
da225 GGCTATATTTGGTATACCAAAAAGTGTAAATAACTCGAGCACCACC
da226 GTTTTTGGTATACCAAATATAGCCAGTTTGCCTCCACTTCGC
da226-2 TTTGCGTTCCACTTCGCAATACGGGCTCGCCGCATACGCGCCAAAC
da227 CGTCAGGGGACCGCGGCGCTGACAACTTGGCTGG
da228 CCAGCCAAGTTGTCAGCGCCGCGGTCCCCTGACG
da229 CGTCAGGGGACCGCGGAAGTACAACTTGGCTGG
da230 CCAGCCAAGTTGTCAGTTCCGCGGTCCCCTGACG
da239 GACAACTTGGCTGGGCGCGCAGCTGGGCATTCTGGG
da240 CCCAGAATGCCAGCTGCGCGCCAGCCAAGTTGTC
da241 GACAACTTGGCTGGGCGAACAGCTGGGCATTCTGGG
da242 CCCAGAATGCCAGCTGTTCCGCCAGCCAAGTTGTC
da243 CTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGATGGCATGACCAACAGCC
da244 GGCTGTTGGTCATGCCATCGCCCTGAAAATACAGGTTTTTCAG
da245 CTGAAAACCTGTATTTTCAGGGCCAGGATACCGCGCATTATCTG
da246 CAGATAATGCGCGGTATCCTGGCCCTGAAAATACAGGTTTTTCAG
da247 CTGGGCAAAAACTGGAAAATAATAACTCGAGCACCACCAC
da248 GTGGTGGTGCTCGAGTTATTAGTTTTCCAGTTTTTTGCCCAG
da251 GGGCAAAAACTGGAAAACCCGAAAAGCAAAACCTGGTTTTGG
da252 CCAAACCAGGTTTTGCTTTTTCGGGTTTTCCAGTTTTTTGCC
da253 GAAAACCTGTATTTTCAGGGCAAAGAGCATGATTGCACTAGTG
da254 CACTAGTGCAATCATGCTCTTTGCCCTGAAAATACAGGTTTTTC
da255 GAAAACCTGTATTTTCAGGGCTGCCTGGAAAGCGCGCTCAGG
da256 CCTGACGCGCGCTTTCCAGGCAGCCCTGAAAATACAGGTTTTTC

2.6 Plasmide

2.6.1 Im Labor vorhandene bzw. kommerziell erworbene Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pk54	E^{rns} -Protein von BVDV Stamm CP7
pETZ2_1	pET Vektor mit 6xHis-tag, Z2-tag und TEV-Spaltstelle. Freundlicherweise überlassen von Gunter Stier [54]
pMA-T_Erns-CSFV	Synthetische Codon optimierte E^{rns} -Ankersequenz des CSFV Stamms Alfort/Tübingen (Gene Art)

2.6.2 Selbst hergestellte Plasmide

Für die bakterielle Expression des E^{rns} -Ankers wurde das Expressionsplasmid pd29G erzeugt, das aus dem Plasmid pETZ2_1 erstellt wurde. Dazu wurde das GFP aus diesem Plasmid durch eine Codon optimierte Sequenz des E^{rns} -Ankers von BVDV Stamm CP7 aus dem Plasmid pk54 ersetzt. Das Expressionsplasmid pd29G besteht somit aus einem His-tag, einem Z2-tag, einer TEV-Proteasespaltsequenz und dem E^{rns} -Anker vom BVDV Stamm CP7.

Das verwendete Expressionsplasmid pd46 wurde durch einen Austausch der BVDV E^{rns} -Ankersequenz im Plasmid pd29G durch die E^{rns} -Ankersequenz des CSFV Stamms Alfort/Tübingen, welches aus dem käuflich erworbenen Plasmid pMA-T_Erns-CSFV gewonnen wurde, hergestellt. Somit entspricht das Plasmid pd46 dem Plasmid pd29G es trägt jedoch die E^{rns} -Ankersequenz des CSFV Stamms Alfort/Tübingen. In Abbildung 17 ist die Vektorkarte der Plasmide dargestellt.

Für die Herstellung der verwendeten Plasmide wurden unterschiedliche molekularbiologische Techniken verwendet, die unter 3.1 angegeben sind. Die Aminosäuresequenzen der exprimierten Proteine aus den generierten Plasmiden sind unter 2.7 angegeben.

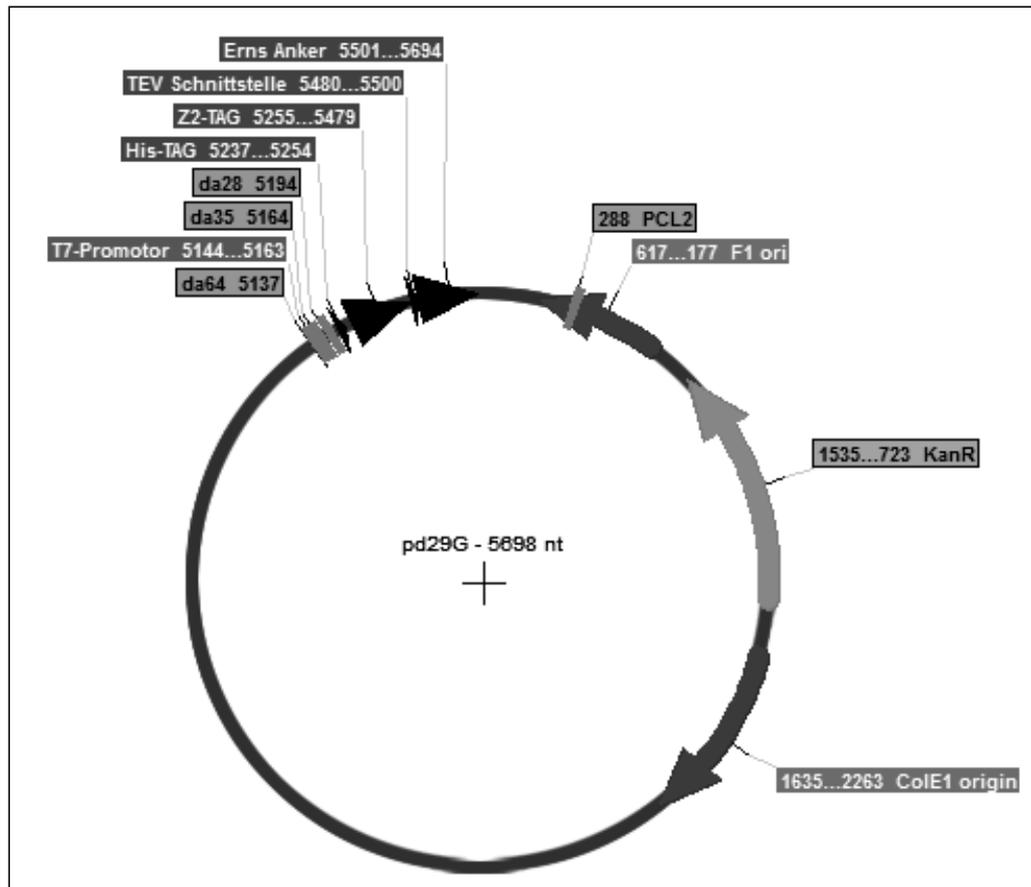


Abbildung 17: Vektorkarte des Expressionsplasmids pd29G bzw. pd46

Vektorkarte des Expressionsplasmids pd29G bzw. pd48. Die Position des T7-Promotors, des His-tags, des Z2-tags, der TEV-Schnittstelle und des E^{ms}-Ankers ist angegeben. Die für den E^{ms}-Anker kodierende Sequenz entspricht im Plasmid pd29G der Sequenz des BVDV Stamms CP7 und im Plasmid pd46 der E^{ms}-Ankersequenz des CSFV Stamms Alfort/Tübingen. Zusätzlich sind die Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide da64, da35, da28 und PCL2 gezeigt, die für die Sequenzierung verwendet wurden. Weil das Plasmid das Gen KanR enthält, das für eine Kanamycinresistenz kodiert, konnten die Plasmide auf Kanamycin selektiert werden. Die Basen- und die Aminosäuresequenz des codierenden Bereiches der Plasmide ist unter 6.1 angeben.

Plasmide basierend auf pd29G:

Plasmidname	Ausgangsplasmid	verwendete Oligonukleotide	resultierendes Protein
pd29G			Erns-Anker(BVDV)
pd29G-STOPP	pd29G	da94/da95	Z2
pd29G-1	pd29G	da98/da99	-1
pd29G-1-1	pd29G-1	da100/da101	-1-1
pd29G-1-2	pd29G-1	da102/da/103	-1-2
pd29G-1-LEN	pd29G-1	da247/da248	-1-LEN
pd29G-1-4	pd29G-1	da132/da133	-1-KK

pd29G-2	pd29G	da104/da105	-2-
pd29G-2-1	pd29G-2	da106/da107	-2-1
pd29G-3	pd29G	da158/da159	-3-
pd29G-3-1	pd29G-3	da160/da161	-3-1
pd29G-4	pd29G	da243/da244	-4
pd29G-5	pd29G	da245/da246	-5
pd29G-LEN	pd29G	da247/da248	-LEN
pd29G-6-4	pd29G-LEN	da253/da254	-6-4
pd29G-7-	pd29G	da255/da256	-7
pd29G-V183A	pd29G	da84/da85	V183A
pd29G-V183L	pd29G	da86/da87	V183L
pd29G-L190A	pd29G	da/88/da89	L190A
pd29G-L208I	pd29G	da90/da91	L208A
pd29G-L208L	pd29G	da92/da93	L208I
pd29G-E216L	pd29G	da207/da208	E216L
pd29G-E216Q	pd29G	da209/da210	E216Q
pd29G-E216G	pd29G	da211b/da212b	E216G
pd29G-N217D	pd29G	da170/da171	N217D
pd29G-N217Q	pd29G	da172/da173	N217Q
pd29G-Q207E	pd29G	da174/da175	Q207E
pd29G-A1+2	pd29G	da108/da109/da110/da111	A1+A2
pd29G-AA	pd29G	da227/da/228/da239/da240	AA
pd29G-EE	pd29G	da229/da230/da241/da242	EE
pd29G-EEE	pd29G	da205/da206b	EEE
pd29G-GGG	pd29G	da176/da177	GGG
pd29G-GPG	pd29G	da178/da179	2xGPG
pd29G-1A	pd29G	da138/da139	1A
pd29G-2A	pd29G	da140/da141	2A
pd29G-3A	pd29G	da142/da143	3A
pd29G-1,2A	pd29G-1A	da140/da141	1,2A
pd29G-1,3A	pd29G-1A	da142/da143	1,3A
pd29G-2,3A	pd29G-2A	da142/da143	2,3A
pd29G-1,2,3A	pd29G-1,2A	da142/da143	1,2,3A
pd29G-1-2 3A	pd29G-1-2	da142/da143	1-2 3A
pd29G-2-1 1A	pd29G-2-1	da138/da139	2-1 1A
pd29G-PS1	pd29G	da146/da147	PS 1

pd29G-PS2	pd29G	da148/da149	PS 2
pd29G-PS3	pd29G	da150/da151	PS 3
pd29G-PS4	pd29G	da164/da165	PS 4
pd29G-PS5	pd29G	da189/da190	PS 5
pd29G-PS1,2	pd29G-PS1	da148/da149	PS 1;2
pd29G-PS1,3	pd29G-PS1	da150/da151	PS 1;3
pd29G-PS2,3	pd29G-PS2	da150/da151	PS 2;3
pd29G-PS3,4	pd29G-PS3	da164/da165	PS 3;4
pd29G-PS1,2,3	pd29G-PS1,2	da150/da151	PS 1;2;3
pd29G-PS1,2,3,4	pd29G-PS1,2,3	da164/da165	PS 1;2;3;4
pd29G-1-2 PS3	pd29G-1-2	da150/da151	1-2 PS 3
pd29G-1-2 PS4	pd29G-1-2	da164/da165	1-2 PS 4
pd29G-1-2 PS3,4	pd29G-1-2 PS3	da164/da165	1-2 PS 3;4
pd29G-1-2 PS5	pd29G-1-2	da189/da190	1-2 PS 5
pd29G-2-1 PS1	pd29G-2-1	da146/da147	2-1 PS1
pd29G-PI1	pd29G	da152/da153	PI 1
pd29G-PI2	pd29G	da154/da155	PI 2
pd29G-PI3	pd29G	da156/da157	PI 3
pd29G-PI4	pd29G	da166/da167	PI 4
pd29G-PI5	pd29G	da251/da252	PI 5
pd29G-PI1,2	pd29G-PI1	da154/da155	PI 1;2
pd29G-PI1,3	pd29G-PI1	da156/da157	PI 1;3
pd29G-PI2,3	pd29G-PI2	da156/da157	PI 2;3
pd29G-PI3,4	pd29G-PI3	da166/da167	PI 3;4
pd29G-PI1,2,3	pd29G-PI1,2	da156/da157	PI 1;2;3
pd29G-PI1,2,3,4	pd29G-PI1,2,3	da166/da167	PI 1;2;3;4
pd29G-1-2 PI3	pd29G-1-2	da156/da157	1-2 PI 3
pd29G-1-2 PI4	pd29G-1-2	da166/da167	1-2 PI 4
pd29G-1-2 PI3,4	pd29G-1-2 PI3	da166/da167	1-2 PI 3;4
pd29G-1-2 PI5	pd29G-1-2	da251/da252	1-2 PI 5
pd29G-2-1 PI1	pd29G-2-1	da152/da153	2-1 PI1
pd29G-1+1AS	pd29G-1	da213/da214	1+1AS
pd29G-1+4AS	pd29G-1	da215/da216	1+4AS
pd29G-1+7AS	pd29G-1+10AS	da217/da218	1+7AS
pd29G-1+9AS	pd29G-1+10AS	da221/da222	1+9AS

pd29G-1+10AS	pd29G-1	da223/da224	1+10AS
pd29G-1+20AS	pd29G-1+10AS	da225/da226/da226-2	1+20AS
pd48	pd29G	da127/da128	MinD-Anker
pd49	pd29G	da129f1/da129f2/da129r1/da129r2/ da129r3	BMV-A1-Anker

Plasmide basierend auf pd46:

Plasmidname	Ausgangsplasmid	Verwendete Oligonukleotide	resultierendes Protein
pd46			E ^{rns} -Anker(CSFV)
pd46 L183A	pd46	da112/da113	CSFV L183A
pd46 I190A	pd46	da114/da115	CSFV I190A
pd46 L208A	pd46	da116/da117	CSFV L208A

2.7 Aminosäuresequenz der exprimierten Proteine

Die Aminosäuren der exprimierten Proteine sind im Ein-Buchstabencode dargestellt. Dabei wurden Aminosäuren, die gegenüber dem Wildtyp BVDV E^{rns}-Anker aus dem Stamm CP7 verändert wurden, unterstrichen und fett markiert. Deletionen und Verkürzungen des E^{rns}-Ankers sind durch fehlende Aminosäuren dargestellt. Der N-terminale tag, bestehend aus dem His-tag, dem Z2-tag und der TEV-Spaltstelle wurde in der Aminosäuresequenz nicht berücksichtigt. Eine vollständige Sequenz mit dem N-terminalen tag ist als Beispiel von pd29G unter 6.1.1 gezeigt.

Exprimierte Proteine, die auf dem Konstrukt pd29G beruhen:

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
E ^{rns} -Anker (pd29G)	GAMAKEHDC TSVI QDTAHY LVDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
-1	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
-1-1	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFG
-1-2	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKT
-1-LEN	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLEN
-1-KK	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKK
-2-	GTSVIQDTAHY LVDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
-2-1	GTSVIQDTAHY LVDGMTNSLESAR
-3-1	GYLVDGMTNSLESARQGTAKLTTW
-4	GDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
-5	GQDTAHY LVDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
-6-4	GKEHDC TSVI QDTAHY LVDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLEN
-7	GCLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
V183A	GAMAKEHDC TSVI QDTAHY <u>L</u> ADGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
V183L	GAMAKEHDC TSVI QDTAHY <u>L</u> LDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
L190A	GAMAKEHDC TSVI QDTAHY LVDGMTNS <u>A</u> ESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
L208A	GAMAKEHDC TSVI QDTAHY LVDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQ <u>A</u> GILGKKLENKSKTWFGAYA

L208I GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQIGILGKKLENKSKTWF GAYA
E216L GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKL LNKSKTWF GAYA
E216Q GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKL QNKSKTWF GAYA
E216G GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKL GNKSKTWF GAYA
N217D GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLE DKSKTWF GAYA
N217Q GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLE QKSKTWF GAYA
Q207E GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRREIGILGKKLENKSKTWF GAYA

A1+A2 GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGAALENASA TWF GAYA
AA GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAA LTTWLGAQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
EE GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAE LTTWLGEQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
EEE GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLE RQLEILEKKLENKSKTWF GAYA

GGG GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLG GGGI LGKKLENKSKTWF GAYA
2xGPG GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLG GGGGPGGGPGGGG ILGKKLENKSKTWF GAYA

1A GAMAKEHDCTSVIQDTAHAYLV DGMTNSLESA RQGTAKLTTW LGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
2A GAMAKEHDCTSVIQDTAH_YLV DGMTNSLESAARQGTAKLTTW_LGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
3A GAMAKEHDCTSVIQDTAH_YLV DGMTNSLESA_RQGTAKLTTWALGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
1,2A GAMAKEHDCTSVIQDTAHAYLV DGMTNSLESAARQGTAKLTTW_LGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
1,3A GAMAKEHDCTSVIQDTAHAYLV DGMTNSLESA_RQGTAKLTTWALGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
2,3A GAMAKEHDCTSVIQDTAH_YLV DGMTNSLESAARQGTAKLTTWALGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
1,2,3A GAMAKEHDCTSVIQDTAHAYLV DGMTNSLESAARQGTAKLTTWALGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
1-2 3A GRQGTAKLTTWALGRQLGILGKKLENKSKT
2-1 1A GTSVIQDTAHAYLV DGMTNSLESA_R

PS 1 GAMAKEHDCTSVIQDTAPYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
PS 2 GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
PS 3 GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTPLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
PS 4 GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLPILGKKLENKSKTWF GAYA
PS 5 GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLEPKSKTWF GAYA
PS 1;2 GAMAKEHDCTSVIQDTAPYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
PS 1;3 GAMAKEHDCTSVIQDTAPYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTPLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
PS 2;3 GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTPLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
PS 3;4 GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTPLGRQLPILGKKLENKSKTWF GAYA
PS 1;2;3 GAMAKEHDCTSVIQDTAPYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTPLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
PS 1;2;3;4 GAMAKEHDCTSVIQDTAPYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTPLGRQLPILGKKLENKSKTWF GAYA
1-2 PS 3 GRQGTAKLTTPLGRQLGILGKKLENKSKT
1-2 PS 4 GRQGTAKLTTWLGRQLPILGKKLENKSKT
1-2 PS 3;4 GRQGTAKLTTPLGRQLPILGKKLENKSKT
1-2 PS 5 GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKT
2-1 PS1 GTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESAR

PI 1 GAMAKEHDCTSVIQDTAHPYLV DGMTNSLESA RQGTAKLTTW_LGRQLG_ILGKKLEN_KSKTWF GAYA
PI 2 GAMAKEHDCTSVIQDTAH_YLV DGMTNSLESA PRQGTAKLTTW_LGRQLG_ILGKKLEN_KSKTWF GAYA
PI 3 GAMAKEHDCTSVIQDTAH_YLV DGMTNSLESA_RQGTAKLTTWPLGRQLG_ILGKKLEN_KSKTWF GAYA
PI 4 GAMAKEHDCTSVIQDTAH_YLV DGMTNSLESA_RQGTAKLTTW_LGRQLGP_ILGKKLEN_KSKTWF GAYA
PI 5 GAMAKEHDCTSVIQDTAH_YLV DGMTNSLESA_RQGTAKLTTW_LGRQLG_ILGKKLEN PKSKTWF GAYA
PI 1;2 GAMAKEHDCTSVIQDTAHPYLV DGMTNSLESA PRQGTAKLTTW_LGRQLG_ILGKKLEN_KSKTWF GAYA
PI 1;3 GAMAKEHDCTSVIQDTAH_YLV DGMTNSLESA PRQGTAKLTTWPLGRQLG_ILGKKLEN_KSKTWF GAYA
PI 2;3 GAMAKEHDCTSVIQDTAH_YLV DGMTNSLESA PRQGTAKLTTWPLGRQLG_ILGKKLEN_KSKTWF GAYA
PI 3;4 GAMAKEHDCTSVIQDTAH_YLV DGMTNSLESA_RQGTAKLTTWPLGRQLGP_ILGKKLEN_KSKTWF GAYA
PI 1;2;3 GAMAKEHDCTSVIQDTAHPYLV DGMTNSLESA PRQGTAKLTTWPLGRQLG_ILGKKLEN_KSKTWF GAYA
PI 1;2;3;4 GAMAKEHDCTSVIQDTAHPYLV DGMTNSLESA PRQGTAKLTTWPLGRQLGP_ILGKKLEN_KSKTWF GAYA
1-2 PI 3 GRQGTAKLTTWPLGRQLG_ILGKKLEN_KSKT
1-2 PI 4 GRQGTAKLTTWPLGRQLGP_ILGKKLEN_KSKT
1-2 PI 3;4 GRQGTAKLTTWPLGRQLGP_ILGKKLEN_KSKT
1-2 PI 5 GRQGTAKLTTWPLGRQLG_ILGKKLEN PKSKT
2-1 PI1 GTSVIQDTAHPYLV DGMTNSLESA R

-1 GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
1+1AS GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYAA
1+4AS GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYAA SPY
1+7AS GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYAA SPYCEV
1+9AS GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYAA SPYCEVER
1+10AS GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYAA SPYCEVERK
1+20AS GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYAA SPYCEVERKLG YIWYTKNC

Exprimierte Proteine, die auf dem Konstrukt pd46 (CSFV) beruhen:

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
E ^{rns} -Anker (pd46)	GAMGDHECGSLQDTALYL ^L LDGMTNTIENARQGAARVTSWLGRQLSTAGKKLERRSKTWFGAYA
CSFV L183A	GAMGDHECGSLQDTALYL ^A LDGMTNTIENARQGAARVTSWLGRQLSTAGKKLERRSKTWFGAYA
CSFV I190A	GAMGDHECGSLQDTALYL ^L LDGMTNT ^A ENARQGAARVTSWLGRQLSTAGKKLERRSKTWFGAYA
CSFV L208A	GAMGDHECGSLQDTALYL ^L LDGMTNTIENARQGAARVTSWLGRQ ^A STAGKKLERRSKTWFGAYA

Sonstige exprimierte Proteine auf Basis des Plasmids pd29G jedoch ohne E^{rns}-Ankersequenz:

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
MinD-Anker	GAMEKKGFLKRLFGG
BMV-A1-Anker	GAMGLVAFALT ^L NLYQKYEKLT ^V LR

2.8 Vorgefertigte Komplettsysteme

BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
His Pure™ Ni-NTA Spin Columns 0,2ml/1ml	Thermo Scientific, Karlsruhe
Nucleobond®AC-100 Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleobond®AC-20 Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleo-Spin®-Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Protino® Ni-NTA Columns 5ml	Macherey-Nagel, Düren
SuperSignalWest Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, USA
Western Blot Signal Enhancer	Pierce, USA

2.9 Sonstige Materialien

Blue Caps CELLSTAR® (15, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
C4-Resprosil 300 Säule 150 x 10 mm 5 µm	Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen
CL-XPosure™ Film (Clear Blue X-Ray Film)	Thermo Scientific Pierce, USA
Einmalspritzen (1 ml, 2 ml, 50 ml)	Braun, Melsungen
Filtereinheit, gebrauchsfertig, Celluloseacetat	Whatman®, Schleicher & Schuell, Dassel
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel
Gilson-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Kanülen (27G)	Braun, Melsungen

Kodak® BioMax MR Film, MR-1	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ni –NTA Agarose	Qiagen, USA
Nitrocellulose Transfer Membran Protran®	Whatman, Dassel
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Plastibrand 1,5 ml Halbmikroküvetten	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Parafilm „M“	American National Can, Greenwich
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Whatman Nuclepore Track–Etit–Membran PCMB 19 MM	W. Schleicher & Schuell, Dassel
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml)	Beckman, München
Thermopapier	Mitsubishi electric, Ratingen
Vacuum Filter Systems	Corning Inc., USA

2.10 Verwendete Software

Online Programme:

Dichroweb	http://cryst.bkk.ac.uk/cdweb/html
ExPASy. Prot Param	http://expasy.org/tools/protparam.html
Heliquest	http://Heliquest.ipmc.cnrs.fr
MultiAlin	http://multialin.toulouse.inra.fr
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NEBcutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php

Software:

GCG 10.3	Accelrys
NMRView	One Moon Scientific
pDraw32(Version 1.1.113)	AcaClone Software
Python2,6/3.2	freie Software
Run 3130 Data Collection v3.0	Applied Biosystems
SerialCloner	freie Software
Un-Scan-it gel 6.1	Silk Scientific, Orem

3.0 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Auf Nukleinsäuren basierende Methoden

3.1.1.1 Methoden basierend auf der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation oder zur gezielten Mutagenese von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) verwendet. Dabei wurde die Pfu DNA-Polymerase verwendet, die eine „proofreading“ Funktion besitzt und deshalb eine geringere Fehlerquote aufweist. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide (siehe 2.5.2) wurden dabei von der Firma Metabion synthetisiert und für die Arbeiten in einer Konzentration von 10 pmol/μl verwendet.

Reaktionsansatz für die PCR:

Komponenten	Volumen [μl]
bidest. H ₂ O	38,5
dNTPs	1,0
DNA (200ng/μl)	1,0
Primer 1	2,0
Primer 2	2,0
10x PCR-Puffer	5,0
Pfu Polymerase	0,5

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die Standard-PCR

3.1.1.1.1 Standard-PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde eine Standard-PCR mit einem Reaktionsansatz wie in Tabelle 1 angegeben verwendet.

Folgender Programmablauf wurde für die Standard-PCR verwendet:

Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
initiale Denaturierung	Denaturierung	95	120
Synthesezyklen (36x)	Denaturierung	95	60
	Primerhybridisierung	48-54	45
	Primerverlängerung	72	60/kb
Endsynthese	Primerverlängerung	72	120

Tabelle 2: Schematische Übersicht über den Ablauf der PCR

3.1.1.1.2 Quik Change[®]-PCR

Bei der Quik Change[®]-PCR wird gezielt eine Mutation in ein Plasmid eingefügt. Dazu wurden jeweils zwei Oligonukleotide verwendet, die die gewünschte Basensubstitution enthielten, wobei ein Oligonukleotid in Plus-Strang und das andere in Minus-Strang Orientierung vorlag. Der Reaktionsansatz wurde wie in Tabelle 1 gezeigt verwendet.

Folgendes Programm wurden für die Quik Change[®]-PCR verwendet:

Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
initiale Denaturierung	Denaturierung	95	30
Synthesezyklen (17x)	Denaturierung	95	30
	Primerhybridisierung	48-54	60
	Primerverlängerung	68	60/kb
Endsynthese	Primerverlängerung	68	120

Tabelle 3: Schematische Übersicht über den Ablauf der Quik Change[®] PCR

Nach Beendigung der Quik Change[®]-PCR wurde zu dem Reaktionsansatz 1,0 µl des Restriktionsenzym DpnI gegeben, welches spezifisch methylierte DNA an der Sequenz GATC spaltet. Da die durch die Quik Change[®]-PCR neu synthetisierte DNA nicht methyliert ist, wird nur die eingesetzte Ursprungs-Plasmid-DNA durch das Restriktionsenzym gespalten. Dadurch bleibt nach der DpnI Behandlung nur die *in vitro* synthetisierte unmethylierte DNA übrig.

3.1.1.1.3 Fusions-PCR

Bei einer Fusions-PCR werden zwei PCR-Produkte (siehe 3.1.1.1.1) in einer weiteren PCR miteinander verbunden, so dass ein großes PCR-Fragment aus den Teilstücken entsteht. Dazu werden die PCR-Produkte aus 3.1.1.1.1 über eine präparative Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.1.3) aufgereinigt. Im Anschluss daran erfolgt die eigentliche Fusions-PCR, bei der beide Primärprodukte gemeinsam in einem Ansatz als Matrize eingesetzt werden. Die beiden aufgereinigten PCR-Produkte können durch ihre komplementären Enden hybridisieren und somit ein DNA-Fragment bilden, das über lange 5' überhängende Einzelstrangbereiche verfügt. In den ersten PCR Zyklen werden zunächst diese Lücken aufgefüllt. Die weitere Amplifikation wird durch die Zugabe des „forward“ Oligonukleotides des ersten Fragmentes und des „reverse“ Oligonukleotides des zweiten Fragmentes erreicht. In Tabelle 4 ist der Reaktionsansatz der Fusions-PCR dargestellt. Nach der Fusions-PCR wurde das PCR-Produkt wie in 3.1.1.3 beschrieben aufgereinigt.

Reaktionsansatz für die Fusions-PCR:

Komponenten	Volumen [µl]
bidest. H ₂ O	37,5
dNTPs	1,0
1. PCR-Produkt	1,0
2. PCR-Produkt	1,0
5'-3' Primer 1 Produkt	2,0
3'-5' Primer 2 Produkt	2,0
10x PCR-Puffer	5,0
Pfu Polymerase	0,5

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die Fusions-PCR

3.1.1.1.4 PCR mittels Superoligonukleotid

Um mehrere Mutationen auf einmal in einen längeren DNA-Bereich einzufügen, wurden vor der PCR mehrere Oligonukleotide zu einem langen Superoligonukleotid verbunden. Dabei wurden abwechselnd Primer in Plusstrangorientierung und solche in Minusstrangorientierung eingesetzt, die jeweils mit benachbarten Oligonukleotiden überlappen. Dazu wurden je 1 nmol der Oligonukleotide zusammen in 40 µl H₂O gemischt und im Wasserbad für 5 min auf 100 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung im Wasserbad langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Oligonukleotide in ihren überlappenden Bereichen zu hybridisieren.

Um die hybridisierten Oligonukleotide zu fusionieren, wurde die Polymerase I verwendet. Sie besitzt die Fähigkeit, Einzelstrangbrüche aus DNA-Fragmenten mittels „*nick translation*“ zu entfernen.

Für die Fusionierung der hybridisierten Oligonukleotide wurde der in Tabelle 5 angegebene Reaktionsansatz verwendet und für 10 min bei 37 °C inkubiert.

Das Superoligonukleotid wurde anschließend mit Hilfe des *Nucleo-Spin®-Extract II Kits* nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und im Anschluss als Primer für eine Quik Change®-PCR (siehe 3.1.1.1.2) verwendet.

Reaktionsansatz für die Superoligonukleotidsynthese:

Komponenten	Volumen [µl]
bidest. H ₂ O	2,0
dNTPs	2,0
hybridisierte Oligonukleotide	40,0
10x Ligase-Puffer	5,0
Polymerase I	1,0

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Superoligonukleotidsynthese

3.1.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde für die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten eingesetzt, da mittels dieser Methode eine Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe möglich ist.

Die Auftrennung erfolgt dabei durch die größenabhängig unterschiedlich starke Retention von DNA-Fragmenten während der Wanderung im elektrischen Feld durch die Agarosematrix. Durch die negative Ladung der DNA, die sie im Laufpuffer ausbildet, erfolgt die Wanderung in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Größe der DNA-Fragmente ab. Je kleiner das Fragment ist, desto schneller ist seine Wandergeschwindigkeit. Zusätzlich hängt die Wandergeschwindigkeit der DNA-Fragmente von der Vernetzung der Agarose ab, die durch die Konzentration der Agarose gesteuert werden kann. Für die Trennung kleiner DNA-Fragmente wurden 2 % Agarosegele und für die Trennung großer DNA-Fragmente wurden 0,8 % Agarosegele verwendet.

Die DNA Probe wurde mit *FR-Puffer* gemischt und im Agarosegel bei 80-120 V für 30 min in *TAE-Puffer* getrennt. Als Größenmarker wurden 12 µl des *1kb Plus DNA Markers* auf das Agarosegel aufgetragen. Die Färbung der DNA-Banden erfolgte durch ein 15minütiges Bad in einer Lösung des Farbstoffs GelRed© (1:3300). Anschließend wurden die DNA-Fragmente bei 254 nm in der Geldokumentationseinheit detektiert.

3.1.1.3 Präparative Agarosegelelektrophorese

Für die präparative Agarosegelelektrophorese wurde die DNA Probe wie unter 3.1.1.2 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden bei 302 nm betrachtet und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden wurden mit Hilfe des *Nucleo-Spin®-Extract II Kits* nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und mit 15 - 30 µl H₂O eluiert.

3.1.1.4 Restriktionsenzymspaltung

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die dsDNA an spezifischen Nukleotidsequenzen schneiden können. Im Labor werden meist Restriktionsenzyme der Klasse II eingesetzt, die ATP unabhängig die dsDNA spezifisch in oder in der Nähe ihrer Erkennungssequenz schneiden. Die Erkennungssequenzen bestehen meist aus gegenläufigen identischen Sequenzen (Palindrom). Durch die Spaltung entstehen vorhersagbare dsDNA-Fragmente mit spezifischen 5'- und 3'-Enden.

Die Methode wurde zum einen eingesetzt, um durch eine spezifische Spaltung und anschließende gelelektrophoretische Trennung (siehe 3.1.1.2) den Aufbau spezifischer DNA Konstrukte zu überprüfen. Dazu wurde eine kleine Menge einer Plasmid-DNA oder eines PCR-Produktes mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen behandelt und für 30 min bei der für das Enzym benötigten Temperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden die erhaltenen DNA-Fragmente wie unter 3.1.1.2 beschrieben aufgetrennt und dargestellt. Die erhaltenen Bandenmuster wurden dann mit den theoretisch zu erwartenden Bandenmustern abgeglichen.

Zum anderen wurde die Methode verwendet, um spezifische Enden von DNA-Fragmenten zu erzeugen, über die mehrere DNA-Fragmente miteinander verbunden werden können (siehe 3.1.1.6). Dazu wurden die Plasmid-DNA oder das PCR-Produkt mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen behandelt und für 1 h 30 min bei der benötigten Temperatur inkubiert. Nach 1h erfolgte eine Probenentnahme und anschließende Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.1.2), um den Fortschritt der Spaltung zu analysieren. Bei Detektion von ungeschnittener DNA wurde die Reaktionszeit entsprechend angepasst. Nach der Restriktionsspaltung wurde der Reaktionsansatz mit *FR-Puffer* versetzt und die gewünschten DNA-Fragmente mittels präparativer Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.1.3) aufgereinigt.

3.1.1.5 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation von komplementären Vektorenden zu verhindern, wurde das 5' Phosphat der Vektor DNA durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIAP) abgespalten. Dazu wurde die linearisierte DNA für 30 min bei 37 °C mit 1 U alkalischer Phosphatase behandelt. Um die alkalische Phosphatase zu deaktivieren, wurde der gesamte Ansatz für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend die DNA mit dem *Nucleo-Spin®-Extract II Kit* nach Herstellerprotokoll extrahiert.

3.1.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden die in 3.1.1.3 aufgereinigten DNA-Fragmente mit komplementären Enden durch die enzymatische Aktivität der T4-DNA Ligase kovalent zu einer zirkulären DNA verbunden. Um eine hohe Ligationseffizienz zu gewährleisten, wurde ein Vektor/Insert Verhältnis von mindestens 1:5 eingesetzt, wobei die Konzentration über ein gefärbtes Agarosegel abgeschätzt wurde.

Der in Tabelle 6 angegebene Ligationsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Reaktionsansatz für die Ligation:

Komponenten	Volumen [μ l]
bidest. H ₂ O	5,5
gereinigte und verdaute DNA	2,5
Vektor	0,5
10x Ligasepuffer mit ATP	1,0
T4-DNA Ligase	0,5

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die Ligation

3.1.1.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA Proben erfolgte mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Dabei wird ein Oligonukleotid an die zu sequenzierende Probe hybridisiert und mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase verlängert. Im Gegensatz zu einer normalen PCR enthält der Ansatz nur eine Oligonukleotid und außer dNTPs auch ddNTPs, an die wiederum ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dabei tragen ddATP, ddCTP, ddTTP und ddGTP jeweils andere Farbstoffe, die sich in ihren Fluoreszenzspektren unterscheiden. Während der Oligonukleotidverlängerung kommt es nun vor, dass die DNA-Polymerase ein ddNTP statt eines dNTPs einbaut. Da das ddNTP keine 3'OH-Gruppe besitzt, wird die Elongation gestoppt und das erhaltene DNA-Fragment ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der spezifisch für eine Base ist. Da während jedes Verlängerungsschrittes ein ddNTP eingebaut werden kann, erhält man am Ende der Reaktion eine Mischung von unterschiedlich langen ssDNA-Fragmenten, deren 3'-Ende spezifisch markiert ist. Über eine Kapillargelelektrophorese können diese Fragmente nun getrennt und durch die spezifische Markierung der 3' Enden die DNA-Sequenz ermittelt werden.

Die Auftrennung, Detektion und bioinformatische Bearbeitung erfolgte mit dem *3130 Genetic Analyzer* von Applied Biosystem (ABI) und den zugehörigen Computerprogrammen.

Plasmid-DNA Proben, die aus der Isolierung über die alkalische Lyse von Bakterien stammten (siehe 3.1.2.4.1), wurden vor der Sequenzierung mit RNase behandelt, um störende RNA zu entfernen.

Dazu wurde das zu sequenzierende Plasmid mit 10 μ l 10x *NEB Puffer 4* und 3 μ l RNase A (10 μ g/ μ l) versetzt, mit bidest. H₂O auf 100 μ l aufgefüllt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte

eine Aufreinigung der Plasmid-DNA über das *Nucleo-Spin®-Extract II Kit*. Für die Elution wurden 15 µl H₂O verwendet.

Der Reaktionsansatz für die Sequenzierung ist in Tabelle 7 dargestellt. Die Sequenzierung erfolgte dabei mit dem „*BigDye Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*“ Version 3.1 von ABI.

Reaktionsansatz für die Sequenzierungsreaktion:

Komponenten	Volumen [µl]
bidest. H ₂ O	2,0
DNA (200ng)	5,0
Oligonukleotid	0,5
10x Sequenzpuffer	1,5
Sequenzmix	1,0

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Sequenzierung

Folgendes Programm wurde für die Sequenzierung verwendet:

Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
Initiale Denaturierung	Denaturierung	95	60
Syntheszyklen (25x)	Denaturierung	95	10
	Primerhybridisierung	50	5
	Primerverlängerung	60	110

Tabelle 8: Schematische Darstellung des Sequenzierprogramms

Um die Syntheseprodukte von den freien Nukleotiden zu trennen, wurden sie mittels Ethanol gefällt. Dazu wurde der Reaktionsansatz zusammen mit 1 µl 3 M NaAc pH 5 und 25 µl 100 %igen Ethanol in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment zweimal mit 150 µl 75 % Ethanol gewaschen, wobei die Lösung jedes Mal 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert wurde. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Sediment für 5 min in der *SpeedVac* getrocknet und im Anschluss in 17 µl *HiDi™* aufgenommen. Die 17 µl wurden dann direkt für die Analyse eingesetzt.

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem im Internet frei verfügbaren Programm *MultiAlin Interface*, dem Programm *CodonCode Aligner* oder dem Programm *GCG* (siehe 2.10).

3.1.2 Mikrobiologische Methoden

3.1.2.1 Herstellung von Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurde 500 ml *LB-Medium* mit 7,5 g Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung auf ca. 40 °C abgekühlt, mit Antibiotikum (50 mg/ 500 ml) versetzt und nach kurzem vorsichtigem Schütteln in Plastikpetrischalen abgefüllt.

3.1.2.2 Herstellung von kompetenten Bakterien

Von einer Übernachtskultur ausgehend wurden 100 ml *LB-Medium* so angeimpft, dass die OD_{600} zwischen 0,05 und 0,10 lag. Die Bakterien wurden anschließend schüttelnd bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,6 – 0,7 kultiviert und bei Erreichen dieser OD für 10 min bei 4000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde in 25 ml kalter *CaCl₂-Lösung* aufgenommen und für 40 min auf Eis gelagert. Danach wurden die Bakterien wiederum für 10min bei 4000 rpm und 4 °C sedimentiert und das erhaltene Pellet in 5 ml *CaCl₂-Lösung* resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis in 150 µl Portionen aufgeteilt und nach weiteren 3 h auf Eis bei -70 °C gelagert.

3.1.2.3 Hitzeschock-Transformation

Für die Klonierung von Plasmid-DNA wurden kompetente TOP-10 Bakterien verwendet, die mit der Hitzeschockmethode transformiert wurden. Dazu wurden 50 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 0,5 – 2 µg Plasmid-DNA aus einer Quik-Change[®] - PCR (siehe 3.1.1.1.2) oder einer Ligation (siehe 3.1.1.6) gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 2 min im Wasserbad auf 42 °C erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Dann wurden 200 µl *LB++* zugegeben und der Ansatz für mindestens 30 min in einem Wasserbad auf 37 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann auf vorgewärmte Agarplatten (siehe 3.1.2.1) ausplattiert und über Nacht in den Brutschrank (37 °C) gestellt.

3.1.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Für die Isolierung von kleinen Mengen (bis zu 5 ml Bakteriensuspension; siehe 3.1.2.4.1) wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet und für größere Mengen an Plasmid-DNA (über 50 ml Bakteriensuspension, siehe 3.1.2.4.2) wurde das *Nucleobond[®]AC-100 Midi Kit* verwendet.

3.1.2.4.1 Im kleinen Maßstab

Für die Isolierung von kleinen Plasmid-DNA Mengen wurden 5 ml *LB-Medium* mit Antibiotikum mit einer Kolonie von einer Agarplatte (siehe 3.1.2.3) angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Am anderen Tag wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde mit 100 µl kalter *Solution I* unter Schütteln gelöst, mit 200 µl *Solution II* versetzt und nach kurzem Mischen für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl *Solution III* wurde die Lösung dreimal invertiert und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Isopropanol gemischt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde anschließend bei 14000 rpm für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment mit 200 µl Isopropanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Sedimentes in der *SpeedVac* wurde es in 40 µl H₂O gelöst und für die Restriktionsanalyse (siehe 3.1.1.4) oder für die Sequenzierung (siehe 3.1.1.7) eingesetzt.

3.1.2.4.2 Im großen Maßstab

Für die Isolierung von großen Mengen an Plasmid-DNA wurden 100 ml *LB-Medium* mit Antibiotikum mit 50 µl Bakteriensuspension angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Plasmid-DNA mit dem *NucleoBond[®] AC-100 Midi Kit* nach Herstellerprotokoll isoliert. Die DNA wurde in 50 µl H₂O gelöst und die Konzentration durch die photometrische Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die analytische Trennung von Proteingemischen wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Schagger und Jagow verwendet. Dabei werden die zuvor durch SDS denaturierten Proteine in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Wandergeschwindigkeit der zu trennenden Proteine hängt vom Retentionsvermögen des Polyacrylamidgels ab, was durch die Konzentration des Acrylamids und das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt wird. Zusätzlich wird die Wandergeschwindigkeit der Proteine auch von der Stärke des elektrischen Feldes beeinflusst.

Das Polyacrylamidgel zur diskontinuierlichen Trennung besteht aus einem Sammelgel, indem die Proteine fokussiert werden, und einem Trenngel, in dem die Proteine nach ihrer apparenten Masse getrennt werden. Dabei wurde ein Sammelgel mit 4 % Acrylamid und, je nach der apparenten Masse des zu analysierenden Proteins, ein Trenngel mit 8 % - 16 % Acrylamid verwendet. In Tabelle 9 sind die Pipettierschemata für die Herstellung von vier unterschiedlichen SDS-Gelen angegeben.

Vor dem Gießen des Polyacrylamidgels wurden die Glasplatten (90 mm x 88 mm x 0,75 mm) mit Aceton gereinigt und in die Gießapparatur eingespannt. Das Sammel- und das Trenngel wurden kurz vor dem Gießen frisch hergestellt und die Polymerisation durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet. Das Trenngel wurde zuerst bis ca. 4cm unter den Rand der Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet um eine ebene Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel hinzugefügt und ein Kamm hineingesteckt.

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoreseeinheit eingespannt. Nach Zugabe des *Jagow-Kathoden-* und *Jagow-Anodenpuffers* wurden die zuvor für 5 min auf 95 °C erhitzten Proben aufgetragen. Je nach Gel wurde eine Spannung von 100 - 150 V (ca. 16 - 24 V/cm²) für 1 - 3 h angelegt.

Nach erfolgter Trennung der Proteine wurde je nach Fragestellung eine Coomassie Färbung (siehe 3.2.2) oder ein *Western Blot* (siehe 3.2.3) durchgeführt.

	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	16%	
Wasser	7,2 ml	7,2 ml	7,2 ml	4,5 ml
Jagow-Gelpuffer	6,0 ml	6,0 ml	6,0 ml	1,75 ml
Glycerin (96%)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	
Acrylamid (29:1)	3,6 ml	4,5 ml	7,2 ml	0,7 ml
10% APS	90 µl	90 µl	90 µl	60 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	8 µl

Tabelle 9: Pipettierschemata für 4 unterschiedliche SDS-Gele

3.2.2 Coomassie Färbung

Für die Färbung der Proteine in einem SDS-Gel wurde der Coomassie Farbstoff G250 verwendet, der sich an basische und aromatische Aminosäuren anlagert und somit die Proteine unspezifisch anfärbt.

Dazu wurde das Gel mindestens zweimal für 10 min mit bidest. H₂O gewaschen, um das bei der Färbung störende SDS zu entfernen. Anschließend wurde das Gel vollständig mit kolloidalem *Coomassie* bedeckt und für mindestens 3 h schüttelnd gefärbt. Wenn die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren, wurde das Gel zweimal mit bidest. H₂O gewaschen und dann für 30 min mit *Coomassie Entfärber* entfärbt. Im Anschluss wurde das Gel wiederum zweimal mit bidest. H₂O gewaschen und digitalisiert.

3.2.3 Western Blot

3.2.3.1 Transfer der Proteine auf Nitrozellulose Membran

Nach erfolgter SDS-PAGE (siehe 3.2.1) wurden die aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurde das Gel nach der SDS-PAGE zunächst für 30 min in *Transferpuffer* equilibriert. Danach wurde das Polyacrylamidgel in die *Mini-Trans Blot* Kammer (Biorad) eingebaut und die Proteine durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 1 h auf eine 0,2 µm Nitrozellulosemembran übertragen. Nach dem Transfer wurden die übertragenen Proteine mit einer Ponceau Färbung (3.2.3.2) sichtbar gemacht.

3.2.3.2 Ponceau Färbung

Um die Transfereffizienz der Proteine einschätzen zu können, wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Transfer mit *Ponceau-S-Lösung* gefärbt. Mit der *Ponceau-S-Lösung* können Proteine reversibel, aber unspezifisch angefärbt werden. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Proteintransfer (3.2.3.1) für 10 sec in der Färbelösung geschwenkt und anschließend so lange mit bidest. H₂O gewaschen bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Durch weiteres Waschen mit bidest. H₂O und *Blockpuffer* wurde die Membran vollständig entfärbt.

3.2.3.3 Immunodetektion der Proteine

Die Nitrozellulosemembran aus 3.2.3.1 wurde für 1h mit *Blockpuffer* gewaschen, um die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran abzusättigen. Nach kurzem Waschen mit *PBS-T* wurde die Nitrozellulosemembran dann zusammen mit ca. 2 ml einer in *PBS-T* verdünnten Antikörperlösung (siehe 2.4.3) ü.N. bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für 15 min mit *PBS-T* gewaschen und für 2 h mit dem zugehörigen sekundären Antikörper (siehe 2.4.3) inkubiert. Die Membran wurde wiederum dreimal für 15 min mit

PBS-T gewaschen und mit dem 1:3 in *PBS* verdünnten *SuperSignal West Pico Chemiluminescent* Substrat, welches zuvor aus seinen zwei Komponenten frisch hergestellt worden war, für 30 sec. inkubiert.

An den sekundären Antikörper ist eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche die chemolumineszente Oxidation von Luminol und H_2O_2 aus dem Substrat katalysiert. Damit ist es möglich, die durch den ersten Antikörper erkannten Proteine durch die Lichtemission mittels eines Röntgenfilmes nachweisen. Je nach Intensität der Lumineszenz wurde der Röntgenfilm für 2 s – 20 min belichtet und anschließend mittels einer Entwicklermaschine entwickelt.

3.2.4 Proteinaufreinigung für den Lipidpulldownassay

3.2.4.1 Proteinexpression im kleinen Maßstab

Für die Proteinexpression wurden 100 ml *LB-Medium* mit 1,5 ml einer Übernachtskultur aus BL21 Bakterien, die zuvor mit dem gewünschten Expressionsvektor transformiert worden waren, angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Um das Wachstum der Bakterien zu kontrollieren, wurde stündlich eine Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD600) durchgeführt. Sobald die OD600 zwischen 0,4 – 0,6 lag, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 100 µl einer 0,5 M IPTG Lösung gestartet. Anschließend wurden die Bakterien bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 3 h Wachstum wurden die Bakterien in zwei 50 ml Falcon Röhrchen aufgeteilt und bei 4 °C für 10 min und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und je ein 50ml Falcon wurde für die weitere Aufreinigung verwendet.

3.2.4.2 Aufreinigung mittels Ni-NTA Spin Säulen

Das Pellet einer induzierten Bakterienkultur wurde in 600 µl *Lysispuffer+(1)* aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei Raumtemperatur für 15 min geschüttelt. Danach erfolgten drei Gefrier-Tau-Zyklen mit flüssigem Stickstoff und ca. 37 °C warmem Wasser. Im Anschluss wurde 200 µl *Lysispuffer+(2)* zugegeben, kurz gevortext und die Probe dann 6 x 30 sec mit Ultraschall bei 4 °C und 100 W behandelt.

Die unlöslichen Bestandteile wurden für 30 min und 140000 rpm bei 4 °C sedimentiert und der Überstand für die Aufreinigung verwendet.

Die Aufreinigung mittels Ni-NTA Spin Säulen verlief weitgehend nach dem Protokoll des Herstellers, jedoch wurden drei zusätzliche Waschschrte eingefügt. Der Durchlauf jedes Waschschrtes wurde für eine spätere Analyse aufbewahrt. Die fünf ersten Waschschrte wurden mit Puffer *Wash½* durchgeführt und der letzte Waschschrte mit *Wash1*. Anschließend wurde das gebunden Protein einmal mit 600 µl und dreimal mit 200 µl *Elu1* von der Säule eluiert, wobei die Säule vor dem Zentrifugieren 2 min mit dem Elutionspuffer inkubiert wurde. Für die spätere Analyse wurden je 5 µl der Wasch- und Eluatfraktionen mit 10 µl *SDS Probenpuffer* versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

3.2.4.3 Ultrafiltration

Die das gewünschte Protein enthaltenden Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration durch Zentrifugation bei 4000 g in einer 2 ml Amicon Ultra-2 Einheit mit einem Ausschlussvolumen von 3 kDa eingeeengt. Anschließend wurde die Proteinlösung in der Ultrafiltrationseinheit mit *Lipidassaypuffer* versetzt und wiederum eingeeengt. Dieser Vorgang wurde so lange durchgeführt, bis der Imidazolgehalt der Proteinlösung rechnerisch unter 2 mM lag. Die konzentrierte Proteinlösung wurde in ein 1,5 ml Eppendorf überführt und anschließend die Konzentration über eine Absorptionmessung bei 280 nm bestimmt.

3.2.4.4 Lipid „pulldown assay“

Für die Lipidbindungsanalysen wurde das Protokoll von John E. Harlan [55] verwendet, das jedoch zusätzlich leicht modifiziert wurde.

3.2.4.4.1 Herstellung der Vesikel

Die lyophilisierten Lipide (siehe 6.2) wurden einzeln in Eppendorfgefäße abgewogen und mittels *Lipidassaypuffer* auf eine Konzentration von 25 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde die Lipidsuspension bei 38 °C so lange mit Ultraschall behandelt, bis sich die Lipide vollständig gelöst hatten.

Die auf Raumtemperatur abgekühlten Lipidlösungen wurden dann in dem gewünschten Verhältnis gemischt, so dass 50 µl der gewünschten Lipidmischung pro Analyse zur Verfügung standen. Anschließend wurde die Lipidmischung für 2 x 30 sec bei 38 °C mit Ultraschall behandelt (100 W), um sie zu homogenisieren.

3.2.4.4.2 Lipid „pulldown assay“

Das zu testende Protein wurde mittels *Lipidassaypuffer* auf eine Konzentration von 120 nmol/ml gebracht und 50 µl dieser Verdünnung zu der entsprechend 3.2.4.4.1 hergestellten 50 µl Vesikellösung gegeben. Diese Mischung wurde sofort kurz gevortext, anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach der Inkubation für 30 min in einer Ultrazentrifuge bei 20 °C und 100000 g sedimentiert.

Nach der Zentrifugation wurden 20 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 10 µl *SDS-Probenpuffer* versetzt und als Probe Überstand bezeichnet. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde mit 100 µl *Lipidassaypuffer* gewaschen und für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Sediment in 20 µl *SDS-Probenpuffer* aufgenommen, für 5 min auf 95 °C erhitzt und heiß gevortext. Zu dieser Lösung wurde 60 µl H₂O hinzugegeben und nach erneutem Vortexen wurde die Lösung für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wurde 20 µl in ein neues Eppendorfgefäß überführt und als Probe Pellet bezeichnet.

3.2.4.4.3 Auswertung des Lipid „pulldown assay“

Je 8 µl der Probe Überstand und Pellet wurden auf ein 18 % Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe 3.2.1) getrennt. Das Gel wurde im Anschluss daran mit kolloidalem *Coomassie* (siehe 3.2.2) gefärbt. Nach dem Entfärben des Gels wurde es eingescannt und die Banden mit Hilfe des Programms „UNScan-IT“ densitometrisch ausgewertet. Um den Anteil des gebundenen Proteins prozentual darstellen zu können, wurden die für die Pelletbande erhaltenen Farbpunkte durch die Summe der Farbpunkte der Pellet- und Überstandbande geteilt und mit 100 multipliziert. Für jedes Protein wurde dann der Mittelwert aus drei separaten Experimenten gebildet und die jeweilige Standardabweichung angegeben.

3.2.5 Aufreinigung von Peptiden für die CD und NMR-Messungen

3.2.5.1 Proteinexpression im Minimalmedium

Für die Expression im Minimalmedium wurden die mit dem gewünschten Expressionsplasmid transformierten BL21 Bakterien für min. 16 h in 50 ml Minimalmedium vorkultiviert. Aus dieser Startkultur wurden 20 ml Bakteriensuspension in 1l Minimalmedium gegeben und bei 37 °C geschüttelt. Die OD₆₀₀ wurde verfolgt und bei Erreichen eines Wertes zwischen 0,6 und 0,8 wurde die Proteinexpression mittels Zugabe von 500 µl 0,5 M IPTG gestartet. Zusätzlich zur IPTG Zugabe wurde am Induktionsstart noch 2,5 ml 20 % Glukose pro l Kultur zugegeben. Die Bakterien wurden für 3 - 4 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und danach durch 10 min Zentrifugation bei 5000 g und 4 °C sedimentiert.

3.2.5.2 Lyse der Bakterien

Die sedimentierten Bakterien wurden in 15 ml *Lysispuffer+(1)* pro l Minimalmedium aufgenommen, in ein 50ml Falcon überführt und für 15 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten drei Gefrier-Tau-Zyklen mit flüssigem Stickstoff und ca. 37 °C warmen Wasser. Im Anschluss daran wurde ¼ des Volumens der Lösung an *Lysispuffer+(2)* zugeben und 14 µl β-ME pro 10 ml Lösung. Die Mischung wurde gevortext und 6 x 30 sec auf Eis geschallt (Branson Sonifier B15, Stufe 7, Zyklus 80 %). Um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen, wurde die Suspension für 30 min bei 15000 rpm in einem JA17 Rotor bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde weiter für die Aufreinigung verwendet.

3.2.5.3 Proteinreinigung mittels FPLC Ni-NTA Säulen

Für die Aufreinigung des exprimierten Proteins wurde eine Ni-NTA Säule (5 ml) bei einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min für mindestens 10 min mit Puffer *Lys* equilibriert. Im Anschluss daran wurde der Überstand aus 3.2.5.2 mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die ganze Zeit über wurde über einen Detektor die Absorption bei ca. 280 nm registriert und über einen Schreiber mit einer Geschwindigkeit von 5mm/min dargestellt. Nach dem Aufbringen der Probe auf die Säule wurde die Säule bei einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min zuerst für 10 min mit *Puffer Lys* und anschließend für 40 min mit *Puffer Wash*^{1/2} gespült. Nach 5 min Waschen mit *Puffer Wash*¹ wurde das Protein mit 50 ml *Puffer Elu* eluiert. Von den letzten Waschfraktionen und von den Elutionsfraktionen wurden jeweils 5 µl entnommen und mit 10 µl *SDS-Probenpuffer* versetzt, um mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.1) analysiert zu werden.

3.2.5.4 Ultrafiltration

Die das gewünschte Protein enthaltenden Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration durch Zentrifugation bei 4000 g mit einer 15 ml Amicon Ultra-15 Ultrafiltrationseinheit und einem Ausschlussvolumen von 3 kDa eingeeengt. Anschließend wurde die Proteinlösung in der Ultrafiltrationseinheit mit *TEV-Spaltpuffer* versetzt und wiederum eingeeengt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der NaCl Gehalt der Proteinlösung rechnerisch unter 2 mM lag.

Die Proteinlösung wurde in ein 3 ml Röhrchen gefüllt und auf ca. 3 ml mit *TEV-Spaltpuffer* aufgefüllt. Die Konzentration der Proteinlösung wurde dann mittels Absorptionmessung bei 280 nm bestimmt und eine Probe für die spätere Analyse aufbewahrt.

3.2.5.5 Proteolytische Abspaltung des N-terminalen tags

Um die benötigte Menge an AcTEVTM-Protease für die Spaltungsreaktion zu berechnen, wurde angenommen, dass 1 U AcTEVTM-Protease 3 µg Substrat pro h spalten kann. Somit kann 1 µl (10 U) AcTEVTM-Protease in 72 h 2,16 mg Substrat spalten. Die Menge an AcTEVTM-Protease wurde so berechnet, dass nach 72 h die gesamte berechnete Menge des aufgereinigten Proteins gespalten vorliegen müsste. Um die Probe vor Oxidation zu schützen, wurde die Luft in dem Spaltungsgefäß durch CO₂ ersetzt und die Probe dann bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss leicht schüttelnd inkubiert.

Um die Spaltung zu verfolgen, wurde alle 24 - 48 h je 1µl Probe entnommen, mit 19 µl H₂O und 20 µl *SDS-Probenpuffer* versetzt und mittels SDS-PAGE (3.2.1) analysiert.

3.2.5.6 Aufreinigung mittels Reverse-Phase-HPLC

Nach der Spaltung lag das gewünschte C-terminale Fragment meist als schwerlöslicher Niederschlag am Boden des Spaltgefäßes vor. Um es vom Überstand zu trennen, wurde die Probe für 5 min bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Das Sediment wurde mit System A und wenigen μl 6 M GuHCl versetzt und mittels Ultraschall gelöst. Das gelöste Sediment und der Überstand aus der Spaltung wurden dann separat über die HPLC –Säule aufgereinigt.

Für die chromatographische Trennung wurde eine präparative C4-Reprosil 300 Säule verwendet und ein Gradient aus ACN und H_2O , wobei beide Systeme 0,05 % TFA enthielten. Gestartet wurde mit einem Gradienten von 30 % System B auf 60 % System B in 30 min. Je nach aufzureinigendem Protein wurde der Gradient jedoch angepasst.

Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule für 8 min mit 30 % *System B* equilibriert und 700 μl der Probe durch Zugabe von 100 μl *System A* angesäuert. Mittels eines Fraktionssammlers wurden in dem erwarteten Elutionsbereichs des gewünschten Proteins 2 ml Fraktionen gesammelt. Die relevanten Fraktionen wurden mittels MALDI-MS auf ihre Reinheit hin untersucht. Zwischen den Läufen wurde die Säule für 3 min mit 100 % *System B* gespült.

3.2.5.7 Lyophilisation

Die für rein erachteten Fraktionen aus 3.2.5.6 wurden vereinigt und der ACN Anteil durch Zugabe von H_2O auf unter 50 % eingestellt. Die Lösung wurde für mind. 12 h auf $-70\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und über mehrere Tage lyophilisiert. Die lyophilisierten Proben wurden in ein Schnappdeckelglas abgewogen und eine kleine Probe nochmals per MALDI-MS überprüft (siehe 3.3.1).

3.3 Biophysikalische Methoden

3.3.1 Reinheitsbestimmung der exprimierten Proteine mittels MALDI-TOF

Die exprimierten und aufgereinigten Proteinfragmente wurden nach dem Lyophilisieren mit einem MALDI-TOF-TOF (matrix assistant laser desorption ionization – time of flight - time of flight) Massenspektrometer im Massenbereich 2000 bis 20000 Da von Barbara Bettin im Linearmodus gemessen. Dazu wurde ein kleiner Teil der lyophilisierten Probe in 3 µl ACN aufgelöst und davon 1 µl mit 1 µl 2,5 % mit TFA gesättigter α -Cyano-4-hydroxymizsäure (HCCA) auf einem Goldtarget gemischt. Anschließend wurden die Spektren der Proben mit der Auswertesoftware *flexanalysis 3.3* auf ihre Reinheit, eine erfolgreiche $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ Markierung und eventuelle Oxidationen des Proteins untersucht. Die MALDI-Spektren der aufgereinigten Proteine sind unter 6.3 zu sehen.

3.3.2 Zirkulardichroismus-Messungen (CD)

3.3.2.1 Herstellung von Mizellen für die CD-Messung

Für die Herstellung der Mizellen in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 wurde für SDS und DPC eine Konzentration von 10 mM verwendet, wobei die verwendete Konzentration über der kritischen Mizellenkonzentration des jeweiligen Detergenzes lag [56, 57]. Das verwendete Protein/Detergenzverhältnis betrug 1:600.

3.3.2.2 Herstellung von Vesikeln für die CD-Messung

Für die Herstellung der Vesikel wurden die lyophilisierten Lipide in einem Chloroform/Methanol Gemisch (50:50) gelöst, so dass eine 7 mM Lipidstammlösung entstand. Aliquots dieser Stammlösung oder Lösungen mit verschiedenen Lipiden wurden in einem Glasgefäß gemischt und die organischen Lösemittel anschließend unter einem leichten Stickstoffstrom entfernt. Um restliches Lösemittel vollständig zu entfernen, wurden die Proben über Nacht im Vakuum gelagert. Der Lipidfilm, der sich an der Glaswand gebildet hatte, wurde durch Zugabe von 200 µl *Phosphatpuffer* unter starkem Vortexen homogenisiert. Um die Lipide zu lösen, wurden 7 Gefrier-Tau-Zyklen angewandt, wobei zwischen den Zyklen die Probe für jeweils 1 min gevortext wurde. Anschließend wurde die Probe für 4 min in einem Ultraschallbad inkubiert, um aus den multilaminaren Vesikeln unilaminare Vesikel zu generieren. Der Ultraschallschritt wurde dreimal wiederholt, wobei zwischenzeitlich das Ultraschallbad durch Eiszugabe auf Raumtemperatur abgekühlt wurde.

Für die Herstellung der Bizellen wurden die jeweiligen Verhältnisse von DMPC und DHPC so eingewogen, dass durch Zugabe von 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 eine Bizellenlösung mit einer Konzentration von 1,1 mg/ml entstand. Dazu wurde zuerst die entsprechende Menge an DHPC durch

eine Ultraschallbehandlung in dem Phosphatpuffer gelöst und anschließend das abgewogene DMPC hinzugegeben und wiederum gelöst. Das Protein Lipidverhältnis betrug bei den Messungen 1:100.

3.3.2.3 CD-Messung

Die zu messenden lyophilisierten Peptide (siehe 3.2.5) wurden abgewogen und in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst, so dass eine Stammlösung mit einer Konzentration zwischen 66 und 200 μM entstand.

Um die Proben für die CD-Messung herzustellen, wurde ein Teil der Probenstammlösung in die verschiedenen Messlösungen gegeben, so dass die Endkonzentration der Probe zwischen 13 und 40 μM betrug. Bei den Messungen mit den gemäß Abschnitt 3.3.2.2 generierten Vesikeln betrug die Endkonzentration der Probe in der Vesikellösung ungefähr 15 - 75 μM , damit ein Protein/Lipidverhältnis von 1:100 erreicht werden konnte. Hierbei betrug die Lipidkonzentration 1,5 mM.

Die CD-Spektren wurden mit einem J-815 Spektropolarimeter (Jasco) aufgenommen, wobei die Messung in einer Quarzküvette (Suprasil) mit einer Schichtdicke von 1 mm stattfand. Die Spektren wurden in einem Intervall zwischen 260 und 185 nm in 0,1 nm Schritten aufgenommen. Die Messtemperatur bei Messungen mit Vesikeln betrug 30 °C, um deutlich über der Phasenübergangstemperatur der eingesetzten Lipide von 23 °C zu liegen. Die restlichen Messungen fanden bei 25 °C statt. Es wurden drei Messungen für jede Probe mit einer Messrate von 10 nm/min, einer Detektor-„Responsezeit“ von 8 sec und einer spektralen Bandbreite von 1 nm durchgeführt. Die Werte der drei Messungen wurden anschließend gemittelt und das zuvor bereits gemessene Hintergrundspektrum des Phosphatpuffers abgezogen. Zusätzlich wurden die Spektren mit der *Jasco Spectra Analysis* Software geglättet.

Um die mittlere molare Elliptizität (MRE) pro Aminosäurerest zu berechnen, wurde die Konzentration der Peptidstammlösung durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Dazu wurde das Spektrum der Probe in einem Bereich von 340 bis 240 nm in einer Halbmikroquarzküvette mit einer Schichtdicke von 1cm gemessen und von diesem das Hintergrundspektrum abgezogen. Für die Konzentrationsbestimmung wurde nach der Korrektur der Basislinie die Absorption bei 280 nm bestimmt und die Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Dazu wurde der Extinktionskoeffizient aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der aromatischen Aminosäuren Tyr und Trp berechnet, die das jeweilige Peptid beinhaltete, wobei für Tyr ein Extinktionskoeffizient von 1490 $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und von Trp ein Extinktionskoeffizient von 5500 $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angenommen wurde [58].

3.3.2.4 Auswertung der CD-Messungen

3.3.2.4.1 Qualitativ (Spektrenform)

Um eine qualitative Bewertung der Spektren vornehmen zu können, wurden die erhaltenen Spektren auf ihren höchsten Messwert normiert, damit die Form der Spektren verglichen werden konnte. Dies wurde hauptsächlich bei Proben angewandt, bei denen keine genaue Konzentrationsbestimmung erfolgen konnte und somit auch keine Berechnung der Sekundärstruktur. Aus der Lage und Stärke der Minima und Maxima konnte dann der helikale Faltungsanteil abgeschätzt werden.

3.3.2.4.2 Quantitativ

Für die Quantitative Auswertung wurden drei verschiedene Vorhersagealgorithmen verwendet, die auf unterschiedlichen mathematischen Methoden beruhen und vom *DICHROWEB* Onlineserver zur Verfügung gestellt werden [59, 60].

- CDSSTR: Singulärwertzerlegung [61]
 CONTIN-LL: *ridge regression* (lokale Linearisierung) [62]
 SELCON-3: Anfangswerte mittels Singulärwertzerlegung (CDSSTR); selbstkonstituierendes Feld [63]

Um die Qualität der Vorhersagen zu beurteilen, wurden zwei Kriterien betrachtet. Zum einen musste die Summe der vorhergesagten Sekundärstrukturelemente zwischen 98-102% liegen. Zum anderen musste die mittlere Standardabweichung zwischen realem und rekonstruiertem Spektrum für CONTIN-LL und CDSSTR unter 0,1 liegen und bei SELCON-3 unter 0,25. Wenn beide Kriterien erfüllt waren, wurde die Vorhersage als gut bewertet und für die weiteren Berechnungen berücksichtigt. Andernfalls wurde die Sekundärstrukturvorhersage als unzuverlässig eingeschätzt und nicht weiter verwendet. Für die Darstellung des vorhergesagten Helixanteils im jeweiligen Peptid wurden die Werte für den helikalen Anteil aus den verschiedenen gültigen Vorhersagen gemittelt und die Standardabweichung der Messwerte berechnet.

3.3.2.5 Orientierte Zirkulardichroismus Messungen (OCD)

Für die OCD-Messungen wurden ca. 100 - 150 µl der wässrigen Vesikeldispersion aus Peptid/Lipidgemisch (vgl. 1.1.1.1) auf runde Quarzglasplättchen mit 20 mm Durchmesser aufgetropft, so dass zentral ein ca. 12 mm großer runder Bereich mit der Peptid/Lipid-Mischung bedeckt wurde, welche maximal ca. 15µg Protein und 200 µg Lipid enthielt. Die wässrige Dispersion wurde mittels eines leichten Luftzugs im Abzug getrocknet. Vor der Messung wurde die getrocknete Probe für 15h in einem Gefäß gelagert, in dem 98% Luftfeuchtigkeit herrschten, um sie zu rehydratisieren. Die 98% Luftfeuchtigkeit wurde durch Gegenwart einer gesättigten K_2SO_4 Lösung bei 30°C eingestellt. Nach dem Einbau der Quarzglasplättchen in die speziell im IBG-2 des KIT entwickelte OCD-Probenkammer [49] wurde die Probe bei 30°C und 98% Luftfeuchtigkeit gemessen. Um Probenartefakte durch Lineardichroismus oder Doppelbrechung auszuschließen bzw. zu minimieren, wurde die Probe nach jeder Messung (Dreifachbestimmung) über eine Rotationsbühne um jeweils 45° gedreht, so dass Messdaten aus 8 verschiedenen Winkeln erhalten werden konnten, die anschließend gemittelt wurden. Für die Messung wurde ein J-810 CD-Spektropolarimeter (Jasco) verwendet. Das Spektrum wurde in einem Intervall zwischen 260 und 180 nm in 0,1 nm Schritten aufgenommen, wobei die Messgeschwindigkeit 10 nm/min, die „Responsezeit“ des Detektors 8 sec und die spektrale Bandbreite 1 nm betrug.

Die Spektren werden üblicherweise nur qualitativ ausgewertet, wobei die erhaltenen Spektren oft auf den Minimum-Elliptizitätswert der α -Helix bei ~222 nm normiert werden, damit die Form der Spektren und das Verhältnis der Elliptizitätswerte bei 208 und 222 nm verglichen werden können. Da die Intensität des Elliptizitätsminimums bei ca. 208 nm eine Aussage über die Orientierung der Helix zulässt, wurde dieser Wert für die Analyse herangezogen.

3.3.3 Kernmagnetresonanz Messungen (NMR)

3.3.3.1 Probenvorbereitung für die NMR-Messung

Für die NMR-Messungen wurde eine 200 mM DHPC/DMPC Mizellen (160:40) Lösung verwendet, mit einem Protein:Lipidverhältnis von 1:222.

Hierzu wurde die entsprechende Menge an DHPC in 450 μ l *NMR-Messpuffer* durch Vortexen und eine Behandlung mit Ultraschall gelöst. Nach dem Lösen wurde die entsprechende Menge an DMPC hinzugefügt und wiederum für mehrere Minuten in einem Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurden 0,5 μ mol der lyophilisierten Probe (siehe 3.2.5) und 50 μ l D₂O hinzugegeben und erneut beschallt. Nichtlösliche Bestandteile wurden durch kurze Zentrifugation sedimentiert und die erhaltene Lösung in ein NMR-Messröhrchen gefüllt.

3.3.3.2 NMR-Messung

Die NMR Experimente wurden entweder mit einem *Bruker Avance I* 600 MHz Spektrometer, mit einem Breitband Dreifachresonanz TBI Probenkopf oder mit einem *Bruker Avance III* 600 MHz Spektrometer mit einem Kryoprobenkopf (CP-TCI) und Z Gradienten von Dr. Claudia Muhle-Goll (KIT) aufgenommen. Die ¹⁵N-HSQC-Spektren wurden normalerweise mit 2 - 4 Scans und 128 Inkrementen in der indirekten Dimension in einem Konzentrationsbereich von 300 μ M bis 1 mM und in einem Temperaturbereich zwischen 23 und 50°C durchgeführt. ¹⁵N-HSQC-NOESY Spektren wurden mit Mischzeiten von 120 ms bei 23 °C aufgenommen. ¹⁵N-HSQC-TOCSY Spektren wurden mit einer Mischzeit von 60 ms und normalerweise 200-250 Inkrementen in der ¹H Dimension und 55 Inkrementen in der ¹⁵N Dimension aufgenommen.

Die Identifizierung der ¹H_N, ¹³C und ¹⁵N Atome wurde mittels Standard Dreifachresonanz Experimenten (HNCACB, HNCA, CBCA(CO)NH) bei 23°C durchgeführt.

3.3.3.2.1 CLEANEX-PM-Pulssequenz

Um festzustellen, ob sich eine Aminosäure in der Bizellenmembran oder im Puffer befindet, kann der Kontakt der Aminosäure mit Wasser gemessen werden. Dazu sind NOESY- oder auch ROESY-Experimente geeignet, da beide Experimente eine wichtige Quelle für Informationen über den Wasserkontakt der Aminosäure darstellen. Sie liefern zum einen Information über den chemischen Austausch zwischen den Lösemittelprotonen und schwach gebundenen Protonen im Protein und zum anderen Informationen über intermolekulare NOE-Signale zwischen gebundenem Wasser und den Makromolekülen. Sie haben jedoch einige Nachteile, da zum einen der schnelle Protonenaustausch z.B. zwischen Amidprotonen zu NOE/ROE-Wechselwirkungen führt, wodurch Artefakte im Spektrum entstehen können. Zum anderen zeigen die C α -H-Protonen eine ähnliche chemische Verschiebung wie die Wasserprotonen, so dass sie sich kaum von den Signalen in Folge eines Wasserkontaktes unterscheiden lassen. Somit sind diese Methoden nur eingeschränkt für eine Bestimmung des Wasserkontaktes der Amidprotonen geeignet. Um einen Wasserkontakt der NH Bindung ohne diese Nachteile bestimmen zu können, wurde die Pulssequenz CLEANEX-PM verwendet [64]. Sie erlaubt

eine quantitative Bestimmung der Wasser-Amid-Protonenaustauschrates, da Kreuzpeaks und intramolekulare NOE eliminiert werden. Zusätzlich erfolgt eine Messung als 2D HSQC-Spektrum, wodurch die Messzeit signifikant verkürzt werden kann. Dadurch ist zusätzlich ein direkter Vergleich zwischen einem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum, in dem alle NH-Bindungen zu sehen sind und einem CLEANEX-PM-HSQC möglich, in dessen Spektrum nur die NH-Bindungen mit Wasserkontakt auftauchen.

3.3.3.2 Relaxationsmessungen

Die ^{15}N longitudinalen (R1) und transversalen Relaxationszeiten (R2) sowie der heteronukleare NOE (Het-NOE) wurden bei 27°C gemessen. Die eingesetzten Zeitabschnitte zur Messung von R1 variierten zwischen 10,8 und 3466,8 ms und von R2 zwischen 14,4 und 259,2 ms. Dabei wurde mit je zwei Werten eine Doppelbestimmung durchgeführt, um Instabilitäten erkennen zu können. Der heteronukleare NOE wurde als Verhältnis der Signalintensität der $\text{H}_\text{N}/\text{N}$ -Kreuzpeaks mit und ohne ^1H Sättigung bestimmt. Alle Messungen wurden ineinander verschachtelt aufgenommen. Das Wassersignal wurde mit Hilfe einer Kombination aus „Water-flip-back“ und WATERGATE Pulssequenz in allen Messungen unterdrückt.

3.3.3.3 NMR-Auswertung

Die Rohdaten aller Messungen wurden mit Hilfe des Programms *NMRPipe* prozessiert und mit dem Programm *NMRView* betrachtet und ausgewertet.

Um die Amid-Wasser-Protonenaustauschrates bestimmen zu können, wurde die für die jeweilige NH-Gruppe gemessene Intensität im CLEANEX-Spektrum mittels *NMRView* bestimmt und durch die Intensität des zugehörigen HSQC-Spektrums Peaks geteilt.

4.0 Ergebnisse

4.1 Analysen der Lipidinteraktion des E^{rns}-Ankers

In vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass E^{rns} in einer Säugerzelle membrangebunden vorliegt und dass die Membranbindung durch eine C-terminal liegende Sequenz verursacht wird [38]. Ein definiertes *in vitro* System wurde verwendet, um die Eigenschaften dieser Aminosäuresequenz näher zu untersuchen. Im Folgenden wird diese Sequenz als E^{rns}-Anker bezeichnet. Um Messungen zur Lipidbindung des E^{rns}-Ankers durchführen zu können, wurde ein Fusionskonstrukt verwendet, bei dem der E^{rns}-Anker über eine TEV-Schnittstelle mit einem Z2-„tag“ fusioniert wurde [65, 66]. Der schematische Aufbau dieses Konstruktes ist in Abbildung 18 gezeigt. Der Z2-tag wurde dabei verwendet, um zum einen das gewünschte Fusionsprotein über dessen His-Tag aufzureinigen zu können und zum anderen, um die Löslichkeit des E^{rns}-Ankers zu erhöhen. Die TEV-Schnittstelle wurde verwendet, um die beiden Domänen nach der Reinigung voneinander trennen zu können. Somit kommt das verwendete Fusionskonstrukt dem natürlichen Aufbau des E^{rns}-Proteins relativ nahe, da es auch aus einer löslichen N-terminalen Domäne besteht, die über einen unstrukturierten Bereich mit dem C-terminalen Anker verknüpft ist.

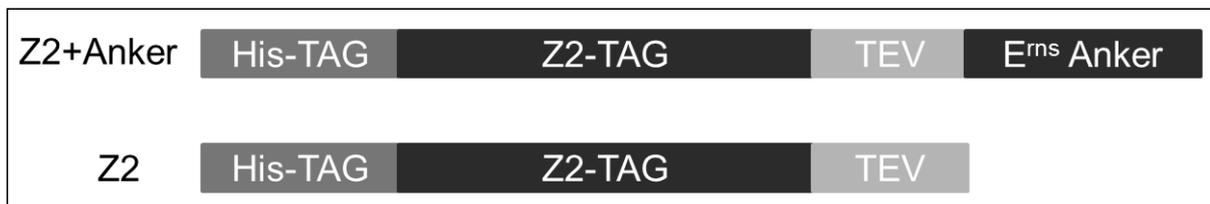


Abbildung 18: Schematische Darstellung des für die Lipidbindungsstudien verwendeten Konstruktes

Das Konstrukt Z2-Anker enthält am N-Terminus einen Hexa-Histidin-tag (His), der für die Aufreinigung verwendet wurde. Der His-tag wurde an einen Z2-tag (einzelne Z-Domäne aus Staphylococcal-Protein A) fusioniert, um die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen. Auf den Z2-tag folgt eine Tobacco-Etch-Virus (TEV) Erkennungssequenz, die den E^{rns}-Anker vom Z2-tag räumlich trennt. Am C-Terminus befindet sich der E^{rns}-Anker bzw. das jeweils zu untersuchende Konstrukt. Um eine mögliche Lipidinteraktion des N-terminalen tags messen zu können, wurde ein Kontrollkonstrukt verwendet (Z2), das mit Ausnahme des E^{rns}-Ankers alle Komponenten des Z2-Anker Konstruktes enthält. (Sequenz siehe 6.1.2).

Die für die Lipidinteraktionsstudien verwendeten Proteine (siehe 2.7) wurden wie unter 3.2.4 beschrieben exprimiert und aufgereinigt. Nach einer Analyse der Reinheit der exprimierten Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.1) und anschließendem Western Blot (3.2.2) bzw. anschließender Coomassiefärbung (siehe 3.2.2) wurde die Konzentration der Proteine über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Im Anschluss wurde der Lipidinteraktionsassay wie unter 3.2.4.4 beschrieben durchgeführt.

Dabei wurde die Bindung der zu analysierenden Sequenz an verschiedene Vesikel getestet, indem nach einer kurzen Inkubationszeit eine Sedimentierung der Vesikel erfolgte und anschließend der gebundene und der nicht gebundene Anteil des Proteins über eine densitometrischen Auswertung der erhaltenen, coomassiegefärbten Gele bestimmt wurde. Anschließend wurde der prozentuale Anteil des Proteins im Sediment berechnet. Für jedes Protein wurde der Mittelwert aus mindestens drei separaten Experimenten gebildet und die jeweilige Standardabweichung berechnet.

4.1.1 Untersuchung der Lipidbindungsspezifität des E^{rns}-Ankers

4.1.1.1 Messung der Lipidspezifität des E^{rns}-Ankers

Um die Bindungsspezifität des E^{rns}-Ankers zu messen, wurden verschiedene Lipidgemische verwendet. Als Hauptlipid wurde dazu das in der Säugerzelle häufigste Lipid Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) verwendet, zu dem je 5 % eines anderen zellulären Lipids beigemischt wurde. Die verwendeten Lipide sowie deren Nettoladung sind unter 6.2 angegeben.

In Abbildung 19 ist die Bindung des E^{rns}-Ankers an Vesikel mit verschiedener Lipidzusammensetzung gezeigt. Man kann erkennen, dass die Bindung des E^{rns}-Ankers an DMPC-Vesikel (PC) relativ schwach ist, da nur eine leichte Erhöhung des Proteinanteils im Pellet im Vergleich zur Negativkontrolle (Puffer) ohne Lipide zu erkennen ist. Da DMPC nur zu einer leichten Bindung des E^{rns}-Ankers führte, wurde es auch für die folgenden Versuche als Hauptlipid verwendet. Der Z2-tag ohne den E^{rns}-Anker (Z2) bindet im Gegensatz zum Z2-tag mit dem E^{rns}-Anker nicht an Vesikel aus DMPC, da der Proteinanteil im Pellet im Puffer und in Gegenwart von DMPC-Vesikeln gleich ist. DMPC ist ein Zwitterion, das jeweils eine negative und eine positive Ladung trägt. Bei Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DMPE) ist dies auch der Fall. Der Unterschied zwischen diesen beiden Lipiden besteht in der Abschirmung der positiven Ladung, da bei DMPC im Gegensatz zu DMPE die positive Ladung durch die Methylgruppen abgeschirmt wird (Strukturformel siehe 6.2). In Abbildung 19 erkennt man, dass DMPC-Vesikel mit einem 5%igen Anteil an DMPE vom E^{rns}-Anker etwas schlechter gebunden werden können als reine DMPC-Vesikel. Somit führt die schlechtere Abschirmung der positiven Ladung von DMPC/DMPE-Vesikeln zu einer schlechteren Bindung des E^{rns}-Ankers.

Da der E^{rns}-Anker eine Gesamtladung von +2 besitzt, wobei die positive Ladung im C-terminalen Bereich konzentriert vorliegt, wurde die Bindung an verschiedene negativ geladene Lipide getestet. Dazu wurden die einfach negativ geladenen Lipide Dimyristoylphosphatidylglycerin (DMPG), L- α -Phosphatidylinositol (PI), Dimyristoylphosphat (DMPA) und Dimyristoylphosphatidylserin (DMPS) verwendet, die alle Bestandteile von natürlichen Zellmembranen sind. DMPA hat dabei von den genannten Lipiden die höchste Ladungsdichte, da der Phosphatrest nicht abgeschirmt wird.

PI hat im Gegensatz zu den anderen negativ geladenen Lipiden einen Inositolrest, der zusätzlich zur negativen Ladung des Phosphates zu einer starken Polarität der Lipidkopfgruppe führt. DMPG und DMPS sind in ihren Eigenschaften sehr ähnlich, wobei die Hydroxylgruppe des DMPS zu einer zusätzlichen leichten Polarisierung der Kopfgruppe führt. Die Ergebnisse der Bindungsfähigkeit des E^{rns}-Ankers an diese negativ geladenen Lipide sind in Abbildung 19 zu sehen. Dabei erkennt man, dass der E^{rns}-Anker an alle getesteten negativen Lipidmischungen sehr gut bindet, wobei die Interaktion mit DMPG am stärksten und die Bindung an PI am schwächsten ist.

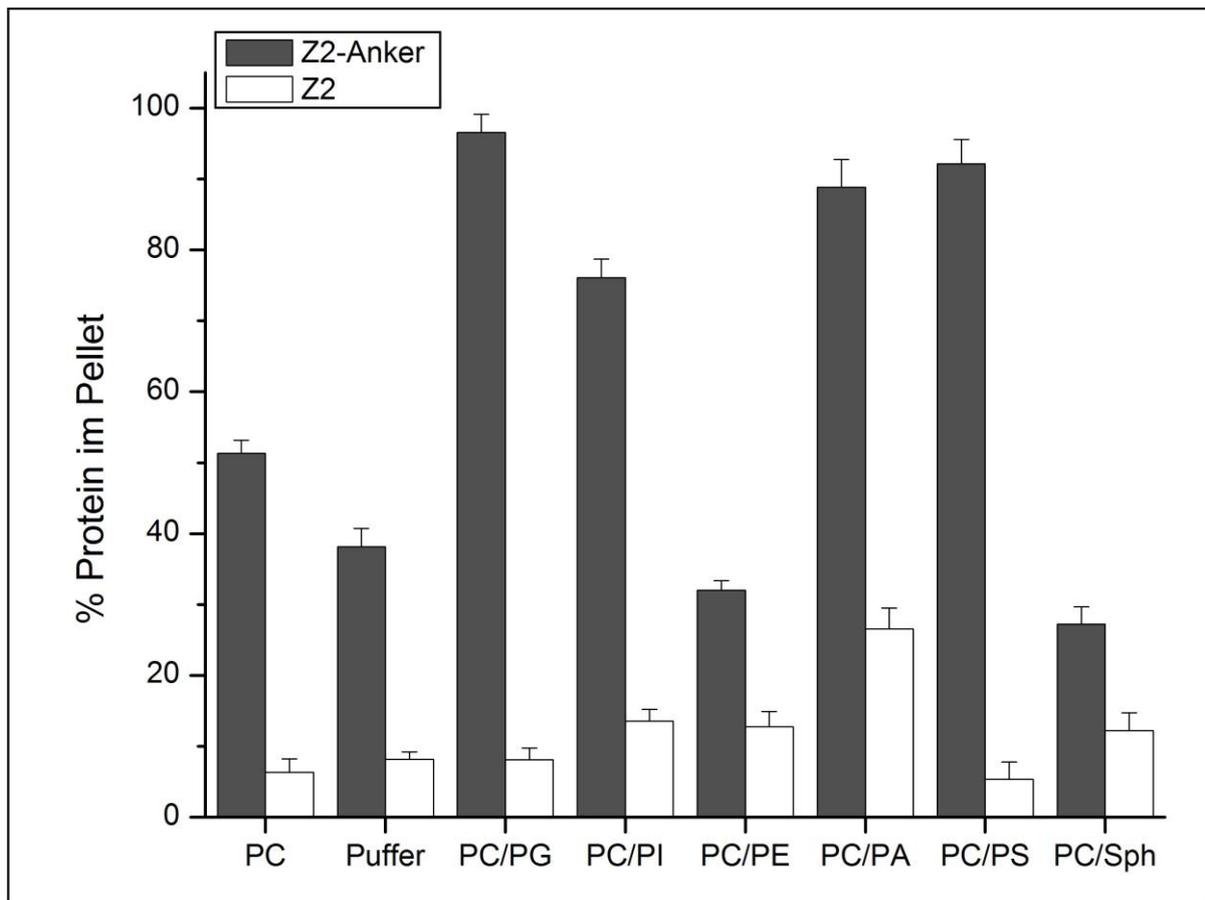


Abbildung 19: Bindung des E^{rns}-Ankers an verschieden zusammengesetzten Lipidvesikel

Die Lipidbindung des E^{rns}-Ankers (Aminosäure 167 - 227 des E^{rns}-Proteins; schwarzer Balken) wurde anhand verschiedener Vesikelsysteme untersucht. Um eine Bindung des N-terminalen tags auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle (weißer Balken), die keinen E^{rns}-Anker jedoch den Z2-tag enthält, analysiert. Als Systeme wurden Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie Systeme aus DMPC/DMPG (PC/PG), DMPC/PI (PC/PI), DMPC/DMPE (PC/PE), DMPC/DMPA (PC/PA), DMPC/DMPS (PC/PS) und DMPC/Sph (PC/Sph) verwendet. Als Kontrolle wurde ein System getestet, das nur aus Puffer bestand (Puffer) und keinerlei Lipide enthielt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Als letztes Lipid wurde das Sphingosin Sphingomyelin (Sph) getestet, welches in eine andere Klasse von Membranlipiden fällt und vor allem im Herzen vorkommt. Wie DMPC besitzt es eine Cholinkopfgruppe und ist somit ein Zwitterion. Abbildung 19 zeigt, dass die Bindung des E^{rns}-Ankers an Sph schlechter ist als die an reines DMPC.

Um auszuschließen, dass der N-terminale Z2-tag einen Einfluss auf die Lipidbindungseigenschaften des E^{rns}-Ankers hat, wurden die Experimente mit dem GB-Carrier Protein [67] als N-terminalen Fusionspartner anstatt der Z2-Domäne wiederholt (nicht gezeigt). Dabei konnte kein Unterschied zum Z2-tag gemessen werden, weswegen die weiteren Analysen mit dem Z2-tag als N-terminalen Fusionspartner des E^{rns}-Ankers durchgeführt wurden.

4.1.1.2 Zeitabhängigkeit der Lipidbindung

Um einen groben Überblick über die Zeitabhängigkeit der Lipidbindung des E^{rms} -Ankers zu bekommen, wurden Messungen bei drei verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt (30 sec, 5 min und 2 h).

In Abbildung 20 sieht man, dass bei den untersuchten Zeiten keine großen Unterschiede in den Lipidbindungseigenschaften des E^{rms} -Ankers auftraten. So ist zwischen den Werten 30 sec und 2 h in allen gemessenen Systemen kein Unterschied in der Bindungsstärke zu erkennen. Nur der 5 min Wert bei PC/PI-Vesikeln zeigte einen kleinen Abfall der Bindungsstärke. Da auch die Bindung des reinen Z2-tags mit der Zeit nicht zunimmt, kann man davon ausgehen, dass der E^{rms} -Anker sehr schnell an die Vesikel bindet und anschließend stabil gebunden bleibt bzw. das Gleichgewicht sehr stark auf der Bindungsseite liegt.

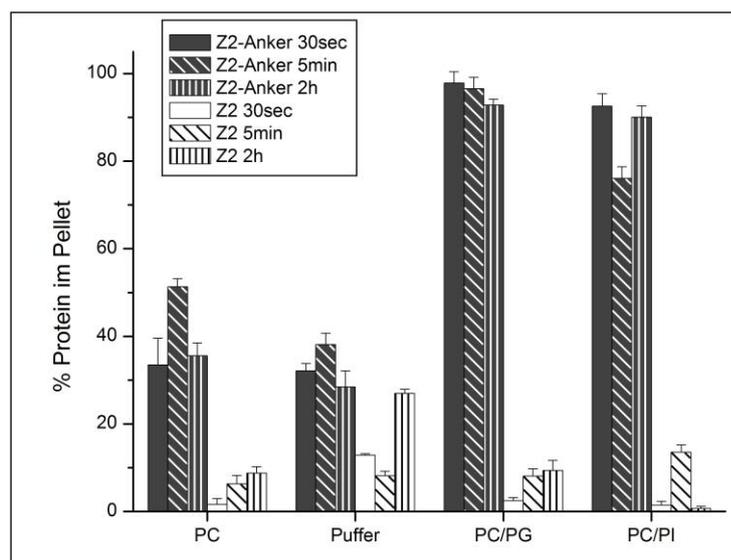


Abbildung 20: Zeitabhängigkeit der Lipidbindung

Messung der Kinetik der Lipidbindung des E^{rms} -Ankers (Z2-Anker ;schwarze Grundfläche) an reine DMPC-Vesikel (PC) und an Systeme aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PC/PI). Als Negativkontrolle für die Lipidspezifität der Bindung wurde mit reinem Puffer (Puffer) gearbeitet. Es wurden Inkubationszeiten von 30 sec, 5 min und 2 h analysiert. Als Negativkontrolle der Lipidbindung diente der N-terminale Z2-tag (Z2; weiße Grundfläche). Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

4.1.1.3 Temperaturabhängigkeit der Lipidbindung

Da die Fluidität und der Aufbau von Vesikeln sehr stark von der Temperatur abhängen, wurde der Einfluss der Temperatur auf die Lipidbindung des E^{rms} -Ankers untersucht. Dazu wurden die Lipidmischungen bei 4 °C, 20 °C oder 37 °C mit dem E^{rms} -Anker inkubiert und anschließend bei der jeweiligen Temperatur zentrifugiert. Die Daten sind in Abbildung 21 dargestellt. Die Bindung von reinem DMPC ist nicht temperaturabhängig, da bei allen gemessenen Temperaturen ein ähnlicher Proteingehalt in den Pellets gemessen werden konnte.

Auch die Bindung an DMPA und DMPS scheint temperaturinsensitiv zu sein, jedoch wurde die Kontrolle ohne den E^{rms} -Anker (Z2) bei beiden Lipiden bei 4 °C und 37 °C viel stärker gebunden als bei

20 °C. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Hauptanteil der Lipidbindung bei diesen Temperaturen durch den N-terminalen tag verursacht wurde und nicht durch den E^{rns}-Anker.

Bei Betrachtung der anderen zwei negativ geladenen Lipide DMPG und PI fiel auf, dass es auch dort bei 4 °C und 37 °C zu einer verstärkten Bindung des reinen Z2-tags kam. Dadurch wurde ein Teil der Bindung des E^{rns}-Ankers in diesen Lipiden und bei diesen Temperaturen durch den N-terminalen Z2-tag verursacht, weshalb die tatsächliche Bindung des E^{rns}-Ankers in diesen Systemen kleiner sein muss. Das Konstrukt mit dem E^{rns}-Anker zeigte aber bei DMPG die höchste Bindungseffizienz bei 20 °C, obwohl dort der N-terminale tag den kleinsten Proteinanteil im Pellet zeigte. Dadurch wurde deutlich, dass die Spezifität der Bindung bei dieser Temperatur höher ist als bei 4 °C oder 37 °C. Bei PI dagegen war die Bindung bei 20 °C leicht reduziert, was aber auch dort an der starken Bindung des N-terminalen Z2-tags an die Lipide bei diesen Temperaturen liegen könnte.

DMPE zeigte ein völlig anderes Bild. Während die Kontrollen bei allen drei Temperaturen kaum gebunden haben, zeigte der E^{rns}-Anker bei 4 °C eine sehr starke Bindung. Auch bei Sph war die Bindung bei 4 °C am stärksten.

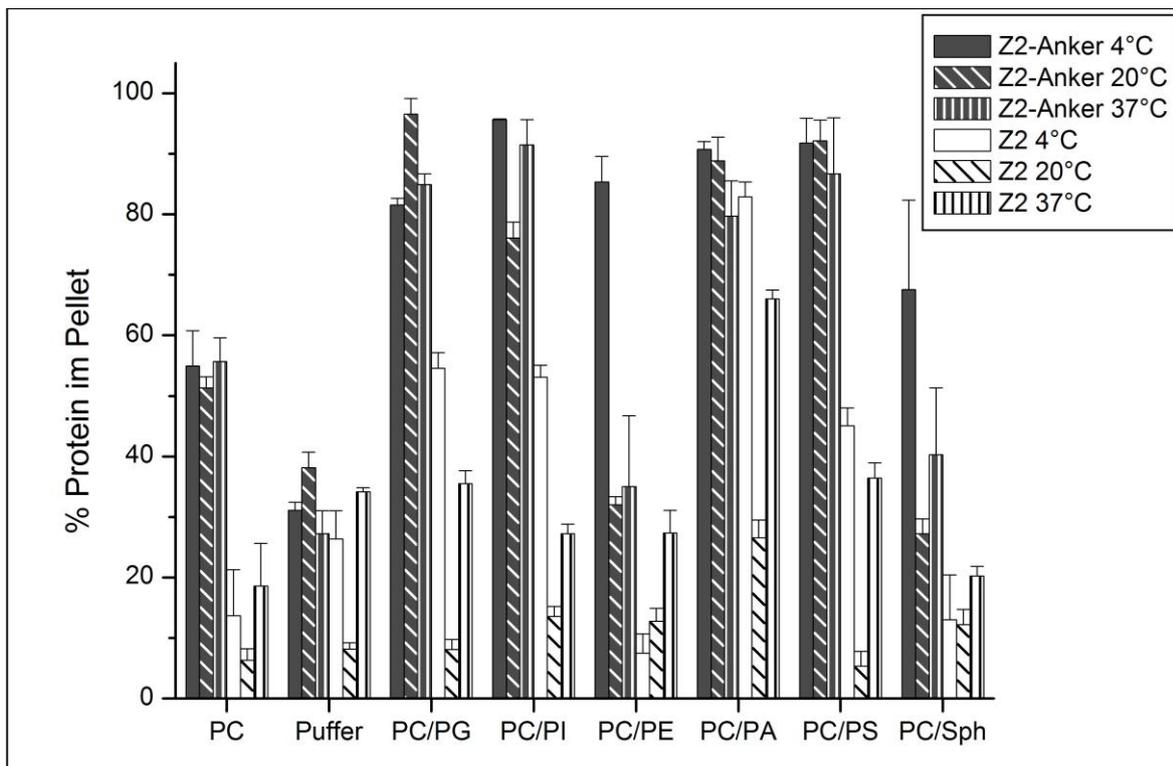


Abbildung 21: Temperaturabhängigkeit der Lipidbindung

Messung der Temperaturabhängigkeit der Lipidbindung des E^{rns}-Ankers (Z2-Anker; Balken mit schwarzer Grundfläche) bei 4 °C, 20 °C und 37 °C in verschiedenen Vesikelsystemen. Um eine Aussage zum Beitrag des N-terminalen tags zur Bindung machen zu können, wurde eine Negativkontrolle (Z2; Balken mit weißer Grundfläche) analysiert, die keinen E^{rns}-Anker jedoch den N-terminalen Z2-tag enthielt. Als Systeme wurden Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie Systeme aus DMPC/DMPG (PC/PG), DMPC/PI (PC/PI), DMPC/DMPE (PC/PE), DMPC/DMPA (PC/PA), DMPC/DMPS (PC/PS) und DMPC/Sph (PC/Sph) verwendet. Als Kontrolle wurde ein System getestet, das nur aus Puffer bestand (Puffer) und keinerlei Lipide enthielt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Beim Vergleich der verschiedenen Temperaturen fiel auf, dass bei 4 °C fast alle Lipide gebunden werden und bei 20 °C am wenigsten. Eine Ursache der stärkeren Bindung bei 4 °C könnte die Versteifung der Membran sein. Um dies zu testen, wurde in späteren Versuchen Cholesterin zu den Vesikeln hinzugeben, um die Fluidität der Vesikelmembranen zu reduzieren. Die generell stärkere Bindung des Z2-tags bei 37 °C im Vergleich zu den niedrigeren Temperaturen könnte an der Überschreitung der Phasentemperatur der Lipide (ca. 23 °C) liegen. Bei Temperaturen oberhalb der Phasenübergangstemperatur sind mehr freie nicht vesikelassoziierte Lipide vorhanden, die als Detergenz wirken können. Das Protein könnte dadurch stärker an die Lipide gebunden werden, da die intramolekularen Wechselwirkungen geschwächt und somit Proteinaggregate aufgelöst werden könnten.

4.1.1.4 Einfluss der Lipidfluidität

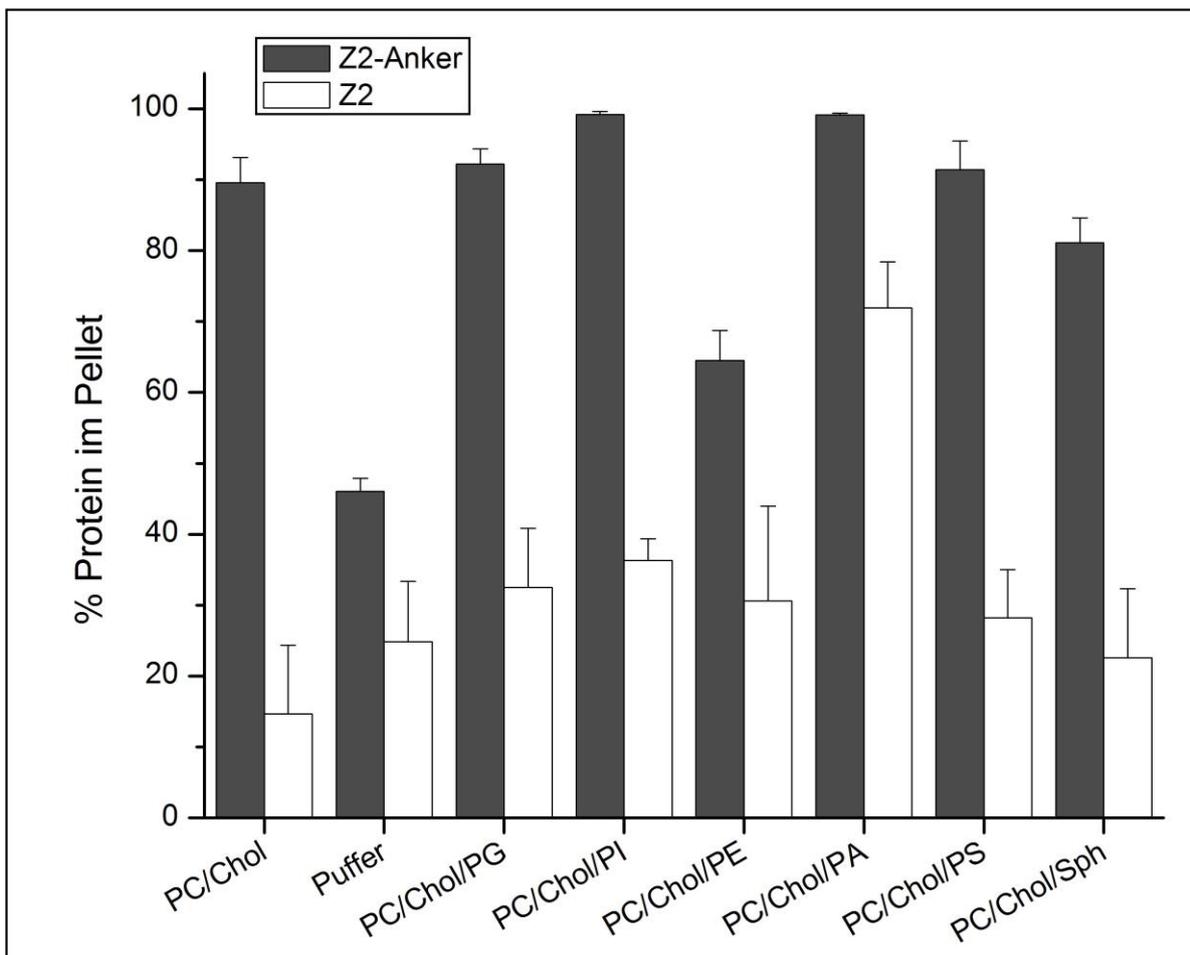


Abbildung 22: Einfluss der Lipidfluidität auf die Lipidbindung des E^{ms}-Ankers

Durch Zugabe von Cholesterin (Chol) wurden Vesikel aus DMPC/Chol (PC/Chol) sowie aus DMPC/Chol /DMPG (PC/Chol/PG), DMPC/Chol/PI (PC/Chol/PI), DMPC/Chol/DMPE (PC/Chol/PE), DMPC/Chol/DMPA (PC/Chol/PA), DMPC/Chol/DMPS (PC/Chol/PS) und DMPC/Chol/Sph (PC/Chol/Sph) hergestellt und anschließend die Bindung des E^{ms}-Ankers (schwarzer Balken) sowie des Kontrollkonstrukts ohne E^{ms}-Anker (weißer Balken) analysiert. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Um den Einfluss der Membranfluidität auf die Lipidbindung des E^{rns} -Ankers zu testen, wurden Vesikel aus Lipiden mit 5%igem Cholesterinanteil (Chol) hergestellt. Das Cholesterin lagert sich zwischen der Lipiddoppelschicht ein und verringert ihre Flexibilität. Dadurch versteift die Membran und die Fluidität sinkt. In Abbildung 22 ist das Ergebnis der Messung dargestellt. Man erkennt, dass durch die Zugabe von Cholesterin der E^{rns} -Anker zu fast 90% an die reinen DMPC-Vesikel gebunden hat, wohingegen das Kontrollkonstrukt mit dem Z2-tag nur zu 15% gebunden hat. Durch die starke Bindung an reine DMPC/Chol Vesikel erklärt sich, dass der E^{rns} -Anker auch an alle anderen getesteten Lipidmischungen sehr gut gebunden hat. Überraschenderweise führte aber die Zugabe von DMPE zu einer geringeren Bindungsfähigkeit des E^{rns} -Ankers an die Vesikel als an reine DMPC/Chol Vesikel. Dieser Effekt könnte auf der unterschiedlichen Ladungsabschirmung der beiden zwitterionischen Lipide beruhen. Die starke Bindung an cholesterinhaltige Vesikel kann zum einen auf einer veränderten Form der Vesikel beruhen. Zum anderen kann sie aber auch in der höheren Stabilität der Vesikel begründet sein, aufgrund welcher die Vesikel durch die Zentrifugation nicht beeinträchtigt werden. Dadurch könnte mehr Protein haften bleiben.

4.1.1.5 Einfluss von mehrfach negativ geladenen Lipiden

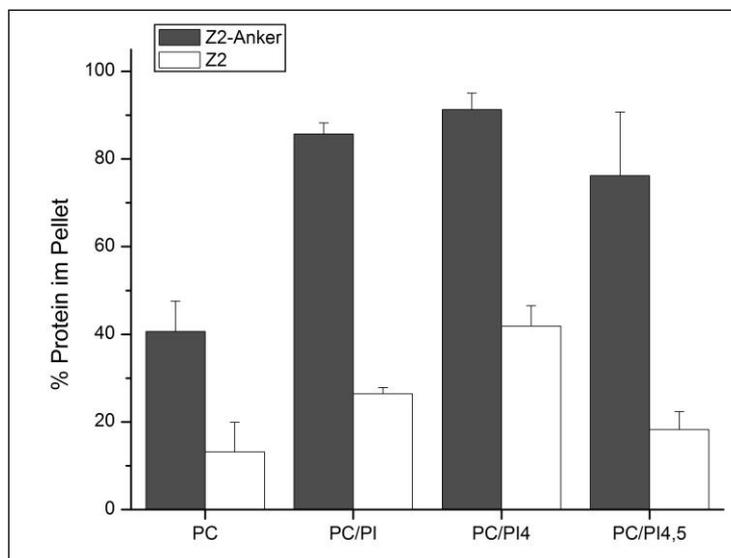


Abbildung 23: Mehrfach negativ geladene Lipide

Die Lipidbindung des E^{rns} -Ankers (schwarzer Balken) sowie des Kontrollkonstruktes ohne E^{rns} -Anker (weißer Balken) wurden in Vesikel bestehend aus DMPC/PI (PC/PI), DMPC/PI-4 (PC/PI4) und DMPC/PI-4,5 (PC/PI4,5) analysiert. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Wie unter 4.1.1.1 festgestellt wurde, bindet der E^{rns} -Anker an einfach negativ geladene Lipide. Um zu testen, ob eine Erhöhung der Lipidladung zu einer Verbesserung der Lipidbindung führt, wurde das zweifach negativ geladene Dimyristoylphosphatidylinositol-4-phosphat (PI4) und das dreifach negativ geladene Dimyristoylphosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI4,5) verwendet. Bei beiden Lipiden wurde durch die Phosphorylierung einer oder zweier Hydroxylgruppen des Inositols eine zusätzliche negative Ladung eingefügt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Man erkennt, dass die zusätzlichen negativen Ladungen der verwendeten Lipide zu keiner Verstärkung der Lipidbindung des E^{rns} -Ankers führten.

4.1.1.6 Einfluss von Mizellen auf die Lipidbindung

Da eine Bindung des E^{rns} -Ankers an negativ geladene Vesikel gemessen werden konnte, sollte anschließend analysiert werden, ob der E^{rns} -Anker auch eine Bindung zeigt, wenn die Lipide nicht in Vesikeln angeordnet sind, sondern wesentlich einfacher strukturierte Mizellen ausbilden. Dazu wurde die Bindung des E^{rns} -Ankers an negativ geladene SDS Mizellen untersucht. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 24 dargestellt. In reinem SDS war keine Bindung des E^{rns} -Ankers an die Mizellen detektierbar. Bei einer Mischung von 95 % DMPC und 5 % SDS war jedoch ein kleiner Unterschied in der Bindung zwischen dem Z2-tag mit und ohne E^{rns} -Anker messbar. Diese Bindung des E^{rns} -Ankers an die Vesikelmischung war jedoch nicht sehr ausgeprägt. Bei einer Erhöhung des SDS Verhältnisses auf 20 % war jedoch keine signifikante Bindung mehr messbar. Um eine Bindung des E^{rns} -Ankers an SDS-haltige Vesikel zu induzieren, wurde zu diesem System 5 % DMPG hinzugegeben, da Mischungen aus DMPC und DMPG eine starke Bindung des E^{rns} -Ankers zeigten (vgl. Abbildung 19). In diesem System aus 75%DMPC/20%SDS/5%DMPG zeigte der E^{rns} -Anker nun zwar eine signifikant stärkere Bindung als das Kontrollkonstrukt, jedoch war diese Bindung deutlich schwächer als die an reine DMPC/DMPG-Vesikel. Somit führen negativ geladen Mizellen zu keiner verstärkten Bindung des E^{rns} -Ankers.

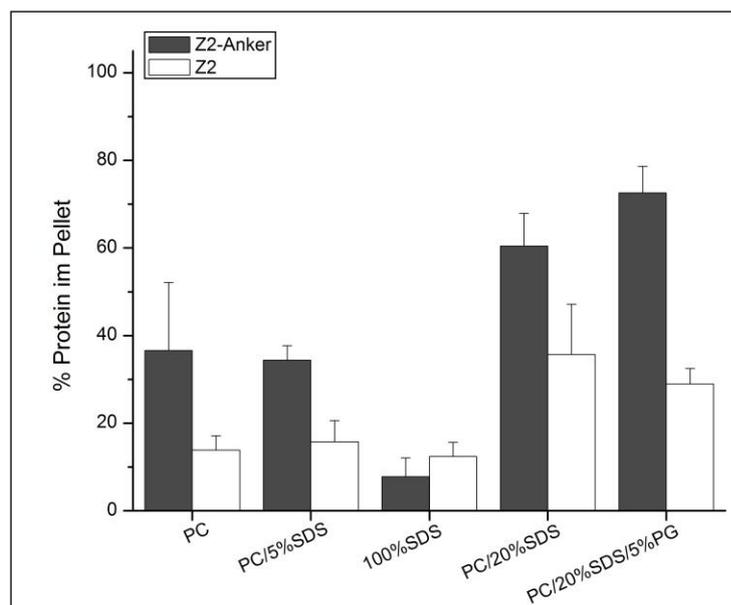


Abbildung 24: Einfluss von Mizellen auf die Lipidbindung

Die Bindung des E^{ms} -Ankers (schwarzer Balken) sowie des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms} -Anker (weißer Balken) an Mizellen aus reinem SDS (100% SDS) wurde analysiert. Zusätzlich wurden die Bindung an Mischungen aus DMPC/5%SDS (PC/5%SDS), DMPC/20%SDS (PC/5%SDS) sowie DMPC/20%SDS/5%DMPG (PC/20%SDS/5%PG) getestet. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

4.1.1.7 Einfluss der Vesikelform auf die Lipidbindung

Nachdem eine Bindung des E^{rns}-Ankers an negativ geladene Vesikel, jedoch nicht an negativ geladene Mizellen, gemessen werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob die Bindung unter anderem von der Vesikelform beeinflusst wird. Um dies zu untersuchen, wurde auch die Bindung in einem Bizellensystem untersucht. Das Bizellensystem ist dem System einer biologischen Membran sehr ähnlich, da es große Bereiche mit planar angeordneten Lipiden aufweist (siehe Abbildung 25). Um verschiedenen Bizellen zu erzeugen, wurden unterschiedliche Mischungen aus den Zwitterionen DMPC und DHPC (Dihexanoylphosphatidylcholin) verwendet.

In Abbildung 26 erkennt man, dass die Lipidbindungsfähigkeit des E^{rns}-Ankers an Bizellen stark vom DMPC/DHPC-Verhältnis abhängt. In Gegenwart reiner DHPC-Vesikel war im Vergleich mit reinen DMPC-Vesikeln nur eine leichte Bindung messbar. Bei Verhältnissen von DMPC/DHPC von 1:1, 1:4 und 1:10 war dies ebenso erkennbar.

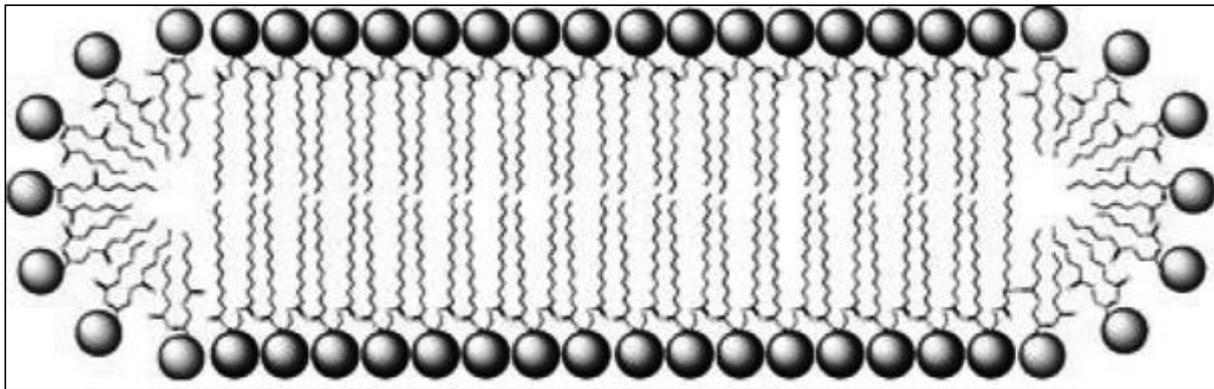


Abbildung 25: Schematische Darstellung einer Bizelle

Schematische Darstellung einer Bizelle. Dabei bildet das längere Lipid eine planare Oberfläche und das kürzere Lipid lagert sich an die Seiten an und schließt diese ab. Somit bildet sich eine diskusförmige Lipidstruktur aus [68].

Bei einem Anstieg des DMPC-Anteils in den Bizellen auf 4:1 bzw. 10:1 war auch ein Anstieg des Proteinanteils im Pellet zu registrieren, was durch den höheren Anteil an DMPC in dem System zwangsläufig zu einer Vergrößerung des planaren Bereiches der Bizellen führt. Jedoch steigt auch der Anteil des N-terminalen tags im Pellet an, so dass im Endeffekt nur eine ähnliche Bindungseffizienz erreicht wurde wie zuvor in DMPC-Vesikeln zu beobachten war.

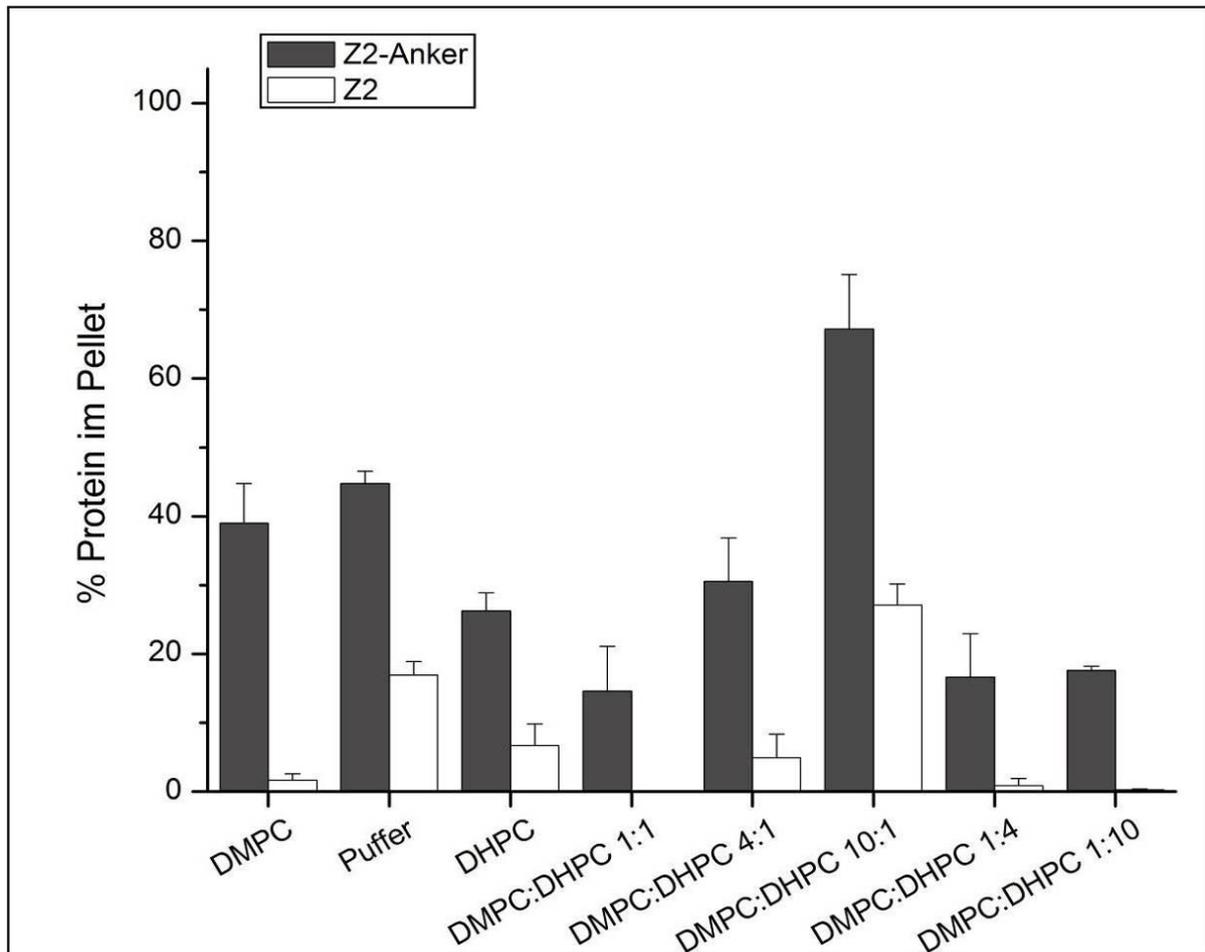


Abbildung 26 Einfluss verschiedener Lipidzusammensetzungen auf die Bindung des E^{ms} -Ankers an Bizellen

Bindung des E^{ms} -Ankers (schwarzer Balken) sowie des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms} -Anker (weißer Balken) an unterschiedliche Bizellensysteme aus DMPC und DHPC und an DMPC- bzw. DHPC-Vesikel. Für die Bizellen wurden Verhältnisse zwischen DMPC und DHPC von 1:1, 4:1, 10:1, 1:4 und 1:10 verwendet. Der hohe Anteil an Protein im Pellet der Negativkontrolle (Puffer) hängt mit der schlechten Löslichkeit des exprimierten Proteins zusammen. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Um zu untersuchen, ob ähnlich wie im Vesikelsystem eine negative Ladung zu einer Verstärkung der Bindung an die Bizellen führt, wurden zusätzlich zu DMPC die negativ geladenen Lipide DMPG und PI in die Bizellenmembran eingeführt. In Abbildung 27 ist das Ergebnis der Messungen gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die negative Ladung der Bizellen zu keiner Verstärkung der Bindung des E^{ms} -Ankers an die Bizellen führte.

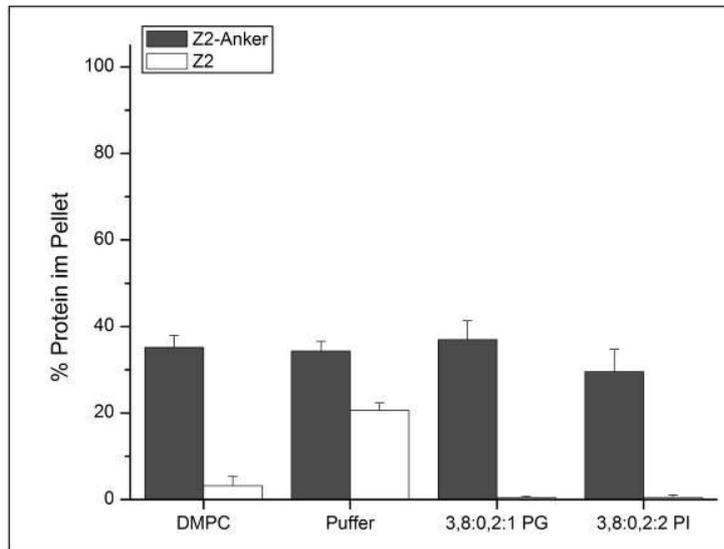


Abbildung 27: Einfluss negativ geladener Bizellen auf die Lipidbindung der E^{ms} -Ankers

Bindungsmessung des E^{ms} -Ankers (schwarzer Balken) sowie des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms} -Anker (weißer Balken) an zwei verschiedene negativ geladene Bizellen; dabei kamen Bizellen mit einer Mischung aus DMPC/DMPG/DHPC (PG) und DMPC/PI/DHPC (PI) mit jeweils einem Mischungsverhältnis von 3,8/0,2/1 zum Einsatz. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

4.1.1.8 Einfluss von biologischen Lipidmischungen auf die Lipidbindung

Biologische Membranen bestehen immer aus Lipidmischungen, die je nach Membran unterschiedliche Lipide mit unterschiedlichen Konzentrationen enthalten. Eine saubere Aufreinigung dieser verschiedenen Membranen aus einem biologischen System erweist sich jedoch als schwierig. Um trotzdem die Bindung des E^{ms} -Ankers an diese Membranen simulieren zu können wurden künstliche Lipidmischungen hergestellt, die der Zusammensetzung der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), des GOLGI Apparates oder der Plasmamembran (PM) entsprachen (siehe Tabelle 10). Alle Lipidmischungen hatten gemein, dass sie einen sehr hohen Anteil an negativ geladenen Lipiden enthielten.

in %	PC	PE	PS	PI	Sph	PG
ER-like	56	22	5	9	6	2
Golgi-like	51	18	6	10	14	0
PM-like	35	23	14	6	23	0

Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Lipidmischungen

Lipidanteil an DMPC (PC), DMPE (PE), DMPS(PS), PI (PI), DMPG (PG) und Sph (Sph) in Prozent für die Lipidmischungen, die den biologischen Membranen vom ER, Golgi oder PM entsprechen. Anteile siehe [69, 70].

In Abbildung 28 ist das Ergebnis der Bindungsmessung dargestellt. Der E^{rns} -Anker zeigte in alle verwendeten Lipidmischungen eine nahezu vollständige Bindung, wohingegen der N-terminale tag nur eine sehr geringe Bindung zeigte. Somit bindet der E^{rns} -Anker mit sehr großer Effizienz an alle diese Lipidmischungen, weist aber keine Spezifität für einen der Membrantypen auf.

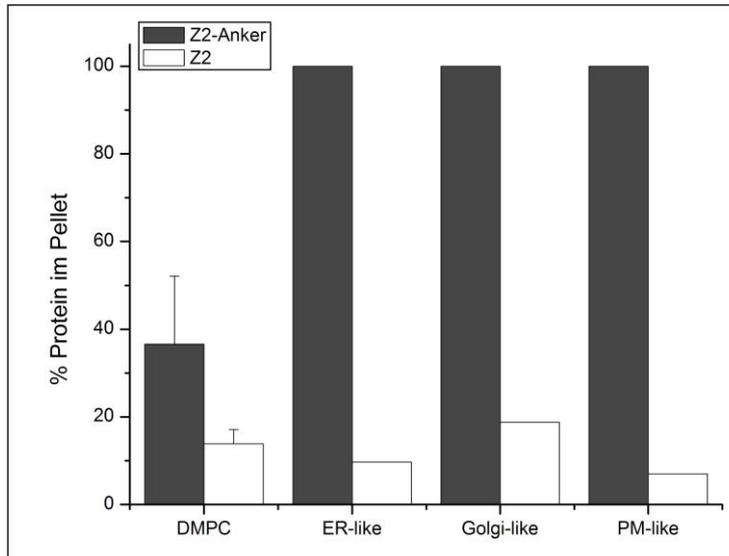


Abbildung 28 Bindung des E^{rns} -Ankers an simulierte biologische Membranen

Bindungsmessung des E^{rns} -Ankers (schwarzer Balken) sowie des Kontrollkonstruktes ohne E^{rns} -Anker (weißer Balken) an Membranen mit verschiedenen Lipidmischungen, die denen der biologischen Membranen des ERs, des Golgi Apparates oder der PM entsprechen. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

4.1.1.9 Einfluss der Proteinladung auf die Lipidbindung

Wie unter 4.1.1.1 festgestellt wurde bindet der positiv geladene E^{rns} -Anker spezifisch an negativ geladene Lipide. Um diese Interaktion näher zu untersuchen, wurden verschiedene ladungsändernde Punktmutationen in den E^{rns} -Anker eingeführt und die resultierenden Mutanten auf ihre Lipidbindungseigenschaften hin untersucht. In Abbildung 29 ist die Punktmutation von Glu 216 zu Leu, Gln und Gly gezeigt. Alle diese Mutationen erhöhen die positive Ladung des E^{rns} -Ankers von +2 auf +3, wobei Asp und Glu als negativ geladen und Arg und Lys als positiv geladen angesehen wurden. Alle drei Mutationen scheinen einen leichten Effekt auf die Lipidbindung zu haben, da die Fähigkeit für die Bindung an PI schwach erhöht wurde. Die Mutationen Leu und Gln scheinen zusätzlich einen Einfluss auf die Bindung an DMPG-haltige Vesikel zu haben, da der Anteil an Protein im Pellet reduziert war. Jedoch zeigte der Austausch des Glu zu Gln und Gly auch einen höheren Anteil des jeweiligen Proteins im Pellet der Pufferkontrolle, woraus auf eine schlechtere Löslichkeit der Proteine zurückgeschlossen werden kann. Dadurch wird eine genaue Aussage über die Lipidbindungsfähigkeit dieser Mutanten erschwert.

Zusätzliche wurden neben den eben genannten Mutationen Einzelmutation getestet, die die positive Ladung des E^{rns} -Ankers reduzieren. Zum einen wurde dazu Asn 217 gegen Asp und zum anderen Gln 207 gegen Glu ausgetauscht. Beide Mutationen reduzierten die Ladung des E^{rns} -Ankers auf +1. Die veränderten Proteine zeigten aber immer noch eine starke Bindung an DMPG- und PI-haltige Vesikel (nicht gezeigt).

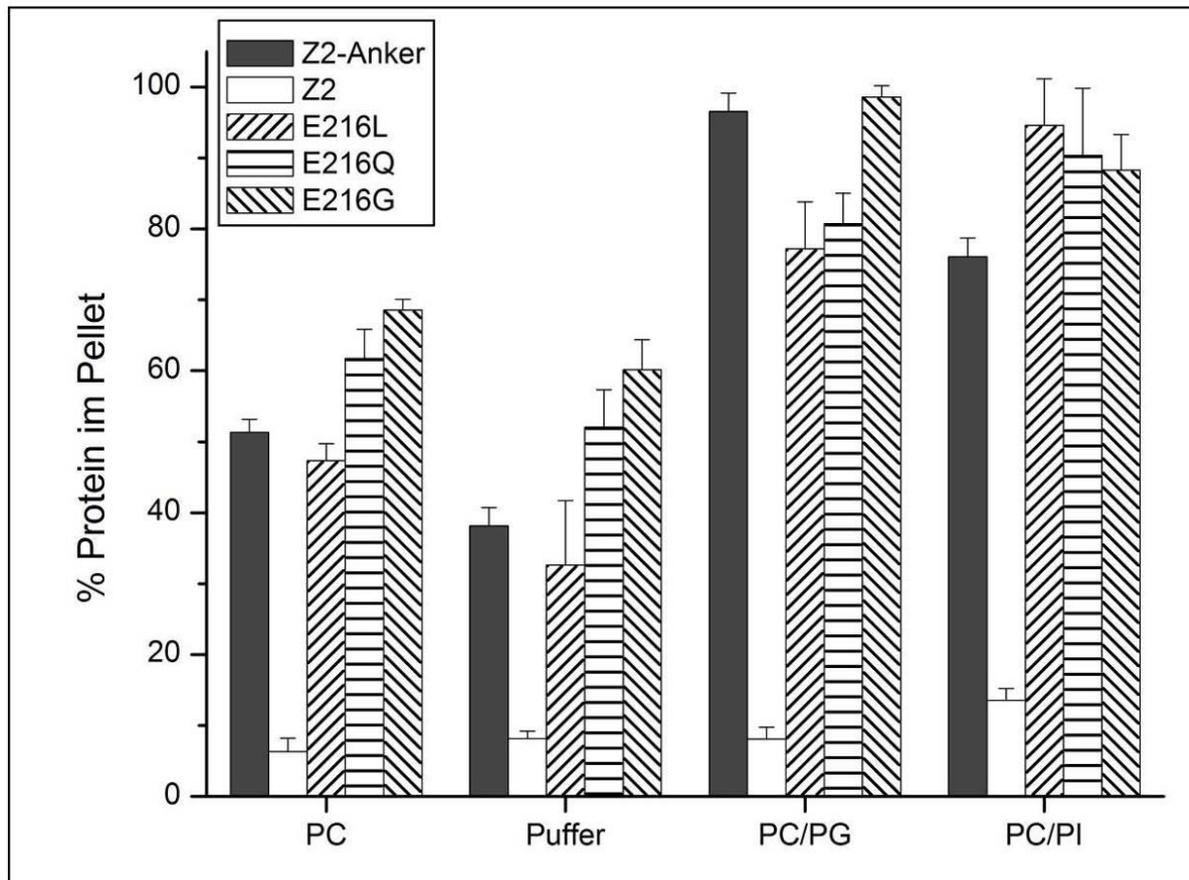


Abbildung 29: Einfluss verschiedener ladungsverändernder Punktmutationen auf die Lipidbindungsfähigkeit des E^{ms}-Ankers

Lipidbindungsmessung von Mutanten des E^{ms}-Ankers, die durch Punktmutation an Position 216 die Ladung des E^{ms}-Ankers von +2 auf +3 ändern. Dabei wurde jeweils das Glu an Position 216 durch Leu (E216L), Gln (E216Q) oder Gly (E216G) ersetzt. Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{ms}-Ankers (Z2-Anker) ist als schwarzer Balken, die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms}-Anker (Z2) als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an. Bei der Berechnung der Gesamtladung der Punktmutationen wurden die Aminosäuren Asp und Glu als negativ geladen und Arg und Lys als positiv geladen angesehen.

Um die Ladung des E^{ms}-Ankers stärker zu verändern, wurden anschließend Mutanten hergestellt, die mehrere ladungsverändernde Mutationen enthielten. Die Mutationen sind in Abbildung 30 dargestellt.

Bei der Mutante EEE wurde Gly 205, 209 und 212 zu Glu mutiert, wodurch die Ladung des E^{ms}-Ankers -1 betrug. In zwei weiteren Mutanten wurde Lys 199 und Arg 206 zum einen gegen Alanin ausgetauscht (AA), wodurch die Gesamtladung des E^{ms}-Ankers 0 betrug, und zum anderen gegen Glu (EE), woraus eine Ladung von -2 resultierte. Als letztes wurde eine Mutante generiert, bei der Lys 213, 214, 218, 220 gegenüber Alanin (A1+2) ausgetauscht wurden. Daraus resultierte eine neue Gesamtladung des E^{ms}-Ankers von -2.

Konstrukt	Sequenz	Ladung
E ^{ms} Anker	GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV ⁻⁻⁻ DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA	+2
A1+2	GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV ⁻⁻⁻ DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGA <u>ALE</u> NSATWFGAYA	-2
AA	GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV ⁻⁻⁻ DGMTNSLESARQGTAA <u>LT</u> TWLGA <u>QL</u> GILGKKLENKSKTWFGAYA	0
EE	GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV ⁻⁻⁻ DGMTNSLESARQGTAE <u>L</u> TTWLGE <u>QL</u> GILGKKLENKSKTWFGAYA	-2
EEE	GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV ⁻⁻⁻ DGMTNSLESARQGTAKLTTWLER <u>Q</u> LE <u>I</u> LEKKLENKSKTWFGAYA	-1

Abbildung 30: Sequenzen der Proteine mit mehreren ladungsverändernden Aminosäureaustauschen und deren Gesamtladung

Aminosäuresequenzen der für diesen Versuch verwendeten Proteine A1+2, AA, EE und EEE. Der N-terminale tag wurde dabei nicht dargestellt. Die unterstrichenen Aminosäuren markieren gegenüber dem E^{ms}-Anker veränderte Aminosäuren. Die Gesamtladung des Proteinfragmentes ist in der letzten Spalte angegeben, wobei die Aminosäuren Asp und Glu als negativ geladen und Arg und Lys als positiv geladen angesehen wurden.

In Abbildung 31 sind die Lipidbindungsanalysen dieser 4 Mutanten zu sehen. Alle vier Mutanten zeigten trotz der eingeführten Mutationen immer noch eine sehr starke Bindung an negativ geladene Vesikel. Nur der Austausch von Lys 199 und Arg 206 gegen Glu zeigte eine leichte Reduktion der Bindung. Somit hat die positive Ladung des E^{rns}-Ankers keinen Einfluss auf die Lipidbindungsfähigkeit des E^{rns}-Ankers.

Bei Mutante EEE wurde zudem ein weiterer Effekt der Mutation offensichtlich. Zwar zeigte die Vesikelkontrolle (reines DMPC) eine gegenüber dem WT unveränderte Bindung des E^{rns}-Ankers (Z2-Anker), aber die Löslichkeit in Puffer (Puffer) war stark verändert. Fast die gesamte Menge des Proteins befand sich dort im Pellet. Da dies bei DMPC nicht der Fall war, müssen die Lipide der Vesikel eine Faltung des mutierten E^{rns}-Ankers stabilisieren und diesen somit in Lösung halten.

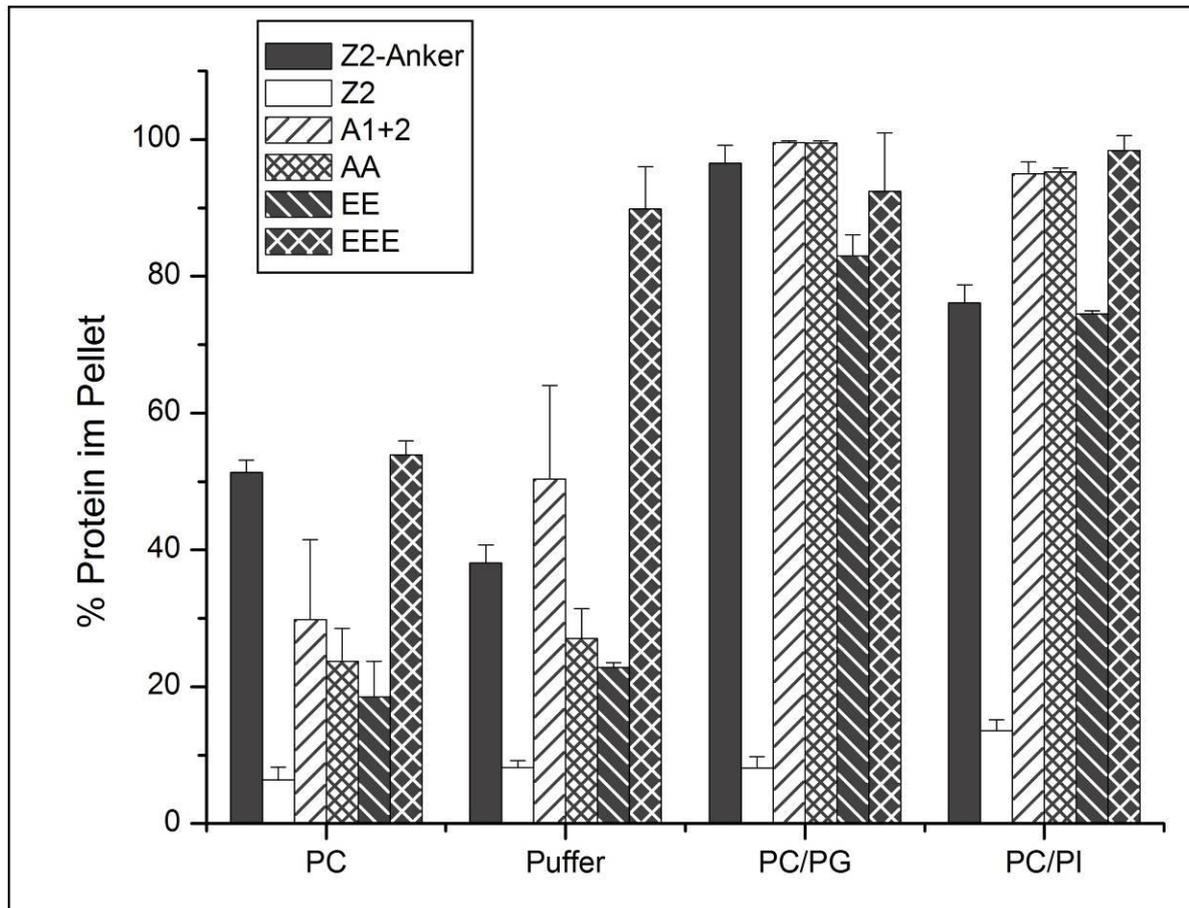


Abbildung 31: Einfluss verschiedener proteinladungsverändernder Mutationen auf die Lipidbindung des E^{ms} -Ankers

Lipidbindungsmessung von Mutanten des E^{ms} -Ankers, bei denen durch mehrere Punktmutationen eine starke Änderung der Gesamtladung des E^{ms} -Ankers erhalten wurde. Dabei symbolisiert A1+2 einen Austausch von Lys 213, 214, 218 und 220 gegen Alanin (Proteinladung -2), AA einen Austausch von Arg 206 und Lys 199 gegen Alanin (Proteinladung 0), EE einen Austausch dieser Aminosäuren gegen Glu (Proteinladung -2) und EEE einen Austausch von Gly 205, 209 und 212 gegen Alanin (Proteinladung -1) (Sequenzen siehe Abbildung 30). Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{ms} -Ankers (Z2-Anker) ist als schwarzer Balken und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms} -Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an. Bei der Berechnung der Gesamtladung der Konstrukte wurden die Aminosäuren Asp und Glu als negativ geladen und Arg und Lys als positiv geladen angesehen.

4.1.2 Vergleich mit anderen bekannten amphipatischen Helices

Um die Lipidbindungsfähigkeit des E^{ms} -Ankers besser einschätzen zu können, wurden weitere bekannte amphipatische Helices im selben System untersucht. Dazu wurde die amphipatische Helix des Proteins MinD (MinD) aus dem Bakterium *Escherichia coli*, die amphipatische Helix vom Protein A1 des Brom-Mosaik-Virus (BMV) und die E^{ms} -Ankersequenz vom CSFV Stamm Alfort/Tübingen (CSFV) verwendet. Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine sind in Abbildung 32 angegeben. Wie bei den vorherigen Untersuchungen wurden die amphipatische Helices mit einem N-terminalen

Fusionsprotein, bestehend aus einem 6xHis Peptid, dem Z2-tag und einer TEV-Spaltsequenz, exprimiert. In Abbildung 33 sind die Ergebnisse der Lipidbindungsexperimente der verschiedenen Helices zu sehen. Wie zu erwarten verhalten sich der E^{rns}-Anker von BVDV und CSFV sehr ähnlich, d.h. sie zeigen eine starke Bindung an die negativ geladenen Vesikel und eine schwache Bindung an zwitterionische Lipide. Die MinD Sequenz zeigt die gleiche Spezifität, welche jedoch stärker ausgeprägt ist, da bei zwitterionischen Vesikeln die Bindung nahezu ausbleibt (vgl. PC/PE oder PC/Sph). Die BMV-A1 Sequenz hingegen zeigt eine starke Bindung an reine DMPC-Vesikel, die durch Zugabe von negativen Lipiden nicht verstärkt sondern teilweise leicht abgeschwächt wurde. Interessanterweise zeigen auch Zugaben der zwitterionischen Lipide PE oder Sph eine Abschwächung der Bindungsfähigkeit der amphipatischen BMV-A1 Helix.

Konstrukt	Sequenz
E ^{rns} Anker (BVDV)	GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLVDMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
E ^{rns} Anker (CSFV)	GAMGDHECGSLLQDTALYLLDGMTNTIENARQGAARVTSWLGRQLSTAGKKLERRSKTWFGAYA
BMV-A1	GAMGLVAFALTLNLYQKYEKLVLR
MinD	GAMEKKGFLKRLFGG

Abbildung 32: Aminosäuresequenzen der verwendeten amphipatischen Helices

Aminosäuresequenzen der für diesen Versuch verwendeten amphipatischen Helices des E^{rns}-Ankers vom BVDV Stamm CP7 und vom CSFV Stamm Alfort/Tübingen und der amphipatischen Helix des MinD-Proteins bzw. des Brom-Mosaik-Virus Protein A1 (BMV-A1) Proteins. Der in den exprimierten Konstrukten enthaltene N-terminale tag ist nicht dargestellt.

Somit zeigen die E^{rns}-Ankersequenzen von BVDV CP7 und CSFV Alfort/Tübingen sowie die amphipatische Helix des bakteriellen Proteins MinD eine ähnliche Lipidspezifität. Interessanterweise besteht die MinD-Sequenz nur aus 12 Aminosäuren, im Gegensatz zur E^{rns}-Ankersequenz, die aus ca. 51 Aminosäuren besteht. Somit reichen 12 Aminosäuren, was ungefähr 3 Helixwindungen entspricht, um eine spezifische Bindung an Lipide zu erreichen.

Die amphipatische Helix vom BMV-A1 besteht auch nur aus ca. 22 Aminosäuren, sie zeigte jedoch eine deutlich andere Lipidbindungsspezifität, da sie anscheinend zwitterionische Vesikel bevorzugt.

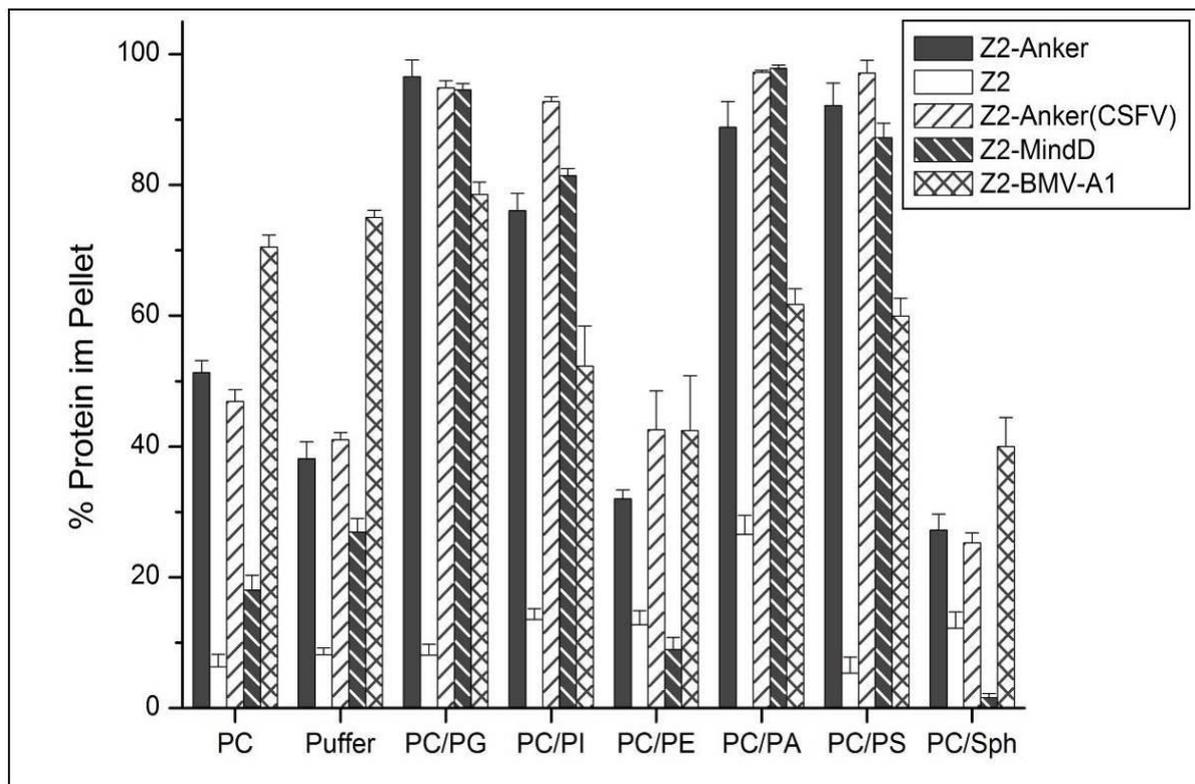


Abbildung 33: Lipidbindungsanalysen verschiedener amphipatische Helices

Messung der Lipidbindungsspezifität der amphipatischen Helix des E^{ms} -Ankers vom CSFV Stamm Alfort/Tübingen (Z2-Anker(CSFV)), der amphipatischen Helix des MinD-Proteins (Z2-MinD) und der amphipatischen Helix vom Brom-Mosaik-Virus Protein A1 (Z2-BMV-A1). Die Messungen fanden in Vesikelsystemen aus reinem DMPC (PC), DMPC/DMPG (PC/PG), DMPC/PI (PC/PI), DMPC/DMPE (PC/PE), DMPC/DMPA (PC/PA), DMPC/DMPS (PC/PS) und DMPC/Sph (PC/Sph) sowie in reinem Puffer (Puffer) statt. Die Bindung des unveränderten BVDV CP7 E^{ms} -Ankers (Z2-Anker) ist als schwarzer Balken und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms} -Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

4.1.3 Untersuchung von im biologisch System wirksamen Mutationen

Um Effekte, die im biologischen System bei speziellen Mutationen im E^{ms} -Anker beobachtet wurden, besser verstehen zu können, wurden entsprechend mutierte Z2-Ankerkonstrukte in Lipidbindungsexperimenten genauer analysiert. Ein Beispiel dafür sind Veränderungen an den Aminosäuren Val 183, Leu 190 und Leu 208. Wenn eine dieser Aminosäuren gegen Ala ausgetauscht wurde, stieg im biologischen System die Sekretionsrate von E^{ms} sehr stark an [37]. Wenn eine dieser Aminosäuren dagegen durch eine andere hydrophobe Aminosäure ausgetauscht wurde, wie z.B. Val 183 gegen Leu oder Ile, kam es entweder zu keiner Veränderung des Sekretionsverhaltens oder in manchen Fällen (z.B. Val 183 Leu) sogar zu einer leichten Reduktion in der Sekretion des E^{ms} -Proteins. Um zu untersuchen, ob die Steigerung der Sekretionsrate von E^{ms} in einer Reduktion der Lipidbindungsfähigkeit dieser Mutanten begründet liegt, wurden sie mittels Lipidbindungsexperimenten analysiert. Als Kontrollen dienten dabei Austausch gegen Ile oder Leu, die im biologischen System keinen Einfluss auf die Sekretionsraten von E^{ms} zeigten.

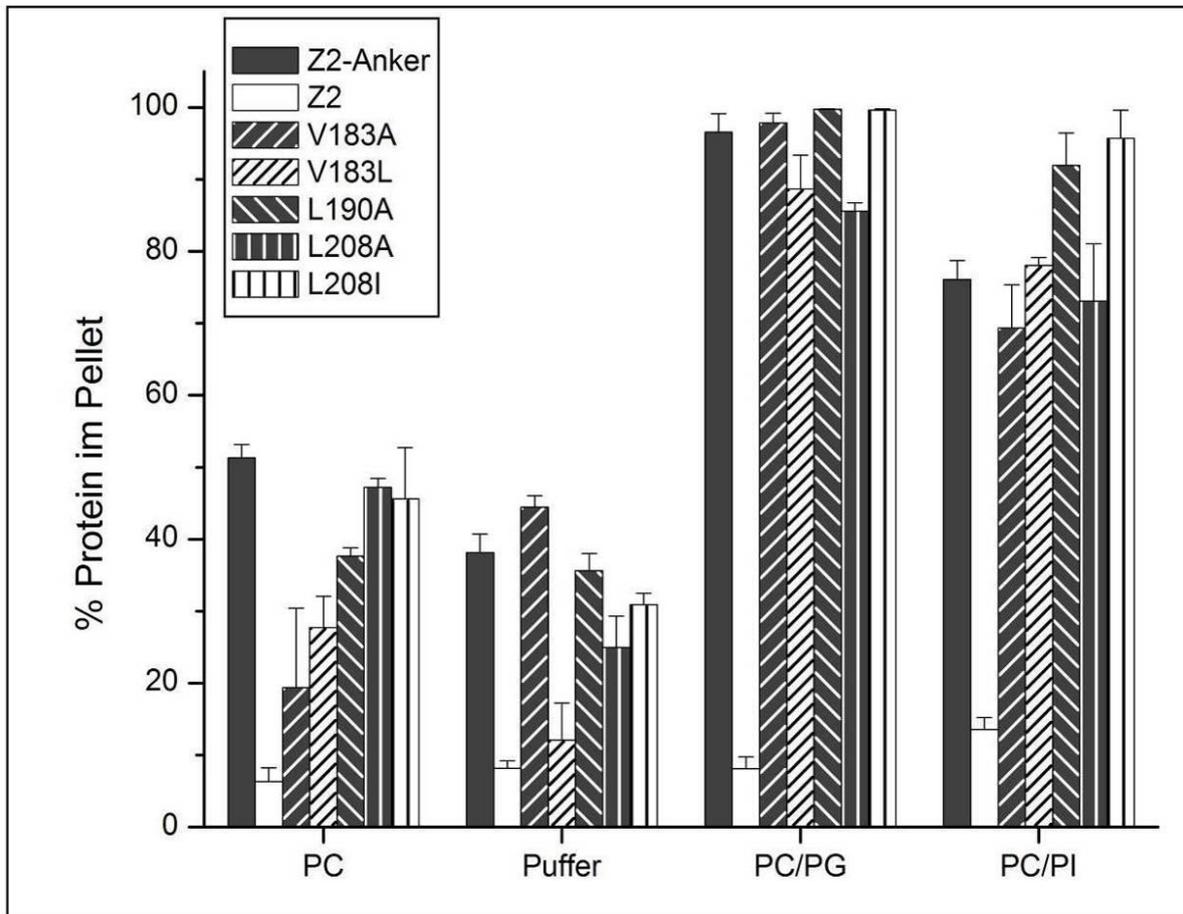


Abbildung 34: Lipidbindungsanalysen von im biologischen System phänotypisch auffälligen Mutanten

Lipidbindungsmessung von Mutanten des E^{ms} -Ankers, die im biologischen System eine starke Zunahme der Sekretionsrate des E^{ms} -Proteins zeigten, wie Val 183 Ala (V183A), Leu 190 Ala (L190A) und Leu 208 Ala (L208A) und Austausch dieser Aminosäuren, die im biologischen System zu keiner Zunahme der Sekretionsrate führten, wie Val 183 Leu (V183L) und Leu 208 Ile (L208I) (vgl. [37]). Für die Messung wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC), sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{ms} -Ankers ist als schwarzer Balken (Z2-Anker) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms} -Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

In Abbildung 34 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt. Dabei zeigten die Austausche von Val 183, Leu 190 und Leu 208 gegen Ala ebenso wenig einen Effekt auf die Lipidbindung wie die Austausche Val 183 Leu oder Leu 208 Ile, die als Kontrolle dienten. Die gleichen Beobachtungen wie beim BVDV E^{ms} -Anker konnten auch bei Mutationen dieser Aminosäure im CSFV E^{ms} -Anker gemacht werden (nicht gezeigt). Somit kann die Steigerung der Sekretionsrate von E^{ms} nicht durch eine Abschwächung der Lipidbindung des E^{ms} -Ankers erklärt werden, sondern muss auf anderen Faktoren beruhen.

4.1.4 Analyse des Einflusses der amphipatischen Eigenschaft des E^{rns} -Ankers auf die Lipidbindung

Der E^{rns} -Anker bildet bei Annahme einer helikalen Faltung ein hydrophobes Moment aus, da die hydrophoben Aminosäuren bei einer helikalen Faltung zusammen auf der einen Seite und die hydrophilen Aminosäuren zusammen auf der anderen Seite liegen. In Abbildung 35 ist das *Helical Wheel* Modell des E^{rns} -Ankers dargestellt. Die hydrophoben Aminosäuren sind dabei durch einen Kasten markiert. Man erkennt deutlich eine Konzentrierung von hydrophoben Aminosäuren im unteren Bereich des Modells. Im restlichen Bereich sind nur sehr vereinzelt hydrophobe Aminosäuren zu erkennen. Dafür sind viele geladene Aminosäuren wie Lys (K), Asp (D), Glu (E) oder Arg (R) im oberen Bereich des Modells zu finden. Dadurch bildet sich ein hydrophobes Moment aus, so dass man davon ausgeht, dass sich der untere Bereich, der durch einen Halbkreis markiert ist, in der Membran befindet und der obere Bereich Kontakt mit den Lipidkopfgruppen bzw. der Lösung hat.

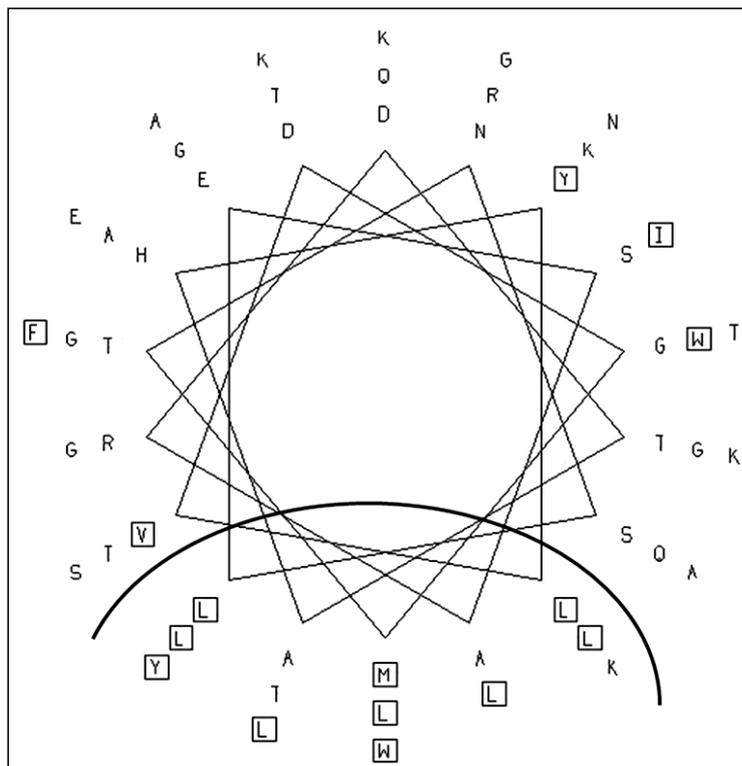


Abbildung 35: „*Helical Wheel*“ Modell des E^{rns} -Ankers von BVDV CP7

„*Helical Wheel*“ Modell des E^{rns} -Ankers vom BVDV Stamm CP7. Es symbolisiert die Queransicht des E^{rns} -Ankers bei Annahme einer helikalen Faltung. Dabei wurden die Aminosäuren im Ein-Buchstabencode angegeben und die hydrophoben Aminosäuren mit einem Kasten markiert. Die schwarze Kurve repräsentiert die Grenze zwischen einem hydrophoben und einem hydrophilen Bereich und könnte somit die Grenze zwischen membrangebundenem und nicht membrangebundenem Helixanteil darstellen.

Diese Amphipatizität des E^{rns} -Ankers spielt im biologischen System eine entscheidende Rolle für die Membranbindung und die Retention des E^{rns} -Proteins [37]. Um den Einfluss der Amphipatizität des E^{rns} -Ankers auf die reine Membranbindung zu untersuchen, wurde an bestimmten Stellen im

E^{ms} -Anker ein zusätzliches Ala inseriert. Durch die Insertion einer zusätzlichen Aminosäure wird die amphipatische Helix der Insertionsstelle um ca. 94° in sich gedreht. Dadurch geht die Amphipatizität an dieser Stelle verloren, da nun auf beiden Seiten hydrophobe und hydrophile Aminosäuren vorkommen.

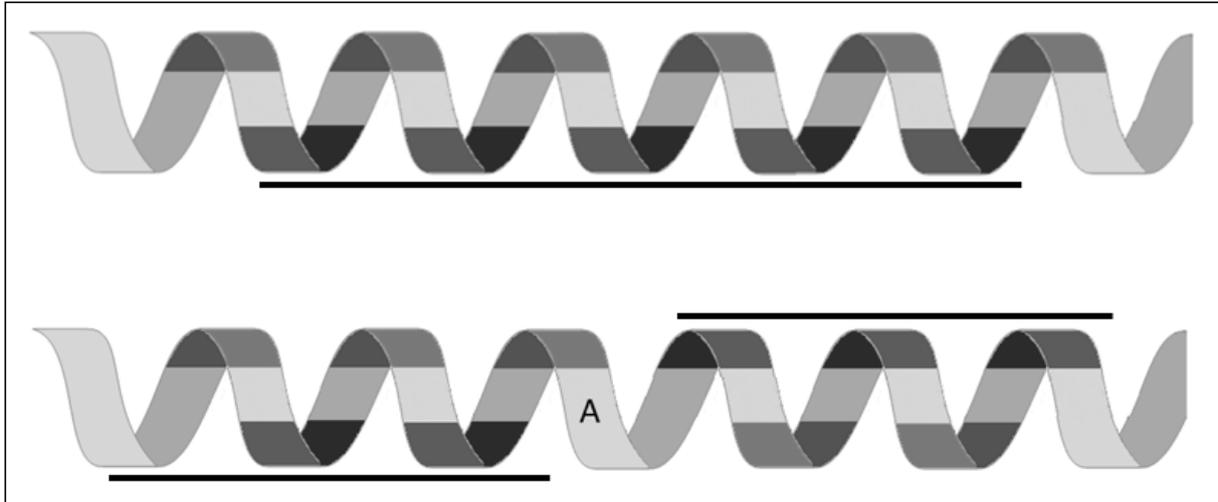


Abbildung 36: Änderung des amphipatischen Charakters durch eine Alanininsertion

Schematische Darstellung der Zerstörung des generellen amphipatischen Charakters (oberes Bild, schwarze Linie) des E^{ms} -Ankers durch Insertion eines einzelnen Alanins (A) (unteres Bild).

Als Insertionspunkte wurde die Aminosäuren an Positionen 181 (181A), 194 (194A) und 204 (204A) im E^{ms} -Protein gewählt, da an diesen Positionen im biologischen System eine deutliche Änderung in der Sekretion von E^{ms} gemessen werden konnte [38]. In Abbildung 37 erkennt man, dass im Gegensatz zum biologischen System keine der drei Insertionen zu einer Verschlechterung der Lipidbindung führte. Jedoch treten bei der Insertion 204A im Experiment mit reinem Puffer auch große Mengen von Protein im Pellet auf. Das deutet darauf hin, dass diese Mutante schwerlöslich ist, was eine Auswertung erschwert. Die anderen beiden Proteine zeigen jedoch eine spezifische Bindung an die negativ geladenen Vesikel.

Auch die gleichzeitige Einführung eines Alanins an zwei oder allen drei Stellen führte nur zu einer schlechteren Löslichkeit des Proteins, aber nicht zur einer Änderung der Lipidbindung (nicht gezeigt).

Um zu untersuchen ob die Helixfaltung in diesen Bereichen wichtig für die Lipidbindung ist, wurden Prolinsubstitutionen durchgeführt. Prolin ist ein Helixbrecher und zerstört die lokale Struktur in seiner Nähe. Deswegen wurden Prolinsubstitutionen an Position His 180 (PS1), Ala 193 (PS2), Trp 203 (PS3), Gly 209 (PS4) und Asn 217 (PS5) durchgeführt. Dabei zeigten Prolinsubstitutionen an den Positionen Trp 203 (PS3), Gly 209 (PS4) und Asn 217 (PS5) keine Veränderung der Lipidbindung (Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigten die Substitutionen PS2 und PS5 eine verminderte Löslichkeit, da teilweise eine große Menge an Protein im Pellet der Pufferkontrolle registriert werden konnte.

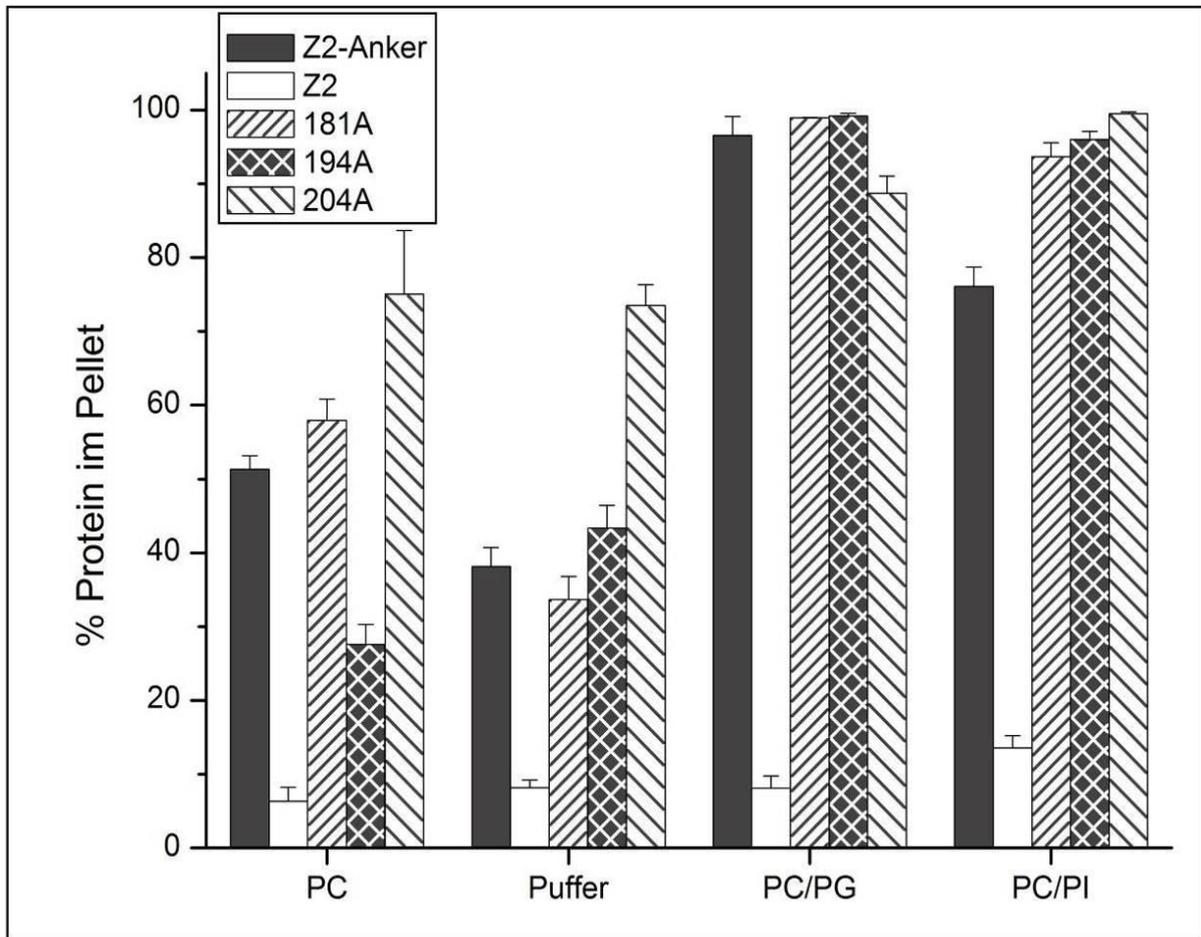


Abbildung 37: Auswirkung von Alanininsertionen auf die Lipidbindung

Lipidbindungsmessung von Alanininsertionen an den Positionen 181, 194 und 204, die zu einer Drehung der amphipatischen Helix führten und somit den amphipatischen Charakter des E^{ms} -Ankers zerstörten. Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{ms} -Ankers ist als schwarzer Balken (Z2-Anker) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms} -Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Nur die Substitutionen an Position His 180 (PS1), Ala 193 (PS2) sowie die Doppelsubstitution an Trp 203 (PS3) und Gly 209 (PS4) (PS3,4) zeigten einen kleinen Effekt auf die Bindung an DMPG-haltige Vesikel, wohingegen die Bindung an PI-haltige Vesikel nur bei der Substitution PS3,4 sehr leicht reduziert wurde (siehe Abbildung 38). Interessanterweise zeigte die Doppelsubstitution von Position His 180 und Ala 193 (PS1,2), im Gegensatz zu den Einzelmutanten keinen Effekt auf die Lipidbindung.

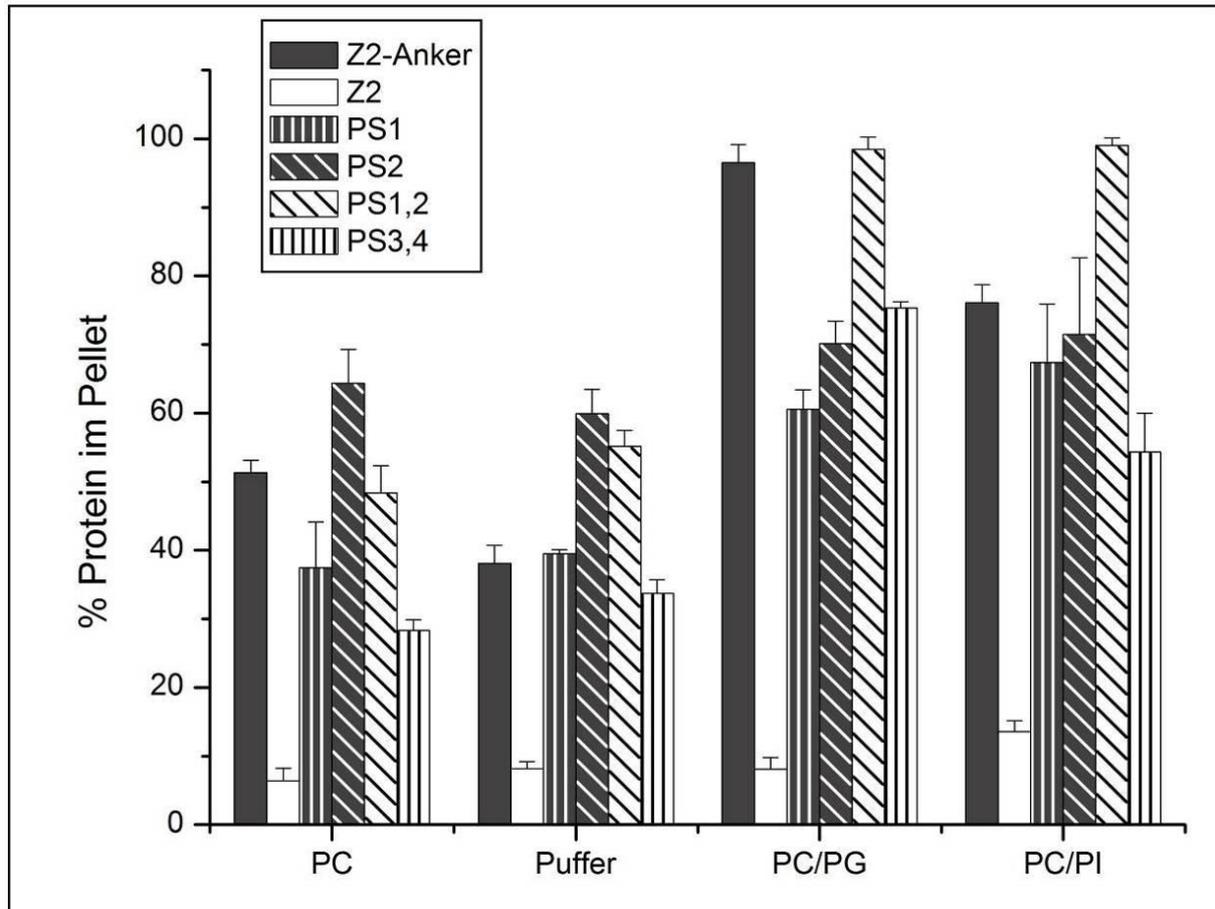


Abbildung 38: Lipidbindungsanalysen ausgewählter Prolinsubstitutionen

Lipidbindungsanalysen von Prolinsubstitutionen im E^{ms} -Anker an den Positionen His 180 (PS1), Ala 193 (PS2) sowie Substitutionen von Prolin jeweils an den Positionen His 180 und Ala 193 (PS1,2) bzw. an den Positionen Trp 203 und Gly 209 (PS3,4). Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{ms} -Ankers ist als schwarzer Balken (Z2-Anker) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms} -Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Um stärkere Auswirkungen auf den E^{ms} -Anker zu generieren, wurden Prolininsertionen an denselben Positionen im Protein wie zuvor die Prolinsubstitutionen durchgeführt, da diese beide Effekte vereinen, nämlich zum einen die Drehung der Helix und zum anderen die Auflösung der lokalen Struktur. Zu diesem Zweck wurden einzelne Prolininsertionen an Position 181 (PI1), 194 (PI2), 204 (PI3), 210 (PI4) und 218 (PI5) eingeführt und analysiert. Dabei zeigten nur die Insertionen an Position 204 (PI3) und 210 (PI4) einen Effekt auf die Lipidbindung (siehe Abbildung 39). Beide Proteine zeigten eine Reduktion in der Bindung an die negativ geladenen Lipide, wobei der Effekt bei den DMPG-haltigen Vesikeln größer war als der Effekt bei den PI-haltigen.

Interessanterweise zeigte auch hier das Protein mit einer doppelten Prolininsertion an Position 204 und 210 (PI3,4) diesen Effekt nicht mehr. Es kam sogar zu einer Reduktion der Bindung an reinen DMPC-Vesikeln und somit zu einer stärkeren Spezifität.

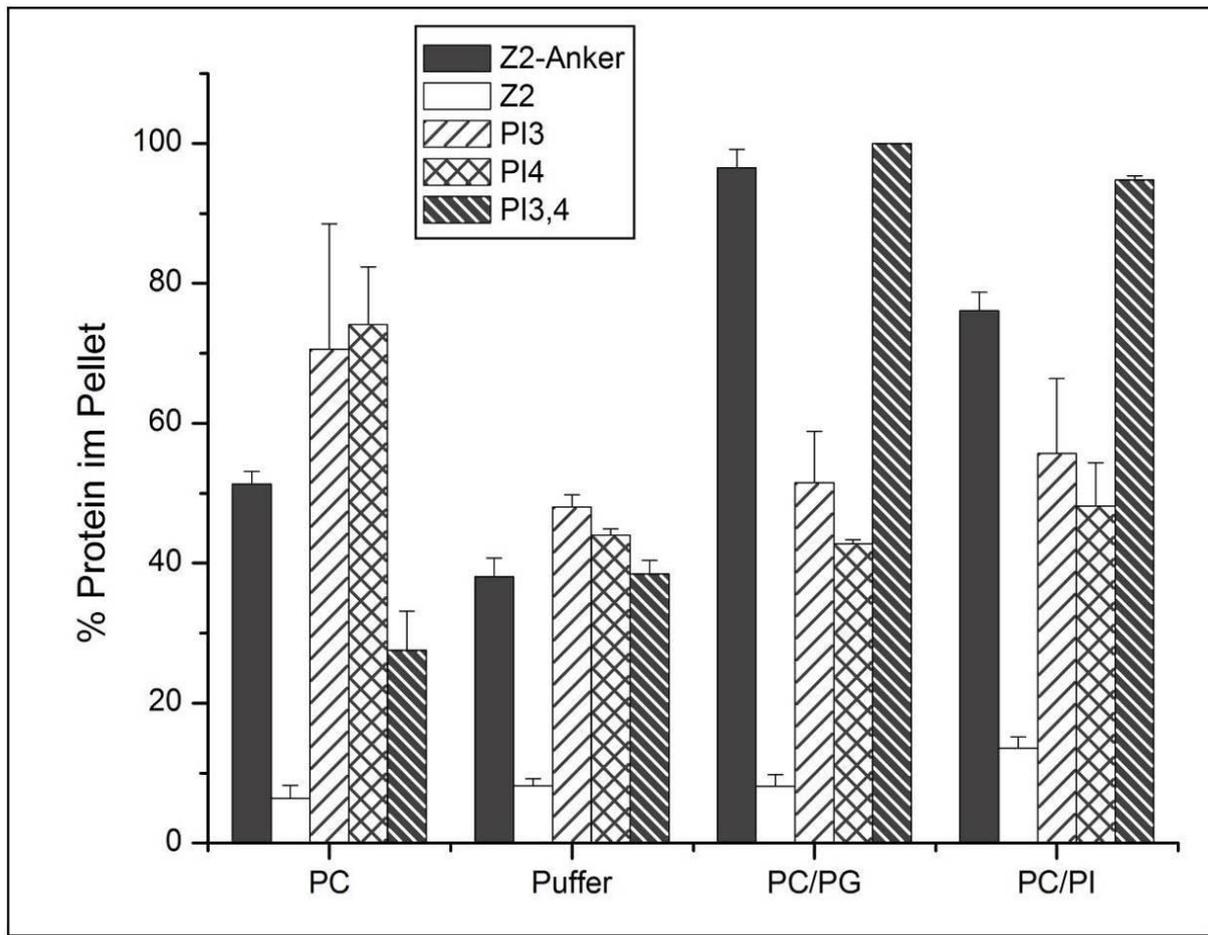


Abbildung 39: Lipidbindungsanalysen ausgewählter Prolininsertionen

Lipidbindungsanalysen von Prolininsertionen im E^{ms}-Anker an den Positionen 204 (PI3) und 210 (PI4) sowie Insertionen von Prolin jeweils an den Positionen 204 und 210 (PI3,4). Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{ms}-Ankers ist als schwarzer Balken (Z2-Anker) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms}-Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Um den amphipatischen Bereich großflächig zu stören, wurde der N-terminale Bereich des E^{ms}-Ankers vom C-terminalen Bereich durch Insertion einer 3 Aminosäuren langen Sequenz GGG (GGG) sowie einer 14 Aminosäuren langen Sequenz GGGPGGGPGGGG (GPG) an Position 210 getrennt. Damit wurde der amphipatische Bereich in einen N- und einen C-terminalen Bereich getrennt. In Abbildung 40 ist das Ergebnis der Lipidbindungsanalysen dieser zwei Proteine zu sehen. Man erkennt deutlich, dass beide Proteine ihre Bindungsfähigkeit an negativ geladene Vesikel nicht verloren haben. Zusätzlich zeigt die Mutante GGG eine verminderte Bindungsfähigkeit an reine DMPC-Vesikel, wodurch die Spezifität an negativ geladen Vesikel zusätzlich erhöht wurde.

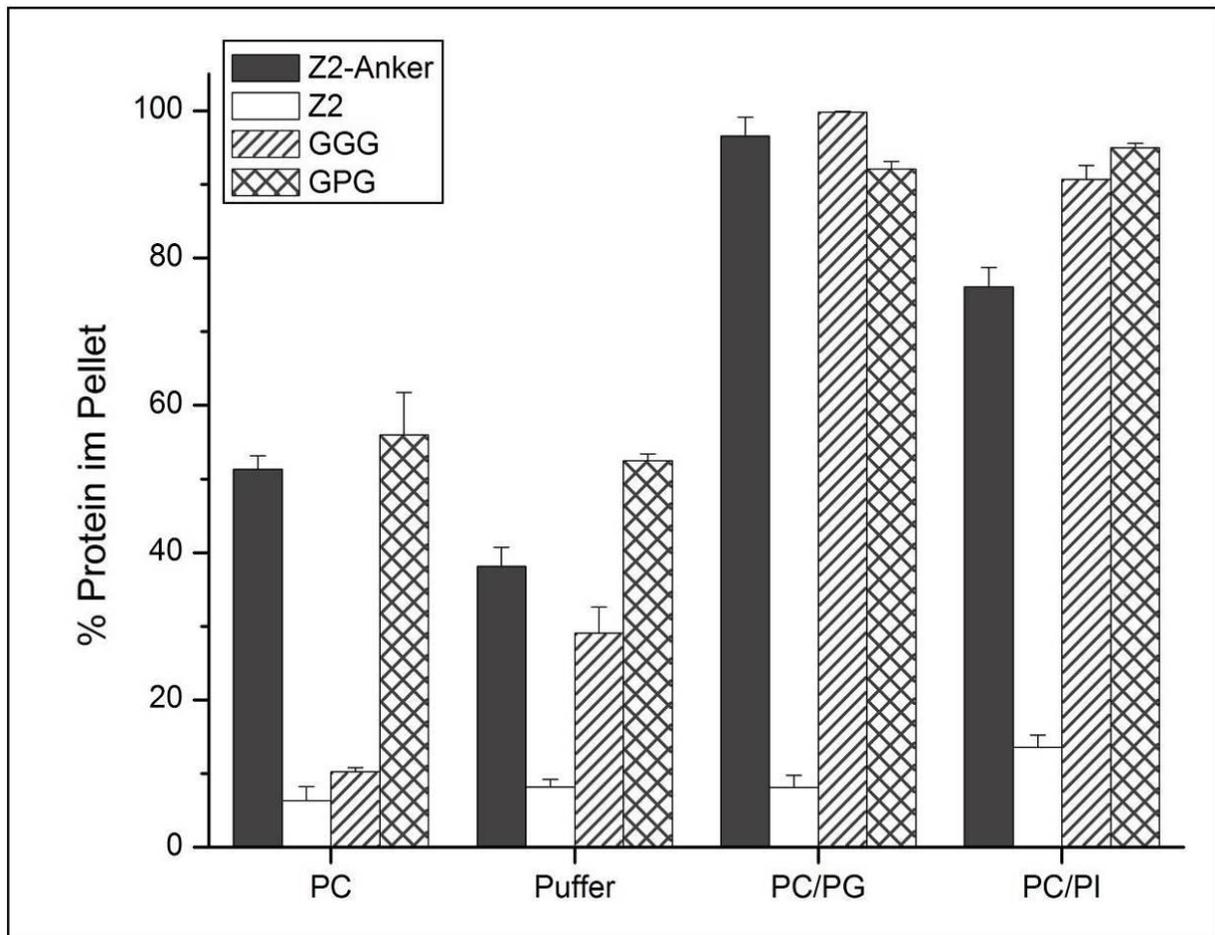


Abbildung 40: Lipidbindungsanalysen von E^{ms}-Ankervarianten mit größeren Aminosäureinsertionen

Lipidbindungsanalysen von E^{ms}-Ankerkonstrukten mit einer Insertion von 3 (GGG) oder 14 (GPG) Aminosäuren an der Position 210. Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC), sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{ms}-Ankers ist als schwarzer Balken (Z2-Anker) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms}-Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

4.1.5 Untersuchung von Teilstücken

Wie unter 4.1.2 schon beschrieben, ist der MinD-Anker im Gegensatz zum E^{ms}-Anker nur 14 Aminosäuren lang. Offensichtlich reicht also eine relativ geringe Anzahl an Aminosäuren für eine Lipidbindung aus. Es stellt sich deshalb die Frage, ob auch deutlich verkürzte Formen des E^{ms}-Ankers eine Membranbindung zeigen können. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Teilstücke des E^{ms}-Ankers auf ihre Lipidbindungseigenschaften analysiert. In Abbildung 41 sind die Aminosäuresequenzen der verwendeten Konstrukte angegeben.

Konstrukt	Sequenz
Erns ^{ms} Anker	GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
Erns_1	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
Erns_7	GCLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
Erns_4	GDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
Erns_5	GQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA
Erns_2	GTSVIQDTAHYLV DGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWF GAYA

Abbildung 41: Aminosäuresequenzen der verwendeten N-terminal verkürzten E^{ms}-Ankerkonstrukte

Aminosäuresequenzen der N-terminal verkürzten E^{ms}-Ankerfragmente Erns-1, Erns-7, Erns-4, Erns-5 und Erns-2, die auf ihre Membranbindungsfähigkeit getestet wurden. Der N-terminale tag wurde hier nicht dargestellt.

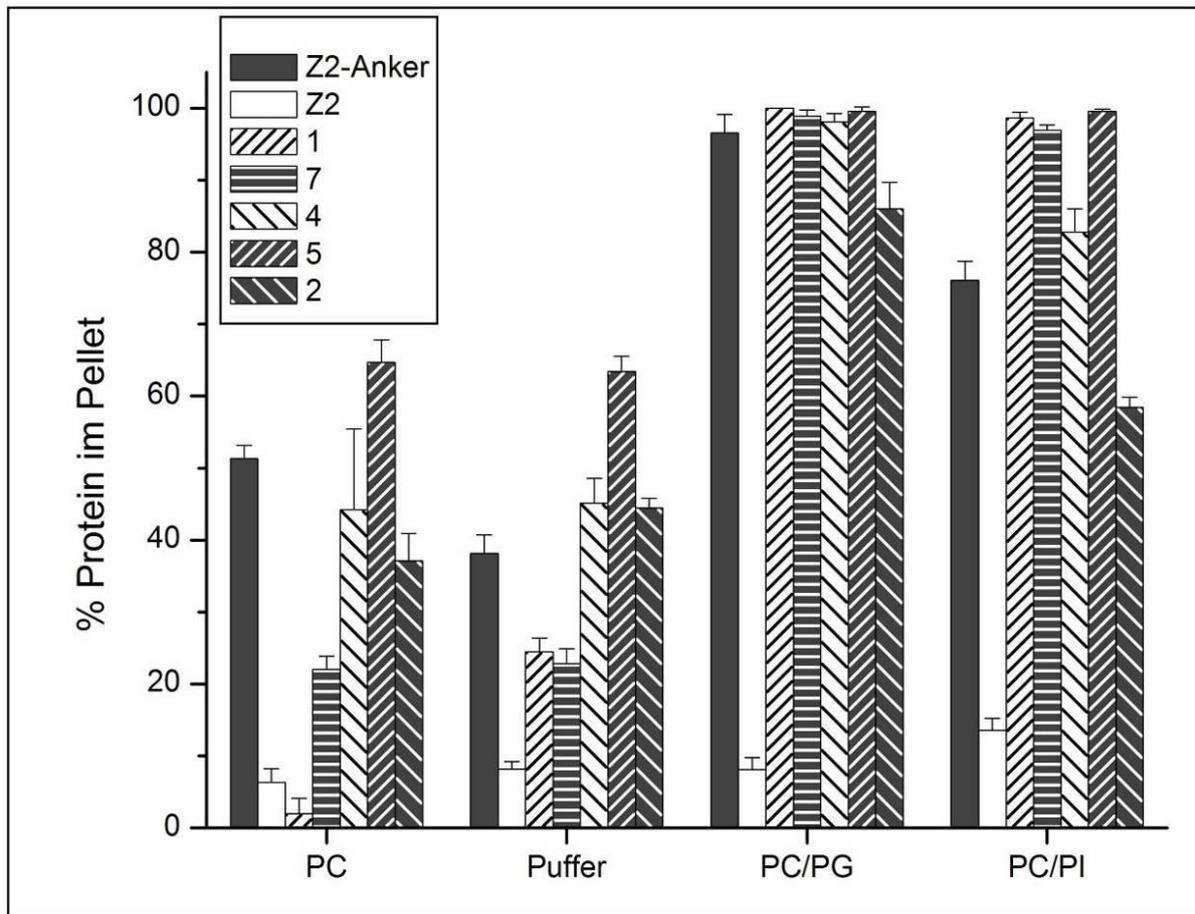


Abbildung 42: Lipidbindungsanalysen von N-terminalen Verkürzungen des E^{ms}-Ankers

Lipidbindungsanalysen von E^{ms}-Ankervarianten mit verschiedenen N-terminalen Verkürzungen. Dabei entspricht Erns-1 (1) einer Verkürzung um 27 Aminosäuren, Erns-7 (7) einer Verkürzung um 22 Aminosäuren, Erns-4 (4) einer Verkürzung um 17 Aminosäuren, Erns-5 (5) einer Verkürzung um 9 Aminosäuren und Erns-2 (2) einer Verkürzung um 5 Aminosäuren. Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{ms}-Ankers ist als schwarzer Balken (Z2-Anker) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms}-Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Begonnen wurde mit N-terminalen Verkürzungen des E^{rns}-Ankers. Dazu wurde der E^{rns}-Anker schrittweise um bis zu 30 Aminosäuren verkürzt. In Abbildung 42 sind die Ergebnisse der mit den resultierenden Proteinen durchgeführten Lipidbindungsexperimente dargestellt. Alle verkürzten Fragmente zeigten eine starke Bindung an DMPG- und PI-haltige Vesikel. Interessanterweise war die Bindung beim E^{rns}-2 Konstrukt, das die kleinste Deletion aufwies, signifikant geringer als beim WT und den anderen Verkürzungsstufen, auch wenn diese Reduktion nicht dramatisch ausfiel. Das Protein E^{rns}-4 zeigte zusätzlich eine sehr leichte Reduktion in der Bindungsfähigkeit an PI-haltige Vesikel. Zusammengefasst ergaben die Experimente mit den N-terminalen Verkürzungen keinen starken Einfluss auf die Lipidbindung, da die kürzeren E^{rns}-Ankerfragmente immer noch eine sehr starke Bindung an negativ geladene Vesikel zeigten. Interessanterweise steigt mit der N-terminalen Verkürzung des E^{rns}-Ankers auch die Spezifität für negativ geladene Vesikel, da die kürzeren Fragmente (vgl. E^{rns}-1 oder E^{rns}-7) eine erheblich schlechtere Bindung an reine DMPC-Vesikel zeigten, aber immer noch eine nahezu vollständige Bindung an DMPG oder PI-haltige Vesikel aufwiesen.

Da die N-terminalen Verkürzungen des E^{rns}-Ankers alleine keine Auswirkungen auf die Lipidbindung hatten, wurden verschiedene N- und C-terminalen Verkürzungen des E^{rns}-Ankers vorgenommen und diese in Bindungsexperimenten analysiert. Die verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 43 dargestellt.

Konstrukt	Sequenz
E ^{rns} Anker	GMAKEHDCTSVIQDTAHYLVDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFAY
Erns_2-1	GTSVIQDTAHYLVDGMTNSLESAR
Erns_3-1	GYLVDGMTNSLESARQGTAKLTTW
Erns_1-2	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSK
Erns_6-4	GKEHDCTSVIQDTAHYLVDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLEN

Abbildung 43: Aminosäuresequenzen der verwendeten E^{rns}-Ankerfragmente

Aminosäuresequenzen und Position im E^{rns}-Anker der getesteten beidseitig verkürzten E^{rns}-Ankerfragmente Erns-2-1 (Thr 172 – Arg 194), Erns-3-1 (Tyr 181 – Trp 203), Erns-1-2 (Arg 194 – Lys 220) und Erns-6-4 (Lys 167 – Asn 217). Der N-terminale tag ist hier nicht dargestellt.

Dabei wurde der N-terminale Bereich des E^{rns}-Ankers vom Konstrukt E^{rns}-2-1, der C-terminale Bereich vom Konstrukt E^{rns}-1-2 und der mittlere Bereich vom Konstrukt E^{rns}-3-1 abgedeckt. In Abbildung 44 sind die Ergebnisse der Bindungsmessungen mit diesen N- und C-terminal verkürzten E^{rns}-Ankerfragmenten dargestellt. Der N-terminale und der mittlere Bereich des E^{rns}-Ankers (vg. E^{rns}-2-1, E^{rns}-3-1) zeigten dabei im Vergleich zur Gesamtsequenz eine drastische Reduktion in der Bindung an beide getesteten negativ geladenen Vesikel, wobei die Bindungsfähigkeit an DMPG-haltige Vesikel bei E^{rns}-3-1 kleiner ausfiel als bei E^{rns}-2-1. Im Gegensatz dazu zeigte das Konstrukt E^{rns}-1-2, das einen C-terminalen Bereich des E^{rns}-Ankers darstellt, an DMPG-haltige Vesikel eine unverändert sehr starke Bindung während die Fähigkeit dieses Konstruktes zur Bindung an PI-haltige Vesikel leicht erniedrigt war.

Zusätzlich wurde das Konstrukt E^{rns}-6-4 getestet, das im Vergleich zum Gesamtanker nur kurze N- und C-terminale Trunkierungen aufweist. Dieses Konstrukt zeigte interessanterweise eine unveränderte starke Bindung in beiden negativ geladenen Vesikelsystemen. Damit war gezeigt, dass gleichzeitige Verkürzung von N- und C-Terminus des E^{rns}-Ankers nicht automatisch die Lipidbindung dramatisch stören.

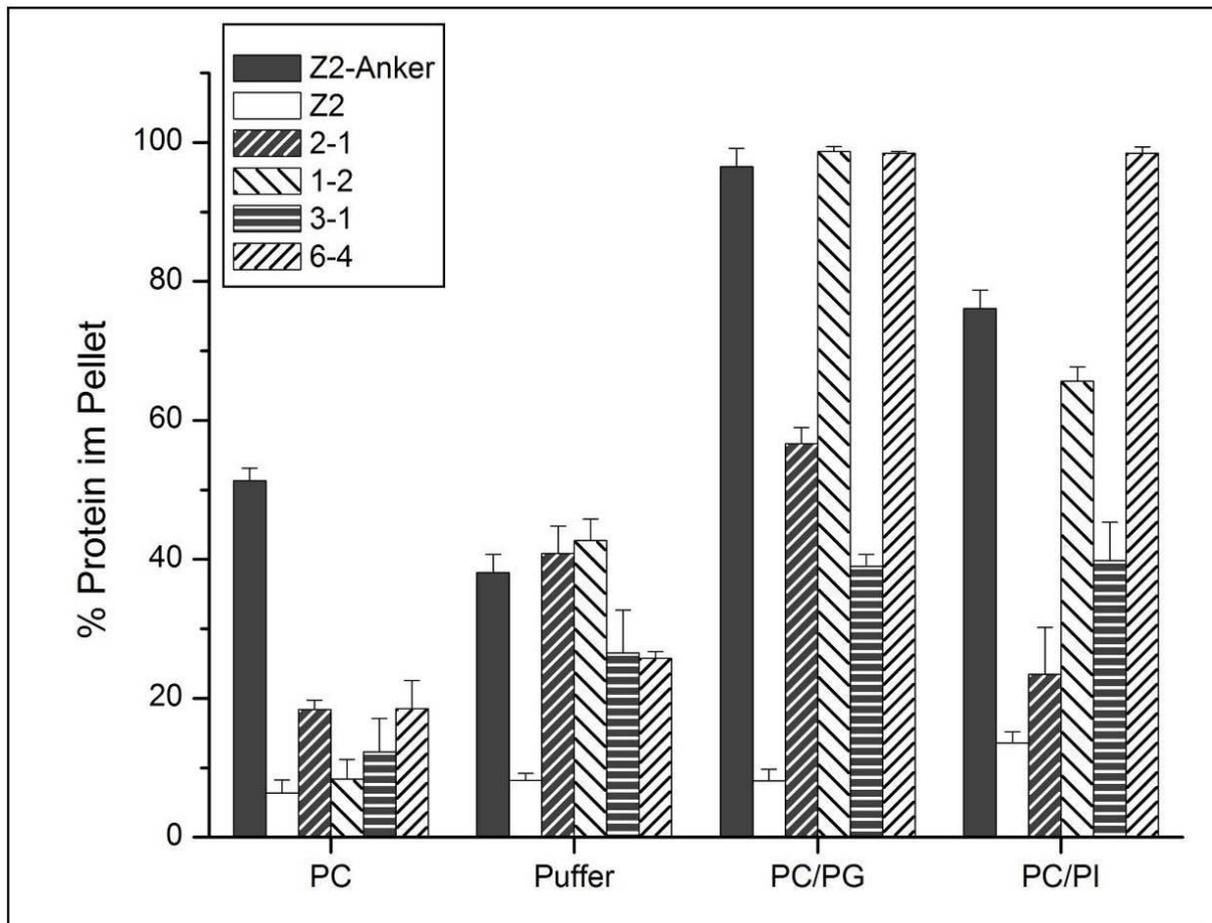


Abbildung 44: Lipidbindungsanalysen von E^{rms}-Ankermutanten, mit sowohl N- als auch C-terminalen Verkürzungen

Lipidbindungsanalysen von verschiedenen E^{rms}-Ankerfragmenten. Dabei entspricht Erns-2-1 (2-1) der Position Thr 172 – Arg 194, Erns-1-2 (1-2) der Position Arg 194 – Lys 220, Erns-3-1 (3-1) der Position Tyr 181 – Trp 203 und Erns-6-4 (6-4) der Position Lys 167 – Asn 217 des E^{rms}-Proteins. Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{rms}-Ankers ist als schwarzer Balken (Z2-Anker) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{rms}-Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Um den Einfluss der Amphipatizität dieser N- und C-terminal verkürzten Konstrukte auf die Lipidbindung zu analysieren, wurden Alanininsertionen eingeführt, die eine Brechung der Amphipatizität verursachen. Dazu wurde beim Konstrukt E^{rms}-2-1 1A ein Alanin an der Position 181 und beim Konstrukt E^{rms} 1-2 3A ein Alanin an der Position 204 eingefügt. In Abbildung 45 sind die Ergebnisse dieser Analysen dargestellt. Wie erwartet führte die Alanininsertion beim Konstrukt E^{rms}-2-1 zu einem Verlust der Bindung an DMPG-haltige Vesikel. In PI-haltigen Vesikeln war bei dem Konstrukt mit und ohne Alanininsertion keine Bindung mehr messbar. Überraschenderweise blieb beim Konstrukt E^{rms} 1-2 3A die Bindungsfähigkeit an DMPG-haltige Vesikel vollständig erhalten. In PI-haltigen Vesikeln erhöhte sich sogar die Bindungsfähigkeit des C-terminalen Bereiches des E^{rms}-Ankers durch die Alanininsertion. Somit ist die Amphipatizität nur für die Lipidbindung des N-terminalen Bereiches wichtig und hat keine Bedeutung für die Lipidinteraktion des C-terminalen Bereiches.

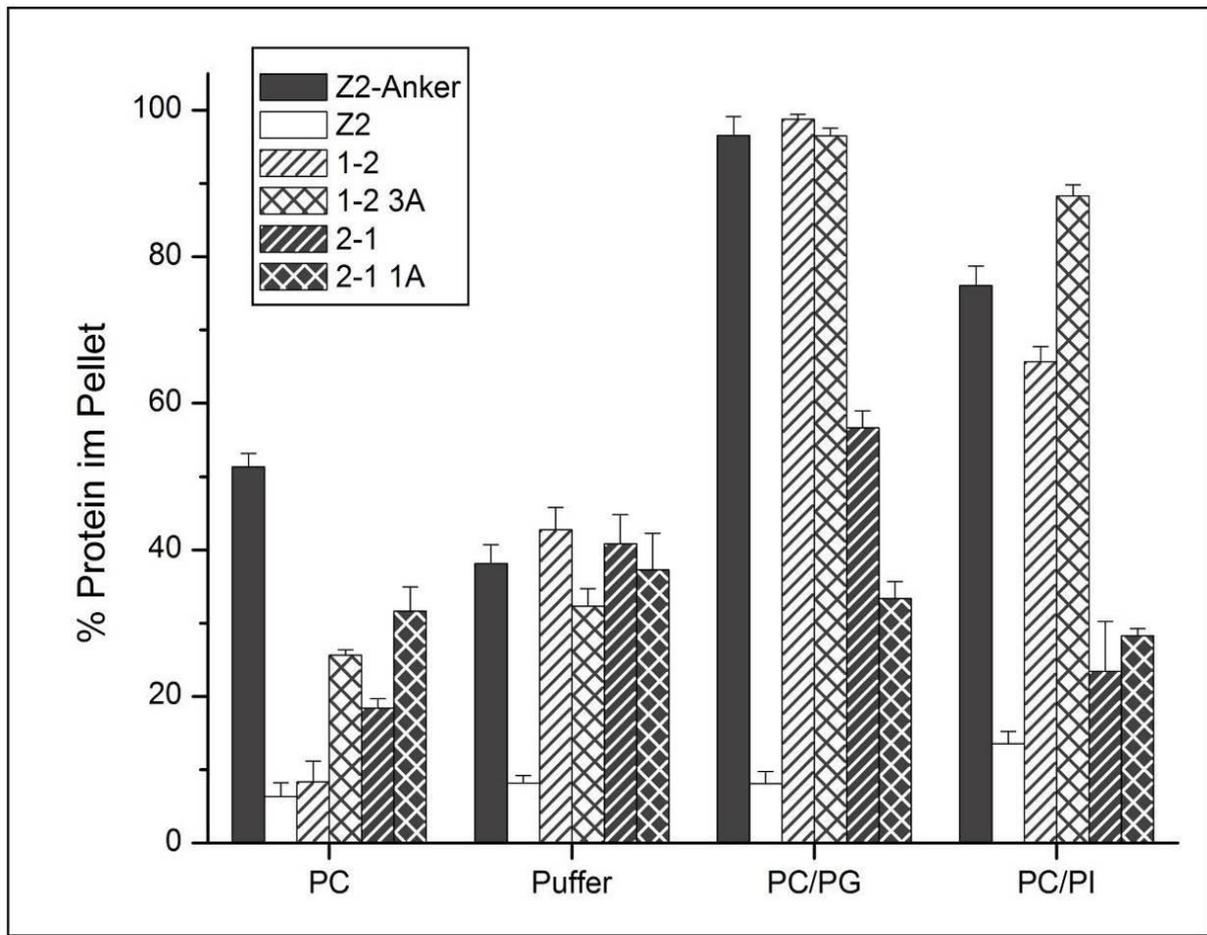


Abbildung 45: Lipidbindungsanalysen von Teilbereichen des E^{ms}-Ankers mit Alanininsertionen

Lipidbindungsanalysen von verschiedenen E^{ms}-Ankerfragmenten im Vergleich mit und ohne Alanininsertion. Dabei entspricht Erns-1-2 (1-2) der Position Arg 194 – Lys 220 des E^{ms}-Proteins und Erns-1-2 3A (1-2 3A) einer Alanininsertion an Position 204 in dieser Sequenz. Erns-2-1 (2-1) entspricht der Position Thr 172 – Arg 194 im E^{ms}-Protein und Erns-2-1 1A (2-1 1A) einer Alanininsertion an Position 181 in dieser Sequenz. Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{ms}-Ankers ist als schwarzer Balken (Z2-Anker) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms}-Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Um festzustellen ob die lokale Struktur der beiden N- und C-terminal verkürzten Konstrukte für eine Lipidbindung wichtig ist, wurden Prolinsubstitutionen durchgeführt. Dazu wurde für das mehr N-terminal liegende Konstrukt die Aminosäure His 180 (2-1 PS1) und für das mehr C-terminal orientierte Konstrukt die Aminosäuren Trp 203 (1-2 PS3) und Gly 209 (1-2 PS4) bzw. beide gleichzeitig (1-2 PS3,4) gegen Prolin ausgetauscht. In Abbildung 46 sind die Ergebnisse dieser Prolinsubstitutionen dargestellt. Das Konstrukt E^{ms} 1-2 PS4 zeigte keine Änderung der Lipidbindungsfähigkeit. Im Gegensatz dazu ergab sich für E^{ms} 1-2 PS3 eine Beeinträchtigung der Bindung an DMPG-haltige Vesikel und ein nahezu vollständiger Verlust der Bindungsfähigkeit an PI-haltige Vesikel. Das Konstrukt E^{ms} 1-2 PS3,4, das beide eben genannten Prolinsubstitutionen enthielt, zeigte eine nochmals stärkere Reduktion der Bindung an DMPG-haltige Vesikeln verglichen mit dem Einzelaustausch Trp 203 Pro. Eine Bindung an PI-haltige Vesikel konnte nicht mehr detektiert werden. Die Prolinsubstitution im N-terminalen Bereich des E^{ms}-Ankers (E^{ms} 2-1 PS1) führt zu einem vollständigen Verlust der Bindungsfähigkeit in beiden negativ geladenen Vesikelsysteme.

Prolininsertionen an den o.b. Positionen zeigten einen vergleichbaren Effekt wie die Prolinsubstitutionen (Daten nicht gezeigt).

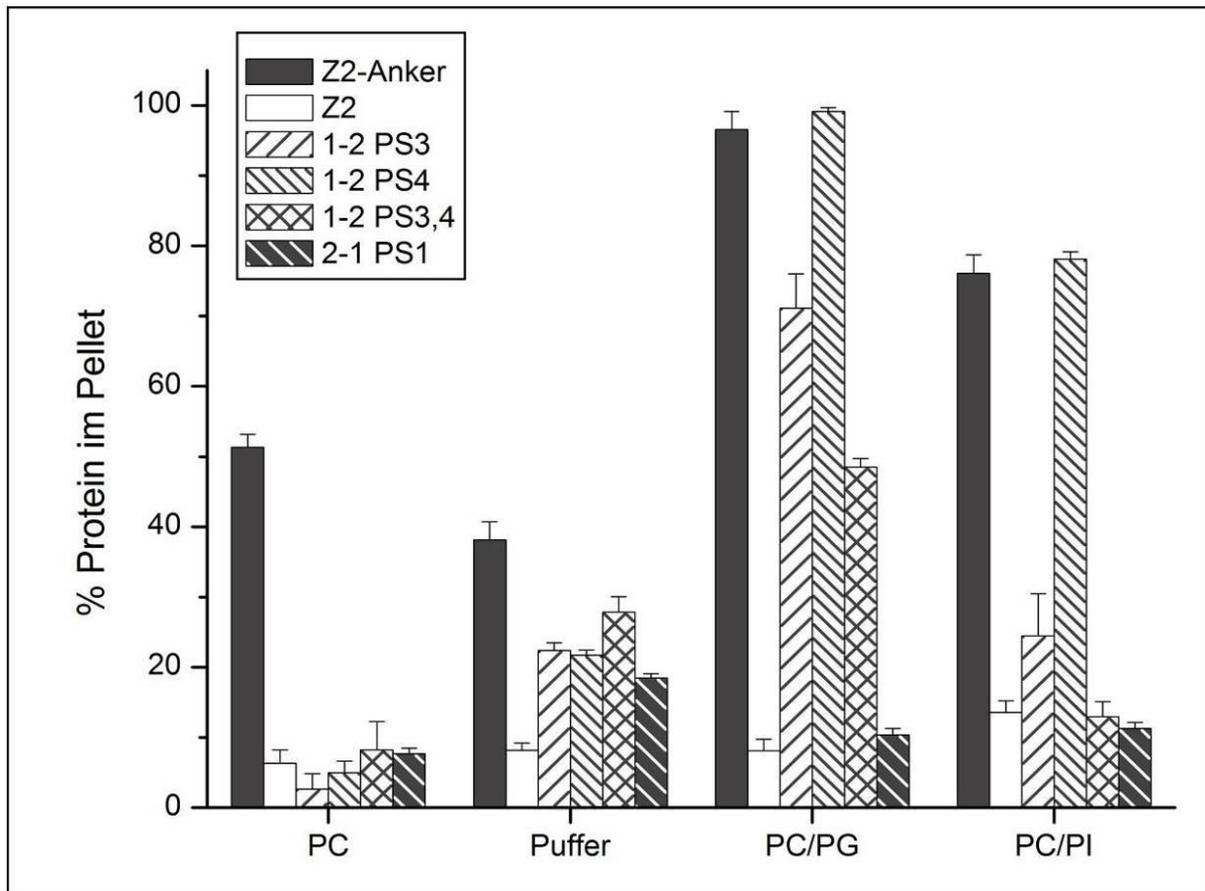


Abbildung 46: Lipidbindungsanalysen von Teilbereichen des E^{ms} -Ankers mit verschiedenen Prolinsubstitutionen

Lipidbindungsanalysen von E^{ms} -Ankerfragmenten mit Prolinsubstitutionen. In die Fragmente Erns-1-2 (1-2) und Erns-2-1 (2-1) wurden Prolinsubstitutionen eingeführt. In Erns-1-2 erfolgte der Austausch an den Positionen Trp 203 (1-2 PS3), Gly 209 (1-2 PS4) sowie an beiden Positionen Trp 203 und Gly 209 zusammen (1-2 PS3,4). Im Konstrukt Erns-2-1 wurden die Substitution an der Position His 180 (2-1 PS1) vorgenommen. Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des unveränderten E^{ms} -Ankers ist als schwarzer Balken (Z2-Anker) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms} -Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

Um die Lipidbindung des C-terminalen Bereiches des E^{ms} -Ankers besser verstehen zu können, wurden verschiedene C-terminale Verkürzungen analysiert. Verkürzungen von mehr als drei Aminosäuren am C-terminalen Ende des E^{ms} -Ankers hatten im biologischen System zu einer stärkeren Sekretion des E^{ms} -Proteins geführt.

Da C-terminale Verkürzungen am gesamten E^{ms} -Anker zu keiner Reduktion der Lipidbindung führten (Daten nicht gezeigt), wurden die C-terminale Verkürzungen am C-terminalen Fragment E^{ms} -1 durchgeführt. Dazu wurde der C-Terminus dieses Konstruktes schrittweise um jeweils 3 - 4 Aminosäuren verkürzt (siehe Abbildung 47).

Konstrukt	Sequenz
Erns-1	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
Erns-1-WFG	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFG
Erns-1-SKT	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKT
Erns-1-LEN	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLEN
Erns-1-KK	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKK

Abbildung 47: Aminosäuresequenzen der verwendeten C-terminal verkürzten Konstrukte

Aminosäuresequenzen der Konstrukte Erns-1-WFG, Erns-1-SKT, Erns-1-LEN und Erns-1-KK, die C-terminale Verkürzungen des E^{rns}-Ankerfragmentes Erns-1 darstellen. Der N-terminale tag ist hier nicht dargestellt.

In Abbildung 48 ist das Ergebnis der Lipidbindungsanalysen dieser verkürzten Konstrukte dargestellt. Im Vergleich mit dem Grundkonstrukt E^{rns}-1 zeigte nur die Verkürzung um 3 Aminosäuren (1-WFG; 1-1) eine leichte Reduktion in der Bindung an DMPG-haltige Vesikel. Bei den Konstrukten E^{rns}-1-SKT (-1-2) und E^{rns}-1-KK befand sich dagegen bei Vesikeln mit PI ein niedrigerer Anteil der Proteine im Pellet. Dabei war die Reduktion bei dem um 6 Aminosäuren verkürzten Konstrukt E^{rns}-1-SKT ausgeprägter als bei E^{rns}-1-KK, das um 13 Aminosäuren verkürzt ist. Somit können die Effekte im biologischen System, die bei C-terminalen Verkürzungen des E^{rns}-Ankers auftraten, nicht auf eine Reduktion der Lipidbindung des E^{rns}-Ankers zurückgeführt werden.

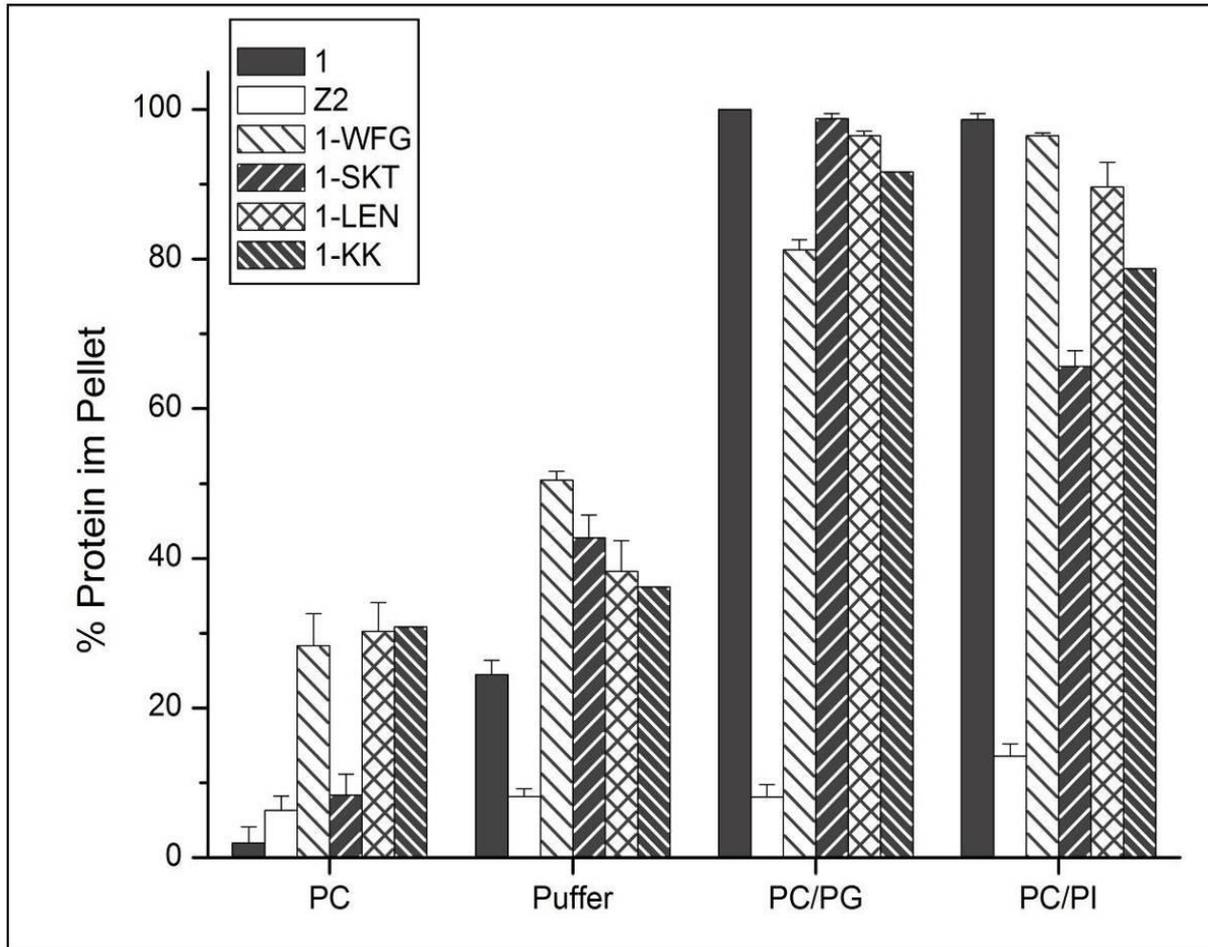


Abbildung 48: Lipidbindungsanalysen von weiteren C-terminal verkürzten E^{rns} -Ankermutanten

Lipidbindungsanalysen des C-terminalen E^{rns} -Ankerfragmentes Erns-1 mit C-terminalen Verkürzungen. Dabei enthält Erns-1-1 (1-WFG) eine C-terminale Verkürzung um 3 Aminosäuren, Erns-1-2 (1-SKT) eine C-terminale Verkürzung um 6 Aminosäuren, Erns-1-LEN (1-LEN) einer C-terminalen Verkürzung um 10 Aminosäuren und Erns-1-KK (1-KK) eine C-terminale Verkürzung um 13 Aminosäuren. Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des C-terminalen Ankerfragmentes Erns-1 ist als schwarzer Balken (1) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{rns} -Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

4.1.6 Verlängerung des E^{rns} -Ankers mittels Aminosäuren aus der N-terminalen Region von E1

E1 ist ein virales Glykoprotein, das im Polyprotein von Pestiviren direkt E^{rns} nachfolgt. Die Spaltung zwischen E^{rns} und E1, die durch die Signalpeptidase katalysiert wird, ist in der Zelle verzögert, so dass ein Zwischenprodukt detektiert werden kann, das eine Fusion von E^{rns} und E1 darstellt. Vorherige Analysen hatten gezeigt, dass in einem zellbiologischen System eine Verlängerung des E^{rns} -Proteins mit wenigen Aminosäuren von E1 zu einer starken Sekretion von E^{rns} führte. Somit könnte eine Verlängerung des E^{rns} -Ankers einen Einfluss auf die Lipidbindungsfähigkeit haben. Um dies zu überprüfen, wurden C-terminale Verlängerungen des E^{rns} -Ankers mit Aminosäuren von E1 generiert.

Dabei wurden Verlängerungen um 1, 4, 7, 9, 10 und 20 Aminosäuren analysiert. Da die meisten der mit Aminosäuren von E1 verlängerten Konstrukte des gesamten E^{rns}-Ankers eine sehr schlechte Löslichkeit besaßen und somit keinen Rückschluss auf die Lipidbindung möglich war, wurde für die Analyse das C-terminale E^{rns}-Ankerfragment E^{rns}-1 verwendet. Die Sequenzen der analysierten Proteine sind Abbildung 49 dargestellt.

Konstrukt	Sequenz
Erns_1	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
Erns_1+1AS	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
Erns_1+4AS	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYAASPY
Erns_1+7AS	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYAASPYCEV
Erns_1+9AS	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYAASPYCEVER
Erns_1+10AS	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYAASPYCEVERK
Erns_1+20AS	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYAASPYCEVERKLGYYIWTKNC

Abbildung 49: Sequenzen der mit Aminosäuren von E1 verlängerten E^{rns}-Ankervarianten

Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine Erns_1+1AS, Erns_1+4AS, Erns_1+7AS, Erns_1+9AS, Erns_1+10AS und Erns_1+20AS. Sie entsprechen C-terminalen Verlängerungen von 1, 4, 7, 9, 10 oder 20 Aminosäuren des Erns_1 Konstruktes, wobei die Aminosäuren im Verlängerungsteil den N-terminalen Aminosäuren des pestiviralen Glykoproteins E1 (BVDV Stamm CP7) entsprechen. Der N-terminale tag ist hier nicht dargestellt.

In der Abbildung 50 erkennt man, dass die Konstrukte mit einer Verlängerung von 10 (1+10AS) oder 20 (1+20AS) Aminosäuren in beiden Vesikelsystemen fast vollständig pelletiert werden konnten. Für das Konstrukt mit 9 zusätzlichen Aminosäuren (1+9AS) dagegen zeigte sich im PI-System eine Reduktion des Proteinanteils im Pellet, wohingegen die Reduktion in DMPG-haltigen Vesikeln nicht so stark ausgeprägt war. Die Verlängerung um 7 Aminosäuren (1+7AS) führte in beiden Vesikelsystemen zu einer ähnlich reduzierten Lipidbindung. Die Verlängerungen um 1 oder 4 Aminosäuren (1+1AS; 1+4AS) zeigten in beiden Systemen nur eine leichte Reduktion in der Lipidbindung, die in den DMPG-haltigen Vesikeln etwas stärker ausgeprägt war.

Somit führte die Verlängerung des E^{rns}-Ankers nur in einigen Fällen zu einer geringfügigen Reduktion des Lipidbindungsvermögens. Zudem ist dieser Effekt von der Anzahl der zugefügten Aminosäuren abhängig, da eine Verlängerung um 1 oder 4 Aminosäuren kaum einen Einfluss hatte, die Verlängerungen um 7 oder 9 Aminosäuren jedoch einen großen. Interessanterweise wird dieser Effekt durch eine weitere zusätzliche Aminosäure aufgehoben, denn wenn der E^{rns}-Anker um 10 Aminosäuren verlängert vorliegt (1+10AS), kommt es zu einer vollständigen Wiederherstellung der Lipidbindungsfähigkeit.

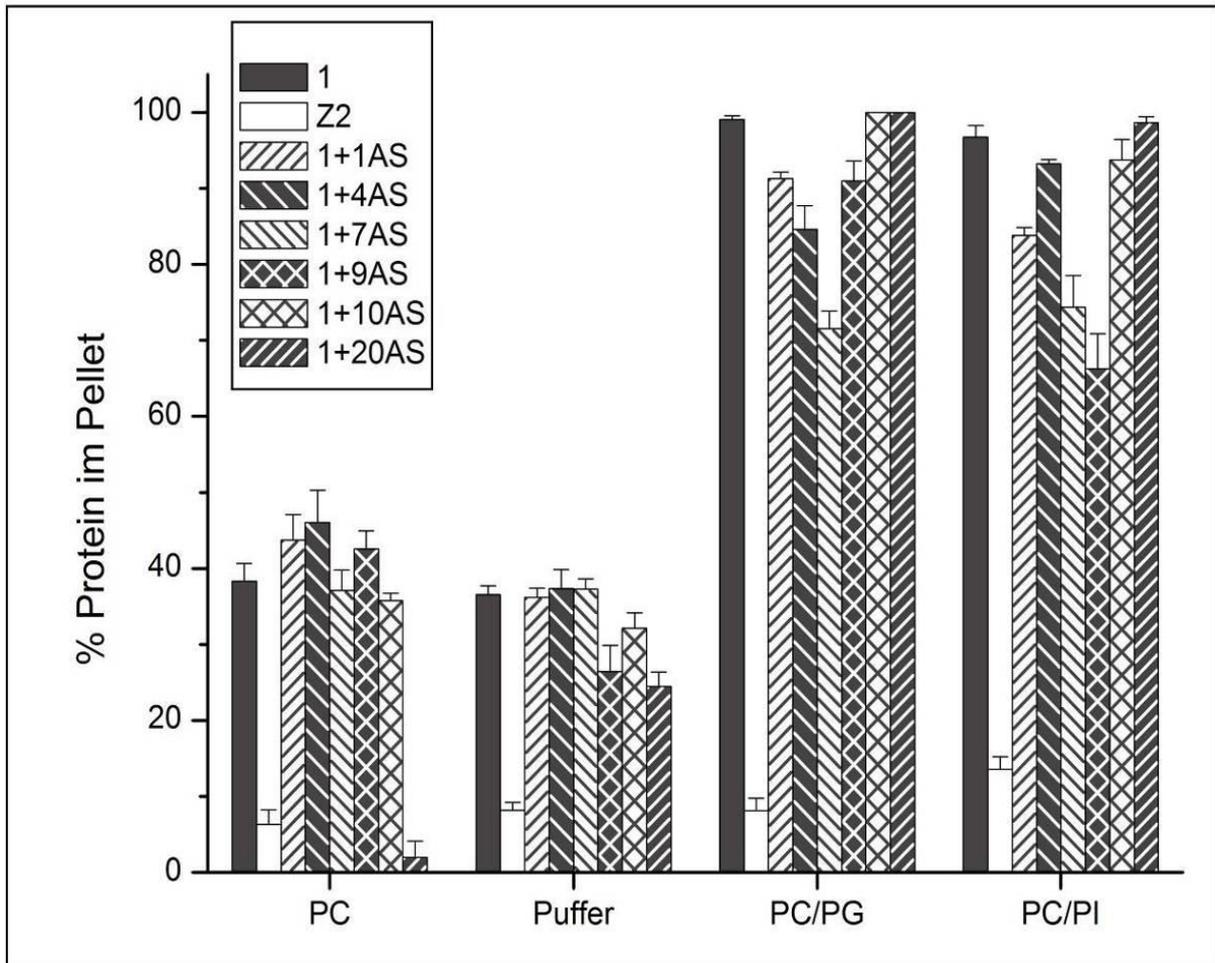


Abbildung 50: Lipidbindungsanalysen von E^{ms}-Ankervarianten, die mit Aminosäuren von E1 verlängert wurde

Lipidbindungsanalysen von verschiedenen C-terminalen Verlängerungen des E^{ms}-Ankerfragmentes Erns-1 mit Aminosäuren des pestiviralen Glykoproteins E1 (BVDV Stamm CP7). Dabei entspricht Erns_1+1AS (1+1AS) einer Verlängerung um 1 Aminosäure, Erns_1+4AS (1+4AS) einer Verlängerung um 4 Aminosäuren, Erns_1+7AS (1+7AS) einer Verlängerung um 7 Aminosäuren, Erns_1+9AS (1+9AS) einer Verlängerung um 9 Aminosäuren, Erns_1+10AS (1+10AS) einer Verlängerung um 10 Aminosäuren und Erns_1+20AS (1+20AS) einer Verlängerung um 4 Aminosäuren von E1. Als Messsysteme wurden reiner Puffer (Puffer) und Vesikel aus reinem DMPC (PC) sowie negativ geladene Vesikel aus DMPC/DMPG (PC/PG) und DMPC/PI (PI) verwendet. Die Bindung des C-terminalen Ankerfragmentes Erns-1 ist als schwarzer Balken (1) und die des Kontrollkonstruktes ohne E^{ms}-Anker (Z2) ist als weißer Balken dargestellt. Die angegebene Standardabweichung zeigt dabei die Varianz von drei unabhängigen Versuchen an.

4.1.7 Bemerkung zur den Lipidbindungsexperimente

Durch die Lipidbindungsversuche wurden neue Erkenntnisse über die Lipidbindungsfähigkeit des E^{ms}-Ankers erhalten. Mit diesen Versuchen kann jedoch nur eine Aussage über die reine Lipidinteraktion des E^{ms}-Ankers getroffen werden, denn es kann keine Information über die Struktur des bindenden Proteins erhalten werden. Eine Aussage über die globale Struktur des E^{ms}-Ankers erhält man nur über die Zirkulardichroismus Spektroskopie (CD).

4.2 Analyse der Sekundärstruktur des E^{rns}-Ankers mittels CD-Spektroskopie

Mit Hilfe der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) ist eine Bestimmung der globalen Struktur eines Proteins oder Peptides möglich (vgl. 1.2.1). Um die in Abbildung 51 angegebenen rekombinanten Proteine analysieren zu können; wurden sie wie unter 3.2.5 beschrieben exprimiert und aufgereinigt. Anschließend erfolgte die eigentliche CD-Messung (siehe 3.3.2). Die erhaltenen CD-Spektren wurden wie unter 3.3.2.4 beschrieben analysiert.

Konstrukt	Sequenz
Erns	GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLVDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
Erns_1	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
Erns_1-1	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFG
Erns_6-4	GKEHDCTSVIQDTAHYLVDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLEN
Erns_4	GDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
Erns_5	GQDTAHYLVDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
Erns_1+10AS	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYAASPYCEVERK

Abbildung 51: Konstrukte für die CD-Analysen

Überblick über die verwendeten Proteine für die CD-Analysen. Die E^{rns}-Sequenz repräsentiert die E^{rns}-Ankersequenz, die der Sequenz des E^{rns}-Proteins von Lys 167 bis Ala 227 entspricht. Die anderen aufgezählten Konstrukte stellen N- oder C-terminale Trunkierungen der E^{rns}-Sequenz dar. Die 10 zusätzlichen Aminosäuren beim Konstrukt Erns_1+10AS stammen vom Protein E1, das im Polyprotein direkt auf E^{rns} folgt.

4.2.1 Strukturanalyse des gesamten E^{rns}-Ankers

Um einen ersten Eindruck über die Faltungsmöglichkeiten des E^{rns}-Ankers (Lys 167 bis Ala 227) zu bekommen, wurde ein Spektrum in 10 mM Phosphatpuffer mit einem pH von 6,5 und in einer 50%igen TFE-Lösung in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 aufgenommen. Die Spektren sind in Abbildung 52 dargestellt. TFE wurde als Lösungsmittel gewählt, da es die einfachste membransimulierende Umgebung darstellt, indem es vor allem die Bildung intramolekularer Wasserstoffbrücken begünstigt und die Interaktion mit H₂O-Molekülen abschirmt. Dadurch zwingt es das Protein in eine helikale Faltung. Hierdurch lässt sich analysieren, ob das Protein überhaupt eine Tendenz zu helikaler Faltung aufweist. Bei der qualitativen Analyse der Spektren wird offensichtlich, dass im Phosphatpuffer nur eine geringe helikale Faltung des E^{rns}-Ankers vorliegt. Dagegen erkennt man bei der 50%igen TFE-Lösung eine starke helikale Faltung, da der für eine helikale Faltung typische Kurvenverlauf mit einem Maximum bei 192 nm und den beiden Minima bei 209 bzw. 222 nm deutlich ausgeprägt ist. Auch die quantitative Analyse, die in Abbildung 53 dargestellt ist, unterstützt diese Schlussfolgerung. Die schlechte Faltung in reinem Phosphatpuffer lässt sich durch die schlechte Löslichkeit in diesem erklären und die resultierende Trübung der Probe führt zu spektralen Artefakten durch differentielle Streuungseffekte, die in einer Verminderung der Bandenintensität bei kurzen Wellenlängen resultieren.

Um die Löslichkeit des Proteins im Phosphatpuffer zu erhöhen, wurde ein saurer pH-Wert eingestellt. Bei pH 3 (siehe Abbildung 53) zeigte sich eine gute Löslichkeit des Proteins und auch der helikale Anteil der Faltung stieg von ca. 28 % auf ca. 53 %.

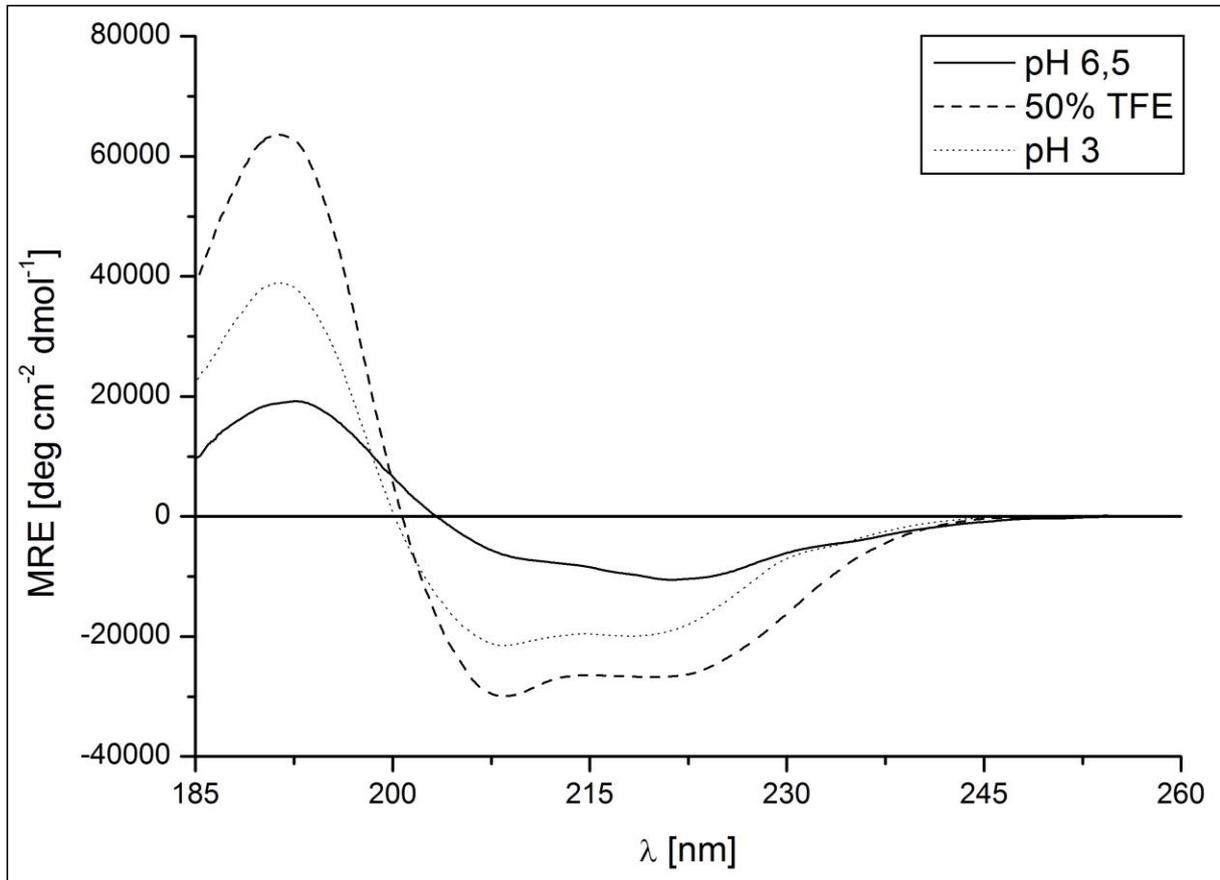


Abbildung 52: CD-Spektrum des E^{rms} -Ankers in 50%TFE und Phosphatpuffer

CD-Spektrum des E^{rms} -Ankers (Lys167-Ala227) in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 (durchgezogene Linie), 50 % TFE in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 (gestrichelte Linie) und 10 mM Phosphatpuffer pH 3 (gepunktete Linie).

Es wurden anschließend weitere chemische Umgebungen getestet. Die Ergebnisse dieser Analysen sind auch in Abbildung 53 dargestellt.

Zuerst wurde die Faltung in Mizellen getestet. Dazu wurden Mizellen aus dem neutral geladenen Detergenz DPC und dem negativ geladenen Detergenz SDS verwendet. In beiden Systemen konnte eine hohe Tendenz zu einer helikalen Faltung des E^{rms} -Ankers festgestellt werden. Da Mizellen jedoch weit vom natürlichen System einer biologischen Membran entfernt sind, wurde anschließend die Faltung des E^{rms} -Ankers in Lipidvesikeln getestet, die ein natürlicheres System darstellen. Als Testsystem wurden Vesikel aus DMPC und DMPC/DMPG (1:1) eingesetzt, die wie in 3.3.2.2 beschrieben hergestellt wurden. DMPC trägt wie DPC eine positive und eine negative Ladung und ist somit ein Zwitterion, das nach außen hin elektrisch neutral erscheint. DMPG besitzt dagegen nur eine negative Ladung und bildet dadurch negativ geladene Vesikel aus. In beiden Vesikelsystemen zeigte sich wie schon bei den Mizellen eine starke helikale Faltung.

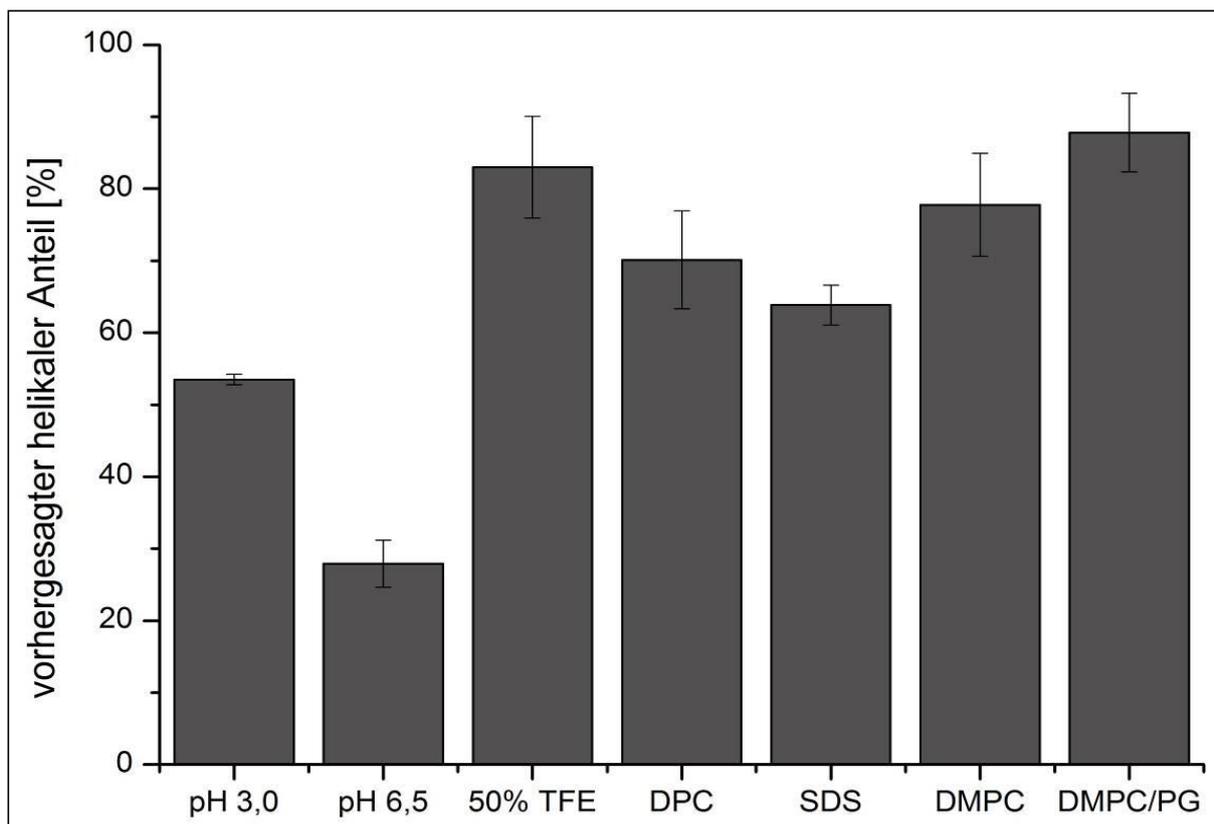


Abbildung 53: Vorhergesagter helikaler Anteil des E^{ms} -Ankers in verschiedenen chemischen Systemen

Mittelwert des vorhergesagten helikalen Faltungsanteils aus den drei verwendeten Sekundärstrukturauswerteprogrammen (CDSSTR, CONTIN-LL und SELCON-3) für den E^{ms} -Anker (Lys 167-Ala 227) in verschiedenen Systemen. Die Standardabweichung gibt die Abweichung zwischen den verschiedenen Vorhersagen an. Wenn nicht anders angegeben, fanden die Messungen in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 statt. Als Mizellen wurden ein zwitterionisches System aus DPC und ein negativ geladenes System aus SDS verwendet. Als Vesikel wurde das Zwitterion DMPC und eine Mischung aus DMPC und dem negativ geladenen DMPG (1:1) verwendet.

Einige antibiotisch wirkende amphipatische Helices zeigen mit steigender Konzentration eine Umorientierung und eine dadurch ausgelöste Zusammenlagerung zu einer Membranpore. Um einen konzentrationsabhängigen Faltungsunterschied des E^{ms} -Ankers untersuchen zu können, wurden CD-Spektren mit unterschiedlichen Protein/Lipidverhältnissen aufgenommen. Durch ein niedrigeres Protein/Lipidverhältnis wird eine lokale Konzentrationserhöhung des Proteins auf der Membran erreicht, da weniger Membranen für eine Interaktion zu Verfügung stehen. Bei einem hohen Protein/Lipidverhältnis wird die lokale Konzentration des E^{ms} -Ankers dagegen erniedrigt, da mehr Membranen für eine Interaktion vorhanden sind. In Abbildung 54 sind die CD-Spektren der Protein/Lipidverhältnis 1:20; 1:50; 1:100 und 1:200 gezeigt. Alle Spektren sehen dabei nahezu identisch aus und zeigen eine deutliche helikale Faltungstendenz, so dass man davon ausgehen kann, dass es zu keiner konzentrationsbedingten Umfaltung kam.

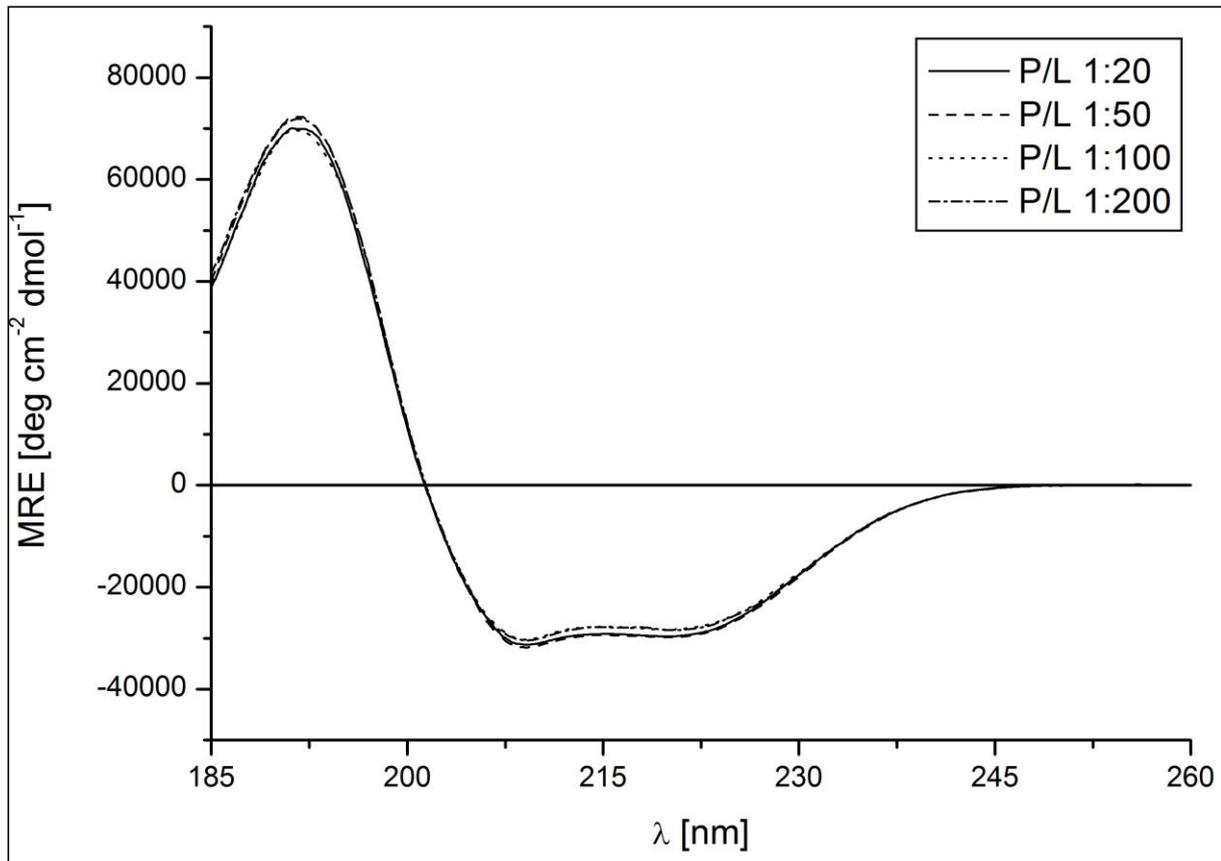


Abbildung 54: CD-Spektren des E^{ms}-Ankers gemessen bei verschiedenen Protein/Lipidverhältnissen

CD-Spektren des E^{ms}-Ankers (Lys167-Ala227) in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5. Die unterschiedlichen Spektren wurden mit veränderten Verhältnissen von Lipid [DMPC/DMPG(1:1)] zu Protein aufgenommen. Die durchgezogene Linie repräsentiert ein Protein/Lipidverhältnis von 1:20, die gestrichelte Linie ein Verhältnis von 1:50, die gepunktete Linie ein Verhältnis von 1:100 und die abwechselnd gestrichelte/gepunktete Linie ein Verhältnis von 1:200.

4.2.2 Vergleichende Strukturanalyse des E^{ms}-Ankers von BVDV und CSFV

In meiner Diplomarbeit habe ich bereits die CD-Spektren von drei überlappenden Peptiden untersucht, die dem C-Terminus des BVDV CP7 E^{ms} entsprechen. Um mögliche Unterschiede in der Faltung des E^{ms}-Ankers zwischen Pestiviren erkennen zu können, wurden analoge Versuche für die entsprechende Sequenz des CSFV Alfort/Tübingen durchgeführt. Dazu wurden wieder im gleichen Bereich wie zuvor bei der Analyse der BVDV CP7 E^{ms} Faltung drei überlappende Peptide vom C-Terminus des E^{ms}-Proteins vom CSFV Stamm Alfort/Tübingen synthetisiert (EZ Biolabs, Carmel, IN) und mittels CD-Spektroskopie analysiert. In Abbildung 55 sind die Aminosäuresequenzen der analysierten Peptide einander gegenübergestellt. Dabei wurden die BVDV Peptide als Erns1, Erns2 und Erns3 benannt und die korrespondierenden CSFV Peptide Erns4, Erns5 und Erns6. Beim Vergleich der Sequenzen von BVDV und CSFV fällt auf, dass die meisten Aminosäuren stark konserviert sind (in Abbildung 55 schwarz markiert). Einige Aminosäuren sind durch Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ausgetauscht (in Abbildung 55 **Fett** markiert). Nur wenige Positionen sind durch nicht verwandte Aminosäuren besetzt (in Abbildung 55 Unterstrichen markiert). Auch die Ladung der verschiedenen Peptide ist stark konserviert; Erns1 und Erns4 sind zweifach negativ geladen und Erns2, Erns3, Erns5 und Erns6 sind mehrfach positiv geladen.

Zusammengefasst lässt sich damit sagen, dass das E^{ms}-Protein beider Virenstämme im C-terminalen Bereich sehr sequenzhomolog ist.

BVDV CP7		
Erns1 ⁽⁻²⁾	Erns2 ⁽⁺²⁾	Erns3 ⁽⁺⁴⁾
TSVIQDTA <u>H</u> YLV <u>D</u> GMTNS <u>L</u> ES <u>A</u> R		
	NS <u>L</u> ESARQGTAK <u>L</u> T <u>T</u> WLGRQ <u>L</u> GI	
		LGRQ <u>L</u> GI <u>L</u> GKKLE <u>N</u> KS <u>K</u> TWFGAYA
G <u>S</u> LLQDTALYLL <u>D</u> GMTNT <u>I</u> ENAR		
	NT <u>I</u> ENARQGA <u>A</u> RV <u>T</u> SWLGRQ <u>L</u> ST	
		LGRQ <u>L</u> STAGKKLE <u>R</u> RS <u>K</u> TWFGAYA
CSFV Alfort/Tübingen		
Erns4 ⁽⁻²⁾	Erns5 ⁽⁺²⁾	Erns6 ⁽⁺⁵⁾

Abbildung 55: Sequenzen der verwendeten Peptide

Schematische Darstellung der verwendeten Peptide. Für jeden untersuchten Virusstamm wurden drei überlappende Peptide mit einer Länge von ca. 23 Aminosäuren synthetisiert. Erns1, Erns2 und Erns3 repräsentieren zusammen den E^{ms}-Anker des BVDV Stammes CP7 (Thr 172 – Ala 227) und Erns4, Erns5 und Erns6 entsprechen zusammen dem E^{ms}-Anker des CSFV Stammes Alfort/Tübingen (Thr 172 – Ala 227). Hinter den Peptidnamen ist in einer runden Klammer die Ladung des jeweiligen Peptides angegeben. Dabei wurde Asp und Glu als negativ geladen und Arg und Lys als positiv geladen angenommen. Schwarze Aminosäuren zeigen Aminosäuren an, die zwischen den zwei Virenstämmen konserviert sind. Fett markierte Aminosäuren repräsentieren unterschiedliche Aminosäuren, deren chemische Eigenschaften jedoch ähnlich sind. Unterstrichene Aminosäuren zeigen unterschiedliche Aminosäuren an, deren chemische Eigenschaften auch unterschiedlich sind.

Um zu testen ob eine helikale Faltung der Peptide überhaupt möglich ist, wurde als erste Umgebung 50 % TFE gewählt, dass eine helikale Faltung der Peptide induziert. In Abbildung 56 sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass alle 6 gemessenen Peptide eine helikale Faltung annehmen können. Es sind jedoch auch gewisse Unterschiede zwischen den Peptiden erkennbar. Bei CSFV weisen alle drei Peptide einen annähernd gleich großen helikalen Faltungsanteil auf, wobei das mittlere Segment (Erns5) mit ca. 72 % den größten Helixanteil offenbart. Bei BVDV sind die gemessenen Unterschiede größer. Auch dort zeigt der mittlere Bereich der E^{ms}-Sequenz (Erns2) den größten helikalen Faltungsanteil, wobei jedoch die Helizität des hinteren Bereiches des E^{ms}-Ankers (Erns3) nur halb so groß ist. Auch der vordere Bereich ist mit einem Wert von ca. 30 % geringer helikal gefaltet. Bei den Mizellen-Systemen ist ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen BVDV und CSFV erkennbar. Bei CSFV zeigt der vordere und der mittlere Bereich der E^{ms}-Ankersequenz eine starke helikale Faltung in DPC und SDS-Mizellen, wobei der mittlere Bereich jeweils deutlich höhere Helixanteile aufweist. Dagegen ist der hintere Bereich in beiden Systemen deutlich niedriger helikal gefaltet als im TFE-System. Bei den BVDV -Peptiden weist nur der mittlere Bereich (Erns2) in DPC eine sehr geringe helikale Faltung auf. Der vordere und der hintere Bereich sind in diesem System konformell weitgehend ungeordnet. In SDS dagegen weist der

negativ geladene vordere Bereich der E^{rns}-Ankersequenz eine starke helikale Faltung auf, im Gegensatz zum mittleren bzw. hinteren Bereich.

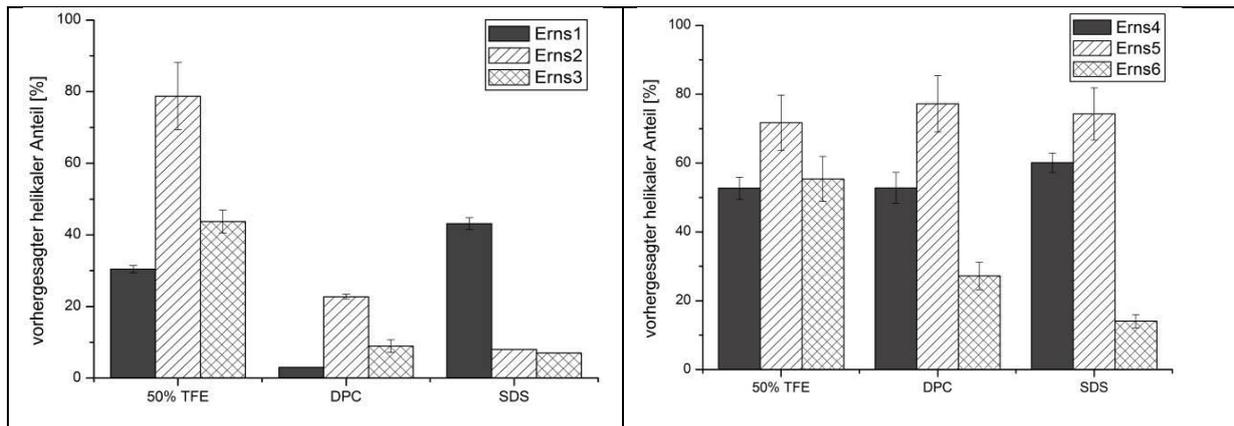


Abbildung 56: Vorhergesagter helikaler Faltungsanteil von BVDV und CSFV in 50 % TFE und Mizellen

Mittelwert des von den drei verwendeten Sekundärstrukturauswerteprogrammen (CDSSTR, CONTIN-LL und SELCON-3) vorhergesagten Helixanteils für die jeweiligen überlappenden Peptide in verschiedenen Systemen. Erns1, Erns2 und Erns3 repräsentieren zusammen den E^{rns}-Anker des BVDV Stammes CP7 (Thr 172 – Ala 227) und Erns4, Erns5 und Erns6 entsprechen zusammen dem E^{rns}-Anker des CSFV Stammes Alfort/Tübingen (Thr 172 – Ala 227). Die Standardabweichung gibt die Abweichung zwischen den verschiedenen Vorhersagen an. Die Messungen, die für die Vorhersage verwendet wurden, fanden in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 statt mit entweder 50 % TFE oder Mizellen aus dem Zwitterion DPC bzw. dem negativ geladenen SDS.

Um die Faltung der Peptide in einem natürlicheren System analysieren zu können, wurden Vesikel aus reinem DMPC und einer Mischung aus DMPC/DMPG (1:1) verwendet. In diesen Systemen konnten für die BVDV- und die CSFV-Peptide die gleichen Eigenschaften bestimmt werden (siehe Abbildung 57). In reinem DMPC zeigte keines der gemessenen Peptide eine helikale Faltung, wohingegen es bei den DMPC/DMPG-Vesikeln zu einer starken helikalen Faltung des mittleren und des hinteren Bereichs des E^{rns}-Ankers von BVDV und CSFV kam. Nur der vordere Bereich zeigte bei beiden Virenstämmen keine helikale Faltung in diesem Lipidsystem mit negativem Ladungsüberschuss.

Beim Vergleich der bei den Messungen für BVDV und CSFV erhaltenen Ergebnisse zeigte sich, wie durch die homologe Sequenz schon vermutet, dass die E^{rns}-Anker der beiden Virenstämme keinen drastischen Faltungsunterschied zeigten. Lediglich in den Mizellensystemen ergab sich für die untersuchten E^{rns}-Sequenzen ein deutlicher Unterschied. Entscheidend war aber, dass sie im natürlicheren Vesikelsystem die gleichen Faltungseigenschaften aufweisen. Interessanterweise zeigt im SDS-System nur das negativ geladene Erns1-Peptid des BVDV eine starke helikale Faltung, obwohl sowohl das Peptid als auch die Mizellen negativ geladen sind. Da die positiv geladenen BVDV-Peptide Erns2 und Erns3 nicht an die negativ geladenen Mizellen binden, kann man davon ausgehen, dass nicht nur die Ladung bei der Lipidbindung und Faltung eine Rolle spielt. Beim Vergleich von BVDV- und CSFV-Daten zeigt sich zusätzlich, dass der mittlere Bereich des Ankers beider Viren die höchste Fähigkeit zur helikalen Faltung besitzt, da das fragliche Peptid sowohl in 50 % TFE als auch in Gegenwart von DMPC/DMPG-Vesikeln einen höheren helikalen Anteil aufweisen konnte, als die vom vorderen und hinteren Bereich abgeleiteten Peptide.

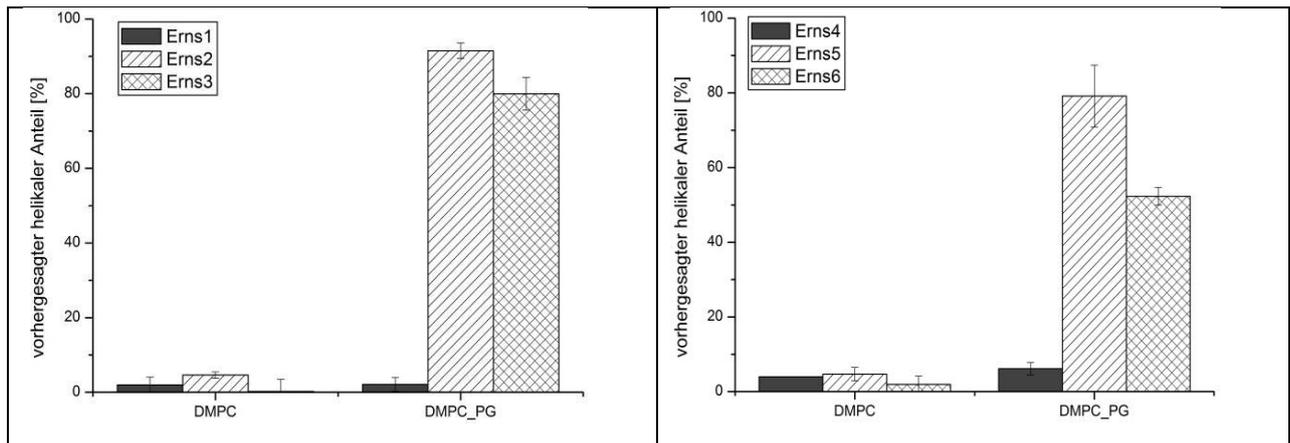


Abbildung 57: Vorhergesagter helikaler Faltungsanteil von BVDV und CSFV in reinem DMPC und DMPC/DMPG-Vesikeln

Mittelwert des von den drei verwendeten Sekundärstrukturauswerteprogrammen (CDSSTR, CONTIN-LL und SELCON-3) vorhergesagten helikalen Faltungsanteils aus den jeweiligen überlappenden Peptiden in DMPC oder DMPC/DMPG (1:1) Vesikeln. Erns1, Erns2 und Erns3 repräsentieren zusammen den E^{rns}-Anker des BVDV Stammes CP7 (Thr 172 – Ala 227) und Erns4, Erns5 und Erns6 repräsentieren zusammen den E^{rns}-Anker des CSFV Stammes Alfort/Tübingen (Thr 172 – Ala 227). Die Standardabweichung gibt die Abweichung zwischen den verschiedenen Vorhersagen an. Die Messungen, die für die Vorhersage verwendet wurden, fanden in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 statt

4.2.3 CD-Analyse verschiedener E^{rns}-Ankerbereiche in bizellhaltiger Lösung

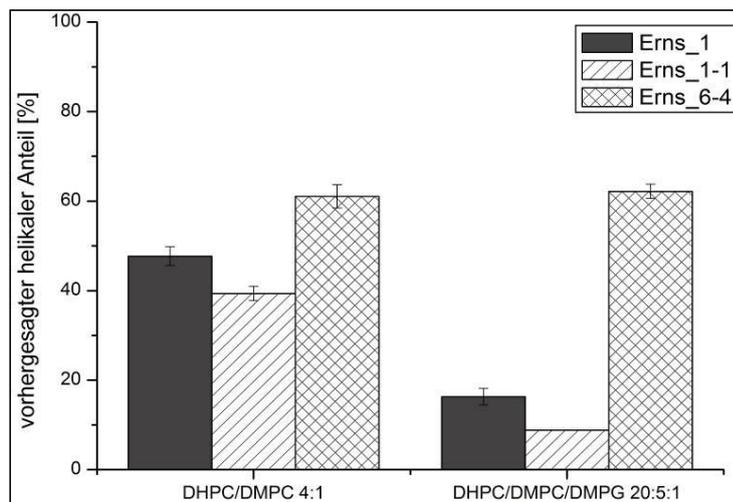


Abbildung 58: Vorhergesagter helikaler Faltungsanteil trunkierter E^{rns}-Ankersequenzen in Bizellen

Mittelwert des von den drei verwendeten Sekundärstrukturauswerteprogrammen (CDSSTR, CONTIN-LL und SELCON-3) vorhergesagten helikalen Faltungsanteils für die jeweiligen überlappenden Peptide in verschiedenen Bizellensystemen. Die Standardabweichung gibt dabei die Abweichung der verschiedenen Vorhersagen an. Die Messungen, die für die Vorhersage verwendet wurden, fanden in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 statt mit Bizellen aus DHPC/DMPC (4:1) oder DHPC/DMPC/DMPG (20:5:1). Erns_1 ist als schwarzer Balken, Erns_1-2 als gestreifter Balken und Erns_6-4 als kariertem Balken dargestellt.

Bizellen sind Vesikel, die aus zwei unterschiedlich langen Lipiden aufgebaut sind. In solchen Gemischen bildet das längere Lipid eine planare, scheibenartige Lipidoberfläche aus, die seitlich vom kürzeren Lipid abgeschlossen wird. Diese planare Lipidstruktur liegt zwar mit ihren Eigenschaften sehr nahe am natürlichen System, jedoch weisen Bizellen-Dispersionen oft starke Trübungen auf. Dies führt wiederum zu einer starken Streuung des UV-Messlichtes, wodurch diese Bizellen-Dispersion bei optischen Messungen wie der CD-Spektroskopie oder der UV-Absorptionsbestimmung nur schwer zu analysieren sind. Aus diesem Grund können die erhaltenen „quantitativen“ Ergebnisse nur einen Hinweis auf die Struktur liefern, da der tatsächliche helikale Faltungsanteil wahrscheinlich höher ist als die Messwerte zeigen.

Um die Faltung des E^{rns}-Ankers in einem planaren Membransystem zu untersuchen, wurden verschiedene Sequenzen mit N- und C-terminalen Verkürzungen exprimiert und anschließend im Bizellensystem analysiert. Dabei wurde ein zwitterionisches System aus DHPC/DMPC(4:1) und ein negativ geladenes System aus DHPC/DMPC/DMPG(20:5:1) verwendet.

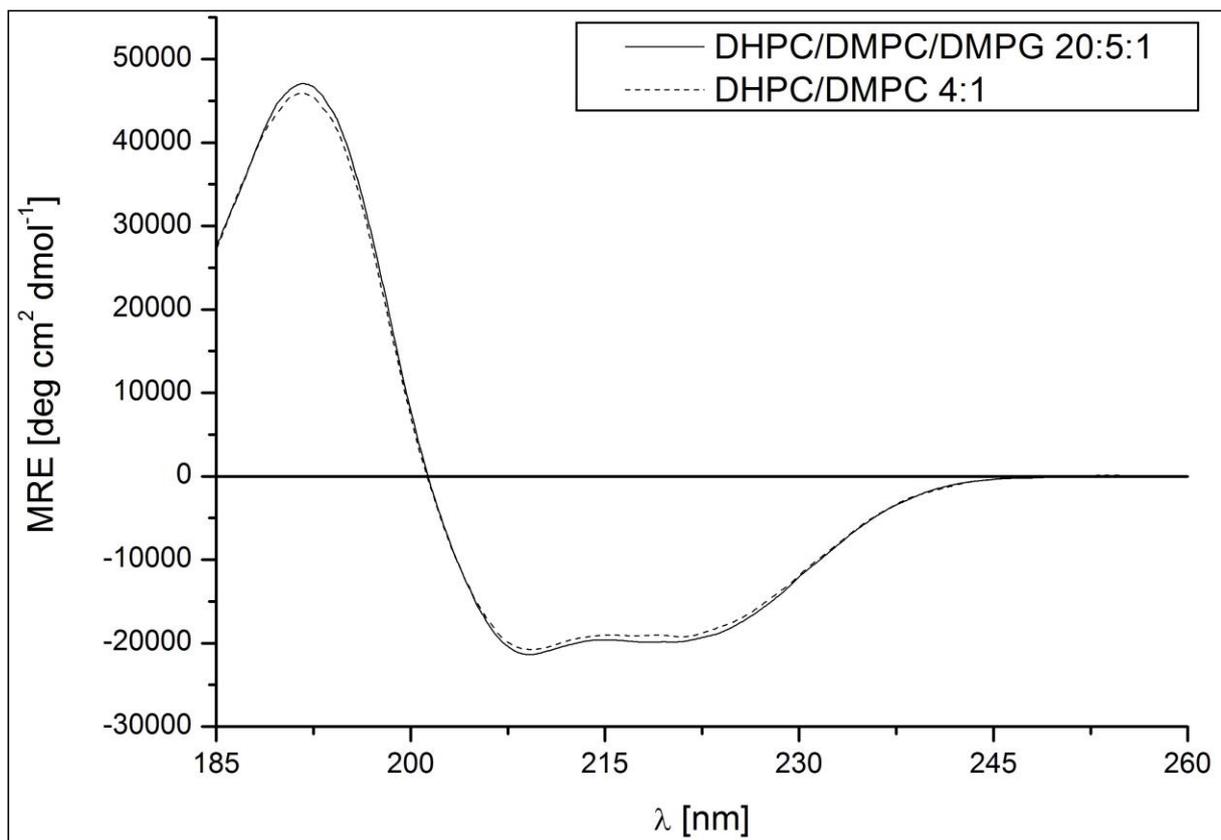


Abbildung 59: CD-Spektrum von Erns_6-4 in Bizellen

CD-Spektrum des Erns_6-4 Konstruktes. Die Messungen fanden in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 in Anwesenheit von Bizellen aus DHPC/DMPC (4:1) (gestrichelte Linie) oder DHPC/DMPC/DMPG (20:5:1) (durchgezogene Linie) statt.

In Abbildung 58 sind die vorhergesagten helikalen Faltungsanteile der getesteten Konstrukte zu sehen. Dabei erkennt man, dass das Konstrukt Erns_1 und Erns_1-1, welche N-terminal trunkierte Versionen des E^{rns}-Ankers darstellen (vgl. Abbildung 51), sich im zwitterionischen Bizellensystem helikal falten. Im negativ geladenen Bizellensystem ist die helikale Faltung auch erkennbar, jedoch nicht so stark ausgeprägt. Das Konstrukt Erns_6-4, das einem E^{rns}-Anker mit N- und C-terminaler Trunkierung darstellt, zeigt jedoch in beiden Systemen eine starke helikale Faltung. Auch beim

Vergleich der CD-Spektren der beiden Bizellensysteme in Abbildung 59 erkennt man keinen großen Unterschied. Somit muss die Struktur von Erns 6-4, im Gegensatz zu den anderen gemessenen Proteinen, in beiden Bizellensystemen stabil sein.

Durch die Messungen in Gegenwart von Bizellen konnte somit gezeigt werden, dass die negative Ladung im Bizellensystem die helikale Faltung des carboxyterminalen Bereiches des E^{rns}-Ankers reduziert. Die Ergebnisse der Messungen mit dem Konstrukt Erns_6-4 zeigten jedoch, dass sich in beiden Bizellensystemen der Hauptteil des E^{rns}-Ankers zum großen Teil helikal faltet. Der helikale Anteil fällt jedoch etwas geringer aus als im Vesikelsystem.

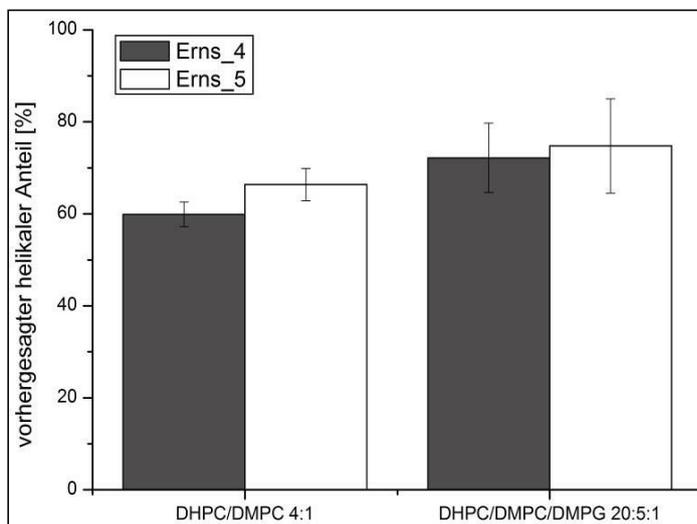


Abbildung 60: Vorhergesagter helikaler Faltungsanteil von Erns_4 und Erns_5 in Bizellen

Mittelwert des von den drei verwendeten Sekundärstrukturauswerteprogrammen (CDSSTR, CONTIN-LL und SELCON-3) vorhergesagten helikalen Faltungsanteils für Erns_4 und Erns_5 in Bizellen. Die Standardabweichung gibt dabei die Abweichung der verschiedenen Vorhersagen an. Die Messungen, die für die Vorhersage verwendet wurden, fanden in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 statt mit Bizellen aus DHPC/DMPC (4:1) oder DHPC/DMPC/DMPG (20:5:1). Erns_4 ist als schwarzer Balken und Erns_5 als weißer Balken dargestellt. Da eine Konzentrationsbestimmung durch die starke Lichtstreuung der Bizellen nicht möglich war, wurde die Konzentration anhand der Einwaage berechnet.

Um weitere Aussagen über die Faltung der N-terminalen Region des E^{rns}-Ankers treffen zu können, wurden die E^{rns}-Ankerfragmente Erns-4 und Erns-5 (Abbildung 51) mittels CD-Spektroskopie untersucht. Als Messsystem wurden dabei Bizellen aus DHPC/DMPC (4:1) bzw. DHPC/DMPC/DMPG (20:5:1) verwendet, um einen Einfluss der Bizellen auf die Faltung zu analysieren. In Abbildung 60 ist der vorhergesagte helikale Faltungsanteil dieser Konstrukte zu sehen. Da eine genaue Konzentrationsbestimmung mittels Absorption bei 280 nm bei diesen Proben aufgrund von Streuartefakten durch die Bizellen nicht möglich war, wurde die Konzentration der Proteine aus der Einwaage berechnet. Da diese Art der Konzentrationsbestimmung erfahrungsgemäß einen eher zu hohen als den tatsächlichen Wert für die Konzentration liefert, kann angenommen werden, dass der tatsächliche Wert für die helikale Faltung größer ist als der analysierte Wert. Trotzdem zeigten beide Proteine einen helikalen Faltungsanteil von über 60%, wobei deren Faltung in den beiden Bizellensystemen sehr ähnlich war. Damit zeigen sie einen ähnlich hohen helikalen Faltungsanteil wie das Konstrukt Erns_6-4 und befürworten eine annähernd helikale Konformation des gesamten E^{rns}-Ankers.

4.2.4 CD-Analyse des Signalpeptidasespaltbereiches

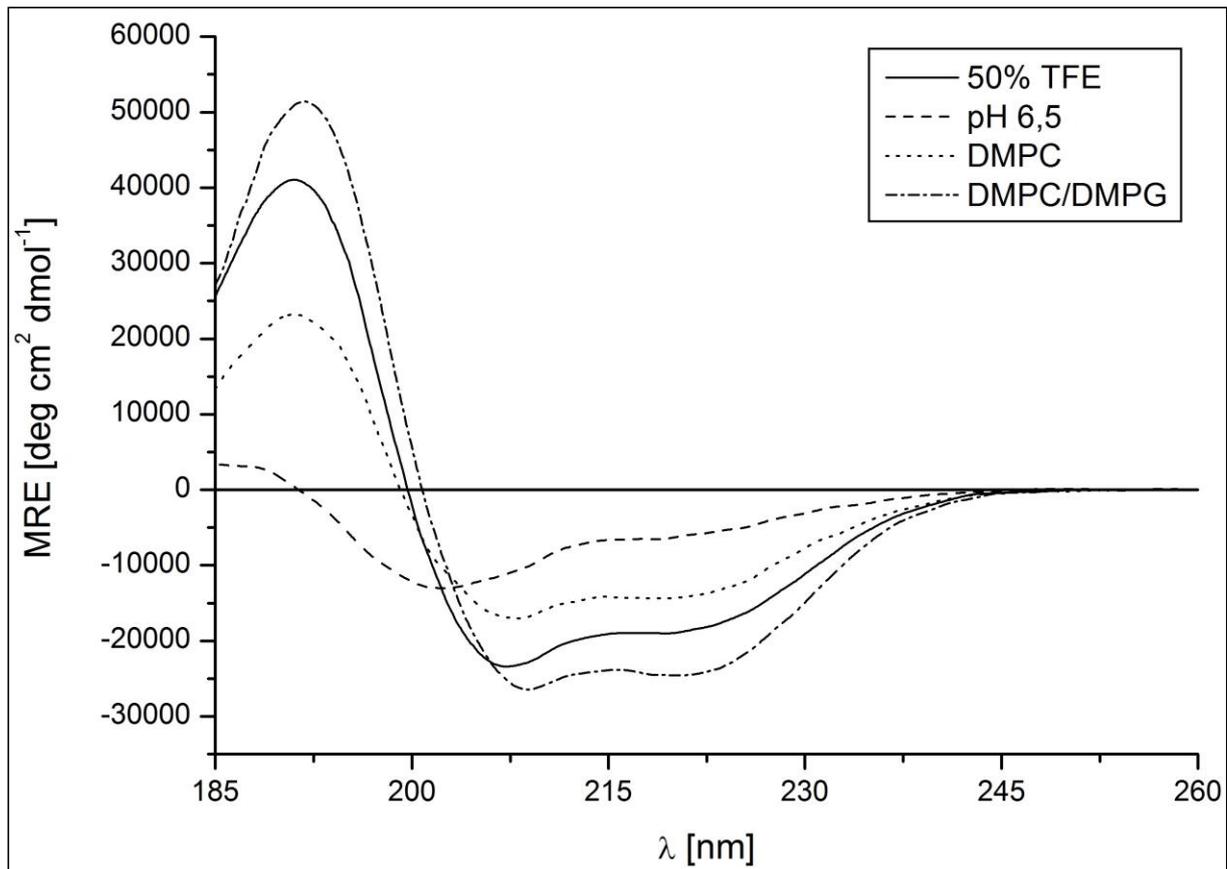


Abbildung 61: CD-Spektren des carboxyterminal verlängerten E^{rn}-Ankers in verschiedenen chemischen Systemen

CD-Spektren des Konstruktes Ern_s_1+10AS in verschiedenen chemischen Systemen. Alle Messungen fanden in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 statt. Das Spektrum in reinem Phosphatpuffer ist gestrichelt und das Spektrum in 50 % TFE ist mit einer durchgezogenen Linie dargestellt. Das Spektrum in Anwesenheit von DMPC-Vesikeln ist gepunktet dargestellt und das Spektrum in Anwesenheit von DMPC/DMPG-Vesikeln (1:1) ist abwechselnd gestrichelt/gepunktet dargestellt.

Um eine mögliche Faltung des Signalpeptidasespaltbereiches näher untersuchen zu können, wurde ein aminoterminal verkürztes E^{rn}-Ankerfragment mit 10 zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus, die den ersten Aminosäuren des im Polyprotein nachfolgenden pestiviralen Glykoproteins E1 entsprachen, exprimiert. Die Faltung des Proteins „Ern_s_1+10AS“ (siehe Abbildung 51) wurde anschließend in verschiedenen Systemen analysiert. Ein Überblick der gemessenen Spektren ist in Abbildung 61 abgebildet. Dabei ist eine deutliche helikale Faltung in Gegenwart von DMPC/DMPG-Vesikeln und in 50 % TFE zu sehen. Bei reinen DMPC-Vesikeln ist der helikale Anteil im Spektrum schon geringer und in Phosphatpuffer pH 6,5 ist nur noch das Spektrum eines weitgehend ungefalteten Proteins zu sehen.

In Abbildung 62 sind die Vorhersagen für den helikalen Faltungsanteil für die Messungen dargestellt. Wie schon der gesamte E^{rn}-Anker (vgl. Abbildung 53) zeigte auch der verlängerte Anker eine helikale Faltung in 50 % TFE aber keine helikale Faltung in reinem Phosphatpuffer pH 6,5. Auch in Mizellen aus DPC oder SDS bildete sich eine partielle helikale Faltung aus, die jedoch in der Summe geringer

ausfiel als beim gesamten E^{rms}-Anker. Auch bei Messungen in DMPC war der helikale Anteil im Vergleich mit dem gesamten E^{rms}-Anker um die Hälfte reduziert. In Gegenwart von negativ geladenen DMPC/DMPG-Vesikeln stieg der Helixanteil jedoch auf über 70 % an und erreichte damit fast den Wert für den gesamten E^{rms}-Anker. Beim Wechsel ins Bizellensystem sankt der helikale Anteil jedoch wieder deutlich unter 30 %.

Zusammenfassend liegt im verlängerten E^{rms}-Anker ein geringer helikaler Anteil vor. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass der Bereich, der die Signalpeptidasespaltstelle direkt umgibt, vor der Spaltung nicht helikal gefaltet ist.

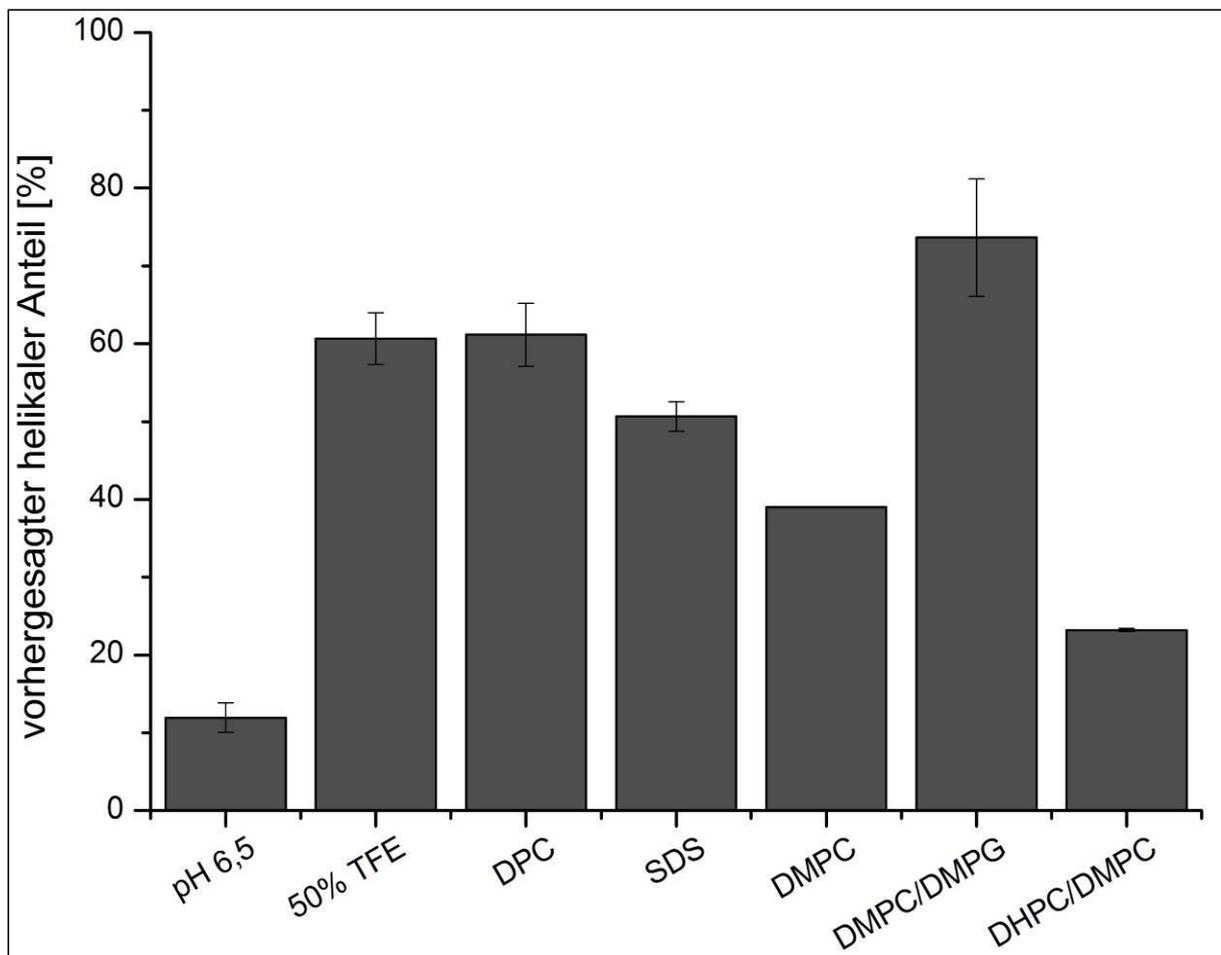


Abbildung 62: Anteil der helikal gefalteten Bereiche im Konstrukt Erns_1+10AS in verschiedenen chemischen Systemen

Mittelwert des von den drei verwendeten Sekundärstrukturauswerteprogrammen (CDSSTR, CONTIN-LL und SELCON-3) vorhergesagten helikalen Faltungsanteils für Erns_1+10AS in verschiedenen Systemen. Die Standardabweichung gibt dabei die Abweichung zwischen den verschiedenen Vorhersagen an. Alle Messungen, die für die Vorhersage verwendet wurden, fanden in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 statt. Als Messumgebung wurden 50% TFE, Phosphatpuffer mit Mizellen aus zwitterionischem DPC oder negativ geladenem SDS oder mit Vesikeln aus zwitterionischem DMPC und negativ geladenem DMPC/DMPG(1:1) sowie Bizellen aus DHPC/DMPC (4:1) verwendet.

4.2.5 Analyse der Helixorientierung (OCD-Spektroskopie)

Um die Lage der helikal gefalteten Region in der Membran untersuchen zu können, wurde die orientierte Zirkulardichroismus (OCD)-Spektroskopie verwendet. Mit dieser Methode kann die Orientierung der helikal gefalteten Region bezogen auf die Ausrichtung der Membranoberfläche gemessen werden. In der normalen CD-Spektroskopie ist dies nicht möglich, weil eine Protein/Lipid-Vesikeldispersion verwendet wird, in der keine Peptidorientierung gemessen werden kann, da die hohlkugelförmigen Vesikel frei drehbar in der Lösung schwimmen. Stattdessen wird bei der OCD-Spektroskopie die Proteinprobe in den Lipidvesikeln auf ein Quarzglasplättchen aufgetragen und angetrocknet (siehe 3.3.2.5). Dabei bilden sich bei der Rehydratisierung unter 98% Luftfeuchte viele parallel zur Glasoberfläche gestapelte Lipiddoppelschichten aus, in denen sich die zu messenden Proteine anordnen können. Somit wird ein System erzeugt, bei dem eine CD-Messung senkrecht zur Membranoberfläche stattfinden kann. Aufgrund der definierten Membranausrichtung kann nun die Lage helikal gefalteter Regionen bezogen auf die Membranoberfläche analysiert werden. Dabei kann über die Intensität der Bande bei ca. 209 nm (parallel zur Helixachse polarisierter π - π^* Übergang) auf die Lage der helikalen Region in der Membran zurückgeschlossen werden (vgl. 1.2.2).

Für die OCD-Analysen wurden die verwendeten Proteine exprimiert und aufgereinigt (siehe 3.2.5) und anschließend wie unter 3.3.2.5 angegeben gemessen. In Abbildung 63 ist mit einer gestrichelten Linie das gemessene OCD-Spektrum des E^{rns}-Ankers (Aminosäure Lys 167 - Ala 227) mit einem Protein/Lipidverhältnis von 1:50 gezeigt. Dabei ist deutlich ein Minimum bei ca. 209 nm erkennbar. Dies bedeutet, dass der π - π^* Übergang, dessen Übergangsdipolmoment parallel zur Helixachse verläuft, auch parallel zum E-Feldvektor des zirkular polarisierten Lichts liegt und somit Lichtabsorption stattfinden kann. Dies kann nur erfolgen, wenn die Helixachse des Peptids parallel zur Membranoberfläche orientiert ist, weil nur dann der parallele π - π^* Übergang erfolgen kann. Somit ist es ausgeschlossen, dass der E^{rns}-Anker in diesem System eine Transmembranhelix ausbildet. Durch Vergleich des Minimums bei 209 nm mit dem Minimum bei 222 nm, welches durch die Absorption des senkrecht zur Helixachse verlaufenden n- π^* Übergangs verursacht wird, kann man erkennen, dass das erste Minimum etwas weniger stark ausgeprägt ist als das zweite bei 222 nm. Daraus kann geschlossen werden, dass der Übergang beim parallelen π - π^* Übergang nicht mit der gleichen Intensität wie beim n- π^* Übergang erfolgt. Dies bedeutet, dass der parallele Übergang bei 209 nm und somit auch die Helix schräg zum E-Feldvektor verlaufen muss. Denn bei Zerlegung des Übergangsvektors in eine horizontale und senkrechte Komponente ist bei einer „Schräglage“ der Helix die Länge der horizontalen Komponente kürzer als wenn die Helix parallel zu Oberfläche liegt; dadurch findet auch entsprechend weniger Wechselwirkung mit dem E-Feldvektor statt und die Intensität der Bande verringert sich

Damit zeigt die OCD-Messung, dass die Orientierung der E^{rns}-Ankerhelix bezogen auf die Membranoberfläche zwar eine eindeutige planare Komponente aufweist, und somit eine Transmembranhelix ausgeschlossen ist, aber dieser Bereich leicht schräg in die Membran eingelagert ist.

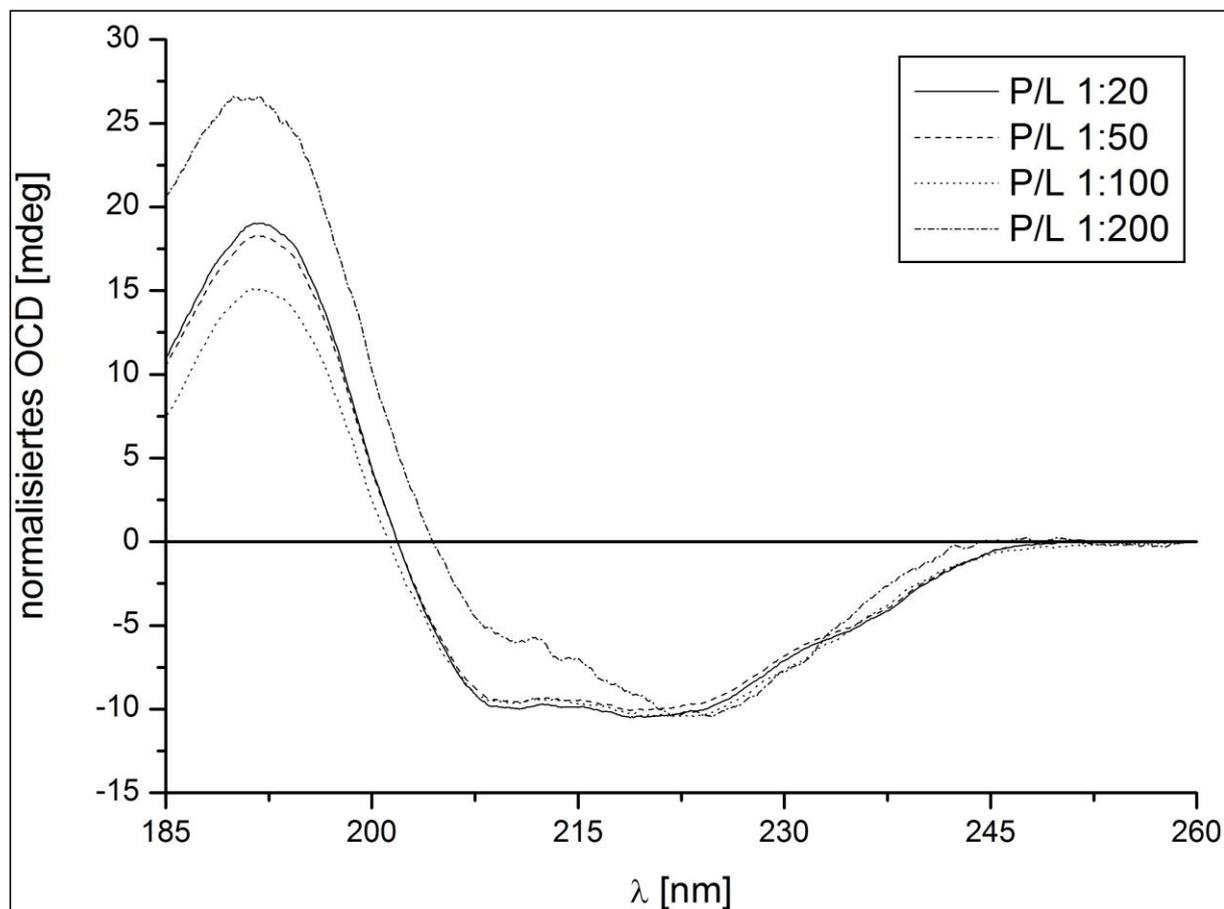


Abbildung 63: OCD-Spektren des E^{rms} -Ankers gemessen bei vier verschiedenen Protein/Lipidverhältnissen

Auf das Minimum bei 220 nm normalisierte OCD-Spektren des E^{rms} -Ankers (Lys 167- Ala 227). Die Messung fand bei einer Luftfeuchtigkeit von 98 % mit einem Lipidgemisch aus DMPC/DMPG (1:1) bei verschiedenen Protein/Lipidverhältnissen statt. Die durchgezogene Linie repräsentiert ein Protein/Lipidverhältnis von 1:20, die gestrichelte Linie ein Verhältnis von 1:50, die gepunktete Linie ein Verhältnis von 1:100 und die abwechselnd gestrichelte/gepunktete Linie ein Verhältnis von 1:200.

Für einige antibiotisch wirkende amphipatische Helices ist gezeigt worden, dass diese je nach Konzentration in einer mehr parallel zur Membranoberfläche oder in einer mehr schräger- bis hin zu membrandurchspannenden-Form vorliegen können [71]. Um den Einfluss der Peptidkonzentration auf die Orientierung des E^{rms} -Ankers zu untersuchen, wurden in weiteren Versuchen OCD-Messungen mit vier verschiedenen Protein/Lipidverhältnissen durchgeführt. In Abbildung 63 ist das Ergebnis der Messungen gezeigt. Beim Vergleich der Spektren erkennt man in allen gemessenen Protein/Lipidverhältnissen eine deutlich ausgeprägte Bande bei ca. 209nm. Somit ist sichergestellt, dass der E^{rms} -Anker auch bei unterschiedlichen Konzentrationen in einer weitgehend planaren Orientierung vorliegt.

Um eine gegebenenfalls vorliegende Änderung der Orientierung des helikalen Bereichs besser erkennen zu können und die unterschiedlichen Konzentrationen besser vergleichen zu können, wurde das Verhältnis zwischen dem ersten und dem zweiten Minimums gebildet. Je höher dieser Wert ausfällt, umso schräger liegt der helikale Bereich in der Membran. In Tabelle 11 sind diese Ergebnisse gezeigt. Beim Vergleich des dabei erhaltenen Wertes mit den Daten aus der OCD-Spektroskopie bei

unterschiedlichen Protein/Lipidverhältnissen erkennt man einen kleinen Unterschied zwischen den Werten bei einem Protein/Lipidverhältnis von 1:20/1:50 und 1:100 gegenüber dem Verhältnis bei 1:200. Das Ergebnis dieses Vergleiches deutet darauf hin, dass bei einer höheren Proteinkonzentration der E^{rms} -Anker etwas planarer in der Membran liegt, als bei niedrigeren Konzentrationen.

Um den planar zur Membranoberfläche orientierten Bereich deutlicher eingrenzen zu können, untersuchten wir im Anschluss drei verschiedene Verkürzungen des E^{rms} -Ankers: E^{rms}_{-1} (Arg 194 – Ala 227), E^{rms}_{-1-1} (Arg 194 – Gly 224) und E^{rms}_{-6-4} (Lys 167 – Asn 217) (vgl. Abbildung 51). Dabei entspricht E^{rms}_{-1} dem C-terminalen Bereich des E^{rms} -Ankers, E^{rms}_{-1-1} stellt eine C-terminale Verkürzung des Konstruktes dar und E^{rms}_{-6-4} ist eine leichte C- und N-terminale Verkürzung der E^{rms} -Ankersequenz.

In Abbildung 64 sind die OCD-Spektren dieser Konstrukte dargestellt. Auch bei diesen Spektren kann man deutlich ein Minimum bei 209 nm erkennen. Somit liegt auch bei den drei untersuchten Verkürzungen eine planare Orientierung zur Membranoberfläche vor. Auch in diesem Falle reicht das Minimum bei 222 nm weiter in den negativen Bereich als das bei 209 nm, so dass auch hier von einer schrägen Ausrichtung ausgegangen werden kann. Aber schon beim Vergleich der drei Spektren und der jeweiligen Verhältnisse der beiden Minima bei ca. 209 und 222 nm in Tabelle 11 erkennt man, dass E^{rms}_{-6-4} das kleinste Verhältnis hat und somit bei Annahme einer ähnlichen helikalen Faltung die planarste Orientierung der analysierten Verkürzungen ausbildet.

E^{rms} ist an seinem C-terminalen Ende mit dem pestiviralen Glykoprotein E1 verbunden und wird bei der Prozessierung durch die zelluläre Signalpeptidase von diesem abgespalten. Dies ist ein interessantes Phänomen, denn die Signalpeptidase spaltet normalerweise nur Transmembranhelices und keine planaren Helices. Um zu untersuchen, ob der Bereich um die Signalpeptidasespaltstelle vielleicht teilweise eine transmembranartige Orientierung ausbildet, wurde das OCD-Spektrum einer N-terminal verkürzten E^{rms} -Ankersequenz aufgenommen, die um die ersten 10 Aminosäuren von E1 verlängert wurde ($E^{rms}_{-1+10AS}$). In Abbildung 64 ist das OCD-Spektrum gezeigt, wobei man das Minimum bei ca. 208 nm deutlich sehen kann. Beim Vergleich der Minimaverhältnisse der Konstrukte E^{rms}_{-1} (siehe Tabelle 11) und dem um 10 Aminosäuren von E1 verlängerten $E^{rms}_{-1+10AS}$, erkennt man, dass das um 10 Aminosäuren verlängerte Konstrukt einen niedrigeren Wert aufweist und somit weniger schräg in der Membran verläuft. Somit kann ausgeschlossen werden, dass sich bei diesem Konstrukt im Bereich der Spaltsequenz eine transmembranartige Orientierung der Helix ausbildet.

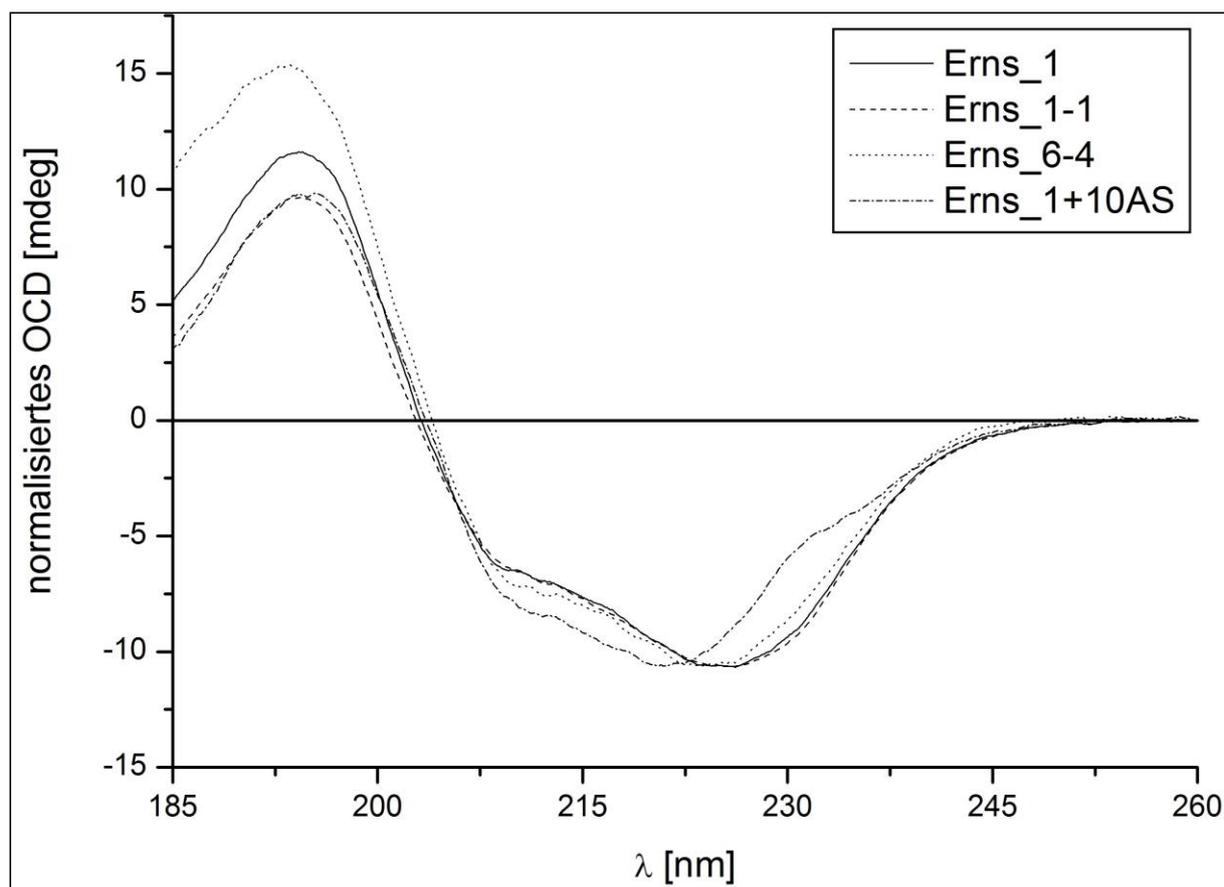


Abbildung 64: OCD-Spektrum von verschiedenen Verkürzungen/Verlängerungen des E^{rns}-Ankers

Auf das Minimum bei 220 nm normalisierte OCD-Spektren von Erns_1 (durchgezogene Linie), Erns_1-1 (gestrichelte Linie), Erns_6-4 (gepunktete Linie) und Erns_1+10AS (abwechselnd gestrichelte/gepunktete Linie). Die Messung fand bei einer Luftfeuchtigkeit von 98 % statt mit einem Lipidgemisch aus DMPC/DMPG (1:1) und einem Protein/Lipidverhältnis von 1:50.

	Min1 [nm]	OCD [mdeg]	Min2 [nm]	OCD [mdeg]	Min2/Min1
E ^{rns} P/L 1:20	210,7	-10,00	218,8	-10,49	1,05
E ^{rns} P/L 1:50	209,9	-9,49	222,4	-10,90	1,15
E ^{rns} P/L 1:100	208,5	-5,87	221,7	-6,44	1,10
E ^{rns} P/L 1:200	210,4	-2,08	224,7	-3,60	1,73
E ^{rns} _1 P/L 1:50	209,5	-6,50	225,7	-10,66	1,64
E ^{rns} _1-1 P/L 1:50	209,3	-9,06	226,1	-15,12	1,67
E ^{rns} _6-4 P/L 1:50	210,3	-3,38	223,6	-5,00	1,48
Erns_1+10AS P/L 1:50	211,2	-7,13	220,9	-9,07	1,27

Tabelle 11: Auswertung der OCD-Daten

Um die einzelnen OCD-Spektren miteinander vergleichen zu können, wurde von jedem angegebenen OCD-Spektrum der Wert und die Wellenlänge des ersten und des zweiten Minimums ermittelt. Um ein Maß für die Lage der Helix in der Membran zu bekommen, wurde der OCD Wert des zweiten Minimums durch den Wert des ersten Minimums geteilt (Min2/Min1).

Zusammengefasst machen die OCD Versuche deutlich, dass der helikal gefaltete Anteil des Membranankers sich planar, jedoch leicht schräg in der Membran befinden muss. Zudem liegt der Bereich um die Signalpeptidasespaltstelle ebenso planar in der Membran wie das C-terminale Fragment und bildet damit keine Transmembranhelix aus.

4.3 Analyse der Sekundärstruktur mittels NMR-Spektroskopie

Die CD und OCD Ergebnisse ergaben einen ersten Eindruck über die globale Struktur des E^{rns}-Ankers und seine Orientierung bezogen auf die Membranoberfläche. Für das Verständnis der Funktionsweise des E^{rns}-Ankers muss seine Struktur jedoch noch genauer aufgelöst werden. Dies ist mit der NMR (nuclear magnetic resonance) Spektroskopie möglich, da damit die Lage jedes einzelnen Atoms bestimmt werden kann.

Die für die NMR-Messung verwendeten Proteine wurden wie unter 3.2.5 beschrieben in ¹⁵N oder ¹⁵N und ¹³C haltigem Minimalmedium exprimiert und aufgereinigt. Nach dem Lyophilisieren fand eine Reinheitskontrolle der Proteine mittels MALDI-TOF statt (siehe 3.3.1). Die Massenspektren der exprimierten Proteine sind unter 6.3 gezeigt. Für die NMR-Messungen wurden die Lipide in Phosphatpuffer gelöst und anschließend die abgewogene Menge Protein zugegeben (siehe 3.3.3.1). Als Messsystem wurden Bizellen aus DMPC und DHPC ausgewählt, da sie zum einen dem natürlichen System von Membranen relativ ähnlich sind und sie zum anderen im NMR-Magnetfeld stabil sind [72].

Da die NMR-Analyse des gesamten E^{rns}-Ankers (Lys 167 – Ala 227) große Probleme bereitete, wurden verschiedene N- und C-terminale Verkürzungen der Gesamtsequenz analysiert (siehe Abbildung 65). Diese zeigten ein einfacheres und damit interpretierbares Spektrum. Gestartet wurde mit einem ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum (siehe 3.3.3.2) gefolgt von einem ¹⁵N-editierten 3D HSQC-TOCSY und HSQC-NOESY, um die ¹⁵N-HSQC Peaks den Aminosäuren zuordnen zu können.

Konstrukt	Sequenz
E ^{rns} Anker	GAMAKEHDCTSVIQDTAHYLVDMGTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
E ^{rns} -1	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
E ^{rns} -1-2	GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKT
E ^{rns} -4	GDGMTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
E ^{rns} -5	GQDTAHYLVDMGTNSLESARQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA
E ^{rns} -2-1	GTSVIQDTAHYLVDMGTNSLESAR

Abbildung 65: Sequenzen der für die NMR Analysen verwendeten Konstrukte

Überblick über die exprimierten Proteine und ihre Aminosäuresequenz im Vergleich zum E^{rns}-Anker (Aminosäure Lys 167 – Ala 227). E^{rns}-1, E^{rns}-4 und E^{rns}-5 stellen verschiedene N-terminale Trunkierungen von E^{rns} dar. E^{rns}-1-2 enthält eine zusätzliche C-terminale Trunkierung von 6 Aminosäuren gegenüber E^{rns}-1. Erns-2-1 repräsentiert im Gegensatz zu dem Konstrukt Erns-1 den N-terminalen Bereich der E^{rns}-Ankersequenz.

4.3.1 Messung der Amid-Wasser-Protonenaustauschrates verschiedener C-terminaler E^{rns}-Ankerfragmente

Das Modell einer amphipatischen Helix im Kontakt mit einer Lipidmembran, das auch für den E^{rns}-Anker angenommen wird, sagt aus, dass ein Teil der Aminosäuren, genauer die hydrophoben

Aminosäuren, in der Membran liegen und die hydrophilen Aminosäuren Kontakt mit dem umgebenden Wasser haben. Um dieses Modell für den E^{rns}-Anker überprüfen zu können, analysierten wir die Amid-Wasser-Protonenaustauschrate. Dazu verwendeten wir die CLEANEX Pulssequenz (siehe 3.3.3.2.1).

Bei der CLEANEX Sequenz werden nicht wie bei einem normalen ¹H-¹⁵N-HSQC die Amidprotonen über einen Radioimpuls aktiviert, sondern es werden die Protonen des Wassers angeregt. Im Anschluss erfolgt während einer Wartezeit, in der das System in Ruhe gelassen wird, ein Protonenaustausch zwischen einem Wassermolekül und einer Amidgruppe. Dieser Austausch tritt umso öfter ein, je räumlich näher das Amidproton an einem Wasserproton liegt. Nach der Wartezeit erfolgt der normale HSQC Vorgang, d.h. die Magnetisierung des Wasserstoffatoms wird auf ein Stickstoffatom übertragen. Dies kann aber nur stattfinden, wenn am Stickstoff ein zuvor aktiviertes Proton gebunden ist. Somit kann ein Übergang nur erfolgen, wenn dieses Proton zuvor an einem Wassermolekül gebunden war und durch Protonenaustausch das Stickstoffatom gebunden hat. Je stärker nun diese Amidbindung in Kontakt mit Wasser steht, umso mehr Protonentransfers sind statistisch möglich und umso stärker ist das resultierende Messsignal. Somit ist die Intensität des Peaks im prozessierten CLEANEX-Spektrum ein Maßstab für die Protonenaustauschrate und damit für das Ausmaß des Wasserkontaktes dieser Amidgruppe.

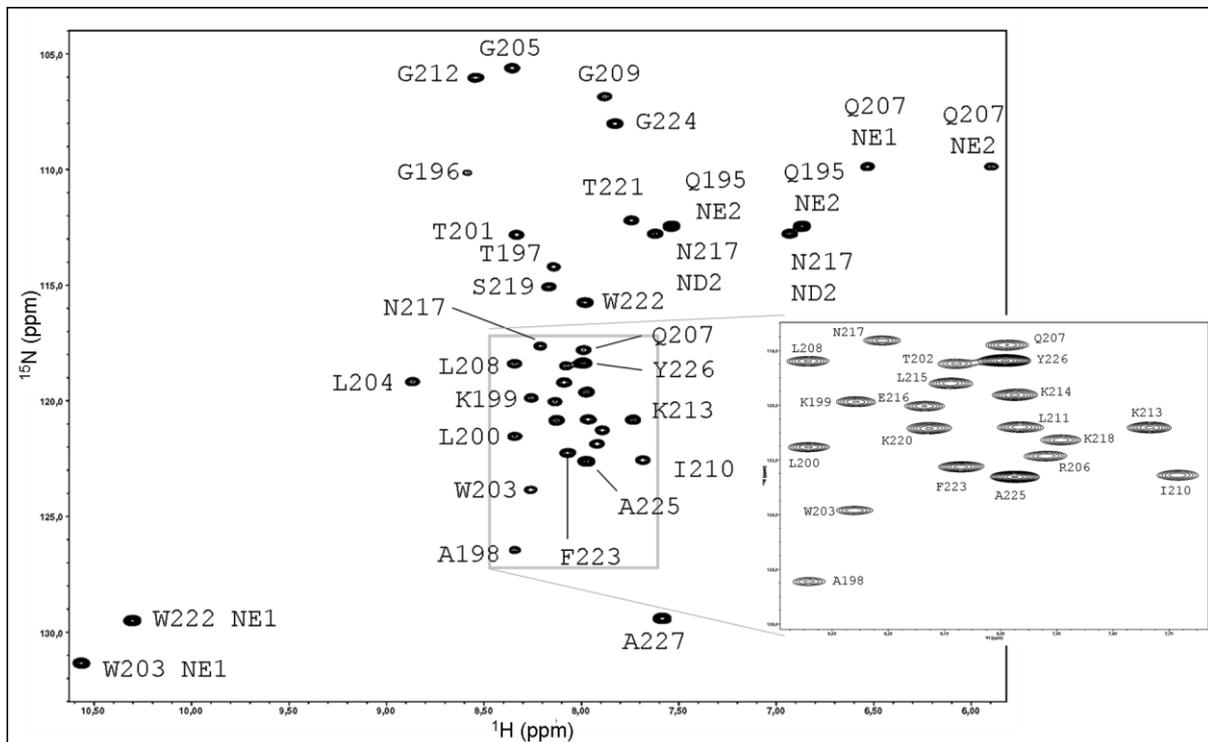


Abbildung 66: ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum von E^{rns}-1

HSQC-Spektrum von E^{rns}-1 mit Angabe der identifizierten Aminosäuren im Ein-Buchstabencode. Jeder Punkt repräsentiert eine NH-Gruppe des Proteins. Daneben sind die zugeordneten Aminosäure und ihre Position im gesamten E^{rns}-Protein angegeben. Die NH-Seitengruppe von Trp (W) ist als NE1 beschriftet, die Amidseitengruppe von Gln (Q) als NE1 bzw. NE2 und die Amidseitengruppen von Asn (N) als ND2 (H-Atome nicht aufgegliedert). Der mittlere Bereich des Spektrums ist für die Übersichtlichkeit seitlich vergrößert dargestellt.

Über die Messung der Amid-Wasser-Protonenaustauschrate ist dadurch eine quantifizierbare Aussage über den Wasserkontakt der einzelnen Amidbindung möglich. Durch diese Analyse kann

deutlich unterschieden werden, ob sich die Amidbindung in der Membran befindet und somit vom Wasser abgeschirmt vorliegt oder ob sie direkten Kontakt zu Wasser hat. Bei einer amphipatischen Helix nimmt man an, dass die hydrophobe Seite der Helix in die Membran eingebettet ist und damit ca. jede dritte Aminosäure, bedingt durch die Windungszahl der Helix, in der Membran liegt und somit vom Wasser abgeschirmt sein muss. Als Konsequenz daraus müsste die Mehrheit der Aminosäuren Wasserkontakt zeigen. Vergleicht man nun aber das HSQC-Spektrum von E^{rms} -1 aus Abbildung 66 mit dem CLEANEX-Spektrum in Abbildung 67, so erkennt man deutlich, dass nur ein kleiner Teil der HSQC Peaks auch im CLEANEX-Spektrum auftauchen und somit nur wenige Aminosäuren Wasserkontakt zeigen.

In Abbildung 68 sind die normierten Protonenaustauschraten (siehe 3.3.3.3) der einzelnen Aminosäuren von E^{rms} -1 zu sehen. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich dabei auf ihre Position im gesamten E^{rms} -Protein. Da die ersten drei Aminosäuren von E^{rms} -1 im HSQC-Spektrum nicht auftauchen und damit keine Aussage über ihren Wasserkontakt möglich ist, wurden sie in der Abbildung 68 nicht berücksichtigt.

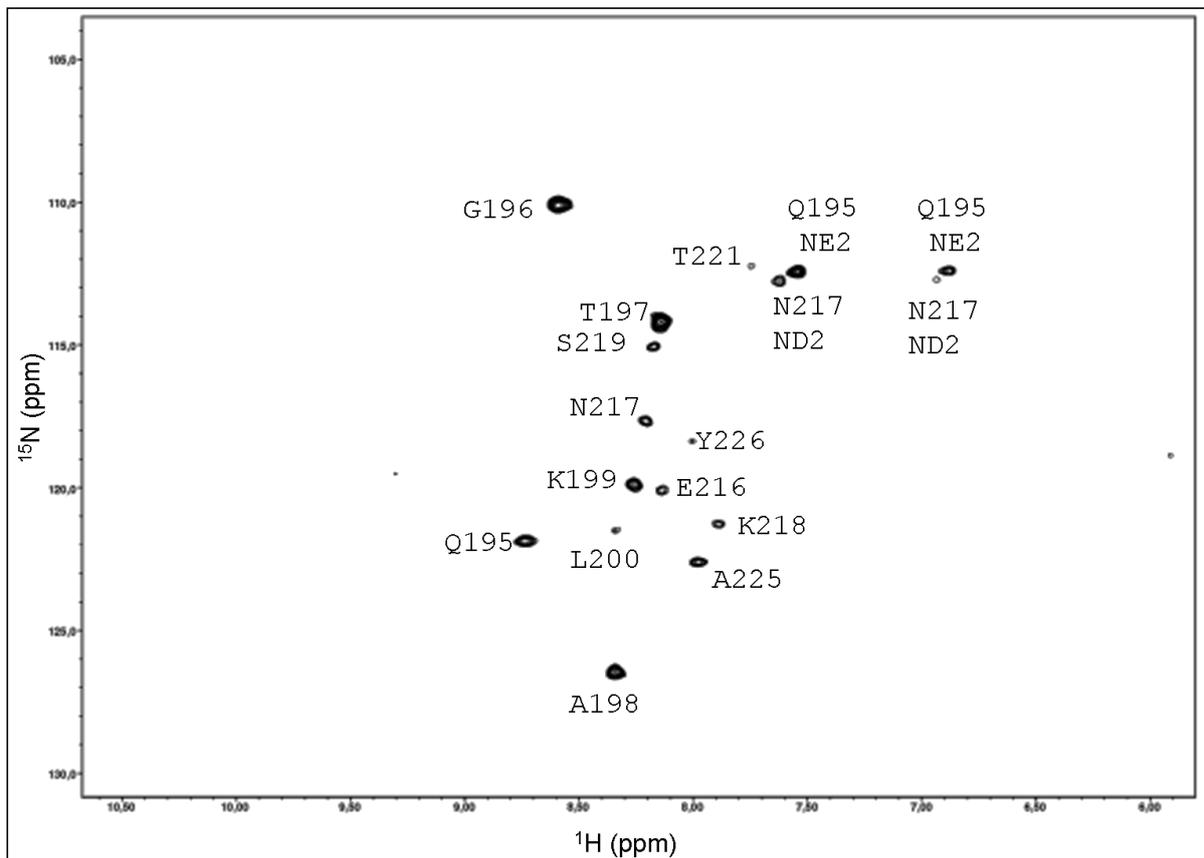


Abbildung 67: CLEANEX-Spektrum von E^{rms} -1

CLEANEX-Spektrum von E^{rms} -1 mit Angabe der identifizierten Aminosäuren im Ein-Buchstabencode. Jeder Punkt repräsentiert dabei die Amid-Wasser-Protonenaustauschrate der jeweiligen Amidgruppe. Die Intensität des Peaks repräsentiert dabei die Anzahl der Protonenaustausche und ist somit ein Maß für die Wasserzugänglichkeit der Amidgruppe. Daneben sind die zugeordneten Aminosäuren und ihre Position im gesamten E^{rms} -Protein angegeben. Die Amidseitengruppe von Gln (Q) wurde als NE2 und die Amidseitengruppen von Asn (N) als ND2 bezeichnet.

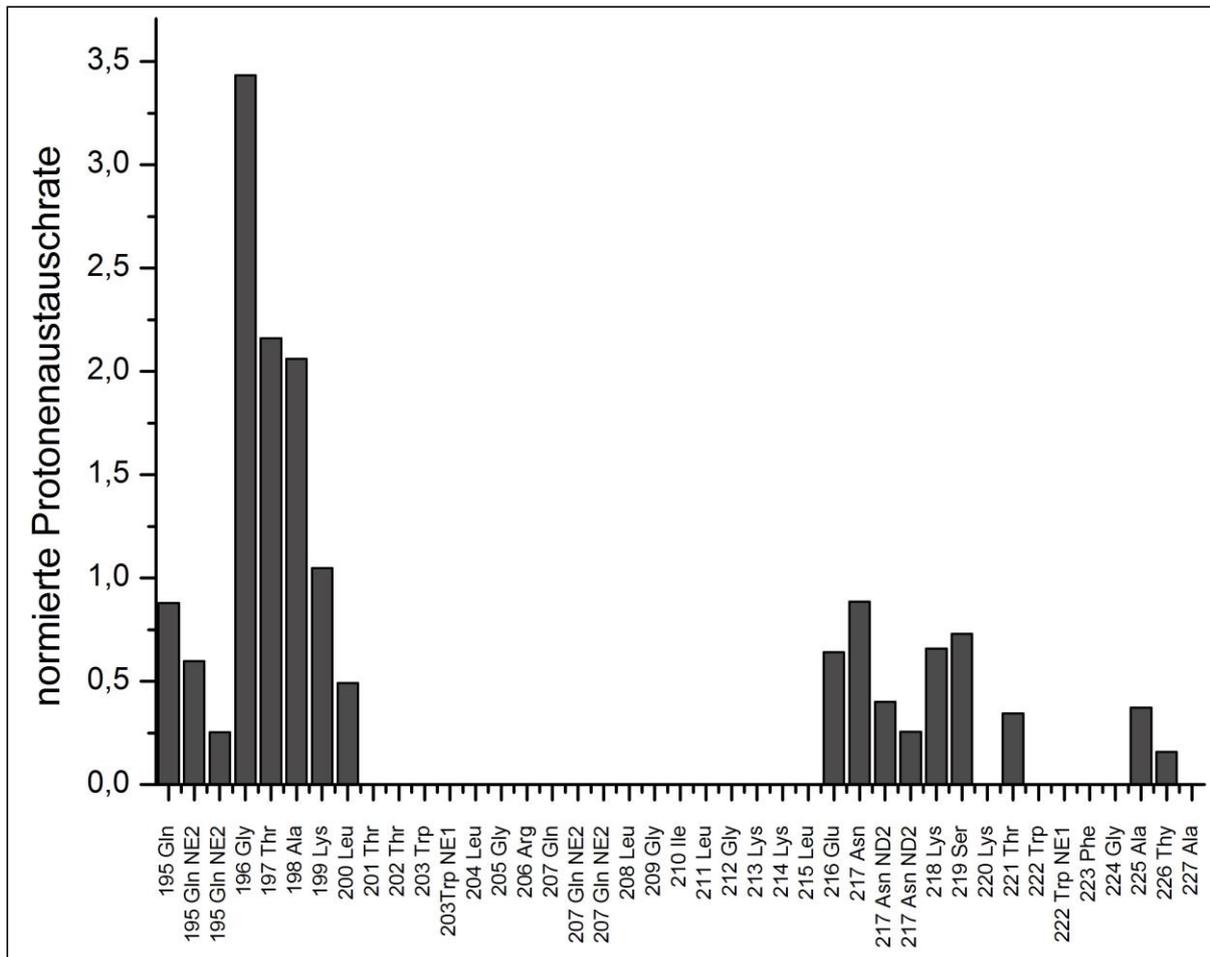


Abbildung 68: Normierte Protonenaustauschrate von $E^{\text{ms}}-1$

Angabe der normierten Protonenaustauschrate von $E^{\text{ms}}-1$ für jede Amidgruppe des Proteins. Hierzu wurde die Intensität des Peaks mittels des Programms NMRView aus dem CLEANEX-Spektrum durch die Intensität des dazugehörigen HSQC Peaks geteilt. Die Aminosäuren sind mit ihrem Triplet Code und ihrer Position im gesamten E^{ms} -Protein angegeben. Die Amidseitengruppe von Trp sind als NE1 beschriftet, die Amidseitengruppe von Gln als NE2 und die Amidseitengruppen von Asn als ND2.

Die erste abgebildete Aminosäure ist Gln an Position 4 im $E^{\text{ms}}-1$, was Position 195 im gesamten E^{ms} entspricht. Man erkennt, dass die Peptidbindung von Gln 195 genauso wie die Amidprotonen der Seitenkette (NE2) einen Wasserkontakt zeigen; wobei der Wasserkontakt der Seitengruppe schwächer ausgeprägt ist. Die weiteren fünf Aminosäuren zeigen auch einen deutlichen Wasserkontakt; wobei das Signal bei den letzten drei Aminosäuren Ala198, Lys 199 und Leu 200 kontinuierlich abfällt. Von Thr 201 an bis Leu 215 kann kein Protonenaustausch gemessen werden. Dies bedeutet, dass bei allen diesen 15 Aminosäuren die Amidgruppen keinen Kontakt zu Wasser haben und somit in der Membran liegen müssen. Die Aminosäuren 216 Glu bis 219 Ser zeigen dann wieder einen Wasserkontakt, wobei die Asn 217 Seitenketten (ND2) ein etwas schwächeres Signal zeigen. Lys 220 dagegen hat keinen Wasserkontakt, während aber Thr 221 wieder mit Wassermolekülen Kontakt hat. Am C-terminalen Ende von $E^{\text{ms}}-1$ ergibt sich ein gemischtes Bild, da von Trp 222 an - einschließlich der Seitengruppe (NE1) - bis zu Gly 224 kein Wasserkontakt messbar ist; Ala 225 und Thy 226 dann jedoch eine geringere Protonentransferrate zeigen, während das C-terminale Ala 227 für Wasser wieder nicht zugänglich ist.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass E^{rns-1} , anders als erwartet, kein homogenes Bild bezüglich der Protonenaustauschrate zeigte. Dies wäre eigentlich für eine amphipatische Helix zu erwarten. Tatsächlich existiert in der Mitte des Membranankers ein langer Bereich ohne Wasserkontakt, der rechts und links von Aminosäuren flankiert wird, bei denen ein Wasserkontakt gemessen werden konnte. Der N-terminal gemessene Wasserkontakt könnte jedoch ein artifizierlicher Effekt dieses Konstruktes sein, da mit diesem nur ein Bereich der Gesamtsequenz exprimiert wurde. Beim gesamten E^{rns} -Anker könnte sich dieser Abschnitt natürlich auch in der Membran befinden. Der C-terminale Bereich von Erns-1 wiederum zeigt ein variables Bild mit abwechselnden Bereichen von mehreren Aminosäuren mit und ohne Wasserkontakt.

Um den Einfluss dieses C-terminalen Bereiches auf die Orientierung des Proteins in der Membran zu untersuchen, wurde ein C-terminal um 6 Aminosäuren verkürztes Protein exprimiert, $E^{rns-1-2}$ (siehe Abbildung 65).

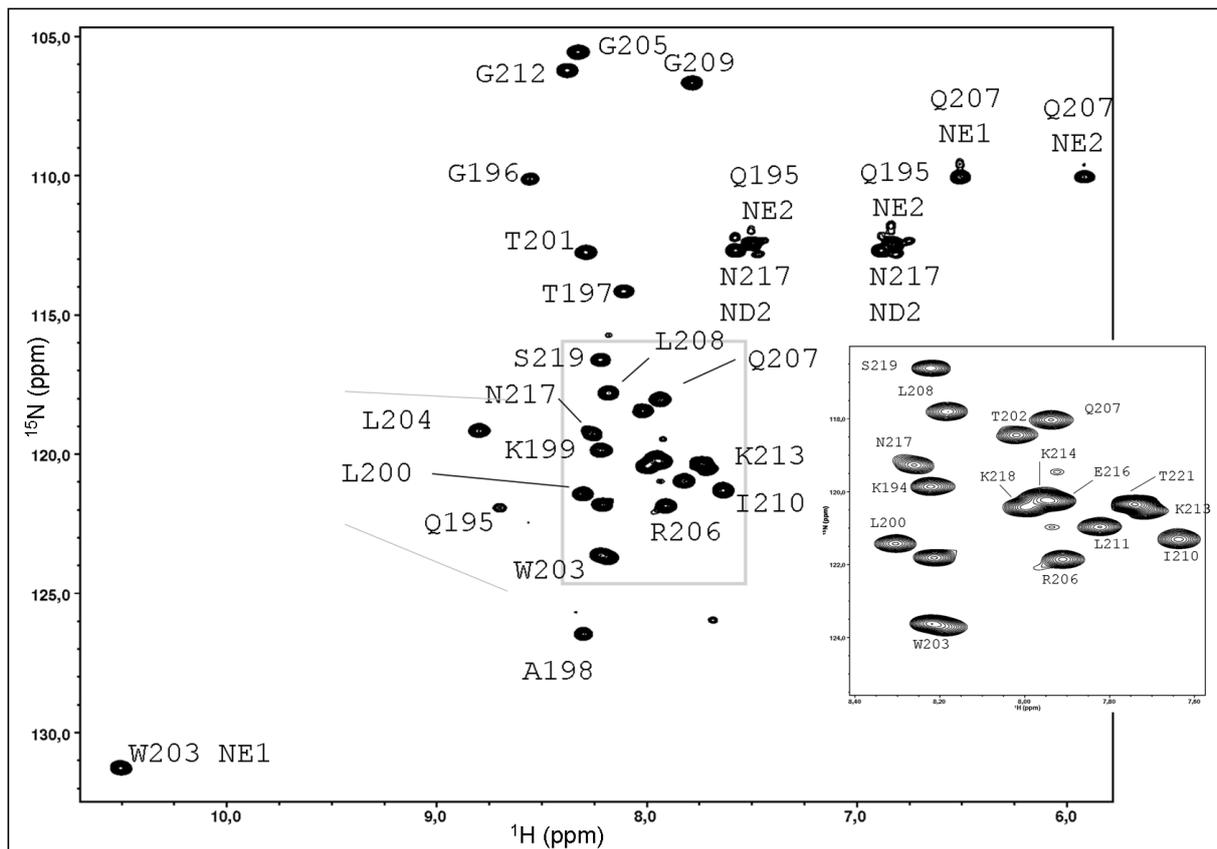


Abbildung 69: ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von $E^{rns-1-2}$

HSQC-Spektrum von $E^{rns-1-2}$ mit Angabe der identifizierten Aminosäuren im Ein-Buchstabencode. Jeder Punkt repräsentiert dabei eine NH-Gruppe des Proteins. Daneben sind die zugeordneten Aminosäuren und ihre Position im gesamten E^{rns} -Protein angegeben. Die NH-Seitengruppe von Trp (W) ist als NE1 beschriftet, die Amidseitengruppe von Gln (Q) als NE1 bzw. NE2 und die Amidseitengruppen von Asn (N) als ND2 (H-Atome nicht aufgegliedert). Der mittlere Bereich des Spektrums ist der Übersichtlichkeit halber seitlich vergrößert dargestellt.

In Abbildung 69 ist das HSQC-Spektrum von $E^{rns-1-2}$ und in Abbildung 70 das dazugehörige CLEANEX-Spektrum zu sehen. Beim Vergleich dieser beiden Spektren erkennt man wie bei E^{rns-1} ,

dass ein Großteil der Aminosäuren von E^{rns}-1-2 keinen Peak im CLEANEX-Spektrum erzeugt und somit keinen Wasserkontakt besitzt. Jedoch sind im CLEANEX von Erns1-2 mehr Peaks zu sehen als im CLEANEX von E^{rns}-1 (vgl. Abbildung 67).

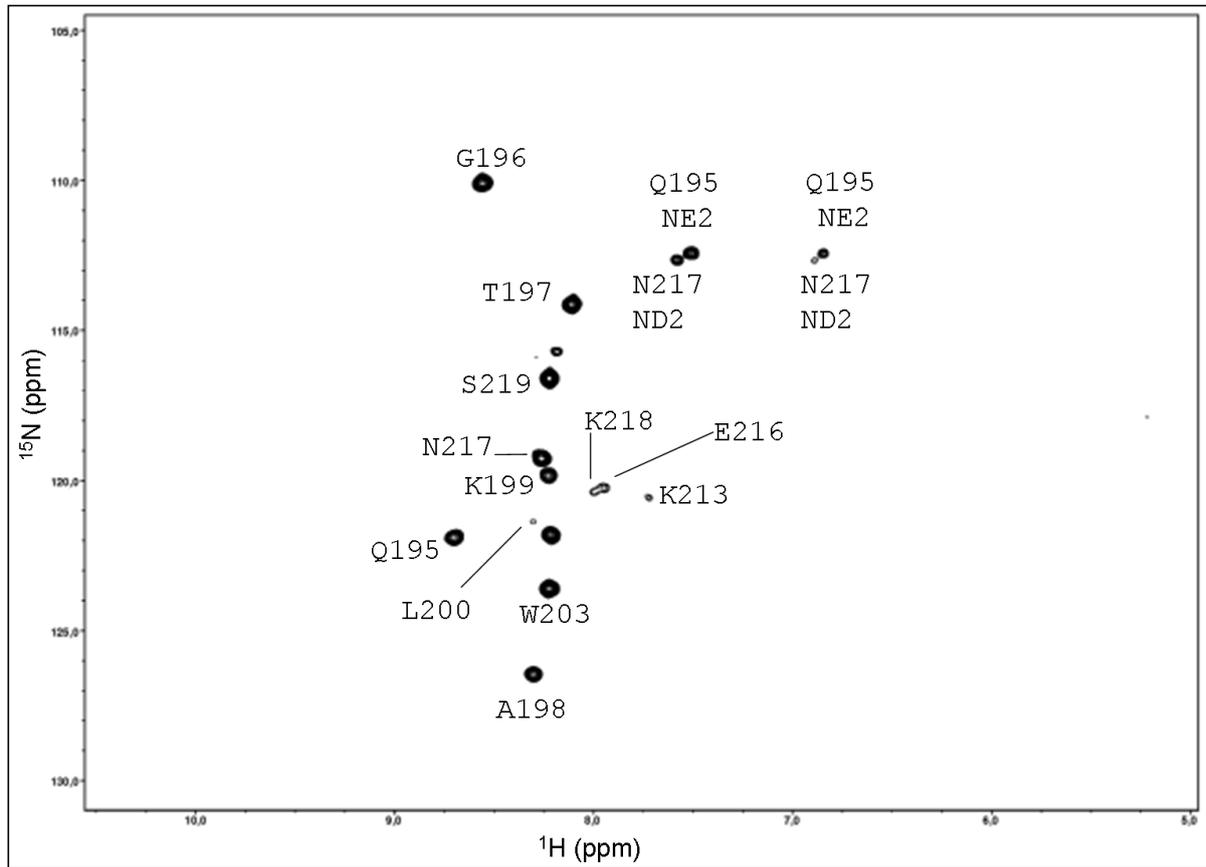


Abbildung 70: CLEANEX-Spektrum von E^{rns}-1-2

CLEANEX-Spektrum von E^{rns}-1-2 mit Angabe der identifizierten Aminosäuren im Ein-Buchstabencode. Jeder Punkt repräsentiert die Amid-Wasser-Protonenaustauschrate der jeweiligen Amidgruppe. Die Intensität des Peaks repräsentiert dabei die Anzahl der Protonenaustausche und ist somit ein Maß für die Wasserzugänglichkeit der Amidgruppe. Daneben sind die zugeordneten Aminosäuren und ihre Position im gesamten E^{rns}-Protein angegeben. Die Amidseitengruppe von Gln (Q) wurde als NE2 und die Amidseitengruppen von Asn (N) als ND2 bezeichnet.

In Abbildung 71 sind die normierten Protonenaustauschraten von E^{rns}-1 und E^{rns}-1-2 im Vergleich dargestellt. Man erkennt, dass sich die ersten 6 Aminosäuren (Gln 195 – Leu 200) nahezu gleich verhalten und auch sehr ähnliche Protonenaustauschraten zeigen. Bei den Aminosäuren Thr 201 und Thr 202 treten jedoch Unterschiede auf, da diese beim Protein E^{rns}-1-2 nun einen Wasserkontakt zeigen. Bei Thr 202 ist der Wasserkontakt zudem noch sehr stark ausgeprägt. Auch Gly 212 und Lys 213 zeigen im Gegensatz zu E^{rns}-1 einen leicht ausgeprägten Wasserkontakt. Im C-terminalen Bereich der untersuchten Proteine (Glu216-Ser219) zeigen beide Wasserkontakt, wobei Intensität und somit die Wasserzugänglichkeit bei E^{rns}-1-2, bis auf die H-Atome der Asn 217 Seitengruppe (ND2), deutlich größer ist.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass eine Trunkierung der 8 C-terminalen Aminosäuren von E^{rms} nicht nur einen Einfluss auf die direkt anschließenden Aminosäuren hat und ihre Wasserzugänglichkeit erhöht, sondern dass die Deletion am C-Terminus von E^{rms-1} auch einen Einfluss auf die Wasserzugänglichkeit von Aminosäuren hat, die mehr als 20 Positionen stromaufwärts lokalisiert sind.

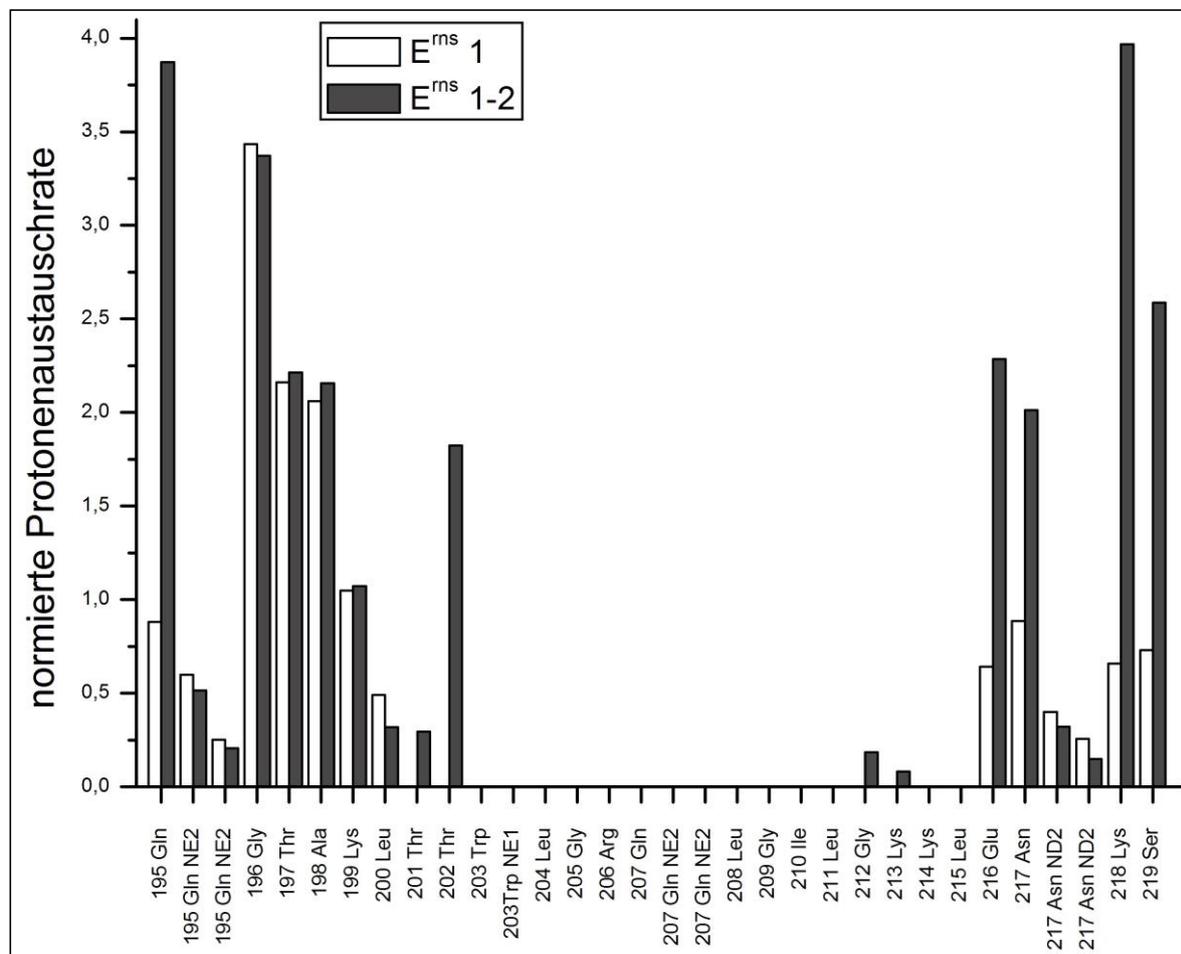


Abbildung 71: Vergleich der normierten Protonenaustauschraten von E^{rms-1} und $E^{rms-1-2}$

Angabe der normierten Protonenaustauschraten von E^{rms-1} (weißer Balken) und $E^{rms-1-2}$ (schwarzer Balken) für jede identifizierte Amidgruppe des Proteins. Da die letzten drei Aminosäuren von $E^{rms-1-2}$ im HSQC kein Signal lieferten, sind die normierten Protonenaustauschraten nur bis Ser 219 gezeigt. Für die Bestimmung der normierten Protonenaustauschraten wurde die Intensität des Peaks mittels des Programms NMRView aus dem CLEANEX - Spektrum durch die Intensität des dazugehörigen HSQC Peaks geteilt. Die Aminosäuren sind mit ihrem Triplet Code und ihrer Position im gesamten E^{rms} -Protein angegeben. Die NH-Seitengruppe von Trp ist als NE1 beschriftet, die Amidseitengruppe von Gln als NE2 und die Amidseitengruppen von Asn als ND2.

Um mehr Informationen über den Wasserkontakt des E^{rms} -Ankers zu erhalten, wurden N-terminal verlängerte Fragmente von E^{rms-1} analysiert. Dabei ist E^{rms-4} um 10 Aminosäuren verlängert und repräsentiert den E^{rms} -Anker von Asp 183 an und E^{rms-5} ist um 18 Aminosäuren gegenüber E^{rms-1} verlängert und repräsentiert den E^{rms} -Anker von Gln 175 an. Die 1H - ^{15}N -HSQC- und

CLEANEX-Spektren der beiden Proteine sind im Anhang unter 6.4.1 bzw. 6.4.2 dargestellt. Beide Proteine zeigten einen deutlich höheren Anteil an Aminosäuren mit Wasserkontakt.

In Tabelle 12 ist ein Vergleich des prozentualen Anteils von Aminosäuren mit Wasserkontakt zwischen den unterschiedlichen Konstrukten angegeben. Dabei wurde die ermittelte Anzahl an Peaks im CLEANEX-Spektrum durch die Anzahl an Peaks im jeweiligen ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum geteilt. Der N-terminale Bereich des E^{rms} -Ankers, repräsentiert durch $E^{\text{rms}}\text{-2-1}$ (Spektren siehe 6.4.3) zeigt im Gegensatz zum C-terminalen Bereich ($E^{\text{rms}}\text{-1-2}$) mehr NH-Bindungen mit einem Wasserkontakt. Man erkennt deutlich, dass durch eine Verlängerung des E^{rms} -Ankers die Anzahl an Aminosäuren mit Wasserkontakt auch zunimmt (vgl. $E^{\text{rms}}\text{-1}$ mit $E^{\text{rms}}\text{-4}$ bzw. $E^{\text{rms}}\text{-5}$). Jedoch zeigt $E^{\text{rms}}\text{-5}$ im Gegensatz zu $E^{\text{rms}}\text{-4}$, welches 8 Aminosäuren weniger besitzt als $E^{\text{rms}}\text{-5}$, mehr geschützte Aminosäuren. Zudem tauchen im ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von $E^{\text{rms}}\text{-4}$ weniger Peaks auf, als man für die Anzahl an Aminosäuren erwarten würde. Dies könnte in einer instabileren Faltung von $E^{\text{rms}}\text{-4}$ begründet liegen, da das nicht Vorhandensein von Peaks im ^1H - ^{15}N HSQC für eine sehr bewegliche Struktur dieser NH-Gruppe spricht. Somit muss eine N-terminale Verlängerung von $E^{\text{rms}}\text{-1}$ auch einen Einfluss auf den mittleren Bereich von $E^{\text{rms}}\text{-1}$ ausüben. Dadurch müssten einige der Aminosäuren, die im Konstrukt $E^{\text{rms}}\text{-1}$ keinen Wasserkontakt zeigen, im verlängerten Konstrukt $E^{\text{rms}}\text{-4}$ bzw. $E^{\text{rms}}\text{-5}$ nun wasserzugänglich sein.

Anzahl Peaks	$E^{\text{rms}}\text{-1}$	$E^{\text{rms}}\text{-1-2}$	$E^{\text{rms}}\text{-4}$	$E^{\text{rms}}\text{-5}$	$E^{\text{rms}}\text{-2-1}$
HSQC	41	32	47	66	24
CLEANEX	16	18	30	45	14
Differenz	25	14	17	21	10
NH-Gruppen mit Wasserkontakt [%]	39,0	56,3	63,8	68,2	58,3

Tabelle 12: Vergleich des Anteils an NH-Gruppen mit Wasserkontakt bei verschiedenen E^{rms} -Ankerfragmenten

Vergleich der NH-Gruppen mit Wasserkontakt zwischen den Proteinen $E^{\text{rms}}\text{-1}$, $E^{\text{rms}}\text{-1-2}$, $E^{\text{rms}}\text{-4}$, $E^{\text{rms}}\text{-5}$ und $E^{\text{rms}}\text{-2-1}$. Dazu wurde mit dem Programm NMRView die Anzahl der sichtbaren Peaks im HSQC- und im CLEANEX-Spektrum ermittelt und anschließend das Verhältnis der NH-Gruppen mit Wasserkontakt gebildet.

Um dies zu überprüfen, wurden die HSQC-Spektren der beiden Konstrukte genauer untersucht, um eine Zuordnung der einzelnen Aminosäuren treffen zu können. Leider konnten jedoch aufgrund der Komplexität der Spektren nur einige Aminosäuren zweifelsfrei identifiziert werden. Von diesen Aminosäuren wurde die normierte Protonenaustauschrate bestimmt und anschließend im Vergleich mit dem Konstrukt $E^{\text{rms}}\text{-1}$ in Abbildung 72 dargestellt. In der Abbildung erkennt man, dass alle Aminosäuren, die in $E^{\text{rms}}\text{-1}$ Wasserkontakt haben, diesen auch bei $E^{\text{rms}}\text{-4}$ und $E^{\text{rms}}\text{-5}$ zeigen. Die normierte Protonenaustauschrate von $E^{\text{rms}}\text{-5}$ ist insgesamt jedoch etwas höher als die von $E^{\text{rms}}\text{-1}$. Somit müssen diese Aminosäuren einen besseren Zugang zu Wasser haben. $E^{\text{rms}}\text{-4}$ zeigt eine noch deutlich höhere Intensität der Peaks als $E^{\text{rms}}\text{-4}$. Ein ähnliches Bild sieht man auch bei den Aminosäuren ohne Wasserkontakt. Bei $E^{\text{rms}}\text{-5}$ zeigen 6 der identifizierten Aminosäuren (203 Trp HE1, 212 Gly, 213 Lys, 222 Trp HE1, 223 Phe, 224 Gly), die bei $E^{\text{rms}}\text{-1}$ keinen Wasserkontakt zeigen, nun einen teilweise sehr deutlichen Kontakt. Bei $E^{\text{rms}}\text{-4}$ sind es sogar 8 Aminosäuren (201 Thr, 203 Trp HE1, 209 Gly, 213 Lys, 222 Trp HE1, 223 Phe, 224 Gly, 227 Ala). Interessanterweise wiesen auch $E^{\text{rms}}\text{-4}$ und $E^{\text{rms}}\text{-5}$ Unterschiede bzgl. des Wasserkontaktes einzelner Reste auf. Während bei $E^{\text{rms}}\text{-4}$ bei Gly 212 Wasserkontakt festgestellt werden konnte, ist dies bei $E^{\text{rms}}\text{-5}$ nicht der Fall. Dafür hat nun

E^{rms-5} einen Wasserkontakt bei den Aminosäuren 201 Thr, 209 Gly und 227 Ala, wobei der Kontakt bei Ala 227 nur sehr schwach ausgeprägt ist.

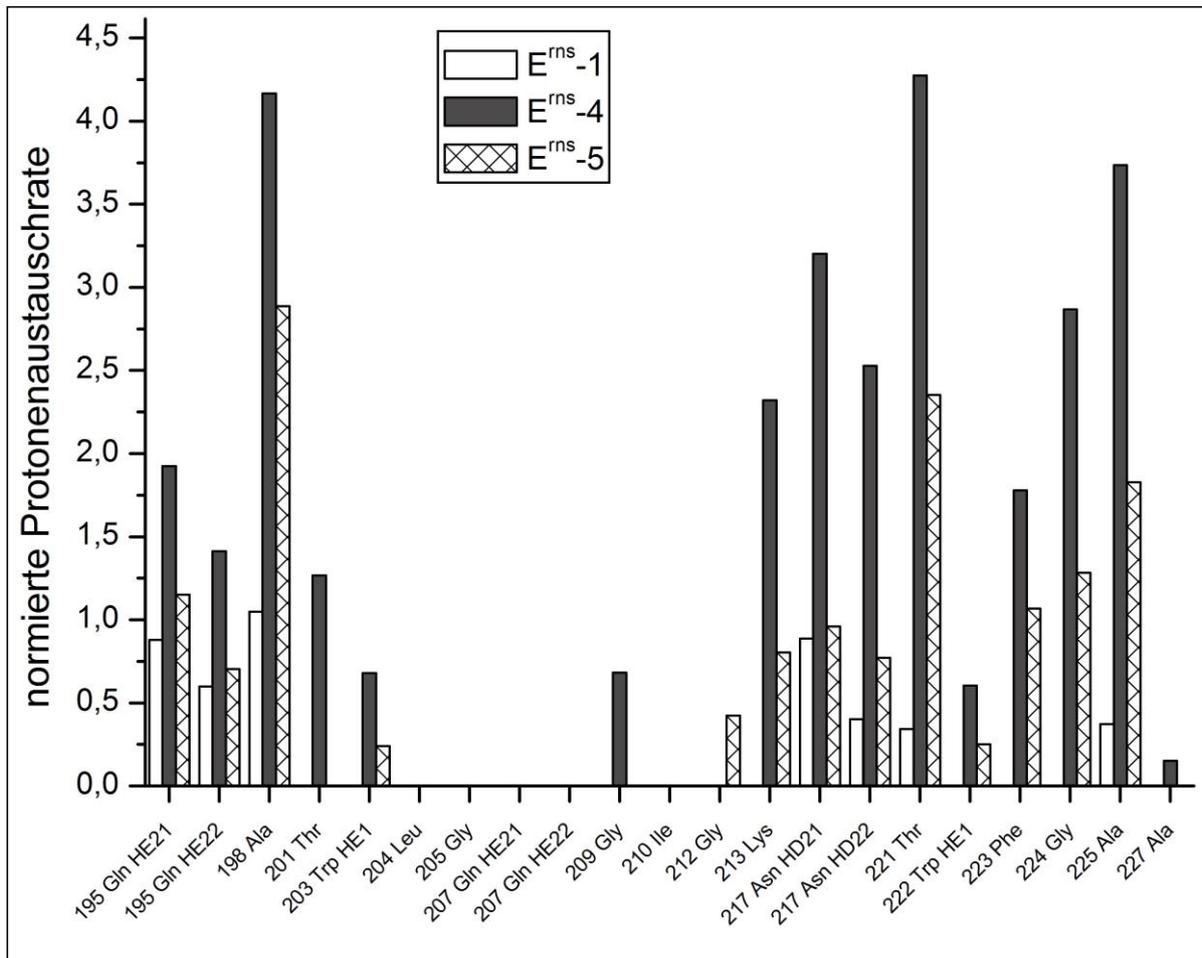


Abbildung 72: Vergleich der normierten Protonenaustauschraten von E^{rms-4} und E^{rms-5} mit E^{rms-1}

Angabe der normierten Protonenaustauschraten von E^{rms-1} (weißer Balken), E^{rms-4} (schwarzer Balken) und E^{rms-5} (schwarz gekreuzter Balken) für jede gemeinsam identifizierte Amidgruppe der drei Proteine. Für die Bestimmung der normierten Protonenaustauschraten wurde die Intensität des Peaks mittels des Programms NMRView aus dem CLEANEX - Spektrum durch die Intensität des dazugehörigen HSQC Peaks geteilt. Die Aminosäuren sind mit ihrem Triplet Code und ihrer Position im gesamten E^{rms} -Protein angegeben. Die Amidseitengruppen von Trp sind als HE1 beschriftet, die Protonen der Amidseitengruppe von Gln als HE21 bzw. HE22 und die Protonen der Amidseitengruppen von Asn als HD21 bzw. HD22.

Eine Zusammenfassung der Wasserkontaktdaten der verschiedenen Proteine ist in Abbildung 73 zu sehen. Dabei stehen leicht graue Aminosäuren für Aminosäuren, über die keine Aussage getroffen werden kann, bei schwarzen Aminosäuren konnte ein leichter Wasserkontakt gemessen werden, fett dargestellte Aminosäuren zeigten starken Wasserkontakt und unterstrichene Aminosäuren keinen Wasserkontakt. Die Seitengruppen von Asn, Gln und Trp wurden in Abbildung 73 nicht berücksichtigt. Man erkennt deutlich, dass der größte Anteil der Reste im untersuchten Abschnitt von E^{rms-1} keinen Wasserkontakt besitzt und dadurch in der Bizellenmembran liegen muss. E^{rms-1} lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: zum einen in einen großen N-terminalen Bereich, in dem 15 vollständig vom Wasser abgeschirmte Aminosäuren von mehreren wasserzugänglichen Aminosäuren flankiert werden

und zum anderen in einen kleinen C-terminalen Bereich, in dem die Aminosäuren abwechselnd leichten und keinen Wasserkontakt besitzen. Wenn der C-terminale Bereich entfernt wird, was durch das Protein E^{rns}-1-2 simuliert wurde, hat das auch einen Effekt auf den N-terminalen Bereich, da nun weniger Aminosäuren vom Wasser abgeschirmt sind. Jedoch zeigt der Kern des N-terminalen Bereichs immer noch eine große Sequenz, bei der die Aminosäuren durchgängig keinen Wasserkontakt haben. Eine Wechselwirkung des vorderen mit dem hinteren Bereich kann auch bei den N-terminal verlängerten Konstrukten E^{rns}-4 und E^{rns}-5 beobachtet werden. Die verlängerten Proteine zeigten plötzlich eine Veränderung im C-terminalen Bereich, da fast alle identifizierten Aminosäuren Wasserkontakt hatten. Wobei E^{rns}-5 mit einer 18 Aminosäuren Verlängerung einen etwas kleineren Effekt zeigt als E^{rns}-4 mit 10 Aminosäuren Verlängerung, da der Wasserkontakt der letzten Aminosäuren bei E^{rns}-5 wieder abnimmt. Aber auch bei den verlängerten Konstrukten existiert anscheinend ein Kernbereich in der Mitte der Sequenz, in dem mehrere Aminosäuren am Stück keinen Wasserkontakt zeigen.

E ^{rns} -1	GR <u>Q</u> GT <u>A</u> KL <u>T</u> TWLGR <u>Q</u> LGILG <u>K</u> KL <u>E</u> N <u>K</u> S <u>K</u> T <u>W</u> FG <u>A</u> Y <u>A</u>
E ^{rns} -1-2	GR <u>Q</u> GT <u>A</u> KL <u>T</u> TWLGR <u>Q</u> LGILG <u>K</u> KL <u>E</u> N <u>K</u> S <u>K</u> T
E ^{rns} -4	GDGMTNSLESAR <u>Q</u> GT <u>A</u> KL <u>T</u> TWLGR <u>Q</u> LGILG <u>K</u> KL <u>E</u> N <u>K</u> S <u>K</u> T <u>W</u> FG <u>A</u> Y <u>A</u>
E ^{rns} -5	G <u>Q</u> DTAHYLV <u>D</u> GMTNSLESAR <u>Q</u> GT <u>A</u> KL <u>T</u> TWLGR <u>Q</u> LGILG <u>K</u> KL <u>E</u> N <u>K</u> S <u>K</u> T <u>W</u> FG <u>A</u> Y <u>A</u>

Abbildung 73: Zusammenfassung der CLEANEX Ergebnisse

Darstellung der CLEANEX Ergebnisse von E^{rns}-1, E^{rns}-1-2, E^{rns}-4 und E^{rns}-5. Dabei stehen leicht grau dargestellte Buchstaben für Aminosäuren, über die keine Aussage getroffen werden konnte. Schwarze Buchstaben stehen für Aminosäuren mit leichtem Wasserkontakt und für fett geschriebene Aminosäuren wurde starker Wasserkontakt festgestellt. Dagegen haben unterstrichene Aminosäuren keinen Wasserkontakt.

Interessanterweise zeigt die letzte Aminosäure Ala 227 bei E^{rns}-1 und E^{rns}-5 keinen und bei E^{rns}-4 nur einen sehr schwachen Wasserkontakt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der C-Terminus sich stabil in einer Umgebung befindet, zu der kein nennenswerter Zugang für Wasser existiert. Da beide Konstrukte in der CD Spektroskopie eine starke helikale Faltung in dem Bizellensystem ausbildeten (vgl. Abbildung 60), ist es nicht wahrscheinlich, dass diese Effekte durch eine Instabilität der Bizellen ausgelöst wurden.

Um Näheres über die Sekundärstruktur der Aminosäuren ohne Wasserkontakt und mögliche intramolekulare Kontakte zu erfahren, wurden anschließend ¹⁵N-HSQC-NOESY Messungen des E^{rns}-1-Proteins durchgeführt.

4.3.2 Sekundärstrukturbestimmung des C-terminalen E^{rns}-Ankerfragmentes

Der Nuklear-Overhauser Effekt (NOE), mit dem Abstände zwischen Protonen bestimmt werden und damit eine Strukturbestimmung durchgeführt wird, wird über Kern-Dipol-Dipol-Wechselwirkungen vermittelt. Die Effizienz dieser Übertragung ist von der Entfernung der zwei Atome abhängig und fällt um r^{-6} ab. Somit beeinflussen sich nur räumlich sehr nahe Atome, die weniger als 5 Å voneinander entfernt sind. In unseren Versuchen verwendeten wir ein 3D ¹H-¹⁵N-HSQC-NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) Experiment.

Da der vollständige E^{rns}-Anker (Lys 167 – Ala 227) durch im ¹⁵N-HSQC-NOESY eine große Linienverbreiterung zeigte, vermutlich bedingt durch Austauschphänomene (z.B. weil das System Protein/Mizelle nicht stabil war) wurde für die Strukturanalyse das Protein E^{rns}-1 verwendet. In Abbildung 74 ist ein Teil der ¹⁵N-HSQC-NOESY Datensatz von E^{rns}-1 zu sehen. Jeder Streifen repräsentiert jeweils einen Peak im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum. Über Kreuzpeaks kann auf einen räumlichen Kontakt mit anderen NH-Gruppen geschlossen werden.

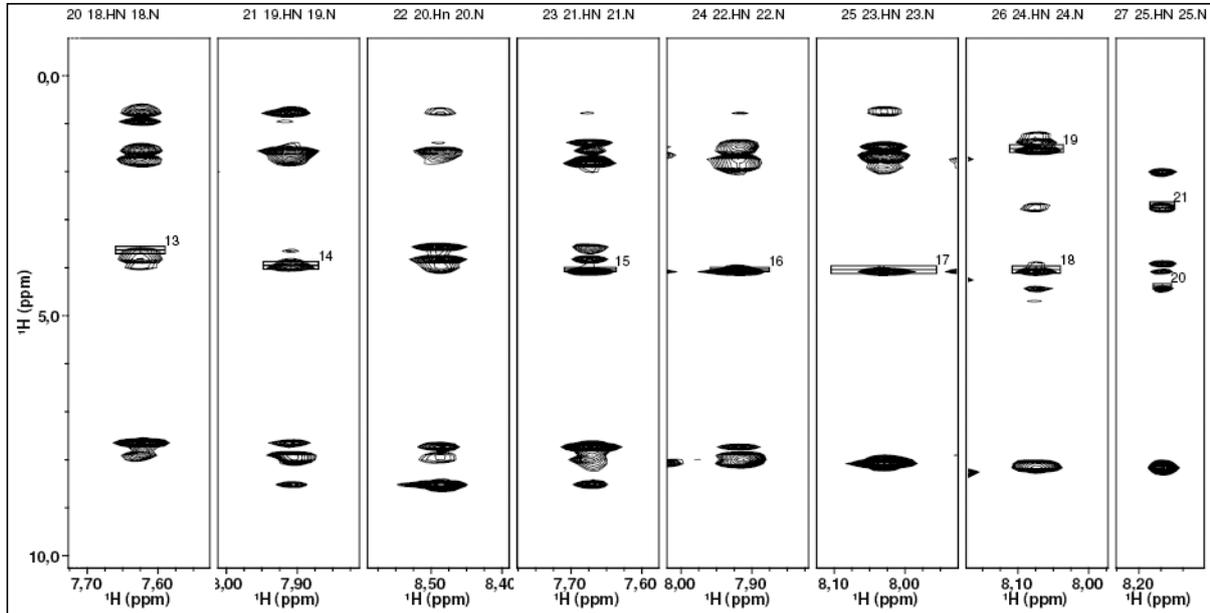


Abbildung 74: Beispiel des ¹H-¹⁵N-NOESY Spektrums von E^{rns}-1

Strips des ¹⁵N NOESY Spektrums von E^{rns}-1, das mit dem Programm NMRView erstellt wurde. Jeder Ausschnitt stellt einen Peak im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum dar, der in der dritten Dimension erweitert wurde. Die beschrifteten Peaks entsprechen identifizierten Kreuzsignalen mit den entsprechenden nummerierten Peaks.

Durch die Windung in einer α -Helix kommt ungefähr die Amidgruppe der jeweiligen dritten Peptidbindung in räumliche Nähe zur Amidgruppe des bezeichneten Restes. Zeigt nun das NOESY-Spektrum, dass in einem Bereich eine Amidgruppe Kontakt mit drei Aminosäuren vor und hinter ihr zeigt, kann auf eine helikale Faltung zurückgeschlossen werden. In Abbildung 75 ist das Faltungsmodell von E^{rns}-1 dargestellt, das mit Hilfe der NOESY-Daten erstellt wurde. Darin erkennt man einen langen Bereich von Leu 200 bis Asn 217, in dem eine helikale Faltung vorherrscht, die in der Abbildung mit einem schwarzen Kasten markiert wurde. Zusätzlich konnten am C-terminalen Ende noch intramolekulare Kontakte der NH Bindungen entdeckt werden, die in Abbildung 74 durch Verbindungslinien angezeigt werden. Zum einen zeigt Thr 221 eine räumliche Nähe zu Gly 224 und zum anderen zeigt Trp 222 eine räumliche Nähe zu Tyr 226. Somit könnte der C-Terminus des E^{rns}-Ankers basierend auf den Ergebnissen der ¹⁵N-NOESY Experimente entweder eine Art Helix oder eine Rückfaltung in eine Art Lassostruktur ausbilden, die sich zurückfaltet. Zusätzlich konnte mittels ¹H-¹³C-NOESY Experimenten von ¹³C markiertem E^{rns}-1 intramolekulare Kontakte zwischen den Protonen der C-terminal liegenden Aminosäuren detektiert werden (siehe 6.4.4), was ebenso für eine komplexe und stabile Struktur spricht. Im Gegensatz dazu erscheint der N-Terminus ungeordnet.

GRQGTAKLTTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA

Abbildung 75: Faltungsmodell unterstützt durch NOESY-Daten von E^{rns}-1

Schematische Darstellung der gemessenen NOESY-Daten von E^{rns}-1. Dabei zeigt der schwarze Kasten die Aminosäuren an, bei denen eine helikale Faltung gemessen werden konnte. Die schwarzen Striche symbolisieren gemessene intermolekulare ¹⁵N-NOESY-Kontakte.

4.3.3 Stabilität der Helixfaltung in der Membran

Um zu untersuchen, ob die helikale Faltung von E^{rns}-1 in der Membran überhaupt stabil vorliegt, wurden Relaxationsmessungen durchgeführt (siehe 3.3.3.2.2). Bei diesem NMR Experiment wird die transversale und longitudinale Relaxation des ¹⁵N-Kerns gemessen. Diese Daten werden unter Zuhilfenahme des Lipari-Szabo-Modells interpretiert und erlauben eine Aussage über die Bewegung der NH-Vektoren untereinander [73]. Ein Vorteil dieser Messung ist, dass sie einfach durchzuführen ist und trotzdem einen Rückschluss auf Bewegungen im ps/ns Bereich zulässt. Die zusätzliche Messung des heteronuklearen NOEs (HetNOE) zwischen dem Amidproton und dem ¹⁵N-Kern gibt Aufschluss auf die genaue Beweglichkeit des Amidstickstoffes, ohne den Zeitbereich der Bewegung genauer zu charakterisieren, d.h. es kann nicht differenziert werden zwischen Bewegungen im Nano-, Micro- oder Millisekundenbereich. Auf die Art der Bewegung kann jedoch nicht zurückgeschlossen werden, da nur die globale Bewegung gemessen wird.

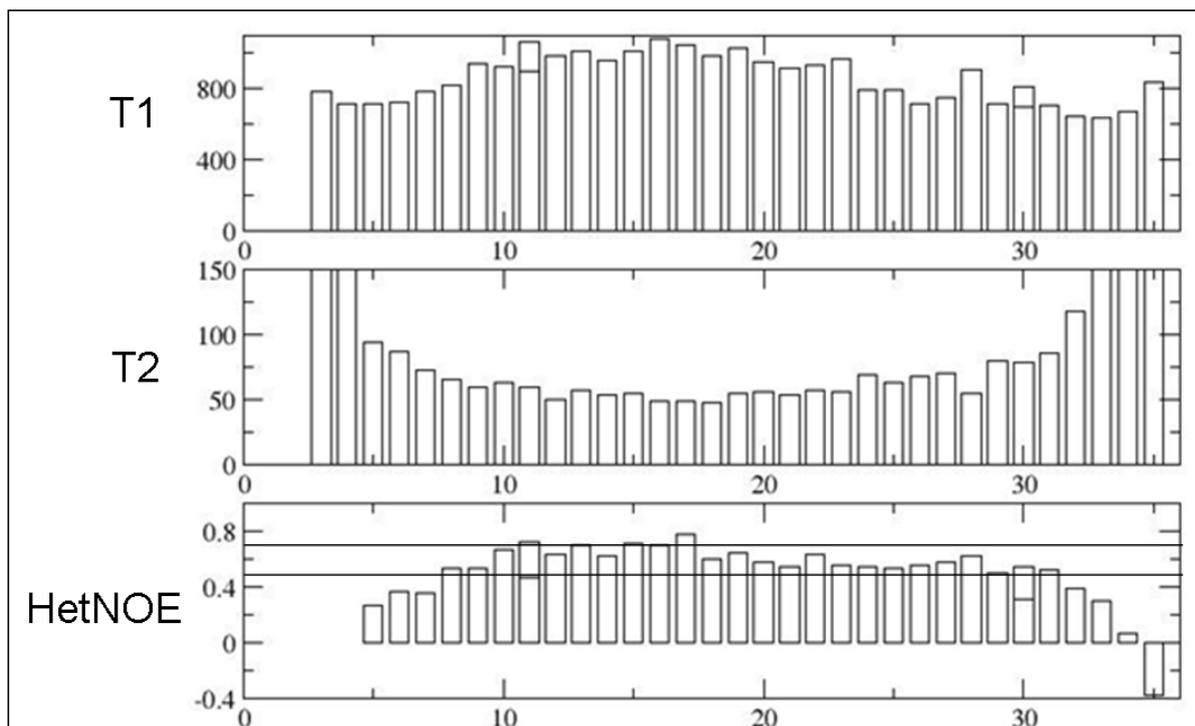


Abbildung 76: Relaxationsmessungen von E^{rns}-1

Messung der Moleküldynamik von E^{rns}-1. Dabei entsprechen T1 und T2 den T1 und T2 Relaxationszeiten und zeigen somit schnelle Bewegung im ps/ns Bereich an. Het-NOE zeigt die heteronukleare NOE an und ist ein Maß für eine allgemeine Dynamik (siehe 3.3.3.2.2).

In Abbildung 76 ist das Ergebnis dieser Messung für E^{rns}-1 dargestellt. Dabei entspricht die erste Aminosäure Gln 195 und die letzte Aminosäure Ala 227. Die T1 und T2 Daten geben gemeinsam Auskunft über schnelle Bewegungen im ps/ns Bereich. Die Het-NOE Daten geben zusätzlich Hinweise über dynamische Bereiche nicht nur in dieser Zeitskala. In T1 und T2 erkennt man, dass die Enden flexibel sind, besonders die Aminosäuren Thr 197 (3), Ala 198(4), Ala 225 (33), Tyr 226 (34) und Ala 227 (35). Der Bereich der helikalen Faltung Leu 204 – Asn 217 (10-23) zeigt sich dagegen starrer als der Rest. Bei den Het-NOE Daten werden alle Aminosäuren über 0,7 (obere Linie) als starr und alle Aminosäuren unter 0,5 (untere Linie) als flexibel bezeichnet. Auch bei dieser Messung sind die Enden sehr flexibel. Der Bereich von Leu 204 – Ile 210 (10-17) ist dagegen starr. Weiterhin existiert ein zusätzlicher Bereich Leu 211 – Thr 221(18-28), der nicht starr, aber auch nicht ganz flexibel ist.

Somit zeigen beide Messungen, dass nicht nur der helikale Bereich von E^{rns}-1 stabil ist, der sich in der Membran befindet, sondern auch die C-terminal angrenzenden Aminosäuren mit Wasserkontakt. Nur die direkten N und C-terminalen Enden erweisen sich als sehr flexibel, wobei der N-Terminus flexibler ist als der C-Terminus.

5.0 Diskussion

Das virale Glykoprotein E^{rns} stellt einen wichtigen Virulenzfaktor von Pestiviren dar, der für die Ausbildung einer Persistenz in Feten mitverantwortlich ist [25]. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die intrinsische RNase-Aktivität und die Dimerisierung zwei wesentliche Charakteristika für die Virulenzfaktorfunktion von E^{rns} darstellen. Dies konnte zum einen in Zellkultursystemen beobachtet werden, da durch Zugabe von aufgereinigtem E^{rns} ins Zellmedium dsRNA keine Interferonantwort der Zelle mehr ausgelöst wird [74]. Zum anderen konnte durch *in vivo* Studien nachgewiesen werden, dass sowohl Mutationen, die die RNase Funktion betreffen, als auch Mutationen, welche die Entstehung stabiler Dimere verhindern, attenuierend wirken [38, 28, 75].

E^{rns} liegt in virusinfizierten Zellen oder bei einer transienten Expression als membrangebundenes Protein vor, die Membranbindung wird hierbei durch den C-terminalen Bereich des Proteins verursacht [38]. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Bindung nicht so stark ist wie die durch eine Transmembranhelix vermittelte, da sie schon mit Detergenzien aufgelöst werden kann, die Membranen nicht zerstören. Bei Annahme einer helikalen Faltung des C-terminalen Bereiches, der als E^{rns} -Anker bezeichnet wird, bildet sich eine amphipatische Helix aus. Es wurde gezeigt, dass bei einer Störung der Amphipatizität E^{rns} stark vermehrt aus der Zelle sekretiert wird [38].

E^{rns} wird bei der Prozessierung des viralen Polyproteins vom nachfolgenden pestiviralen Glykoprotein E1 durch die zelluläre Signalpeptidase abgespalten [39]. Diese Spaltung ist jedoch verzögert, so dass eine nennenswerte Menge eines Fusionsproteins aus E^{rns} und E1 in den Zellen detektiert werden kann. Die Spaltung der E^{rns} /E1-Fusionsstelle durch die Signalpeptidase ist überraschend, da die zelluläre Aufgabe der Signalpeptidase die Spaltung einer Position im Protein ist, die direkt auf eine Transmembranhelix folgt. Diese Spaltung findet im Bereich des Übergangs zwischen Membran und wässrigem Milieu statt. Die Signalpeptidase ist ausgesprochen kritisch bezüglich der exakten Positionierung und Konformation ihres Substrats [76, 77]. Der E^{rns} -Anker als amphipatische Helix sollte sich an dieser Grenzfläche befinden, aber aufgrund der hier zu erwartenden planaren Anordnung der Helixachse zur Membranoberfläche in deutlich anderer Konformation vorliegen. Die Spaltung sollte daher nur stattfinden, wenn der E^{rns} -Anker zusammen mit dem N-Terminus von E1 im direkten Spaltstellenbereich eine Struktur ausbildet, die in diesem begrenzten Bereich eine Transmembranhelix simuliert und deshalb als Substrat akzeptiert wird. Dadurch ergibt sich aber eine hohe Anforderung an die Struktur des Spaltstellenbereiches. Dass die Spaltsequenz in der Tat erheblich weniger Freiheitsgrade als eine normale Signalpeptidasespaltsequenz besitzt, konnte durch Mutationsanalysen bereits gezeigt werden [39].

E^{rns} ist ein essentielles virales Protein, das für die Bildung infektiöser Partikel wichtig ist. Es wird aber interessanterweise auch zu einem kleinen Anteil von der Zelle sekretiert. Die Kontrolle dieses Mechanismus erfolgt vermutlich wiederum über den C-terminalen Membrananker. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass verschiedene Primär- und Sekundärstrukturelemente des E^{rns} C-Terminus die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Sekretion und Retention beeinflussen. Dabei beinhaltet der E^{rns} C-Terminus ein Signal, das die intrazelluläre Retention des überwiegenden Teils des E^{rns} -Proteins im ER nahen Bereich bewirkt [37].

Somit vereint der E^{rns} C-Terminus mindestens drei verschiedene Funktionen; (i) Membranverankerung des Proteins, (ii) Substrat für Signalpeptidasespaltung und (iii) intrinsisches Retentionssignal. Um mehr über diese Funktionen zu erfahren, sollte in der vorliegenden Arbeit die strukturellen und biologischen Voraussetzungen für die Interaktion des E^{rns} C-Terminus mit Membranen im Detail analysiert werden.

5.1 Basisinteraktion mit Lipiden

In vorangegangenen Versuchen wurde das Bindungsverhalten des E^{rns} -Ankers an Membranen in Zellen untersucht. Dies ist jedoch ein ungeeignetes System zur Untersuchung von reinen Lipidinteraktionen, da die Zelle ein komplexes System ist, in welchem der E^{rns} C-Terminus nicht nur Lipidinteraktionen sondern auch Proteininteraktionen ausführen kann. Zusätzlich erfüllt der E^{rns} -Anker im biologischen System viele verschiedene Funktionen, die schwer voneinander zu trennen sind. Um die reine Lipidbindungsfähigkeit des E^{rns} -Ankers untersuchen zu können, wurde ein einfaches *in vitro* System gewählt, in dem die Lipidinteraktion ohne störende Einflüsse durch andere Komponenten analysiert werden konnte. Dazu wurde der E^{rns} -Anker an einen Z2-tag fusioniert, wodurch die bakterielle Expression und die Wasserlöslichkeit erhöht wurden. Anschließend wurde die Bindung dieses Fusionsproteins an Vesikel bestehend aus verschiedenen Lipiden getestet. Als Kontrolle diente hierbei der Z2-tag ohne E^{rns} -Anker. Es konnte dabei eine spezifische Bindung an negativ geladene Vesikel gemessen werden, die unabhängig vom N-terminalen tag war. Da die Nettoladung des E^{rns} -Ankers +2 beträgt könnte die Bindung auf einer reinen Ladungsinteraktion zwischen Protein und Lipid beruhen, wobei die Ladungsdichte des C-terminalen Bereichs des Ankers mit 4 positiv geladenen Aminosäuren am ausgeprägten ist. Durch Zugabe von Lipiden, die mehrere negative Ladungen besitzen, konnte jedoch keine Verstärkung der Bindung erreicht werden. Dagegen zeigte der E^{rns} -Anker eine hohe Bindungsfähigkeit an Lipidmischungen, die biologische Membranen simulierten und deswegen einen sehr hohen Anteil an negativ geladenen Lipiden besaßen. Es konnte jedoch keine Bindung an negativ geladene Mizellen detektiert werden. Auch das Reduzieren der positiven Ladung des E^{rns} -Ankers durch verschiedene Mutationen führte in einigen Fällen nur zur Aggregation des Proteins, was die schlechtere Löslichkeit des Proteins beweist, führte jedoch nie zu einer Abschwächung der Lipidinteraktion. Eine Veröffentlichung beschreibt eine Lipidinteraktion des E^{rns} -Ankers im biologischen System abhängig von einem positiv geladenen Motiv im C-terminalen Bereich des Ankers [78]. Jedoch konnte im *in vitro* Assay auch bei ladungsändernden Mutationen in diesem Motiv kein Einfluss auf die Lipidbindung gemessen werden. Somit dürfte die Proteinladung keinen Einfluss auf die Lipidbindung haben, da selbst ein negativ geladener E^{rns} -Anker unverändert stark an die negativ geladenen Vesikel bindet.

Um einen ersten Eindruck von der Kinetik der Lipidbindung zu erhalten, wurden verschiedene Bindungszeiten getestet. Hierbei führte selbst das experimentell kürzeste durchführbare Zeitintervall von 30 sec zu einer vollständigen Bindung. Somit erfolgt der Aufbau der Membraninteraktion sehr schnell. Das Bindungsgleichgewicht muss stark auf der Bindungsseite liegen, da während einer mehrstündigen Inkubation immer eine vollständige Bindung gemessen werden konnte. Die Stabilität der Interaktion wurde auch durch die Messung bei verschiedenen Temperaturen deutlich. In einem Temperaturbereich von 4 bis 37°C konnten keine Bindungsunterschiede gemessen werden.

Amphipatische Helices scheinen in der Zelle meist für die Induktion von Membrankrümmungen verantwortlich zu sein und stellen zudem einen Sensor für die Membrankrümmung dar, da sie sich an Fehlstellen in der Membran einlagern können, die bei gekrümmten Membranen gehäuft vorkommen [79-81]. Die Bindungsversuche wurden zunächst mit Vesikeln durchgeführt, die eine gekrümmte Oberfläche aufwiesen. Die Bindung des E^{rns} -Ankers wurde aber auch an Bizellen getestet, die eine planare Membranoberfläche besitzen und somit dem biologischen System ähnlicher sind [72]. Auch in diesem System konnte eine Lipidinteraktion gemessen werden, die jedoch nicht so ausgeprägt war wie die der getesteten Vesikelsysteme. Außerdem erfolgte keine Verstärkung der Bindung durch die Zugabe von negativ geladenen Lipiden. Somit hängt die Bindung des E^{rns} -Ankers von der Oberfläche der Lipidstrukturen ab, da runde Lipidstrukturen eine deutlich bessere Bindung zeigen als planare Lipidstrukturen. Dies ist nicht verwunderlich, da eine Insertion in eine gekrümmte Membran weniger Energie benötigt als die Einlagerung in eine planare Membran. Grund dafür ist, dass die Krümmung bereits Fehlstellen in der Membran induziert, wodurch eine Einlagerung erleichtert wird, da für die

Proteinbindung keine Lipide verdrängt werden müssen. Bei planaren Membranen dagegen müssen die Lipide erst verdrängt werden, um eine Einlagerung zu ermöglichen. Dies ist mit einem hohen Energieaufwand verbunden. Somit ist es erstaunlich, dass sich annähernd 40 % des E^{rns}-Membranankers in die Membranen einlagern können. Normalerweise führt die Einlagerung von einer amphipatischen Helix in eine zelluläre Membran zu einer leichten Krümmung. Durch diese Krümmung können Fehlstellen in der Membran ausgebildet werden, durch die weitere amphipatische Helices binden können und durch die sich der Membrankrümmungseffekt verstärkt bzw. stabilisiert. Im Gegensatz dazu führt eine Einlagerung des E^{rns}-Ankers in Bizellen höchstens zu einer sehr leichten Krümmung, da die Bizellenstruktur keine starken Krümmungen erlaubt und eine Krümmung viel Energie für die Umorientierung der Lipide benötigt. Zusätzlich könnte im Bizellensystem, im Gegensatz zum Vesikelsystem, die Bindung eines E^{rns}-Ankers an eine Seite der Bizelle die Bindungsfähigkeit eines weiteren E^{rns}-Ankers auf der anderen Seite der Bizelle herabsetzen. Dies geschieht, weil durch die Bindung des E^{rns}-Ankers die Bizelle eine leicht konkave Form annehmen muss. Durch diese Form wird die Bindung auf einer Seite der Bizelle begünstigt und auf der anderen Seite erschwert.

Einige Punktmutationen im E^{rns}-Anker zeigten im biologischen System eine deutliche Steigerung der Sekretionsrate des Proteins. Um zu untersuchen, ob die Änderung der Sekretionsrate auf die Membranbindung zurückzuführen ist, wurden diese Mutationen in das Z2-tag E^{rns}-Ankerkonstrukt eingeführt und die resultierenden Mutanten auf ihre Lipidbindungsfähigkeit analysiert. Es wurden Austausche der aliphatischen Aminosäuren V183, L190 und L208 gegen die neutrale Aminosäure Alanin getestet. Jede einzelne dieser Punktmutationen im E^{rns}-Anker führte bei beiden untersuchten Pestiviren im biologischen System zu einer dramatischen Steigerung der Sekretionsrate. Bei den Lipidbindungsexperimenten konnte dagegen keine Änderung in der Lipidbindungsspezifität und Stärke beobachtet werden. Somit lassen sich die Effekte, die im biologischen System auftraten, nicht durch eine Änderung in der Lipidbindung erklären. Sie müssen andere Ursachen haben und auf Faktoren beruhen, die im Lipidbindungsversuch nicht gegeben waren, wie z.B. die Interaktion mit einem zellulären Protein.

Um die Rolle des amphipatischen Charakters bei der Lipidbindung zu analysieren, wurden verschiedene Alanininserktionen durchgeführt, die eine Drehung der amphipatischen Helix am Insertionspunkt auslösen. Diese Drehung der Helix führte zu einer erheblichen Schwächung des amphipatischen Charakters des E^{rns}-Ankers und zeigte im biologischen System eine starke Sekretion, was durch eine Störung des Retentionsverhaltens und der Membranbindung hervorgerufen wurde. Bei allen untersuchten einzelnen Alanininserktionen konnte kein Unterschied in der Bindungsstärke detektiert werden. Auch bei Einführung mehrerer Alanininserktionen in das Protein kam es zu keiner Reduzierung der Lipidbindung. Keinen Effekt zeigten ebenso die Einführung eines Prolin-Glycin-linkers, der den N-terminalen Bereich des E^{rns}-Ankers vom C-terminalen Bereich trennte. Jedoch zeigten Prolininserktionen, die zum einen eine Drehung der Helix verursachen und zum anderen die lokale Struktur der Helix zerstören, zum Teil einen Effekt auf die Spezifität und die Stärke der Lipidbindung. Dieser Effekt trat aber nur bei Prolininserktionen im C-terminalen Bereich des E^{rns}-Ankers auf und konnte durch eine zweite Prolininserktion in diesem Bereich wieder egalisiert werden. Da Prolinsubstitutionen diesen Effekt nicht aufwiesen, zeigt dies, dass man sehr starke Störungen im E^{rns}-Anker einführen muss, um die Lipidbindung überhaupt zu verhindern. Somit hat die Amphipazität des E^{rns}-Ankers trotz der offensichtlichen großen Bedeutung im biologischen System keinen großen Einfluss auf die Lipidbindung in den *in vitro* Experimenten. Dieser schwache Effekt in den *in vitro* Experimenten könnte davon herrühren, dass trotz der Drehung der amphipatischen Helix ein Teil immer noch einen amphipatischen Charakter aufweist und dieser Teil noch ausreicht, um eine stabile Bindung zu gewährleisten.

Beim Vergleich des E^{rns}-Ankers mit anderen amphipatischen membranbindenden Sequenzen fiel auf, dass die MinD Helix aus dem *E. coli* Protein MinD eine ähnliche Spezifität für negativ geladene

Vesikel besitzt wie der E^{rns} -Anker. Ihre Sequenz besteht jedoch nur aus 12 Aminosäuren, was ca. 3 - 4 Helixwindungen entspricht. Der E^{rns} -Anker besteht dagegen aus fast fünfmal so vielen Aminosäuren. Um zu untersuchen, ob auch kleinere Fragmente des E^{rns} -Ankers eine Bindung an Lipide bewerkstelligen können, wurden Fragmente des E^{rns} -Ankers hergestellt und diese auf ihre Lipidbindungsfähigkeit untersucht. Dabei konnte ein großer Unterschied zwischen dem N-terminalen Bereich (E^{rns} -2-1) und dem C-terminalen Bereich (E^{rns} -1-2) des E^{rns} -Ankers gemessen werden. Der N-terminale Bereich zeigte nur noch eine sehr schwache Bindung an die negativ geladenen Vesikel, wohingegen die C-terminale Sequenz unverändert stark an die Membranen band. Auffällig war, dass diese Teilsequenz eine noch größere Spezifität für negativ geladene Lipide besaß als die gesamte Ankersequenz. Zur Untersuchung des Einflusses der Amphipatizität auf die Lipidbindung dieser beiden Fragmente, wurden Alanininsertionsanalysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das N-terminale Fragment durch die Insertion seine Fähigkeit an Lipide zu binden verlor, wohingegen das C-terminale Fragment eine unverändert spezifische und starke Bindung an die negativen Lipide zeigte. Somit ist der amphipatische Charakter des E^{rns} -Ankers nur für die Lipidbindung des vorderen Bereichs wichtig und nicht für den C-terminalen Bereich. Um herauszufinden, ob die Faltung des C-terminalen Bereiches trotzdem eine Rolle für die Lipidbindung spielt, wurden Prolinsubstitutionen analysiert. Dabei wurde eine Prolinsubstitution im vorderen und eine im hinteren Bereich des C-terminalen Fragmentes getestet. Interessanterweise führte nur die vordere Prolinsubstitutionen zu einer Reduktion der Lipidbindung. Dieser Effekt fiel bei Interaktion mit DMPG-haltigen Vesikeln deutlich schwächer aus als der Effekt bei PI-haltigen. Aus diesen Analysen lässt sich schlussfolgern, dass der Hauptanteil der Lipidinteraktion des E^{rns} -Ankers von diesem vorderen Bereich des C-terminalen Fragmentes verursacht werden muss und dieser somit den Kernbereich des E^{rns} -Ankers darstellt. Zu genaueren Analyse dieses Kernbereichs des E^{rns} -Ankers wurde ein Fragment des mittleren Bereiches des E^{rns} -Ankers (E^{rns} -3-1), welches diesen Kernbereich darstellt, hergestellt und analysiert. Dieser mittlere Bereich des E^{rns} -Ankers band aber nur sehr schwach an die Lipide. Ein N- und C-terminal verlängertes mittleres Fragment (E^{rns} -6-4) zeigte dagegen eine stärkere Bindung an negativ geladene Vesikel als die gesamte Ankersequenz. Zusätzlich war die Bindung an zwitterionischen Vesikel reduziert, so dass die Spezifität für negative Lipide bei diesem Fragment deutlicher ausgeprägt war.

Die schlechtere Lipidbindung des kürzeren mittleren E^{rns} -Ankerfragmentes könnte durch eine andere Faltung dieses Bereiches verursacht werden. In diesem Fragment laut Strukturvorhersagen eine „charge zipper“ Faltung möglich [82]. Durch diese Faltung könnte das Fragment statt einer Faltung zur planaren Helix eine Haarnadelstruktur ausbilden. Diese Struktur wäre dann nicht mehr in der Lage, mit den Lipiden zu interagieren. Durch die Verlängerung dieses Fragments könnte die Stabilität des Faltungsmotivs herabgesetzt werden, wodurch es wieder zu einer planaren Faltung kommen könnte, so dass das verlängerte Fragment nun wieder mit den Lipiden interagieren könnte. Diese Möglichkeit muss durch gezielte Veränderung des „charge zipper“ Motivs verifiziert werden, dies war jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich.

Bei Vergleichen zwischen verschiedenen Pestivirussequenzen fiel auf, dass der C-Terminus von E^{rns} eine große Anzahl an konservierten Aminosäuren enthält. Dies kann natürlich zum einen der speziellen Struktur geschuldet sein, die sich für die Signalpeptidasespaltung an der E^{rns} /E1 Grenze ausbilden muss, aber zum andern kann es auch für die Membraninteraktion eine Rolle spielen. Bei Analysen im biologischen System scheint der C-Terminus von E^{rns} eine wichtige Funktion für die Membranbindung zu haben, da zum einen Verkürzungen von wenigen Aminosäuren am C-Terminus zu einem sprunghaften Anstieg der Sekretionsrate führten und zum anderen Verlängerungen des C-Terminus mit wenigen Aminosäuren des im Polyprotein folgenden Glykoproteins E1 ebenfalls zu einer Verschlechterung der Membranbindung führten. Somit stellt sich die Frage, ob ein freier C-Terminus wichtig für die Ausbildung der Membranbindung ist. Um dies zu untersuchen, wurden C-terminale Verkürzungen und Verlängerungen des E^{rns} -Ankers in Lipidbindungsexperimenten

getestet. Aber auch in diesem Fall ließen sich die Ergebnisse aus dem biologischen System nicht mit den Daten der Lipidbindungsanalysen in Einklang bringen, da keines der Konstrukte einen so deutlichen Effekt in Bezug auf die Lipidbindung hatte, wie analoge Mutationen zuvor im biologischen System gezeigt hatten. Für C-terminale Verkürzungen des E^{rns}-Ankers ergaben sich, wenn überhaupt, nur leichte Effekte auf die Lipidbindung. Hierdurch wodurch vorherige Lipidbindungsmessungen bestätigt. Auch die Verlängerungen des C-Terminus mit Aminosäuren von E1 führten nicht zu den erwarteten Effekten auf die Lipidbindung. Es konnten aber zumindest leichte Unterschiede für die verschiedenen Verlängerungen registriert werden. So führten Verlängerungen um 7 oder 9 Aminosäuren zu einer leichten Verschlechterung der Bindung. Verlängerungen um 4 oder 10 Aminosäuren zeigten diesen Effekt jedoch nicht. Dieser leichte Unterschied in der Lipidbindung könnte an einer veränderten Faltung des C-Terminus liegen, da diese Sequenz als Substrat für die Signalpeptidase erkannt werden und damit in irgendeiner Weise eine Transmembranhelix simulieren muss. Somit wird dieser Bereich stark strukturiert sein, was das Auftauchen von Faltungsartefakten durch Trunkierungen in dieser Region wahrscheinlich macht.

Die Daten können dahingehend zusammengefasst werden, dass eine spezifische Lipidbindung des E^{rns}-Ankers gemessen wurde und kürzere Bereiche der Sequenz eine deutlich unterschiedliche Bindungsstärke zeigten. Gravierende Effekte, wie sie im biologischen System in Bezug auf die Sekretion von E^{rns}-Proteinen mit verschiedenen Mutationen in der Ankersequenz auftraten, lassen sich nicht mit Änderungen in der Lipidbindungseigenschaft des E^{rns}-Ankers erklären. Dies könnte zwei Ursachen haben. Entweder sind diese Änderungen in dem verwendeten Messsystem nicht detektierbar, da sie in diesem System zu klein sind, während sie in einem zellulären System größere Auswirkungen haben, oder die Steigerung der Sekretionsrate bzw. die Abschwächung der Membranbindung ist ein sekundärer Effekt, der auf eine gestörte Interaktion mit einer unbekanntem zellulären Komponente z.B. einem Membranprotein hinweist. Beim Messsystem würden als Faktor der verwendete Puffer und die Vesikel bzw. das aufgereinigte Protein in Betracht kommen. Bei der Aufreinigung des Proteins könnte es zu Faltungsartefakten und damit zur Aggregation kommen. Diese Aggregate könnten bei der Zentrifugation sedimentieren und damit eine größere Bindung an Lipide suggerieren. Aus diesem Grunde wurde eine Pufferkontrolle eingeführt, um einen Eindruck von der Menge schwerlöslicher Aggregate im Testsystem zu erhalten. Jedoch sah man beim Vergleich der Puffer- mit der Vesikelkontrolle, dass oft der Anteil an Protein im Sediment in der Pufferkontrolle höher war als bei der Vesikelkontrolle mit reinen DMPC-Vesikeln. Ein Grund dafür könnte sein, dass immer ein Gleichgewicht zwischen den freien Lipiden und den an Vesikel gebundenen Lipiden vorliegt und die freien Lipide als Detergenz wirken können, wodurch die Löslichkeit des aufgereinigten Proteins erhöht wird. Auch der verwendete Puffer könnte eine Auswirkung auf das Messsystem haben. Zwar wurde die Zusammensetzung des Puffers wegen seiner erfolgreichen Verwendung in einem anderen System gewählt [55] und es konnte gezeigt werden, dass eine unspezifische Bindung, z.B. die des N-terminalen tags, in diesem Puffer nicht auftrat. Trotzdem kann aber eine unspezifische Bindung, ausgelöst durch die Fusion der beiden Proteine, nie ganz ausgeschlossen werden. Wie schon erwähnt könnten auch die Vesikel eine Fehlerquelle darstellen. Die Vesikel wurden zwar mittels Ultraschall hergestellt, um eine Inhomogenität der Vesikelgröße zu gewährleisten und damit fehlerhafte Ergebnisse aufgrund einer möglichen Präferenz des E^{rns}-Ankers für eine bestimmte Größe der Vesikel auszuschließen. Ob dieses Ziel jedoch erreicht wurde, kann nicht überprüft werden. Da jedoch eine unterschiedliche Bindung des E^{rns}-Ankers in den verschiedenen Vesikelsystemen detektiert wurde, kann man davon ausgehen, dass der Unterschied in der Bindung auf der Zusammensetzung der Vesikel beruht.

Ein Problem der verwendeten Methode ist, dass die Trennung des gebundenen vom nichtgebundenen Protein durch einen Ultrazentrifugationsschritt erfolgt. Bei dieser Sedimentierung findet eine teilweise Zerstörung der Vesikel statt, was vor allem bei Bizellen der Fall ist. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil des gebundenen Proteins durch die Zentrifugationskräfte aus den Vesikeln

freigesetzt wird. Da aber in einigen Proben annähernd 100% des Proteins im Sediment vorlagen, muss die Interaktion des Proteins mit diesen Lipiden relativ stark sein, um die sinkende Bindungsenergie in Folge einer Deformation der Vesikel zu egalisieren. Eine Publikation beschrieb den E^{rns}-Anker als Translokationssequenz [83], was eine mögliche Erklärung für die beobachtete starke Wechselwirkung sein kann. Das Protein, oder ein Teil davon, könnte in die Vesikel hineintransportiert werden oder es könnte zumindest zu einer starken und stabilen Ankerwirkung in der Membran kommen. Gegen diese Erklärung spricht, dass eine vollständige Bindung schon nach 30 sec detektiert werden konnte und die Ausbildung einer stabilen Ankerwirkung mehr Zeit benötigen würde.

Wenn die im biologischen System aufgetretenen Effekte ihren Ursprung nicht in der reinen physikalischen Lipidbindung haben, sondern dies nur ein sekundärer Effekt ist, muss die Ursache in einem zellulären Faktor liegen. Dieser Faktor könnte ein Protein darstellen oder eine systembedingte Anomalie. In den Analysen wurde ein isoliertes Protein auf einer reinen Lipidoberfläche betrachtet. Zelluläre Membranen sind jedoch mit großen Mengen von Proteinen besetzt, so dass sich kaum ein Bereich mit reinen Lipiden bilden kann. In Folge dessen muss ein membranbindendes Protein zuerst die Proteine an der Membran verdrängen, um überhaupt Kontakt mit den Lipiden aufnehmen zu können. Wenn dieser Vorgang gestört ist, kann ein Protein nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit an Membranen gebunden werden, da die membrangebundenen Proteine schlechter verdrängt werden können, wodurch scheinbar die Membranbindung gestört wird. Vor allem die Auswirkungen von Alanininsertionen, die eine Drehung der amphipatischen Helix bewirken und im zellulären System einen großen Effekt aufweisen, können durch dieses Phänomen erklärt werden. Durch die Drehung der Helix würden viele mögliche Interaktionsflächen des E^{rns}-Ankers unbrauchbar werden, wodurch Interaktionen verhindert werden könnten. Solche sekundären Effekte könnten die Membranbindung erheblich beeinflussen. Auch der Austausch einzelner Aminosäuren kann eine Interaktion so stören, dass keine Einlagerung in die Membran mehr erfolgen kann. Es wäre wichtig, die genaue Struktur des E^{rns}-Ankers zu analysieren, um diese möglichen Kontaktflächen zu finden und damit die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus den Membranbindungsversuchen und den zellbiologischen Experimenten erklären zu können.

5.2 Globale Struktur des E^{rns}-Ankers

Um einen ersten Eindruck von der Struktur des E^{rns}-Ankers zu erhalten, wurden CD-Messungen durchgeführt, die eine Vorhersage der globalen Struktur des E^{rns}-Ankers erlaubten. Die Messungen fanden dazu in verschiedenen Systemen statt, damit Rückschlüsse auf Faltungsunterschiede oder gegebenenfalls vorliegende Faltungszwischenzustände gezogen werden können. Um festzustellen, ob der E^{rns}-Anker überhaupt fähig ist, eine helikale Faltung anzunehmen, wurden Messungen in 50 % TFE durchgeführt. TFE simuliert eine Membranumgebung, indem es die Proteine voneinander separiert und nur noch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zulässt. Somit wird jedes helikal faltbare Protein in diese Faltung gepresst, auch wenn sie normalerweise im physiologischen Milieu nicht vorkommt. Bei dieser Analyse zeigte der E^{rns}-Anker eine sehr starke Tendenz zu helikaler Faltung. Der helikale Anteil an der Faltung machte dabei über 80 % aus. In Phosphatpuffer pH 6,5 zeigte sich dagegen kaum eine helikale Faltung. Dies war aufgrund der schlechten Löslichkeit des Proteins in diesem Puffer schon vorauszusehen. Bei pH 3 hingegen lag fast die Hälfte des Proteins helikal gefaltet vor. Damit muss die Reduzierung der Nettoladung des E^{rns}-Ankers, z.B. durch Protonierung von Carbonylgruppen, zu einer Stabilisierung der helikalen Faltung führen. In Mizellen aus DPC bzw. SDS und in negativ geladenen Vesikeln oder zwitterionischen Vesikeln zeigte der

E^{rns} -Anker einen sehr großen helikalen Faltungsanteil, der auf dem Niveau lag, das in 50 % TFE erreicht wurde. Somit führt eine negativ geladene Membrenumgebung zu einer Stabilisierung der helikalen Faltung. Die OCD-Messungen zeigten zudem, dass sich die helikale Region parallel zur Membranoberfläche befindet, sie jedoch leicht schräg in dieser verläuft. Über den Winkel der Krümmung der Helix bezüglich der Membranoberfläche konnte leider keine genauere Aussage gemacht werden, aber zumindest war das Vorliegen einer Transmembranhelix ausgeschlossen. Ein paralleler Verlauf wäre für eine amphipatische Helix auch zu erwarten gewesen, da sich der hydrophile Bereich im Lösemittel befinden sollte und der hydrophobe Bereich in der Membran. Jedoch wurde die schräge Komponente der Helix nicht so ausgeprägt erwartet, da das Modell der Interaktion einer amphipatischen Helix mit einer Membran eine relativ starre planare Anordnung fordert.

Viele amphipatische Helices bilden bei verschiedenen Konzentrationen unterschiedliche Strukturen aus. Eines der am besten untersuchten Systeme sind antibiotisch wirkende amphipatische Helices, die sich ab einer bestimmten Konzentration zusammenlagern und dadurch eine Membranpore ausbilden. Im CD-Spektrum zeigt der E^{rns} -Anker keinen Einfluss der Konzentration auf die Faltung, wohingegen im OCD-Spektrum leichte Unterschiede im Eintauchwinkel gemessen werden konnten. Dort erscheinen die konzentrierteren Proben planarer in der Membran zu liegen als die Probe mit der höchsten Verdünnung. Dies könnte mehrere Ursachen haben. E^{rns} kommt in der Zelle als Dimer vor und der E^{rns} -Anker könnte als Interaktionsfläche für die Dimerisierung dienen. Dafür spricht zum einen, dass sich das für die Dimerisierung benötigte Cystein 171 am N-Terminus der E^{rns} -Ankersequenz befindet. Zum anderen zeigt sich, dass es trotzdem zu einer Dimerisierung kommen kann, wenn dieses Cys 171 mutiert und gleichzeitig ein neues Cystein eingeführt wird, welches sich C-terminal des natürlicherweise vorkommenden Cysteins auf Position 209 befindet. Da diese Interaktion von der Anzahl der Moleküle abhängt, könnte eine niedrigere Konzentration des Proteins dazu führen, dass weniger Interaktionen vorkommen. Durch die geringere Anzahl an Dimeren könnte die stabilisierende Wirkung des Dimers nicht mehr so gehäuft auftreten, wodurch die planare Form der Helix destabilisiert wird. Der größere Winkel könnte jedoch auch nur eine Messungenauigkeit darstellen. Dafür spricht, dass die Werte der anderen Verdünnungen relativ konstant sind und nur bei der höchsten Verdünnung Unterschiede gemessen werden konnten. Durch die niedrige Konzentration treten Artefakte bei den Messungen stärker in den Vordergrund und können dadurch ein anderes Ergebnis vortäuschen. Zusätzlich ist im CD-Spektrum kein isodichroistischer Punkt erkennbar. Damit kann ausgeschlossen werden, dass zwei Faltungszustände parallel existieren.

Um Unterschiede in der Faltung des E^{rns} -Ankers zwischen verschiedenen Pestiviren analysieren zu können, wurden überlappende Peptide des E^{rns} -Ankers vom BVDV Stamm CP7 und vom CSFV Stamm Alfort/Tübingen hergestellt und deren Faltung in verschiedenen Systemen untersucht. Wie schon aus der stark homologen Aminosäuresequenz der beiden Proteine vorhersehbar war, zeigten beide Proteine eine zumeist ähnliche Faltung. In 50 % TFE waren alle Peptide helikal gefaltet, wobei jeweils das mittlere Fragment den höchsten helikalen Anteil zeigte. Auch in den anderen Lösemitteln war der helikale Anteil des mittleren Fragmentes vergleichbar hoch. Eine Ausnahme bildete die CD-Messung in Mizellen. In dieser Ausnahme zeigten die vom BVDV Virus abgeleiteten Peptide kaum eine helikale Faltung, wohingegen für die vom CSFV Virus abgeleiteten Peptide bis auf das C-terminale Peptid eine sehr starke helikale Faltung in den Mizellen detektiert werden konnte. Überraschenderweise bildete auch das negativ geladene N-terminale Peptid vom BVDV eine helikale Faltung in einem System aus negativ geladenen SDS-Mizellen aus, ebenso wie das entsprechende CSFV Peptid. Somit kann die Ladung in diesem System nicht für die Faltung verantwortlich sein, da man sonst eine Abstoßung der negativ geladenen Peptide von den ebenfalls negativ geladenen Mizellen erwarten würde. Interessanterweise konnte in einem System mit zwitterionischen Vesikeln keine helikale Faltung der Peptide gemessen werden. Dagegen zeigten in einem System mit negativ geladenen Vesikeln jeweils das mittlere und das carboxyterminale Peptid eine starke helikale Faltung,

wobei das mittlere Fragment den höchsten helikalen Anteil besaß. Somit ist ein großer Unterschied in der Faltung der Peptide zwischen einem Mizellen- und einem Vesikelsystem messbar. Eine der Ursachen könnte in der Struktur der Systeme liegen. Mizellen haben im Gegensatz zu Vesikeln einen kleineren Durchmesser und besitzen keine Doppelmembran. Zusätzlich bilden sich bei Vesikeln, im Gegensatz zu Mizellen, durch die Krümmung der Membran Fehlstellen aus, die durch eine amphipatische Helix besetzt werden können. Bei Mizellen ist die Einlagerung solch einer Helix weitaus schwieriger, weil es keine Fehlstellen in der Lipidschicht gibt. Das Peptid muss erst eine Stelle für die Einlagerung schaffen. Eine andere Ursache könnte sein, dass die Faltung nicht durch die Bindung an die Vesikel oder Mizellen bedingt wird, sondern dass die freien Lipide, die immer im Gleichgewicht mit den als Membranen organisierten Molekülen vorliegen, für eine Faltung sorgen. Jedoch konnte in den Lipidbindungsexperimenten mit E^{rns} -Ankerfragmenten, die in ähnlichen Bereichen des E^{rns} -Ankers wie die Peptide liegen, eine spezifische Bindung an negativ geladene Vesikel gemessen werden, so dass die Faltung der Peptide in diesem System mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Bindung verursacht wird. Es treten weitere Unterschiede zu Tage, wenn man die Ergebnisse, die für die BVDV Peptide erhalten wurden, mit den Ergebnissen, die für den gesamten E^{rns} -Anker erhalten wurden, vergleicht. Zum einen konnte beim gesamten E^{rns} -Anker eine starke helikale Faltung auch in Mizellen gemessen werden und zum anderen zeigte sich für dieses Konstrukt eine helikale Faltung in beiden getesteten Vesikelsystemen, wohingegen sich keines der Peptide in den zwitterionischen Vesikeln helikal faltete. Somit muss das Gesamtsystem eine Faltungseigenschaft besitzen, die in den Teilfragmenten nicht auftritt. Dies könnte ein Hinweis auf eine Interaktion der verschiedenen Bereiche des E^{rns} -Ankers sein, die sich daraufhin gegenseitig in ihrer Faltung beeinflussen.

Um die mithilfe der CD-Analyse zur globalen Faltung des E^{rns} -Ankers erhaltenen Daten mit den NMR-Daten vergleichen zu können, wurden die Versuche im selben Bizellensystem durchgeführt. Zusätzlich wurde dabei der Unterschied in der Faltung der Proteine im Kontakt mit zwitterionischen und negativ geladenen Bizellen untersucht. Bizellen bestehen aus einer planaren Membranoberfläche und entsprechen damit sehr genau dem zellulären Membransystem. In beiden Bizellensystemen zeigte ein N- und C-terminal leicht verkürzter E^{rns} -Anker einen großen Anteil an helikaler Faltung. Im Gegensatz dazu wies das C-terminale E^{rns} -Ankerfragment nur in zwitterionischen Bizellen eine helikale Faltung auf, während im negativ geladenen Bizellensystem der helikale Anteil deutlich reduziert war. Wurde das C-terminale Fragment zusätzlich um 3 Aminosäuren am C-Terminus trunziert, sank der helikale Anteil an der Faltung in beiden Bizellensystemen weiter ab. Da das C-terminale Fragment eine höhere positive Ladung trägt als das mittlere Fragment ist hier, ähnlich wie bei den Lipidbindungsversuchen, die Ladung des E^{rns} -Ankers anscheinend nicht ausschlaggebend für die Faltung in dem negativ geladenen Bizellensystem. Somit zeichnet sich auch hier ab, dass der mittlere Bereich des E^{rns} -Ankers den Kernbereich der helikalen Faltung darstellt, analog zu den getesteten Peptiden. Auch bei N- und C-terminalen Verlängerungen des mittleren E^{rns} -Ankerbereiches blieb die helikale Faltung in beiden Bizellensystemen erhalten, der helikale Faltungsanteil verstärkte sich zudem leicht. Um die Lage der Helix in der Membran zu analysieren, wurden auch diese Proteine mittels OCD-Spektroskopie analysiert. Dabei zeigten alle drei Fragmente eine schräge Lage in der Membran, wobei das mittlere Fragment am planarsten erschien. Auffällig war, dass die Proteinfragmente im Vergleich mit dem gesamten E^{rns} -Anker eine deutlich schrägere Ausrichtung zur Membran aufwiesen, so dass durch die Verkürzungen wahrscheinlich Bereiche entfernt wurden oder Interaktionen nicht mehr stattfinden konnten, die eine planar Form der Helix stabilisieren. Dies könnte auch für eine nicht mehr mögliche bzw. abgeschwächte Interaktion der Proteine sprechen, wobei in diesem Fall eine Deletion des N-terminalen Bereiches einen größeren Einfluss hätte als kleine N- und C-terminale Deletionen. Dieser Effekt könnten jedoch auch durch die Fehleranfälligkeit der OCD-Messung hervorgerufen werden, wodurch die Lage der Fragmente bezogen zur Membranoberfläche schräger erscheint.

Ein interessanter struktureller Bereich des E^{rns}-Ankers ist die Region am C-Terminus, welche die Signalpeptidasespaltstelle enthält. Um von der Signalpeptidase überhaupt gespalten werden zu können, muss dieser Bereich als Substrat akzeptiert werden. Dies sollte nur mit einer speziellen Faltung möglich sein, da bisher beschriebene Substrate für dieses Enzym alle eine Transmembranhelix stromaufwärts von der Spaltstelle aufweisen. Dass die Faltung dieses Bereiches des E^{rns}/E1-Proteins wichtig ist, deuten Vergleiche verschiedener Pestivirussequenzen an, aus denen ersichtlich wird, dass dieser Bereich besonders konserviert ist und somit wenige Freiheitsgrade besitzt. Um die globale Struktur dieses Bereiches zu untersuchen, wurde ein C-terminales Fragment des E^{rns}-Ankers mit den ersten 10 Aminosäuren des im viralen Polyprotein folgenden Glykoproteins E1 verlängert. Die CD-Analysen ergaben dabei, dass dieses Protein in 50 % TFE und in den Mizellensystemen helikal gefaltet war. Interessanterweise zeigte sich in Gegenwart von zwitterionischen Vesikeln oder Bizellen ein sehr viel kleinerer Anteil helikaler Faltung als in den Mizellen, wohingegen bei Anwesenheit von negativ geladenen Vesikeln eine sehr starke helikale Faltung detektiert werden konnte. Somit müssten für die Ausbildung der Signalpeptidasespaltstelle in einem Vesikelsystem negativ geladene Vesikel benötigt werden. Da die Signalpeptidase normalerweise nur nach Transmembranhelices schneidet, könnte eine Umfaltung des C-Terminus des E^{rns}-Ankers zu einer kleinen transmembranartigen Helix führen, die dann prozessiert werden könnte. Sollte dies der Fall sein, würde man im OCD-Spektrum eine Zunahme des Verhältnisses der Werte für das zweite und erste Minimum erwarten. Doch die OCD-Analysen zeigten, dass dieser Bereich in Kontakt mit der Membran ebenfalls eine planare Konformation annimmt. Damit ist es nicht wahrscheinlich, dass sich durch die zusätzlichen Aminosäuren ein transmembranartig ausgerichteter Helixabschnitt bildet. Somit muss der C-Terminus des E^{rns}-Ankers eine andere Struktur aufweisen, welche die Spaltstelle optimal für die Signalpeptidasespaltung positioniert, um die Spaltung zu gewährleisten.

Zusammengefasst ergibt sich aus den CD-Analysen, dass der E^{rns}-Anker in einem großen Bereich helikal gefaltet ist, wobei der mittlere Bereich des Proteins die größte Tendenz zur helikalen Faltung zeigte. Im Vergleich zu den Lipidbindungsexperimenten mit dem gesamten E^{rns}-Anker konnte bei Verwendung der Peptide eine helikale Faltung auch in Systemen gemessen werden, in denen der E^{rns}-Anker keine Bindung zeigte. Somit ist klargelegt, dass die Faltung nicht unbedingt einhergeht mit einer Bindung des E^{rns}-Ankers an die Lipide. Ein Grund dafür könnte sein, dass die freien Lipide auch als Detergenz wirken und somit eine Faltung des E^{rns}-Ankers stabilisieren könnten. Zu beachten ist auch der hohe Anteil an helikaler Faltung. Dadurch ergibt sich, dass annähernd der gesamte E^{rns}-Anker als Helix vorliegen muss und nur wenige Aminosäuren am N- und C-Terminus ungefaltet vorliegen.

Als größte Fehlerquelle bei der Berechnung der Anteile der Sekundärstrukturelemente stellte sich die Konzentrationsbestimmung heraus, da ihr Wert mit hoher Gewichtung in die Berechnung eingeht. In einigen Systemen war z.B. durch Streuung bei den Bizellen eine spektroskopische Konzentrationsbestimmung nicht möglich und es musste deswegen auf den naturgemäß stärker fehlerbehafteten Einwaagwert zurückgegriffen werden. Da dieser Wert erfahrungsgemäß stets zu hoch ausfällt, wurde immer eine eher zu hohe Konzentration angenommen. Somit kann bei diesen Messungen von einem höheren helikalen Anteil ausgegangen werden als durch die Vorhersagen angegeben.

Für die Sekundärstrukturvorhersage wurden drei verschiedene Vorhersagealgorithmen verwendet, die mit unterschiedlichen mathematischen Methoden arbeiten. Dabei zeigte sich, dass die Vorhersagen meist einen ähnlichen helikalen Anteil ergaben, selbst wenn ihre internen Kontrollen sie als schlechte Vorhersage werteten und sie deswegen nicht für die Auswertung benutzt werden konnten.

Ein Problem bei der OCD-Analyse ist, dass man im Gegensatz zur CD-Messung nicht in einem natürlichen wässrigen System arbeiten kann, sondern dass das Protein in planaren Lipidlagen

angeordnet ist, die nur mit Wasser befeuchtet sind. Dadurch könnte sich natürlich eine andere Faltung ausbilden, da der Wasserkontakt nicht so gegeben ist wie in einem wässrigen System. Jedoch zeigten die gemessenen Proteine weiter eine starke helikale Faltung und auch das Minimum bei ca. 220 nm war ähnlich ausgeprägt wie bei den CD-Messungen, weswegen starke Faltungsunterschiede unwahrscheinlich sind. Bei den OCD-Analysen stellte sich heraus, dass sich der helikale Anteil des E^{rns}-Ankers leicht schräg zur Membranoberfläche ausrichtet. Somit kann ausgeschlossen werden, dass der E^{rns}-Anker als Transmembranhelix vorliegt. Daraus ergibt sich die Annahme, dass sich der E^{rns}-Anker zumindest größtenteils als amphipatische Helix faltet und diese Helix sich dann planar zur Membran, jedoch leicht schräg zu dieser, orientiert. Interessanterweise zeigte der gesamte E^{rns}-Anker eine weniger schräge Orientierung zur Membran als die anderen untersuchten Fragmente, so dass Unterschiede in der Lage der helikalen Bereiche zwischen den untersuchten Fragmenten und dem gesamten E^{rns}-Anker existieren könnten.

5.3 Lokale Struktur des E^{rns}-Ankers

Zur genaueren Bestimmung der Struktur des E^{rns}-Ankers erfolgte eine NMR-Analyse an aufgereinigten und mit ¹⁵N bzw. ¹³C markierten Proteinen. Als Messsystem wurden Bizellen aus DHPC/DMPC gewählt, da zum einen schon mittels CD-Spektroskopie eine helikale Faltung des E^{rns}-Ankers in diesem System detektiert werden konnte und zum anderen die Bizellen im NMR-Gerät lange Zeit stabil sind, was eine Voraussetzung für die Messung ist [72]. Zudem lassen sich die Bizellen einfach herstellen, was die Probenvorbereitung erleichtert und reproduzierbar macht. Um die Interaktionsmöglichkeiten der Atome des aufgereinigten Proteins mit den Wasserstoffatomen der Lipide zu reduzieren, wurden Lipide mit deuterierten Kopfgruppen verwendet. Interessanterweise änderte sich die Intensität der Spektren nicht durch die Zugabe von DMPG, weswegen darauf verzichtet wurde. Für die Strukturbestimmung wurden Fragmente des E^{rns}-Ankers untersucht, da die ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren bei Analysen des gesamten E^{rns}-Ankers ein zu kompliziertes Bild lieferten und die für die Strukturbestimmung benötigten 3D-Pulssequenzen keine Daten lieferten. Dies könnte zum einen an der schnellen Bewegung des E^{rns}-Ankers und der damit verbundenen Unschärfe liegen. Dies ist jedoch nicht wahrscheinlich, da im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum Peaks zu sehen waren und auch in der CD-Analyse eine offensichtlich stabile Faltung des Proteins festgestellt werden konnte. Zum anderen könnte es aber auch an den vielen Kontakten liegen, welche die Atome des Proteins mit anderen Atomen des Proteins bzw. Atomen der Lipide haben, wodurch das NMR-Signal sehr schnell abnimmt und nicht gemessen werden kann bzw. sich die Signale gegenseitig aufheben. Um dies zu verhindern, wurden volldeuterierte Lipide verwendet, die jedoch zu keiner Verbesserung führten. Durch eine Erhöhung der Messtemperatur konnten einige Signale erhalten werden. Grund dafür ist die schnellere Bewegung des Moleküls bei einer höheren Temperatur, wodurch die Korrelationszeit zwischen den Atomen abnimmt und das NMR-Signal somit langsamer abfällt und messbar wird. Jedoch kann bei diesen Temperaturen nicht gewährleistet werden, dass die Bizellen ihre Struktur behalten. Bei den E^{rns}-Ankerfragmenten gab es diese Probleme nicht, weswegen eine genauere Analyse nur bei diesen Fragmenten möglich war. Wir konzentrierten unsere Untersuchungen dabei auf den C-terminalen Bereich des E^{rns}-Ankers, da wir uns von diesem Bereich interessantere Effekte erhofften. Großes Interesse hatten wir dabei an der quantitativen Messung der Wasser-Amid-Protonenaustauschrate. Durch diese Messungen, die wir mittels der CLEANEX Pulssequenz durchführten, kann relativ einfach die Wasserzugänglichkeit der Amidbindung analysiert werden. Somit können wir unterscheiden, ob sich eine bestimmte Amidbindung des Proteins in der Membran, in der Lösung oder in einem Lipid/Wasser-Zwischenbereich befindet. Bei einer amphipatischen Helix, die planar auf der Membran liegt, würde man erwarten, dass die NH-Bindungen der hydrophoben Aminosäuren keinen

Wasserkontakt zeigen, wohingegen bei den NH-Bindungen der hydrophilen Aminosäuren ein starker Wasserkontakt zu messen sein sollte. Die Grenze der Membranbindung würde durch Amidbindungen angezeigt, die einen leicht reduzierten Wasserkontakt zeigen.

Die Daten der CLEANEX Experimente und der Sekundärstrukturbestimmung von E^{ms}-1 sind in Abbildung 77 zusammengefasst dargestellt. Dabei stehen leicht graue Aminosäuren für Reste, die in der NMR keine Signale lieferten und somit nicht analysiert werden konnten. Schwarz dargestellte Aminosäuren zeigten einen leichten Wasserkontakt, wohingegen fett markierte Aminosäuren einen starken Wasserkontakt zeigten. Die Bezeichnungen von Aminosäuren ohne erkennbaren Wasserkontakt sind in der Abbildung unterstrichen. Ein schwarzer Kasten repräsentiert den Bereich, in dem eine helikale Faltung gemessen werden konnte und schwarze Verbindungsstriche symbolisieren einen intramolekularen Kontakt zwischen den mit dem Strich verbundenen Aminosäuren.

Man erkennt deutlich, dass 15 helikal gefaltete Aminosäuren keinen Kontakt mit Wasser zeigten und sich somit in der Membran befinden müssen. Infolgedessen nimmt dieser Bereich des E^{ms}-Ankers trotz seines amphipatischen Charakters und dem daraus resultierenden amphipatischen Moment keine Position an der Lipid/Wassergrenze ein, sondern stellt eine Membranelix dar. Nur die Reste an den Enden des helikalen Bereiches zeigen einen starken Wasserkontakt.



Abbildung 77: Zusammenfassung der NMR Ergebnisse für das C-terminale Fragment des E^{ms}-Ankers

Schematische Darstellung der für das E^{ms}-1 gemessenen ¹⁵N-NOESY- und CLEANEX-Daten. Schwarz dargestellte Aminosäuren ohne Unterstrich stehen für Aminosäuren mit einem leichten Wasserkontakt, fett geschriebene Bezeichnungen deuten einen starken Wasserkontakt an und unterstrichene Aminosäuren stehen für keinen Wasserkontakt. Die leicht grauen Aminosäuren konnten im NMR-Spektrum aufgrund ihrer starken Bewegung nicht detektiert werden, weshalb über sie keine Aussage getroffen werden kann. Der schwarze Kasten zeigt die Aminosäuren an, bei denen eine helikale Faltung gemessen werden konnte. Die schwarzen Striche symbolisieren intramolekulare NOESY-Kontakte.

Zusätzlich zum mittleren Bereich bildet auch der C-Terminus eine geordnete Struktur aus. Zum einen gibt es abwechselnd Aminosäuren ohne und mit leichtem Wasserkontakt. Somit kann sich eine Struktur ausbilden, die sich stabil an der Wasser/Membrangrenze befindet. Zum anderen konnten im ¹⁵N-NOESY intramolekulare Kontakte der NH-Bindungen gemessen werden, die entweder für eine helikale Faltung oder eine Rückfaltung des C-Terminus in einer Art Haarnadelstruktur sprechen. Einer der gemessenen Kontakte war der räumliche Kontakt zwischen der NH-Gruppe im Tyr 226 und der NH-Gruppe von Trp 222. Interessanterweise zeigen die Amidbindungen beider Aminosäuren einen unterschiedlichen Wasserkontakt, weshalb eine Wasser/Lipid-Grenzfläche zwischen den beiden Aminosäuren existieren muss. Zwischen den NH-Gruppen von Thr 221 und Ala 225 ist auch ein räumlicher Kontakt messbar, wobei beide Aminosäuren einen schwachen Wasserkontakt zeigten. Durch ¹³C-NOESY-Daten konnten weitere Informationen über die Struktur des C-Terminus erhalten werden. Nach diesen Experimenten ist die Rückfaltungshypothese am wahrscheinlichsten.

Wie vorab dargestellt, ergab die Messung des C-terminalen Bereiches von E^{ms}-1 ein messbares NMR-Signal und lieferte deutliche CLEANEX-Daten. Beides spricht für eine stabile Struktur, da die Messsignale sonst nicht detektiert werden könnten. Zusätzlich konnten intramolekulare Kontakte

zwischen den Protonen der C-terminal liegenden Aminosäuren bei E^{rns-1} detektiert werden, was ebenso für eine komplexe und stabile Struktur spricht. Trotzdem ergaben die Messungen zur Moleküldynamik, dass dieser Bereich sehr flexibel ist (siehe Abbildung 76). Die letztgenannten Resultate lassen sich mit den Daten zum Wasserkontakt nur dann in Einklang bringen, wenn die Struktur des E^{rns-1} C-Terminus in sich selbst flexibel ist, da im anderen Fall die Aminosäuren zwischen einer Lage in und außerhalb der Membran wechseln müssten und die gemessene Protonenaustauschrate dementsprechend größer ausfallen würde.

Durch diese teilweise von Wasser abgeschottete Struktur des C-Terminus kann nun der membraninsetierte Anteil des E^{rns} -Ankers in der Membran stabilisiert werden. Ohne die letzten 6 Aminosäuren (vgl. Konstrukt $E^{rns-1-2}$) sank der membrangebundene Anteil, so dass ein Teil der helikalen Region in Kontakt mit Wasser kam. Außerdem zeigten die zwei letzten C-terminalen Aminosäuren bei der Verkürzung kein NMR-Signal mehr, was für eine Auflösung der C-terminalen Struktur durch diese Verkürzung spricht. Diese Deletion hatte aber nicht nur einen Einfluss auf den C-Terminus, sondern zeigte auch einen Einfluss auf den vorderen Teil der membraninsetierten Aminosäuren, da dort zwei Aminosäuren (Thr 201/202) nun einen Kontakt zu Wasser erhielten. Bei N-terminalen Verlängerungen von E^{rns-1} war dieser Einfluss ebenso zu sehen, wobei bei einer Verlängerung um 10 Aminosäuren (E^{rns-4}) ein größerer Effekt detektiert werden konnte, als bei einer Verlängerung um 18 Aminosäuren (E^{rns-5}). Somit könnte die Verlängerung um 10 Aminosäuren einen leicht geänderten Faltungszustand stabilisieren, der während der Prozessierung in der Zelle oder der Insertion in die Membran vielleicht als Zwischenzustand vorliegen könnte. Beide Verlängerungen zeigten zusätzlich einen deutlichen Effekt auf den C-Terminus, da dieser dann plötzlich starke Wasserkontakte zeigte (siehe Abbildung 73).

Mit diesen Daten aus den NMR Experimenten konnten erste deutliche Hinweise auf die Struktur des E^{rns} -Membranankers und die Lage der einzelnen Aminosäuren in der Membran erlangt werden, aus denen sich ein vorläufiges Faltungsmodell für den E^{rns} -Anker ableiten lässt.

5.4 Faltungsmodell des E^{rns} -Ankers

Durch die Verknüpfung der Ergebnisse der CD-Analysen, der OCD-Spektroskopie und der NMR-Messungen waren wir in der Lage, ein Modell der Struktur des C-terminalen Bereiches des E^{rns} -Ankers anzufertigen (Abbildung 78). Dieses Modell reflektiert die Erkenntnisse der CD-Analyse, weil es einen großen Anteil an helikal gefalteten Aminosäuren beinhaltet. Zudem liegt dieser helikale Bereich leicht schräg in der Membran, was mit den OCD Daten übereinstimmt. Anhand der in der NMR gefundenen Wasser- und ^{15}N -NOESY-Kontakte wurde das Protein in der Membran positioniert, wobei für den C-Terminus das wahrscheinlichste Szenario, eine Rückfaltung des C-Terminus und keine helikale Faltung, angenommen wurde. Der C-Terminus muss nach der Signalpeptidasespaltung eine stabile Struktur annehmen, da die C-terminalen Reste sonst zum einen im NMR nicht hätten detektiert werden können und zum anderen nicht diesen deutlichen Unterschied in Bezug auf den Wasserkontakt der verschiedenen Aminosäuren hätten zeigen dürfen. Diese Faltung, die durch einen Wechsel von Resten mit Wasserkontakt und Aminosäuren ohne solche Kontakte gekennzeichnet ist, könnte vielleicht als eine Art Stabilisator dienen, der den stromaufwärts gelegenen Bereich in die Membran drückt bzw. die Eintauchtiefe des helikalen Bereiches festlegt. Bei Mutanten, die um 3 Aminosäuren verkürzt wurden (E^{rns1-1}), findet man deutlich weniger vor Wasserkontakt geschützte Amidbindungen. Trotzdem weist das verkürzte Peptid immer noch eine helikale Faltung auf. Dies spricht für eine Änderung in der Eintauchtiefe der helikalen Region in die Membran und nicht für eine Änderung der Sekundärstruktur dieses Bereiches. Somit könnten Effekte, die im biologischen System gemessen wurden, mit einer Änderung in der Eintauchtiefe des C-terminalen Bereiches erklärt

werden, wodurch bestimmte Kontakte des E^{ms} -Ankers verhindert würden. Dass dieser Bereich keine Transmembranhelix ausbildet, konnte eindeutig durch die OCD-Daten belegt werden. Auch wenn die Signalpeptidasespaltstelle durch eine Verlängerung des E^{ms} -Ankers um 10 Aminosäuren des Glykoproteins E1 simuliert wurde, konnten keine Hinweise auf die Ausbildung einer Transmembranhelix gefunden werden. Nichtsdestotrotz wird dieser Bereich als Substrat akzeptiert und muss somit eine Faltung ausbilden, die diesen Bereich als Substrat für das Enzym kennzeichnet. Leider konnten noch nicht genügend Daten gesammelt werden, um eine Strukturvorhersage für diesen Bereich auch nur in Erwägung zu ziehen. Es kann nur mit Sicherheit gesagt werden, dass der exprimierte Bereich (Erns-1+10AS) eine helikale Faltung aufweist, wobei diese helikale Region ähnlich planar zur Membranoberfläche vorliegt wie der C-terminale Abschnitt des E^{ms} -Ankers. Vorstellbar ist, dass dieser Bereich analog zu der helikalen Region im C-Terminus leicht schräg in der Membran verläuft. Stabilisiert durch eine speziellen Aminosäurekonstellation kann sich an der Wasser/Lipidgrenzfläche ein minimaler Bereich so falten, dass sich die Spaltstelle senkrecht zur Membranoberfläche befindet, so wie dies für eine Signalpeptidasespaltstelle nach einer Transmembranhelix der Fall wäre. Dadurch würde die Sequenz die benötigte Konformation an der Wasser/Membrangrenzfläche einnehmen, die sie als Substrat für die Signalpeptidase ausweisen könnte.

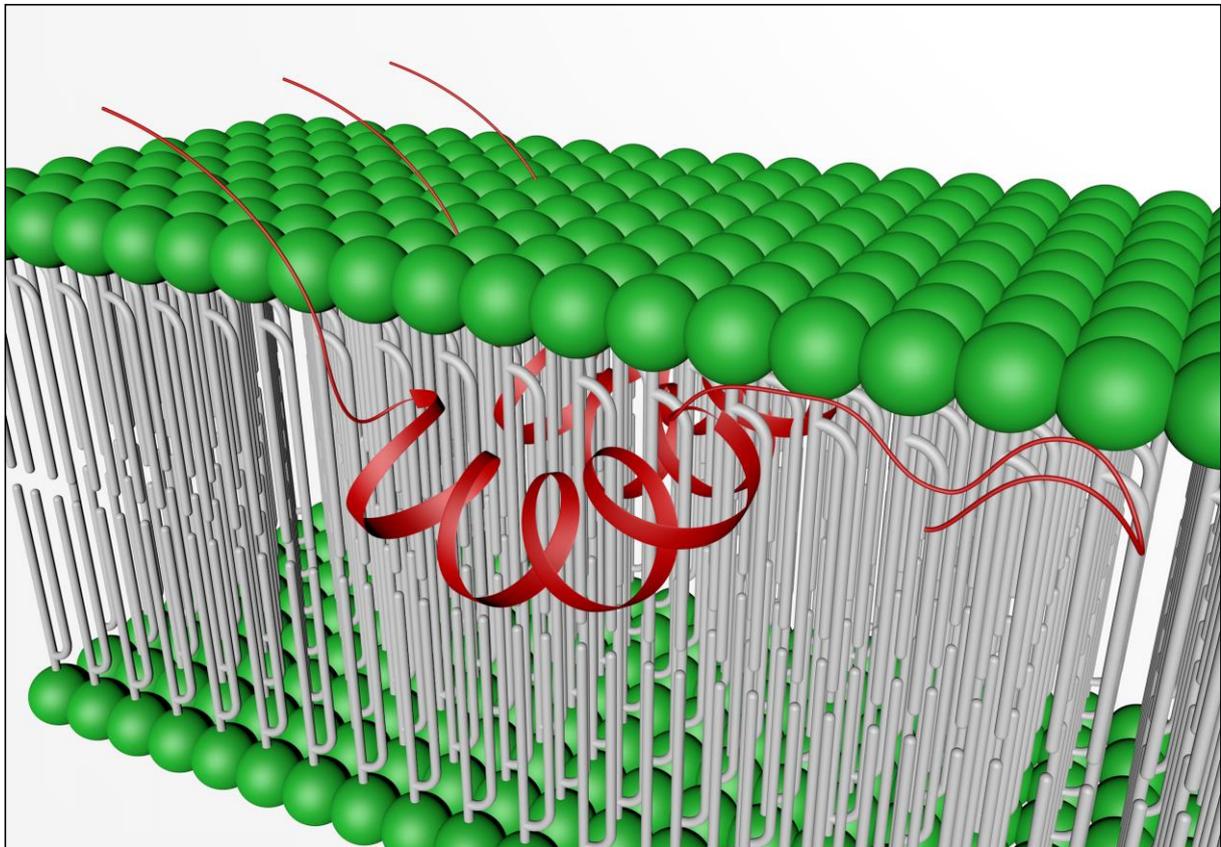


Abbildung 78: 3D-Faltungsmodell des E^{ms} C-Terminus

3D-Modell der voraussichtlichen Faltung des C-Terminus des E^{ms} -Ankers. Die Kugeln stellen die Lipidkopfgruppen (Cholin) und die Striche den aliphatischen Rest der Lipide dar. Das Proteintrückgrad ist schematisch als rotes Band gezeigt.

Die Stabilität der Membraninsertion der Helix am C-Terminus des E^{ms} -Ankers wird auch durch die Tatsache deutlich, dass zum einen selbst die Seitengruppe von Gln 207 keinen Wasserkontakt

besitzt, was sehr ungewöhnlich ist. Zum andern machen die Lipidbindungsversuche deutlich, dass die positive Ladung des C-Terminus nicht wichtig für die Lipidbindung ist. Dadurch zeigt sich, dass die Lipidinteraktion und das Eintauchen der Helix in die Membran nicht durch Wechselwirkungen der Ladungen mit den Lipidkopfgruppen, sondern durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert werden muss. Theoretische Modelrechnungen zeigten, dass die freie Energie einer amphipatischen Helix in der Membran größer sein kann als an der Wasser/Lipidgrenze, da bei einer vollständigen Einlagerung im Gegensatz zu einer Insertion an der Wasser/Lipidgrenze die Lipide nicht umorientiert werden müssen. Für eine solche Änderung würde viel Energie benötigt [84]. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass sich dieser Abschnitt des E^{rns}-Ankers vollständig in der Membran und nicht im Bereich der Interphase befindet.

Das Modell wird zusätzlich durch die Lipidbindungsexperimente gestützt, da eine Alanininsertion in diesem helikalen Bereich zu keiner Änderung der Lipidbindung führte. Somit führt eine Zerstörung des amphipatischen Charakters in diesem Bereich zu keiner Änderung der Bindungseigenschaft. Dies ist einleuchtend, da sich nach dem Modell alle Aminosäuren in der Membran befinden und somit der amphipatische Charakter dieses Bereiches nicht für eine Bindung benötigt wird. Zu dem eben Genannten kommt hinzu, dass ein Sequenzmotiv im E^{rns} C-Terminus, für das eine Rolle bei der Bindung des Proteins an die Zellmembran beschrieben ist [85, 78], sich nach dem Modell direkt in der Membran befindet. Dies unterstützt das Modell zusätzlich. Die Bedeutung des amphipatischen Charakters dieses Bereiches, die in den zellbiologischen Analysen deutlich wurde, muss somit in der biologischen Funktion begründet liegen. Beispielweise sind durch die Zerstörung des amphipatischen Charakters Änderungen in Proteininteraktionsflächen vorstellbar, die wiederum Änderungen in der Dimerisierung, der Signalpeptidaserekrutierung oder der Interaktionen mit Proteinen, die für die Retention/Sekretion benötigt werden, zur Folge haben können.

Da nun ein Modell der Struktur des C-terminalen Bereiches des E^{rns}-Ankers vorliegt, ergibt sich anschließend die Frage, ob darauf aufbauend auf die Faltung des gesamten E^{rns}-Ankers geschlossen werden kann. Die Frage kann im Moment nicht abschließend beantwortet werden, da hierzu noch zu wenige Daten vorliegen, um ein gesichertes Modell des gesamten E^{rns}-Ankers entwerfen zu können. Dessen ungeachtet konnten jedoch erste Anhaltspunkte für die Struktur des gesamten E^{rns}-Ankers ermittelt werden. In Abbildung 79 ist das hypothetische 3D-Strukturmodell gezeigt, das nach den vorläufigen Daten angefertigt wurde.

Die CD-Messungen zeigten, dass sich auch der N-terminale Bereich des E^{rns}-Ankers überwiegend helikal faltet, die Faltung jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie im C-terminalen Bereich. Die CD-Messungen des gesamten E^{rns}-Ankers zeigten einen großen helikalen Bereich, was auch für eine helikale Faltung des vorderen Bereiches des E^{rns}-Ankers spricht. Bei der Auswertung der Daten zum Wasserkontakt der Aminosäuren im vorderen Bereich (E^{rns} 2-1) erkennt man, dass nur wenige Amidgruppen vor Wasser geschützt sind. Auch die Wasserkontaktaten der in aminoterminaler Richtung verlängerten C-terminalen Fragmente (Erns-4, Erns-5) machten deutlich, dass in diesem Bereich nur einige Amidgruppen keinen Wasserkontakt besitzen. Diese Daten aus den CD- und den NMR-Messungen sprechen somit für eine Faltung des N-terminalen Bereiches als amphipatische Helix. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass diese Helix aufgrund der vielen Wasserkontakte im Bereich der Wasser/Lipidgrenzfläche planar ausgerichtet ist, wie man es für eine amphipatische Helix auch erwarten würde. Dieses Modell wird auch durch die Lipidbindungsmessungen unterstützt, da dieser Bereich immer noch in der Lage ist, negativ geladene Lipide zu binden, jedoch eine Alanininsertion, die den amphipatischen Charakter dieses Bereiches zerstört, die Lipidbindung vollständig verhindert. Die Struktur des C-terminalen Bereiches wird sich durch den N-terminalen Bereich allerdings nicht stark ändern, da die identifizierten Aminosäuren in allen Spektren (Erns-1, Erns-4, Erns-5) eine sehr ähnliche Verschiebung zeigten und somit die Faltung dieses Bereiches nicht sehr unterschiedlich sein kann. Dennoch konnten Einflüsse auf die Wasserkontakte der Aminosäuren

von C-terminalen auf N-terminale Bereiche und umgekehrt detektiert werden. Somit ließ sich aus diesen Analysen der N- und C-terminalen Sequenzen des E^{rns} -Ankers ein klares Bild der möglichen Struktur dieses Bereiches ableiten. Nur der mittlere Bereich des E^{rns} -Ankers zeigte bei den Analysen ein ungewöhnliches Bild. Nach den CD-Daten zeigte dieser Bereich die höchste Tendenz für eine helikale Faltung und sollte den Kernbereich der membranbindenden Region darstellen. Jedoch konnte keine Lipidbindung gemessen werden und auch das NMR-Spektrum zeigte eine völlig andere Faltung, die nicht in Einklang mit der Faltung des N- oder dem C-terminalen Bereiches gebracht werden konnte. Bei einer Verlängerung des mittleren Fragmentes um einige Aminosäuren konnte allerdings wiederum ein sehr großer Anteil an helikaler Faltung gemessen werden, der zudem eine sehr starke Lipidbindung zeigte. Die OCD-Daten zeigten zusätzlich, dass dieses verlängerte Protein nun wieder leicht schräg in der Membran verläuft. Somit könnte dieser mittlere Bereich eine andere Faltung aufweisen, wenn er in isolierter Form vorliegt. Diese alternative Faltung könnte auch im natürlichen Kontext temporär auftreten und lediglich durch die Fragmentierung des E^{rns} -Ankers stabilisiert werden. Als Faltung wäre theoretisch eine Haarnadelstruktur vorstellbar, wobei die Struktur durch komplementäre Ladungen stabilisiert werden könnte. Dieser „Charge Zipper“ könnte nun als eine Art Zwischenstufe während der Prozessierung von E^{rns} gebildet werden und z.B. für die korrekte Insertion des E^{rns} -Ankers in die Membran benötigt werden. Um dies jedoch aufzuklären, sind weitere Versuche u.a. in einem zellbiologischen System notwendig. So ließe sich überprüfen, ob Änderungen in dieser Sequenz ggf. einen Phänotyp ausbilden.

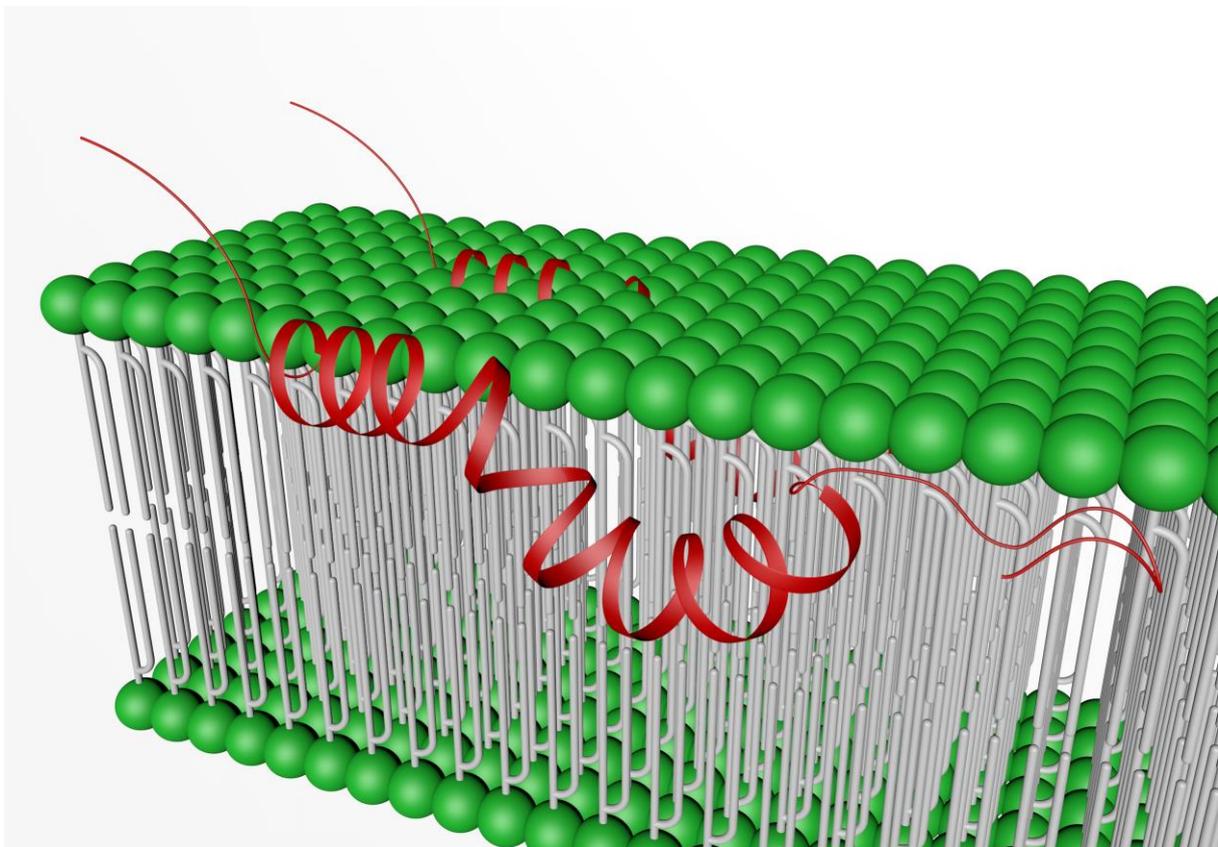


Abbildung 79: Hypothetisches 3D-Strukturmodell des E^{rns} -Ankers

Hypothetisches 3D-Strukturmodell des E^{rns} -Ankers auf der Basis der bislang generierten Daten. Die grünen Kugeln stellen die Lipidkopfguppen (Cholin) und die Striche den aliphatischen Rest der Lipide dar. Das Proteinrückgrad ist schematisch als rotes Band gezeigt.

Nichtsdestotrotz ergibt sich für den gesamten E^{rns} -Anker, dass er eine sehr lange amphipatische Helix ausbilden wird, wobei sich der hintere Teil der Helix in der Membran befindet und der vordere Bereich planar aufliegt. Der vordere Bereich könnte dabei als Interface für die Dimerisierung dienen, da ein in dieser Region aufgetretener Austausch gegen Cystein eine Dimerisierung von E^{rns} in Abwesenheit des eigentlich für die Dimerisierung verantwortlichen weiter stromaufwärts gelegenen Cysteins 171 ermöglichte. Der C-Terminus wird wahrscheinlich eine stabile haarnadelförmige Struktur ausbilden, die als Stabilisierung für den membraninsetierten Helixanteil dienen wird. Die Auswirkung dieser Struktur am äußeren C-Terminus wird wahrscheinlich nicht nur auf die C-terminale Region begrenzt bleiben. Die Ergebnisse der Lipidinteraktionsstudien des E^{rns} -Ankers sprechen zudem für ein sehr belastbares System, da die Versuche zeigten, dass man starke Störungen in den E^{rns} -Anker einführen muss, um die Lipidbindung überhaupt zu verhindern.

5.5 Vergleich mit anderen amphipatischen Helices

In der Literatur sind viele verschiedene Proteine beschrieben, die eine amphipatische Helix besitzen und bei denen diese unerlässlich für die Funktion des Proteins ist. Die Proteine haben dabei unterschiedliche Aufgaben.

Ein Beispiel dafür sind Proteine, die eine BAR (Bib/Amphiphysin/Rvs)-Domäne enthalten [86, 87]. Diese Domäne sorgt für eine Krümmung von zellulären Membranen, wodurch sie z.B. im ER für die Bildung von Vesikeln mit verantwortlich sind. Die Proteine werden dabei in verschiedene Klassen eingeteilt, da einige Proteine eine konkave Membrankrümmung induzieren [BAR und F-BAR (Fes/CIP4 homology BAR)] und andere wiederum eine konvexe Membranform erzeugen [I-BAR (Inverse BAR)]. Zusätzlich können sie auch als Sensoren für die Membrankrümmung eingesetzt werden [79]. Die amphipatische Helix liegt bei diesen Proteinen N-terminal vor und ist hauptsächlich für die Membranbindung der Proteine verantwortlich. Die Krümmung der Membran wird hier durch die „Bananenform“ der BAR Domäne induziert. Durch Oligomerisierung der Proteine wird so nach und nach die Krümmung der Proteinstruktur auf die Membran übertragen, so dass sich die Membran ebenfalls krümmt.

Ein weiteres Beispiel für eine Klasse von Proteinen, die eine amphipatische Helix besitzen und eine Krümmung der Membran erzeugen, sind Proteine mit einer ENTH (epsin N-terminal homology)-Domäne wie Epsin1 [87]. Die N-terminal gelegene amphipatische Helix von Epsin1 bindet spezifisch an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und führt dadurch zu einer Bindung des Proteins an die zytosolische Seite der Plasmamembran. Bei diesem Protein wird die Krümmung der Membran nicht durch die Insertion der amphipatischen Helix eingeleitet, sondern durch die „Ballung“ der Proteine an der Membran, wodurch die Proteine durch ihre Größe und molekulare Bewegung eine Krümmung der Membranoberfläche verursachen [88]. Die amphipatische Helix ist bei dieser Klasse von Proteinen somit allein für die Membranbindung verantwortlich und nicht aktiv an der Krümmung der Membran beteiligt.

Eine weitere Funktion von amphipatischen Helices abseits der Membranbindung ist die Ausbildung einer Protein-Protein-Interaktion. So sorgt z.B. die amphipatische Helix in den Proteinen erlin1 und erlin2 für eine Oligomerisierung dieser beiden Proteine [89]. Die beiden Proteine liegen als integrale Membranproteine im ER vor und sind am Abbau von un- bzw. falsch gefalteten Proteinen im ER beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die amphipatische Helix dieser Proteine verantwortlich ist für die Bildung von über 2 MDa großen Komplexen aus den beiden einzelnen Proteinen.

Eine weitere große Klasse von Proteinen mit einer amphipatischen Helix sind zytolytisch wirkende Proteine [90]. Diese Proteine bestehen meist aus einer langen amphipatischen Helix von 23 - 31 Aminosäuren Länge und treten entweder als antibiotisch wirkendes Peptid, wie z.B. das Magainin-2, das auf der Haut von Fröschen (*Xenopus laevis*) zu finden ist, auf oder sind Bestandteil von Giften, wie das Protein Melittin [91, 92], das in Bienengift (*Apis mellifera*) enthalten ist. Die Wirkung dieser beiden Proteine ist sehr ähnlich, nur ihre Spezifität für die Zielmembranen unterscheidet sich. Melittin kann an bakterielle oder zelluläre Membranen und Magainin-2 nur an bakterielle Membranen binden. Alle diese zytolytisch wirkenden Proteine besitzen den gleichen Wirkmechanismus. Nach der Bindung an die Membran lagern sich die Proteine zusammen und bilden dadurch eine Membranpore aus. Durch diesen Mechanismus wird die Membran durchlöchert. Der Verlust der Membranintegrität leitet die Zerstörung der Zellen oder Bakterien ein. Diese zytolytischen Proteine besitzen eine längere amphipatische Helix als die reinen membrankrümmenden Helices, da sie die gesamte Membran durchspannen müssen. Zusätzlich konnte für das aus 26 Aminosäuren bestehende Melittin gezeigt werden, dass die Helix des Monomers leicht schräg in der Membran verläuft, ähnlich wie beim E^{rns} -Membrananker. Im Gegensatz dazu lagern sich die o.b. rein membranbindenden amphipatischen Helices planar an die Membran an.

Es sind auch virale Proteine bekannt, die eine amphipatische Helix enthalten. So besitzt das Protein 1a des Brom-Mosaik-Virus eine amphipatische Helix von ca. 18 Aminosäuren Länge. Die amphipatische Helix befindet sich ungefähr in der Mitte des Proteins und sorgt für die Bindung an die ER-Membran, um zusammen mit der Polymerase (Protein 2a) den Replikationskomplex zu bilden [93]. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die amphipatische Helix nicht nur für die Membranbindung verantwortlich ist, sondern auch einen Einfluss auf die verschiedenen Funktionen des Proteins 1a (RNA „capping“, NTPase und Helikase-Aktivität) hat und unentbehrlich für die Replikation des Virus ist. Aber auch das Hepatitis C Virus, das wie das BVDV auch zur Familie der *Flaviviridae* gehört, besitzt am C-Terminus des NS4B-Proteins [94] und am N-Terminus des NS5A-Proteins eine amphipatische Helix [95]. Die amphipatische Helix im NS5A-Protein sorgt für eine Membranbindung des Proteins, die für die erfolgreiche Replikation von HCV notwendig ist. Entsprechend charakteristische Sequenzen existieren auch bei den analogen Pestivirusproteinen.

Beim Vergleich der verschiedenen amphipatischen Helices kann festgestellt werden, dass sie einige Gemeinsamkeiten besitzen. So befinden sie sich meist N-terminal oder im Zentrum des Proteins, seltener am C-Terminus und werden hauptsächlich für die Bindung an Membranen eingesetzt. Bis auf die zytolytischen Proteine besitzen sie meist eine Länge zwischen 12 - 20 Aminosäuren, was ca. 3 - 6 Helixwindungen entspricht. Die amphipatische Helix im E^{rns} -Anker sorgt auch für eine Membranbindung, befindet sich jedoch am C-Terminus und ist mit ihren ca. 65 Aminosäuren auch deutlich länger als die klassischen amphipatischen Membrananker. In Bezug auf die Länge zeigt der E^{rns} -Anker hier eine Verwandtschaft mit den zytolytisch wirkenden Proteinen. Auch liegt der E^{rns} -Anker leicht schräg in der Membran, wie es für Melittin ermittelt wurde. Allerdings liegt der E^{rns} -Membrananker nicht in Transmembrankonfiguration vor. Der E^{rns} C-Terminus bildet keine Membranpore und zeigt auch keine Tendenz zur Oligomerisierung, sondern bildet lediglich Dimere aus. Im Unterschied zu allen bisher entdeckten amphipatischen Helices ist ein Teil der amphipatischen Helix in die Membran eingelagert, liegt also nicht vollständig planar vor. Da aber viele Strukturanalysen dieser amphipatischen Helices, z.B. HCV NS5A, nur in membransimulierenden Systemen wie TFE oder Mizellen aus SDS bzw. DPC gemessen wurden und nicht in einem Bizellensystem wie in dieser Arbeit, kann die gemessene Faltung dieser amphipatischen Helices von der Faltung im biologischen System deutlich abweichen.

Ein wichtiger Unterschied zwischen E^{rns} und den vorher genannten Proteinen ist, dass E^{rns} das einzige Oberflächenprotein unter den Proteinen mit einer amphipatischen Helix ist. E^{rns} ist ein Glykoprotein mit einer RNase-Funktion und ist an das Viruspartikel gebunden; es wird aber auch von der Zelle sekretiert. Auf dem Viruspartikel könnte die amphipatische Helix für eine Krümmung der Membran sorgen. Dafür spricht, dass neue Ergebnisse für das Kapsidprotein von CSFV zeigen, dass es sich nicht wie früher angenommen zu einem ikosaedralen Kapsid zusammenlagert und dabei durch Interaktion von Kapsidprotein und Oberflächenprotein die für das „budding“ erforderliche Membrankrümmung bewirkt. Dadurch fehlt dem Virus scheinbar ein Protein, das die Membrankrümmung induziert. Demzufolge muss die Bildung eines Virions von einem anderen viralen Protein durchgeführt werden, wozu sich die amphipatische Helix des E^{rns} -Ankers anbieten würde, da durch die Dimerisierung ein ähnlicher Effekt wie bei dem oben genannten Protein Epsin1 vorstellbar ist, nämlich die Induktion einer Membrankrümmung durch „Proteinballung“. Eine Induktion der Membrankrümmung durch die Übertragung der Proteinkrümmung auf die Membran, wie z.B. durch eine BAR-Domäne, ist eher unwahrscheinlich, da die N-terminale Kristallstruktur von E^{rns} keine solche gekrümmte Domäne aufweist.

Dessen ungeachtet hebt sich der E^{rns} -Anker von den anderen amphipatischen Helices ab, da sich ein Teil von ihm gänzlich in der Membran befindet. Damit bewirkt er eine stabilere Membranbindung als sie von einer peripher angelagerten Struktur vermittelt würde. Die Bindung fällt aber nicht so stark aus wie die einer Transmembranhelix. Der amphipatische Membrananker von E^{rns} ist wie schon angemerkt viel länger als andere amphipatische Helices (z.B. HCV NS5a), was zusätzliche Funktionen abseits der reinen Membranbindung wahrscheinlicher macht. Bis jetzt wurden außer der bereits beschriebenen Membranbindung auch die Steuerung der Sekretion/Retention sowie die Bildung einer ungewöhnlichen Signalpeptidasespaltstelle der amphipatischen Helix zugeschrieben. Möglich wäre zudem, dass der E^{rns} -Anker zusätzlich noch weitere Funktionen ausübt, wie die Einleitung der Membrankrümmung für die Knospung der Virionen oder eine Dimerisierung von E^{rns} . Beide Funktionen wurden schon bei anderen amphipatischen Helices beschrieben.

5.6 Fazit und Ausblick

Pestiviren, allen voran das BVD-Virus, haben einen faszinierenden Mechanismus entwickelt, um ihren Fortbestand zu gewährleisten. Kommt es zur Infektion einer trächtigen Kuh, kann das Virus die Plazentarschranke überwinden und in den Fötus eindringen, um dann eine persistente Infektion im Fötus zu manifestieren. Dazu muss die Infektion in einem bestimmten Zeitraum der Fötusentwicklung erfolgen, in welchem sich das Immunsystem gerade ausbildet. Zu diesem Zeitpunkt lernt das Immunsystem, welche Proteine körpereigen sind, damit später keine Autoimmunreaktion gegen die körpereigenen Proteine stattfindet. Kommt es nun in diesem Zeitraum zu einer Infektion des Fötus mit einem BVD-Virus werden die viralen Proteine als körpereigene Proteine erkannt, wodurch später die Aktivierung der adaptiven Immunantwort (B-Zellen, T-Killerzellen) gegen das Virus ausbleibt. Nach der Geburt der Kälber bleibt die persistente Infektion lebenslang erhalten und führt zu starker Vermehrung und Ausscheidung der Viren, wodurch wiederum weitere Rinder infiziert werden können. Der Vorteil für die Viren liegt klar auf der Hand. Zum einen werden über mehrere Jahre große Virusmengen ausgeschiedenen, was die Verbreitung des Virus in der Wirtspopulation sicherstellt. Zum anderen schadet es seinem Wirt trotzdem nicht sehr, auch wenn persistent infizierte Tiere einen Wachstumsnachteil zeigen und deshalb als „Kümmerer“ bezeichnet werden. Jedoch funktioniert die Immunantwort gegen andere Viren und Bakterien noch vollständig, so dass das Kalb trotz persistenter

BVDV Infektion mehrere Jahre relativ unbeschadet leben kann bis zum eventuellen Ausbruch der „Mucosal Disease“.

Es konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass für diesen Persistenzmechanismus zwei virale Proteine entscheidend sind, die bis jetzt auch nur bei Pestiviren gefunden werden konnten [25]. Es handelt sich dabei um das Nichtstrukturprotein N^{pro} und das Glykoprotein E^{rns} . N^{pro} ist, wie der Name schon andeutet, eine Autoprotease, die sich vom Capsidprotein abspaltet und dann in der Zelle den Faktor IRF3 (Interferon regulating faktor 3) dem proteasomalen Abbau zuführt. Dadurch wird ein entscheidender Signalweg des angeborenen Immunsystems der Zelle inaktiviert, wodurch die Vermehrung des Virus unbehelligt geschehen kann. Die Funktion des Glykoproteins E^{rns} bei der Ausbildung der Persistenz ist noch nicht so gut verstanden. E^{rns} bildet Dimere aus und ist hoch glykosyliert, so dass die Zuckerreste über die Hälfte der Molekülmasse ausmachen. Zudem besitzt es eine RNase-Aktivität, was für das Glykoprotein eines RNA-Virus sehr sonderbar ist. Beide Fähigkeiten, also die Dimerisierung und die RNase-Aktivität, stellen Virulenzfaktoren von E^{rns} dar, da die Blockierung einer dieser Fähigkeiten zu einem attenuierten Virus führt. Die Beteiligung der E^{rns} -RNase an der Blockierung der angeborenen Immunantwort im BVDV-infizierten Fötus konnte kürzlich bewiesen werden [25]. E^{rns} ist aber nicht nur an der Blockierung der angeborenen Immunantwort beteiligt, sondern stellt auch ein essentielles Strukturprotein dar, das Teil der Virusoberfläche ist und für die Bildung von infektiösen Partikeln benötigt wird. Antikörper gegen E^{rns} können die Viren neutralisieren. Aber E^{rns} kann nicht nur auf den Viruspartikeln detektiert werden, sondern auch im Blut der infizierten Tiere, da es von der Zelle sezerniert wird. Wir und andere denken, dass diese sekretierte Form von E^{rns} den Ausgangspunkt für die immunevasive Funktion von E^{rns} bildet. Um dies eindeutig zeigen zu können, müssen Viren hergestellt werden, die E^{rns} nicht mehr sekretieren können, so dass E^{rns} nur noch an Viruspartikel gebunden vorkommt. Zur Erzeugung eines solchen Virus muss die Steuerung des Retentions/Sekretionsmechanismus genauer analysiert werden. Ausgehend von der Kenntnis über die Steuerung dieses Vorgangs, sollte es möglich sein, gezielt nur diese Eigenschaft des Proteins zu verändern. Erste Schritte zum Verständnis der E^{rns} -Sekretion enthielten die Identifizierung des Membranankers und des Retentionssignals des Proteins. Dabei konnten wir feststellen, dass der C-Terminus von E^{rns} gleichzeitig als Membrananker und Retentionssignal dient. Zum genaueren Verständnis dieser Funktion ist die Strukturaufklärung dieses Bereiches von enormer Bedeutung. Daraus sind Ansätze für ein besseres Verständnis des Retentionsmechanismus des E^{rns} -Proteins zu erwarten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, wie zu erwarten war, eine helikale Faltung des E^{rns} -Ankers, woraus sich zwangsläufig eine Faltung in Form einer amphipatischen Helix ergibt. Überraschenderweise stellte sich jedoch heraus, dass sich ein Teil der amphipatischen Helix in der Membran befindet und nicht wie erwartet planar an der Lipid/Wassergrenzfläche positioniert ist. Diese interessante Faltung könnte wichtig für die Ausbildung der Signalpeptidasespaltstelle sein, die dafür sorgt, dass E^{rns} von E1 abgespalten wird. Eine weitere mögliche Funktion könnte diese Struktur bei der Membrankrümmung haben und dann daran beteiligt sein, dass die viralen Partikel abknospen können. Dabei könnte die Krümmung der Membran durch die Einlagerung der amphipatischen Helix an sich induziert werden oder durch eine „Proteinballung“ [88], die durch die Dimerisierung verstärkt wird.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit durch Analysen in einem einfacheren System geklärt werden, dass die Lipidinteraktion des E^{rns} -Ankers nur schwer gestört werden kann. Deshalb muss man davon ausgehen, dass die durch eingeführte Mutationen erfolgte Steigerung der Sekretionsrate des Proteins aus der Zelle nicht durch den Verlust der Membranbindung hervorgerufen wird, sondern andere Ursachen haben muss. Damit stellt sich natürlich die Frage, wie das sekretierte E^{rns} genau aussieht. Vorstellbar wäre z.B., dass der E^{rns} -Anker abgespalten oder modifiziert wird. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, dass der E^{rns} -Anker durch eine Umfaltung seine Funktion verliert und E^{rns} somit als Dimer sezerniert werden kann. Eine weitere Unbekannte stellt das Zielmolekül bzw. der Wirkungsort der E^{rns} -RNase dar. E^{rns} könnte seine Funktion zum einen direkt im Blutstrom ausführen oder an

speziellen Orten bzw. bestimmten Zelltypen im Organismus. Da E^{rns} in recht hohen Konzentrationen im Blut infizierter Tiere vorkommt, gleichzeitig die Sekretionsrate jedoch sehr gering ist, bedeutet dies, dass nur wenig E^{rns} am Zielort aufgenommen werden kann und somit weit verbreitete Zellen, wie z.B. Endothelzellen, als Ziel ausgeschlossen werden können. Um all diese Fragen beantworten zu können, ist es wichtig die Funktion des E^{rns} -Ankers weiter zu entschlüsseln, damit der Retentions/Sekretionsmechanismus und die Verankerung in der Membran besser verstanden werden können. Dazu leisten die in der veröffentlichten Arbeit erhobenen Daten einen entscheidenden Beitrag. Es müssen jedoch weitere Strukturanalysen folgen, die über den Rahmen diese Arbeit hinausgehen.

Die hier präsentierten Ergebnisse geben erste Einblicke in die Struktur und die Membranbindung des E^{rns} -Ankers und sind ein wichtiger Schritt auf dem langen Weg zum Verständnis der Biochemie dieses faszinierenden Proteins. Diese Arbeit wird als Ausgangspunkt für weitere Studien dienen, in denen nicht nur neue Erkenntnisse über einen wirtschaftlich bedeutenden Tierseuchenerreger gesammelt werden können, sondern auch neue Mechanismen der Immunevasion aufgeklärt werden können. Die bei diesen Untersuchungen zu gewinnenden Erkenntnisse sind damit für das Verständnis von Erreger/Wirtsinteraktionen von allgemeiner biologischer und medizinischer Bedeutung und können somit zu einem besseren Verständnis des Immunsystems beitragen.

6.0 Anhang

6.1 Plasmidsequenzen

Basen- und Aminosäuresequenzen der verwendeten Grundkonstrukte pd29G, pd29G-STOPP und pd46, wobei nur der codierende Bereich dargestellt wurde.

6.1.1 Plasmid pd29G

Basensequenz:

```

ATGAAACATC ACCATCACCA TCACCCCATG AAACAACACG ATGAAGCCGT
AGACAACAAA TTCAACAAAG AACAAACAAA CGCGTTTTAT GAAATTCTGC
ATCTGCCGAA CCTGAACGAA GAACAGCGTA ACGCCTTCAT CCAAAGTTTA
AAAGATGACC CAAGCCAAAG CGCTAACCTG CTGGCGGAAG CTAAAAAACT
GAACGATGCG CAGGCGCCGA AAGTAGACGC GGGATCTGGC AGTGGTTCTG
AAAACCTGTA TTTTCAGGGC GCCATGGCCA AAGAGCATGA TTGCACTAGT
GTGATTCAGG ATACCGCGCA TTATCTGGTG GATGGCATGA CCAACAGCCT
GGAAAGCGCG CGTCAGGGGA CCGCGAAACT GACAACCTGG CTGGGCCGTC
AGCTGGGCAT TCTGGGCAA AACTGGAAA ACAAAGCAA AACCTGGTTT
GGCGCGTATG CGTAA

```

Aminosäuresequenz:

```

MKHHHHHHPM KQHDEAVDNK FNKEQQNAFY EILHLPNLNE EQRNAFIQSL 50
KDDPSQSANL LAEAKKLNDA QAPKVDAGSG SGSENLVYFQG AMAKEHDCTS 100
VIQDTAHYLV DGMTNSLESA RQGTAKLTTW LGRQLGILGK KLENKSKTWF 150
GAYA

```

6.1.2 Plasmid pd29G-STOPP

Basensequenz:

```

ATGAAACATC ACCATCACCA TCACCCCATG AAACAACACG ATGAAGCCGT
AGACAACAAA TTCAACAAAG AACAAACAAA CGCGTTTTAT GAAATTCTGC
ATCTGCCGAA CCTGAACGAA GAACAGCGTA ACGCCTTCAT CCAAAGTTTA
AAAGATGACC CAAGCCAAAG CGCTAACCTG CTGGCGGAAG CTAAAAAACT
GAACGATGCG CAGGCGCCGA AAGTAGACGC GGGATCTGGC AGTGGTTCTG
AAAACCTGTA TTTTCAGTAA TAA

```

Aminosäuresequenz:

```

MKHHHHHHPM KQHDEAVDNK FNKEQQNAFY EILHLPNLNE EQRNAFIQSL 50
KDDPSQSANL LAEAKKLNDA QAPKVDAGSG SGSENLVYFQA YA

```

6.1.3 Plasmid pd46

Basensequenz:

```

ATGAAACATC ACCATCACCA TCACCCCATG AAACAACACG ATGAAGCCGT
AGACAACAAA TTCAACAAAG AACAAACAAA CGCGTTTTAT GAAATTCTGC
ATCTGCCGAA CCTGAACGAA GAACAGCGTA ACGCCTTCAT CCAAAGTTTA
AAAGATGACC CAAGCCAAAG CGCTAACCTG CTGGCGGAAG CTAAAAAACT
GAACGATGCG CAGGCGCCGA AAGTAGACGC GGGATCTGGC AGTGGTTCTG
AAAACCTGTA TTTTCAGGGC GCCATGGGTG ATCATGAATG TGGTAGCCTG
CTGCAGGATA CAGCACTGTA TCTGCTGGAT GGTATGACCA ATACCATTGA
AAATGCACGT CAGGGTGCAG CACGTGTTAC CAGCTGGCTG GGTCGTCAGC
TGAGCACCGC AGGTAAAAAA CTGGAACGTC GTAGCAAAAC CTGGTTTGGT
GCATATGCCT AATAA
  
```

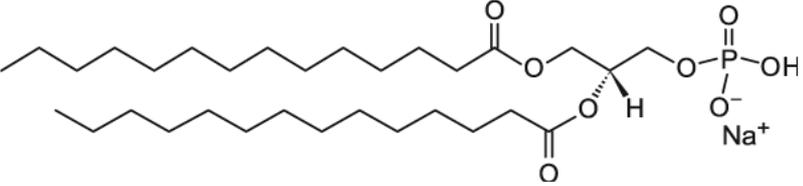
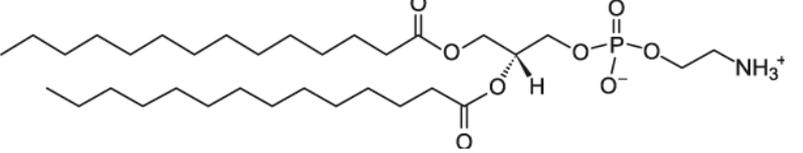
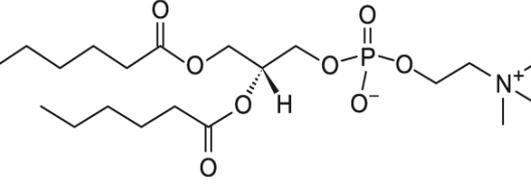
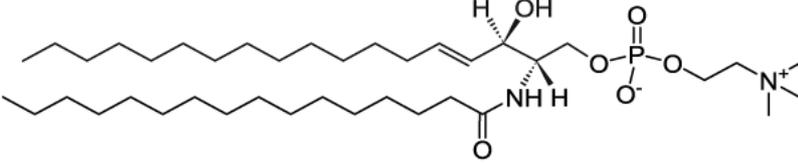
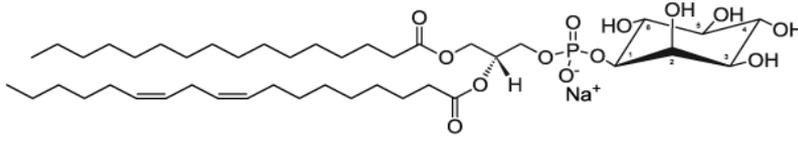
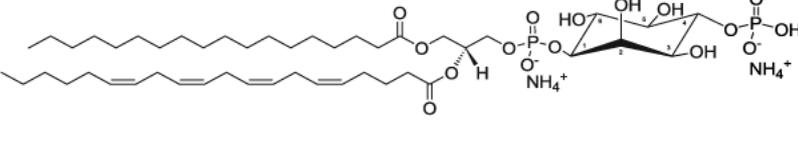
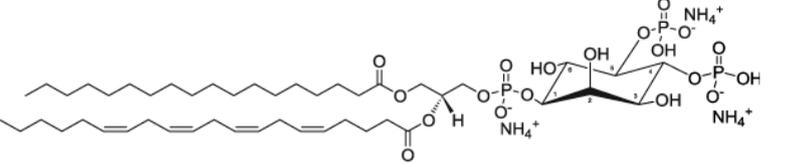
Aminosäuresequenz:

```

MKHHHHHHPM KQHDEAVDNK FNKEQQNAFY EILHLPNLNE EQRNAFIQSL 50
KDDPSQSANL LAEAKKLNDA QAPKVDAGSG SGSENLVYFQG AMGDHECGSL 100
LQDTALYLLD GMTNTIENAR QGAARVTSWL GRQLSTAGKK LERRSKTWFG 150
AYA
  
```

6.2 Verwendete Lipide

Name		Gesamtladung
DMPC		0
DMPG		-1
DMPS		-1

Name		Gesamtladung
DMPA		-1
DMPE		0
DHPC		0
Sph		0
PI		-1
PI 4		-2
PI 4,5		-3

Bilderquelle: Avantin Polar Lipids

6.3 MALDI-TOF-Spektren

MALDI-TOF Spektren der exprimierten und aufgereinigten Konstrukte für die NMR bzw. CD-Analysen. Es ist jeweils ein Spektrum des Massenbereiches bis 20000 Da gezeigt, um die Effizienz der Aufreinigung zu demonstrieren und ein Spektrum des direkten erwarteten Massenbereichs, um die Effizienz der Markierung und mögliche Oxidationen des Proteins hervorzuheben.

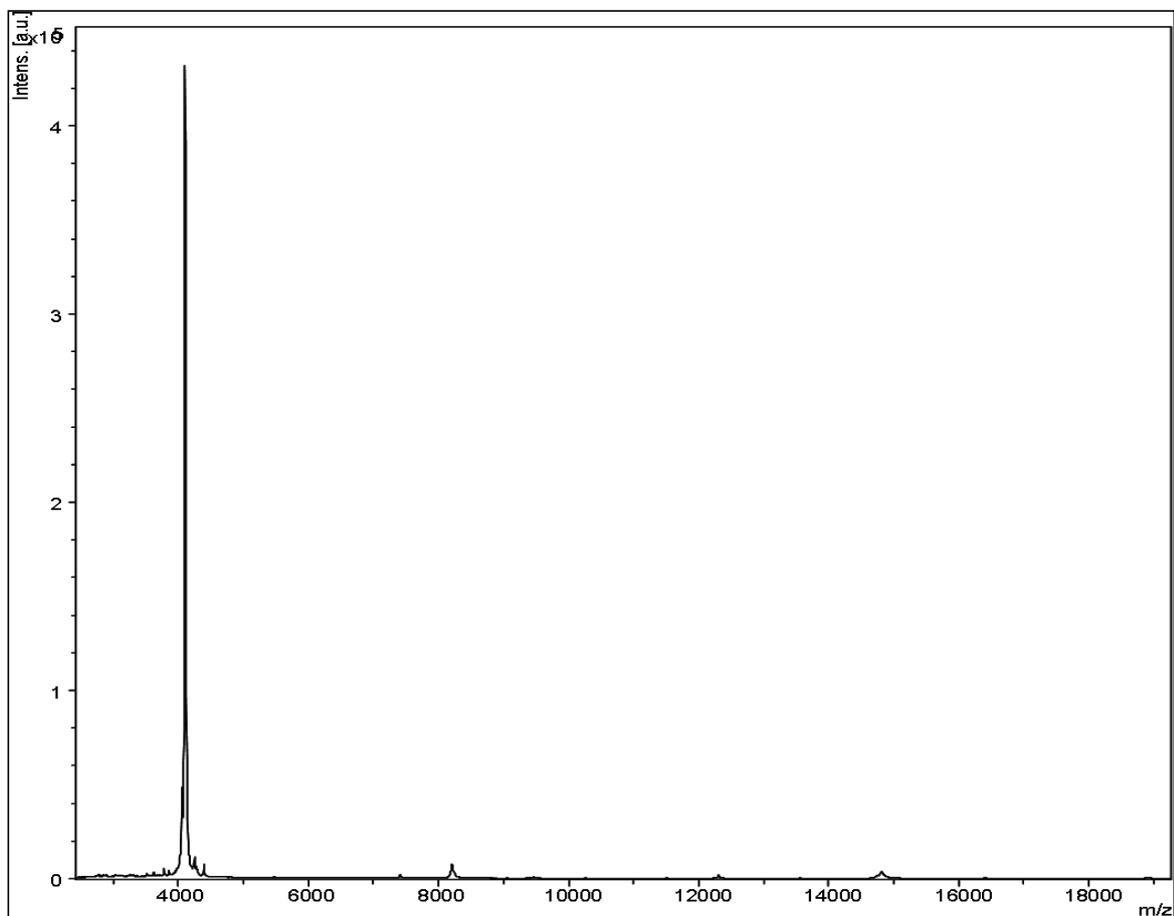
6.3.1 Erns-1 ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$)

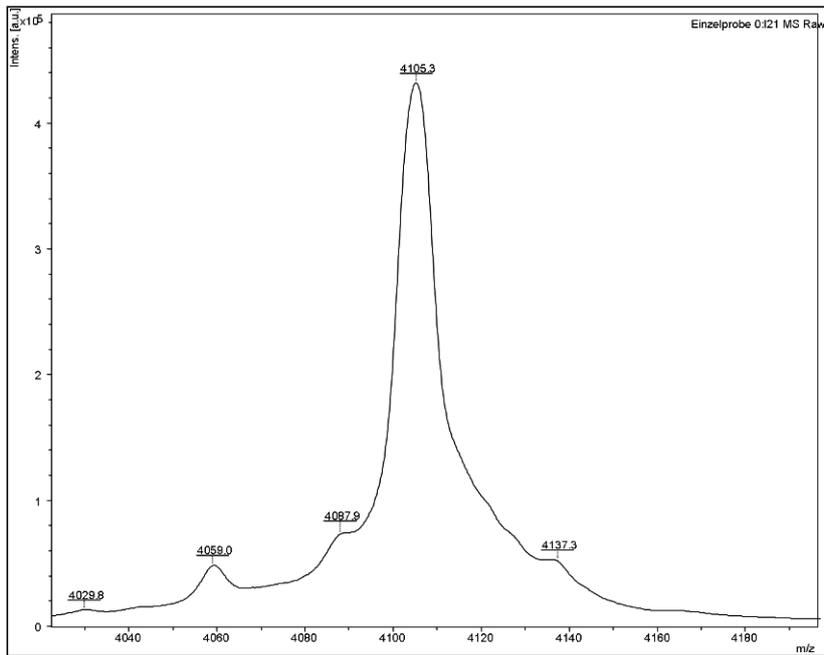
Berechnete Massen:

Masse Edukt: 14829 Da

Masse Erns-1: 4105 Da

Masse N-terminaler tag: 10741 Da





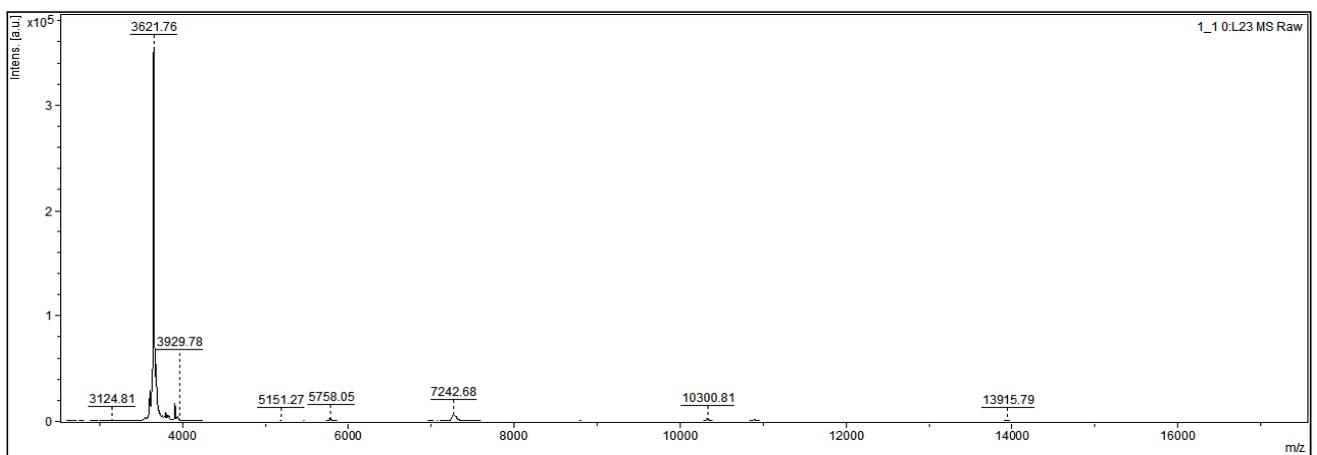
6.3.2 Erns-1-1 (^{15}N)

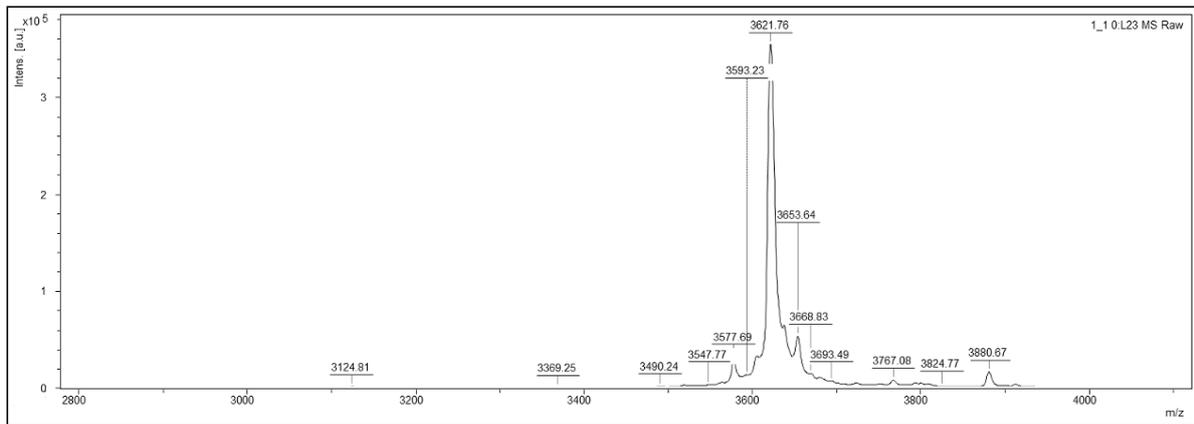
Berechnete Massen:

Masse Edukt: 13909,3 Da

Masse Erns-1-1: 3622,1 Da

Masse N-terminaler tag: 10305,1 Da





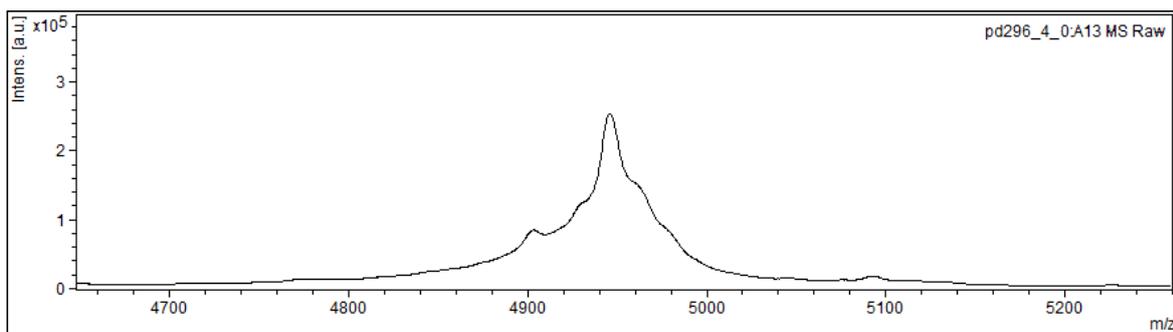
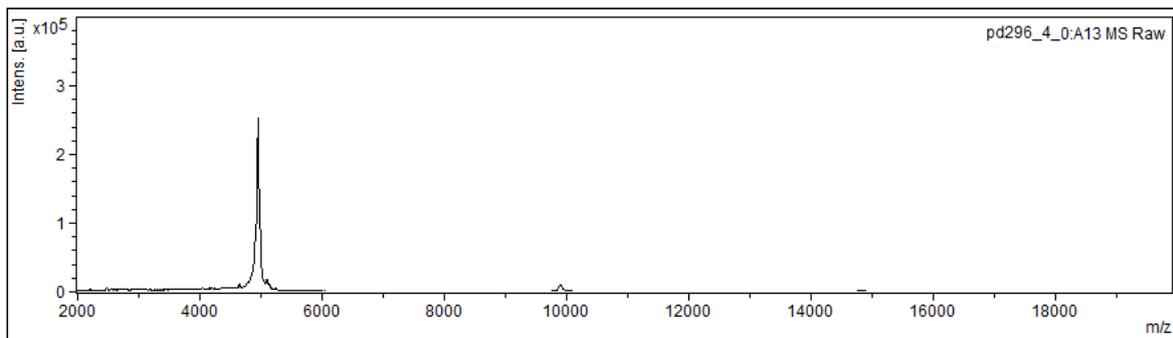
6.3.3 Erns-4 (¹⁵N)

Berechnete Massen:

Masse Edukt: 15234,7 Da

Masse Erns-4: 4947,5 Da

Masse N-terminaler tag: 10305,1 Da



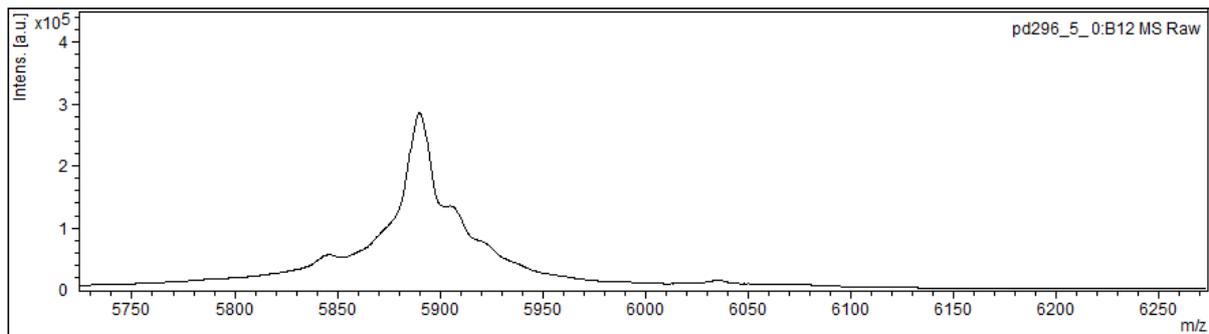
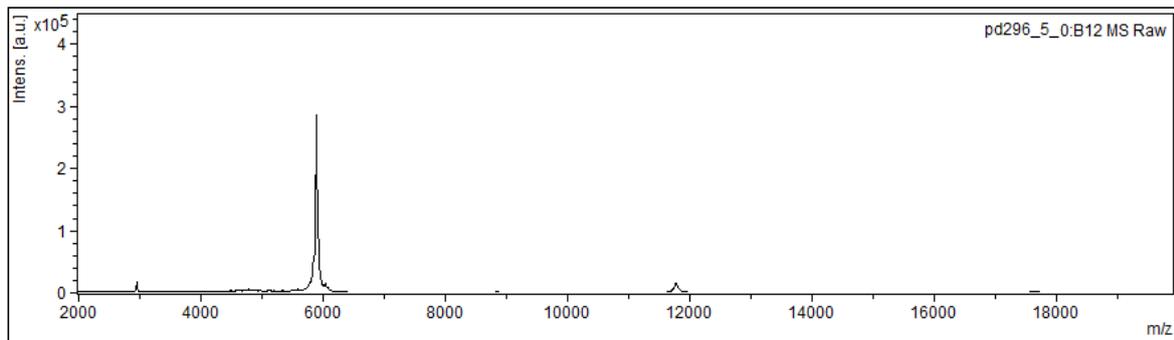
6.3.4 Erns-5 (^{15}N)

Berechnete Massen:

Masse Edukt: 16173,7 Da

Masse Erns-5: 5886,5 Da

Masse N-terminaler tag: 10305,1 Da



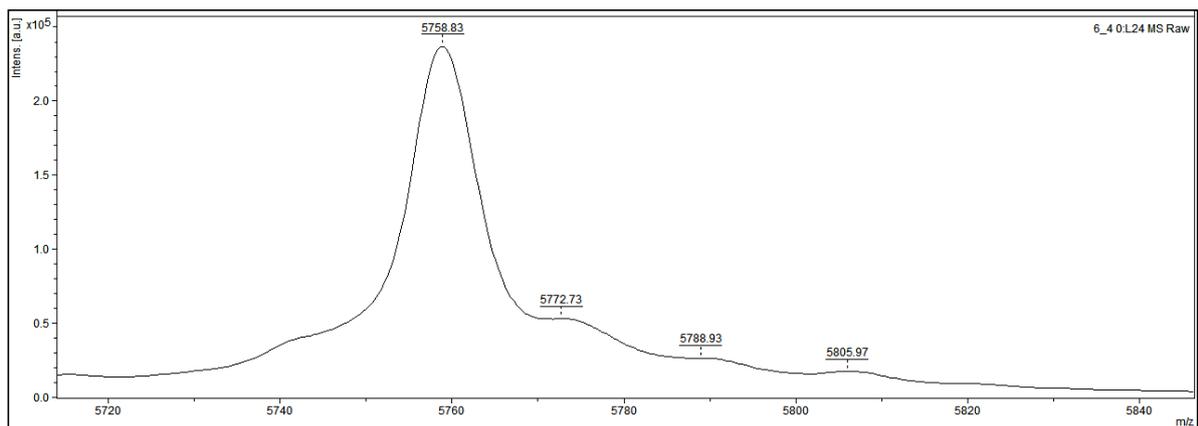
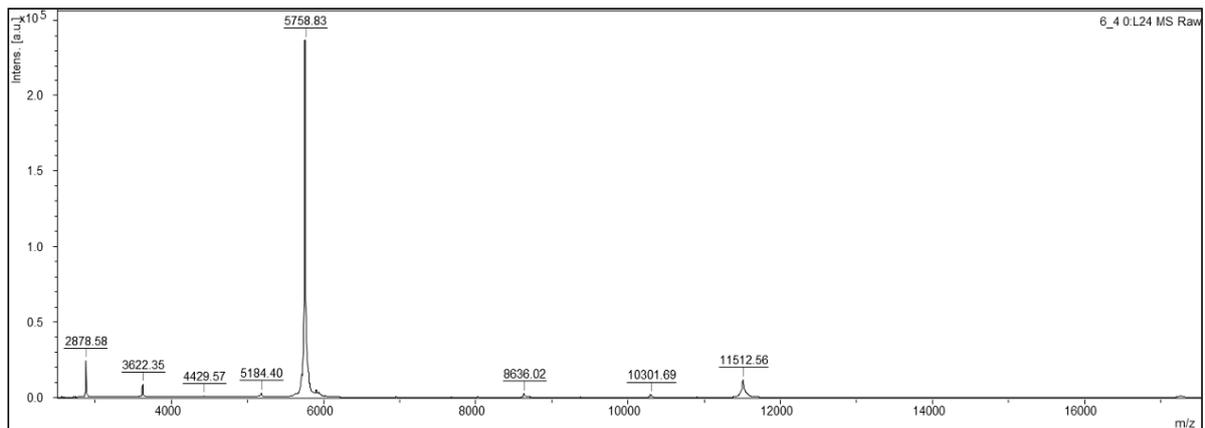
6.3.5 Erns-6-4 (^{15}N)

Berechnete Massen:

Masse Edukt: 16045,5 Da

Masse Erns-6-4: 5758,4 Da

Masse N-terminaler tag: 10305,1 Da



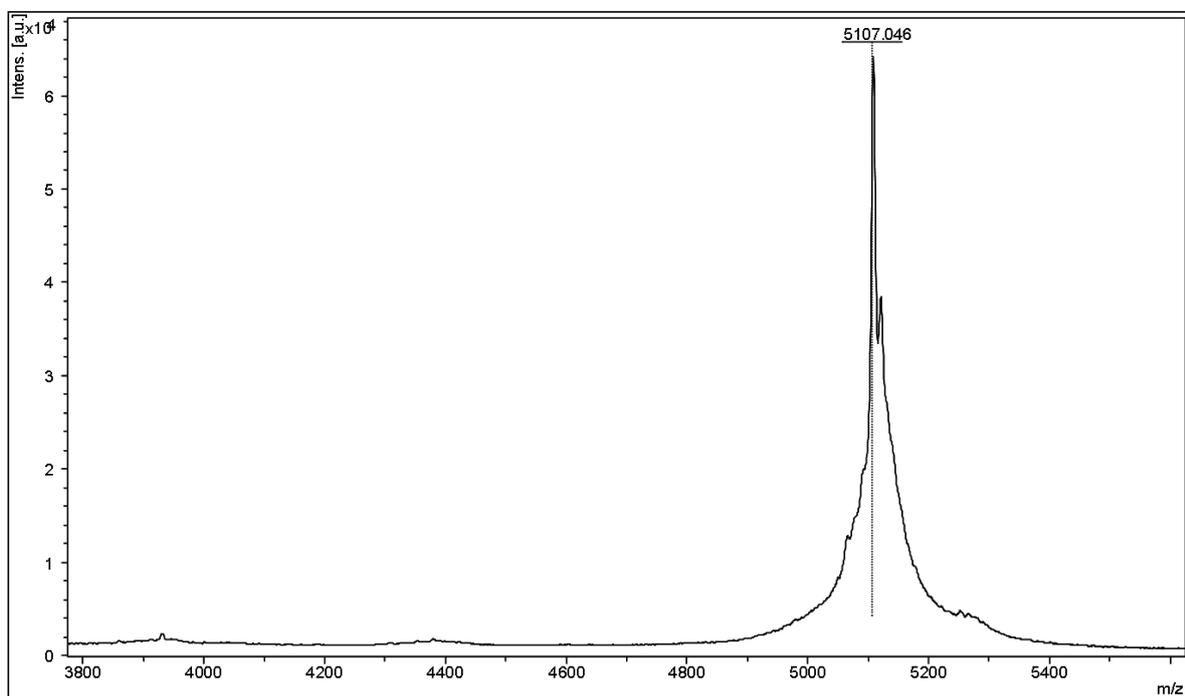
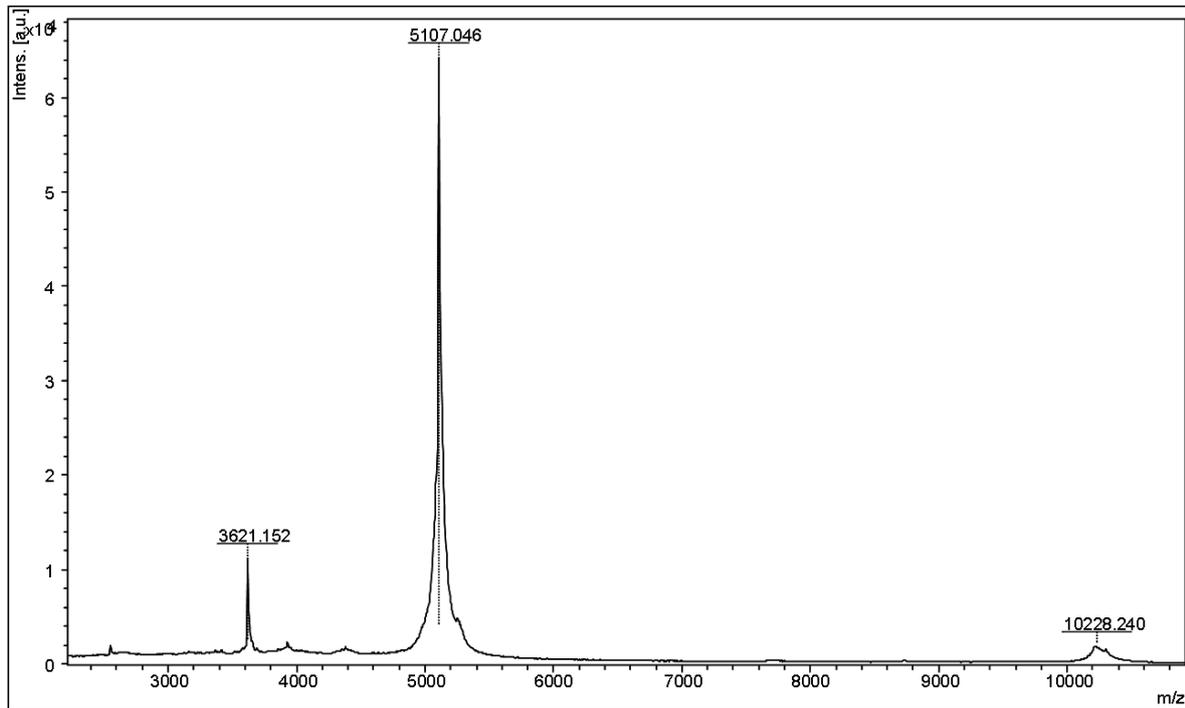
6.3.6 Erns-1+10AS (^{15}N)

Berechnete Massen:

Masse Edukt: 15394,9 Da

Masse Erns-1+10AS: 5107,8 Da

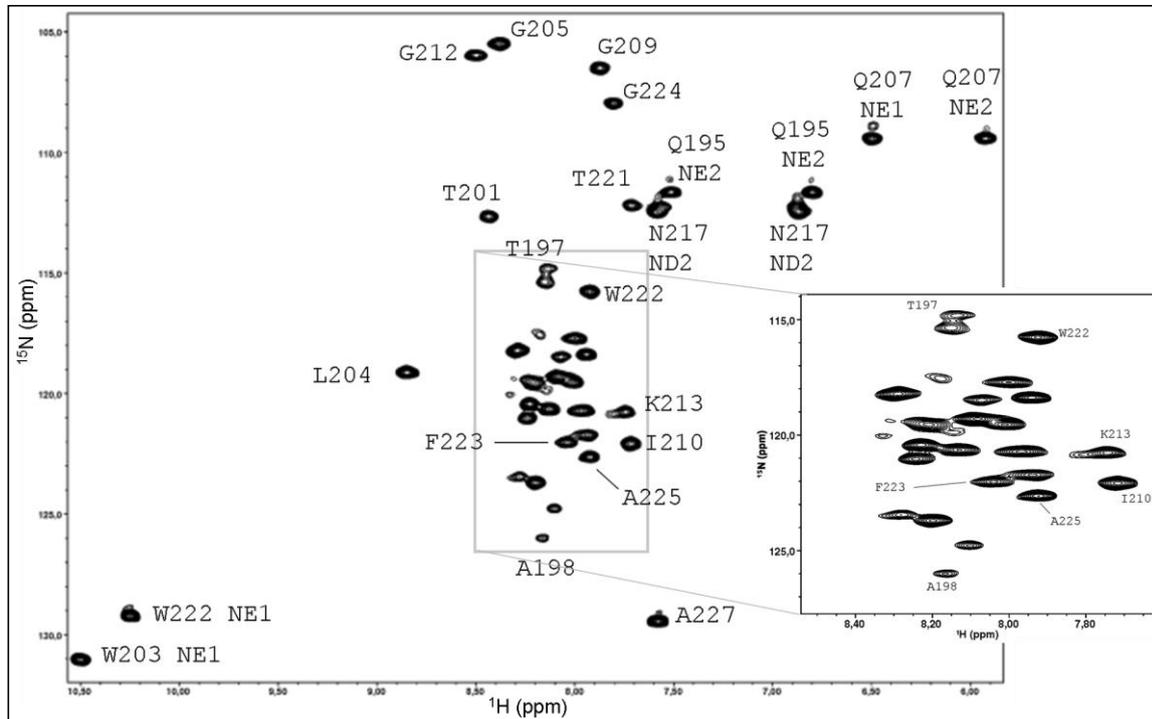
Masse N-terminaler tag: 10305,1 Da



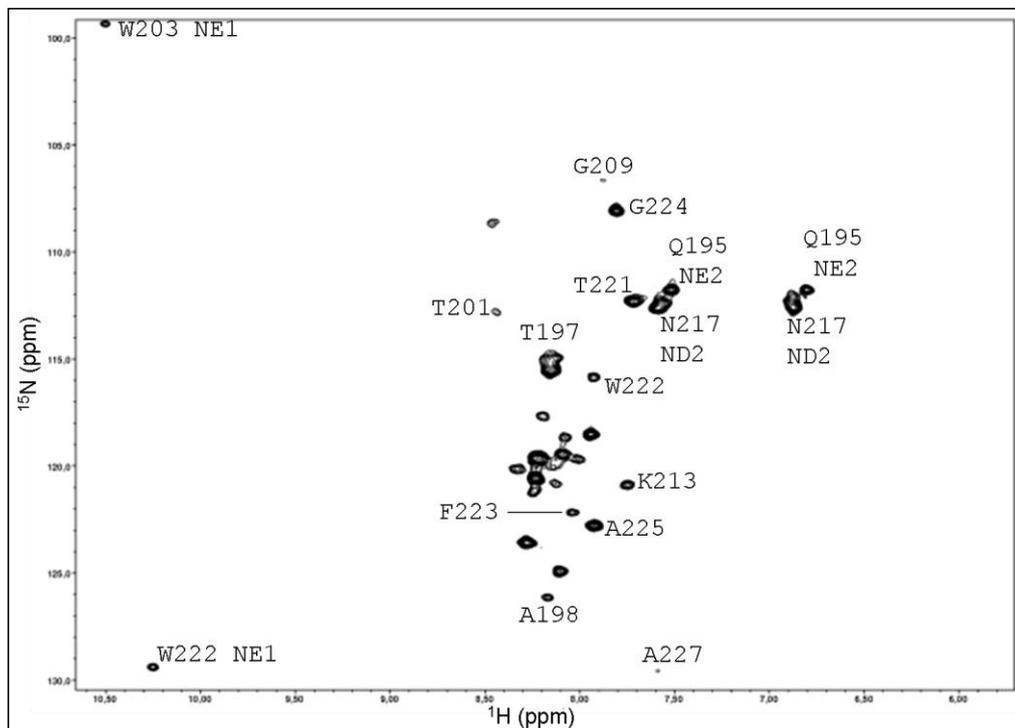
6.4 Weitere NMR-Spektren

6.4.1 ^1H - ^{15}N -HSQC- und CLEANEX-Spektrum von E^{rms}-4

^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum

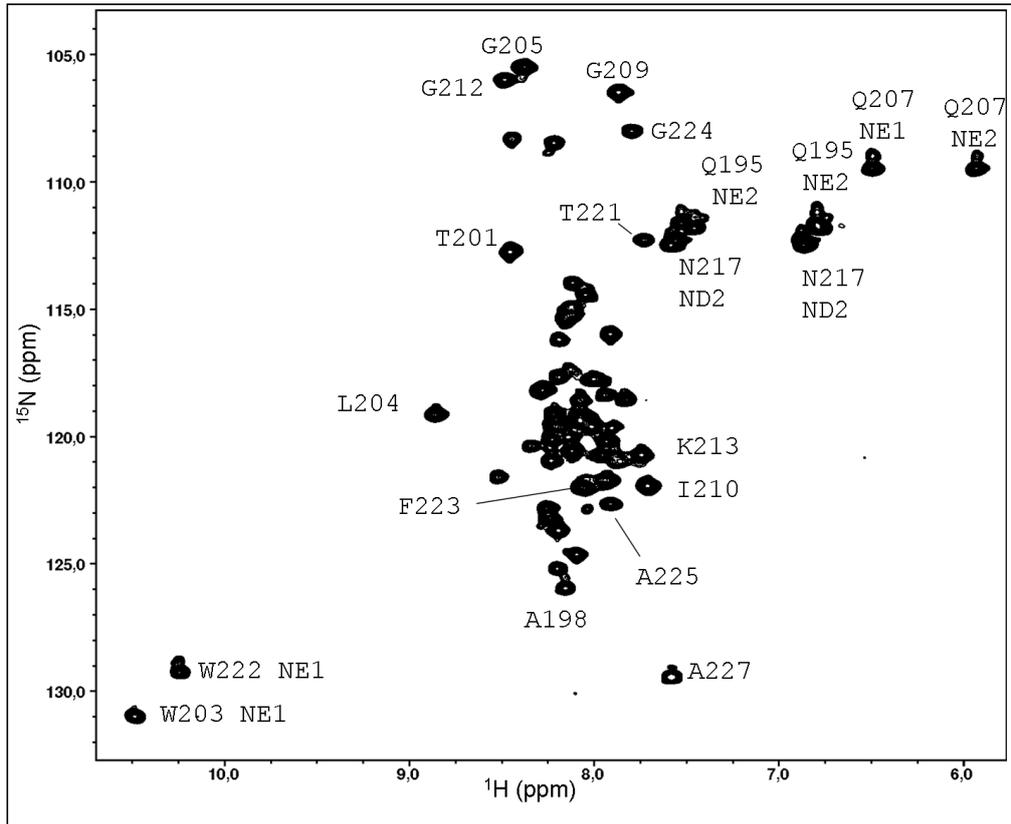


CLEANEX-Spektrum

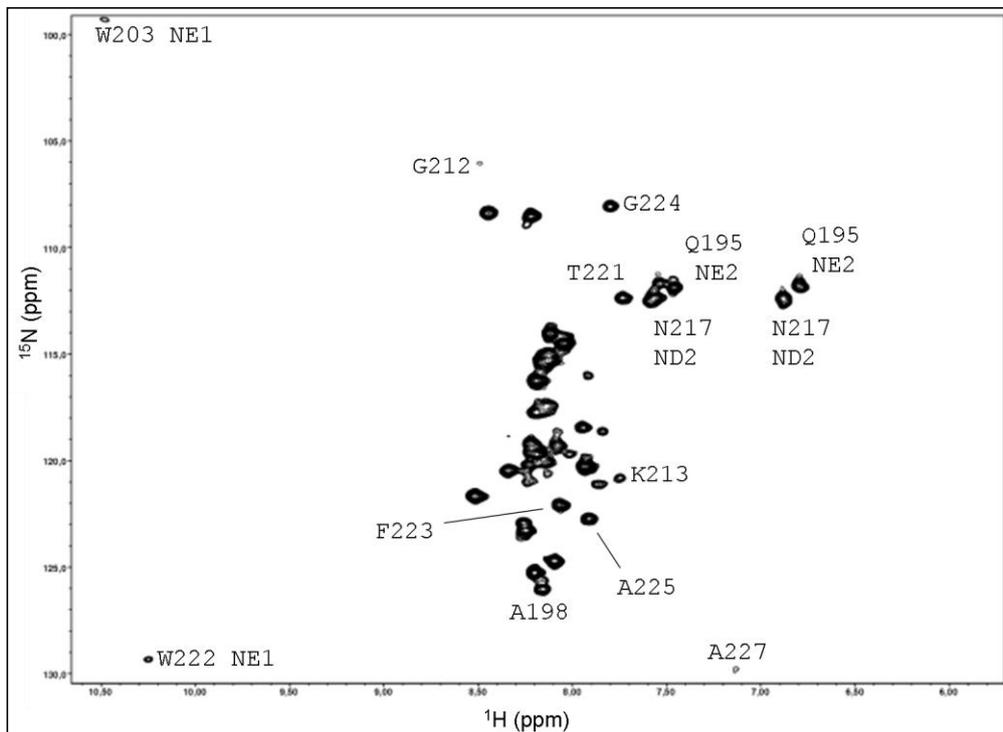


6.4.2 ^1H - ^{15}N -HSQC- und CLEANEX-Spektrum von E^{ms}-5

^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum

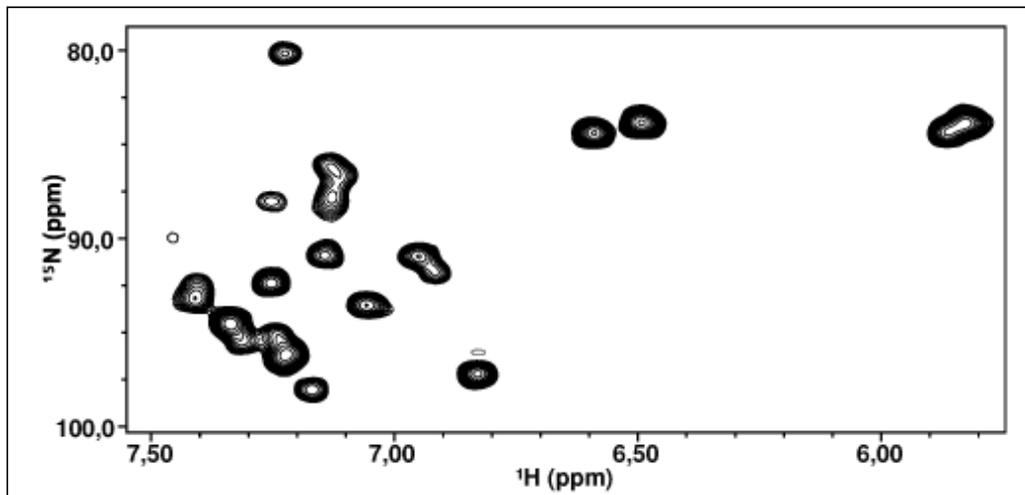


CLEANEX-Spektrum

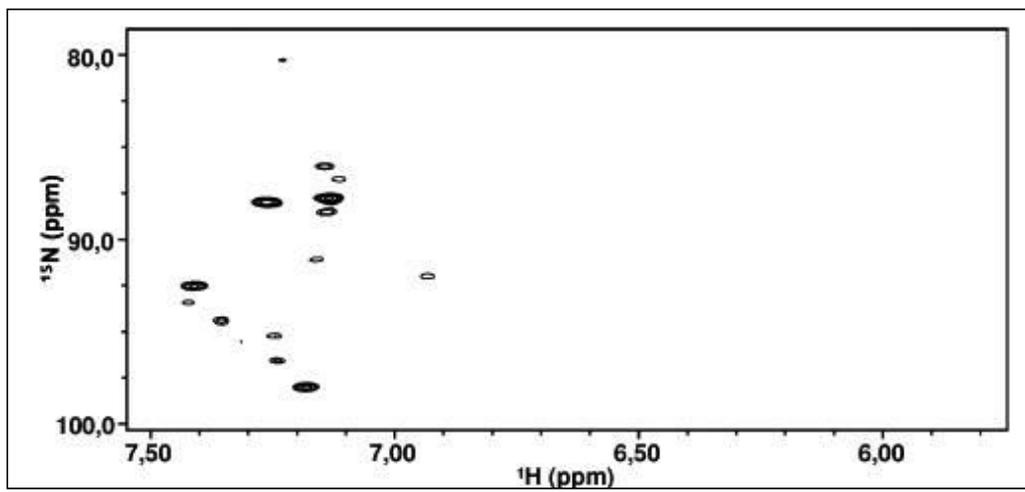


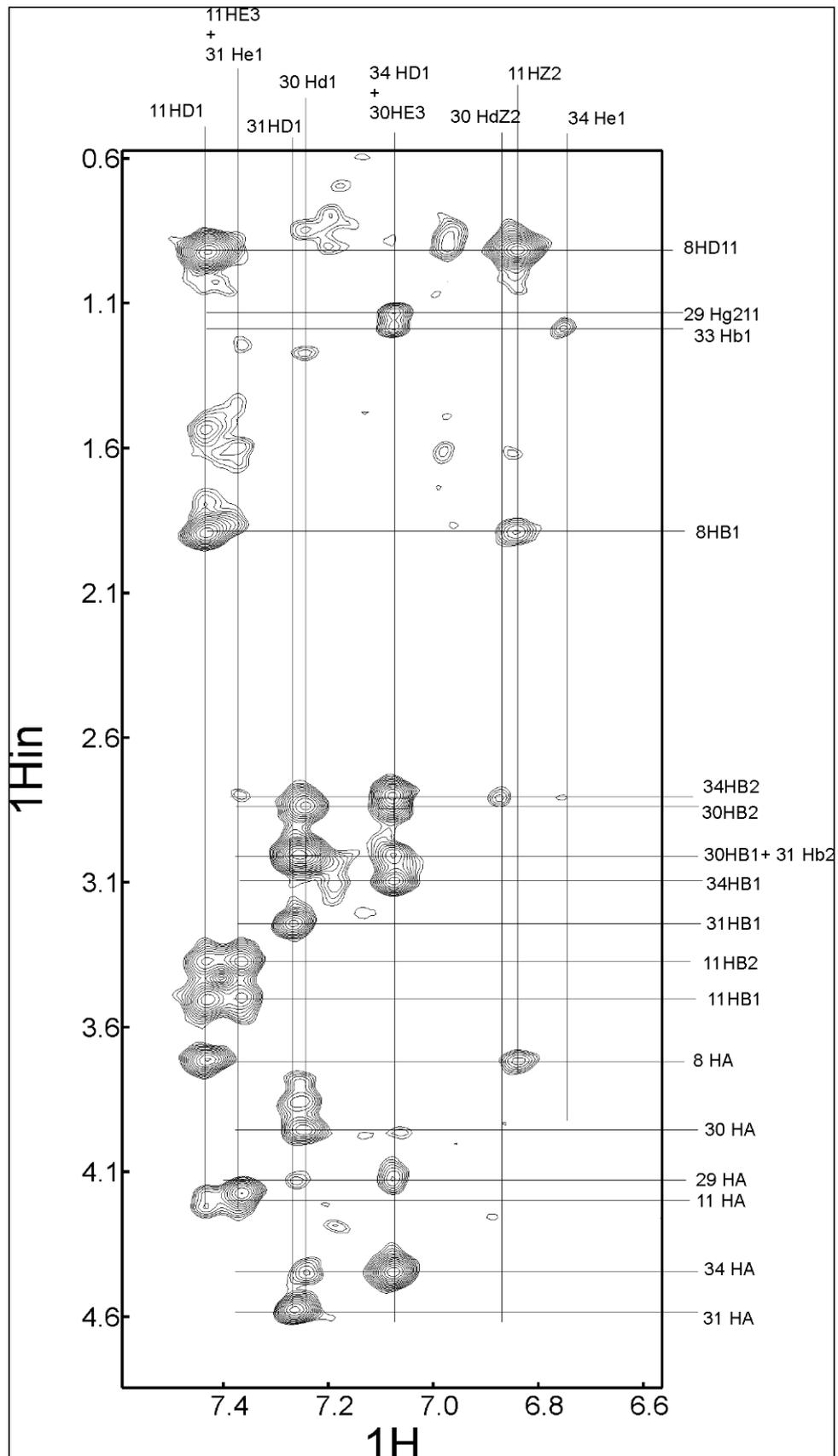
6.4.3 ^1H - ^{15}N -HSQC- und CLEANEX-Spektrum von E^{ms}-2-1

^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum



CLEANEX-Spektrum



6.4.4 Intramolekulare ^1H - ^1H -NOESY-Kontakte des C-Terminus von E^{ms}-1

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Reaktionsansatz für die Standard-PCR.....	61
Tabelle 2:	Schematische Übersicht über den Ablauf der PCR.....	62
Tabelle 3:	Schematische Übersicht über den Ablauf der Quik Change® PCR.....	62
Tabelle 4:	Reaktionsansatz für die Fusions-PCR.....	63
Tabelle 5:	Reaktionsansatz für die Superoligonukleotidsynthese.....	64
Tabelle 6:	Reaktionsansatz für die Ligation.....	66
Tabelle 7:	Reaktionsansatz für die Sequenzierung.....	67
Tabelle 8:	Schematische Darstellung des Sequenzierprogramms.....	67
Tabelle 9:	Pipettierschemata für 4 unterschiedliche SDS-Gele.....	70
Tabelle 10:	Zusammensetzung der verwendeten Lipidmischungen.....	92
Tabelle 11:	Auswertung der OCD-Daten.....	129
Tabelle 12:	Vergleich des Anteils an NH-Gruppen mit Wasserkontakt bei verschiedenen E ^{rms} -Ankerfragmenten.....	137

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines BVDV Partikels.....	18
Abbildung 2:	Genomorganisation von Pestiviren.....	19
Abbildung 3:	3D-Struktur des N-Terminus von E ^{rms}	23
Abbildung 4:	Schematische Darstellung einer rechts zirkular polarisierten Lichtwelle.....	25
Abbildung 5:	Schematischer Ablauf einer CD-Messung.....	26
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Peptidbindung.....	27
Abbildung 7:	Absorptionsspektrum und Elektronenübergänge der Peptidbindung eines helikal gefalteten Peptides.....	28
Abbildung 8:	Orientierung der Elektronenübergänge der Peptidbindung im fernen UV.....	29
Abbildung 9:	Darstellung von verschiedenen Basis-Sekundärstrukturen im CD-Spektrum.....	30
Abbildung 10:	Aufbau OCD-Messzelle.....	31
Abbildung 11:	Veränderung des OCD-Spektrums in Abhängigkeit von der Helixorientierung.....	32
Abbildung 12:	Zeeman-Effekt für einen I = ½ Kern.....	34
Abbildung 13:	Schematische Darstellung einer NMR-Messung.....	35
Abbildung 14:	Schematische Darstellung der Fouriertransformation.....	36
Abbildung 15:	Beispiel für ein 2D Puls Experiment.....	36
Abbildung 16:	Kombination mehrerer einzelner NMR Experimente zu einem 2D Spektrum.....	37
Abbildung 17:	Vektorkarte des Expressionsplasmids pd29G bzw. pd46.....	54
Abbildung 18:	Schematische Darstellung des für die Lipidbindungsstudien verwendeten Konstruktes.....	82
Abbildung 19:	Bindung des E ^{rms} -Ankers an verschieden zusammengesetzten Lipidvesikel.....	84
Abbildung 20:	Zeitabhängigkeit der Lipidbindung.....	85
Abbildung 21:	Temperaturabhängigkeit der Lipidbindung.....	86
Abbildung 22:	Einfluss der Lipidfluidität auf die Lipidbindung des E ^{rms} -Ankers.....	87
Abbildung 23:	Mehrfach negativ geladene Lipide.....	88
Abbildung 24:	Einfluss von Mizellen auf die Lipidbindung.....	89
Abbildung 25:	Schematische Darstellung einer Bizelle.....	90
Abbildung 26:	Einfluss verschiedener Lipidzusammensetzungen auf die Bindung des E ^{rms} -Ankers an Bizellen.....	91
Abbildung 27:	Einfluss negativ geladener Bizellen auf die Lipidbindung der E ^{rms} -Ankers.....	92
Abbildung 28:	Bindung des E ^{rms} -Ankers an simulierte biologische Membranen.....	93
Abbildung 29:	Einfluss verschiedener ladungsverändernder Punktmutationen auf die Lipidbindungsfähigkeit des E ^{rms} -Ankers.....	94
Abbildung 30:	Sequenzen der Proteine mit mehreren ladungsverändernden Aminosäureaustauschen und deren Gesamtladung.....	95
Abbildung 31:	Einfluss verschiedener proteinladungsverändernder Mutationen auf die Lipidbindung des E ^{rms} -Ankers.....	96
Abbildung 32:	Aminosäuresequenzen der verwendeten amphipatischen Helices.....	97
Abbildung 33:	Lipidbindungsanalysen verschiedener amphipatische Helices.....	98
Abbildung 34:	Lipidbindungsanalysen von im biologischen System phänotypisch auffälligen Mutanten.....	99

Abbildung 35:	„ <i>Helical Wheel</i> “ Modell des E ^{rms} -Ankers von BVDV CP7	100
Abbildung 36:	Änderung des amphipatischen Charakters durch eine Alanininsertion	101
Abbildung 37:	Auswirkung von Alanininsertionen auf die Lipidbindung	102
Abbildung 38:	Lipidbindungsanalysen ausgewählter Prolinsubstitutionen	103
Abbildung 39:	Lipidbindungsanalysen ausgewählter Prolininsertionen	104
Abbildung 40:	Lipidbindungsanalysen von E ^{rms} -Ankervarianten mit größeren Aminosäureinsertionen	105
Abbildung 41:	Aminosäuresequenzen der verwendeten N-terminal verkürzten E ^{rms} -Ankerkonstrukte	106
Abbildung 42:	Lipidbindungsanalysen von N- terminalen Verkürzungen des E ^{rms} -Ankers	106
Abbildung 43:	Aminosäuresequenzen der verwendeten E ^{rms} -Ankerfragmente	107
Abbildung 44:	Lipidbindungsanalysen von E ^{rms} -Ankermutanten, mit sowohl N- als auch C-terminalen Verkürzungen	108
Abbildung 45:	Lipidbindungsanalysen von Teilbereichen des E ^{rms} -Ankers mit Alanininsertionen	109
Abbildung 46:	Lipidbindungsanalysen von Teilbereichen des E ^{rms} -Ankers mit verschiedenen Prolinsubstitutionen	110
Abbildung 47:	Aminosäuresequenzen der verwendeten C-terminal verkürzten Konstrukte	111
Abbildung 48:	Lipidbindungsanalysen von weiteren C-terminal verkürzten E ^{rms} -Ankermutanten	112
Abbildung 49:	Sequenzen der mit Aminosäuren von E1 verlängerten E ^{rms} -Ankervarianten	113
Abbildung 50:	Lipidbindungsanalysen von E ^{rms} -Ankervarianten, die mit Aminosäuren von E1 verlängert wurde	114
Abbildung 51:	Konstrukte für die CD-Analysen	115
Abbildung 52:	CD-Spektrum des E ^{rms} -Ankers in 50% TFE und Phosphatpuffer	116
Abbildung 53:	Vorhergesagter helikaler Anteil des E ^{rms} -Ankers in verschiedenen chemischen Systemen	117
Abbildung 54:	CD-Spektren des E ^{rms} -Ankers gemessen bei verschiedenen Protein/Lipidverhältnissen	118
Abbildung 55:	Sequenzen der verwendeten Peptide	119
Abbildung 56:	Vorhergesagter helikaler Faltungsanteil von BVDV und CSFV in 50 % TFE und Mizellen	120
Abbildung 57:	Vorhergesagter helikaler Faltungsanteil von BVDV und CSFV in reinem DMPC und DMPC/DMPG-Vesikeln	121
Abbildung 58:	Vorhergesagter helikaler Faltungsanteil trunkierter E ^{rms} -Ankersequenzen in Bizellen	121
Abbildung 59:	CD-Spektrum von Erms_6-4 in Bizellen	122
Abbildung 60:	Vorhergesagter helikaler Faltungsanteil von Erms_4 und Erms_5 in Bizellen	123
Abbildung 61:	CD-Spektren des carboxyterminal verlängerten E ^{rms} -Ankers in verschiedenen chemischen Systemen	124
Abbildung 62:	Anteil der helikal gefalteten Bereiche im Konstrukt Erms_1+10AS in verschiedenen chemischen Systemen	125
Abbildung 63:	OCD-Spektren des E ^{rms} -Ankers gemessen bei vier verschiedenen Protein/Lipidverhältnissen	127
Abbildung 64:	OCD-Spektrum von verschiedenen Verkürzungen/Verlängerungen des E ^{rms} -Ankers	129
Abbildung 65:	Sequenzen der für die NMR Analysen verwendeten Konstrukte	130
Abbildung 66:	¹ H- ¹⁵ N HSQC-Spektrum von E ^{rms} -1	131
Abbildung 67:	CLEANEX-Spektrum von E ^{rms} -1	132
Abbildung 68:	Normierte Protonenaustauschrates von E ^{rms} -1	133
Abbildung 69:	¹ H- ¹⁵ N HSQC-Spektrum von E ^{rms} -1-2	134
Abbildung 70:	CLEANEX-Spektrum von E ^{rms} -1-2	135
Abbildung 71:	Vergleich der normierten Protonenaustauschrates von E ^{rms} -1 und E ^{rms} -1-2	136
Abbildung 72:	Vergleich der normierten Protonenaustauschrates von E ^{rms} -4 und E ^{rms} -5 mit E ^{rms} -1	138
Abbildung 73:	Zusammenfassung der CLEANEX Ergebnisse	139
Abbildung 74:	Beispiel des ¹ H- ¹⁵ N-NOESY Spektrums von E ^{rms} -1	140
Abbildung 75:	Faltungsmodell unterstützt durch NOESY-Daten von E ^{rms} -1	141
Abbildung 76:	Relaxationsmessungen von E ^{rms} -1	141
Abbildung 77:	Zusammenfassung der NMR Ergebnisse für das C-terminale Fragment des E ^{rms} -Ankers	153
Abbildung 78:	3D-Faltungsmodell des E ^{rms} C-Terminus	155
Abbildung 79:	Hypothetisches 3D-Strukturmodell des E ^{rms} -Ankers	157

Literaturverzeichnis

1. Lindenbach, B.D., C.M. Rice, D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*, in *Fields Virology*. 2001, Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, New York. p. 991-1042.
2. Krey, T., A. Himmelreich, M. Heimann, C. Menge, H.J. Thiel, K. Maurer, and T. Rüménapf, *Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1*. J Virol, 2006. **80**(8): p. 3912-3922.
3. Krey, T., E. Moussay, H.J. Thiel, and T. Rüménapf, *Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine viral diarrhea virus*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10862-10867.
4. *Epidemiologisches Bulletin 04 / 2012*. Robert Koch-Institut, 2012.
5. Major, M.E., B. Rehermann, S.M. Feinstone, D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Hepatitis C Viruses*, in *Fields Virology*. 2001, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, New York. p. 1127-1162.
6. Weiland, F., E. Weiland, G. Unger, A. Saalmüller, and H.J. Thiel, *Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 5): p. 1157-1165.
7. Riedel, C., B. Lamp, M. Heimann, M. König, S. Blome, V. Moennig, C. Schüttler, H.J. Thiel, and T. Rüménapf, *The core protein of classical Swine Fever virus is dispensable for virus propagation in vitro*. PLoS Pathog, 2012. **8**(3): p. e1002598.
8. Collett, M.S., R. Larson, S. Belzer, and E. Retzel, *Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: The genome organization of a pestivirus*. Virology, 1988. **165**: p. 200-208.
9. Collett, M.S., M.A. Wiskerchen, E. Welniak, and S.K. Belzer, *Bovine viral diarrhea virus genomic organization*. Arch.Virol.Suppl, 1991. **3**: p. 19-27.
10. Lamp, B., C. Riedel, G. Roman-Sosa, M. Heimann, S. Jacobi, P. Becher, H.J. Thiel, and T. Rüménapf, *Biosynthesis of classical swine fever virus nonstructural proteins*. J Virol, 2011. **85**(7): p. 3607-3620.
11. Gil, L.H., I.H. Ansari, V. Vassilev, D. Liang, V.C. Lai, W. Zhong, Z. Hong, E.J. Dubovi, and R.O. Donis, *The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism*. J.Virol., 2006. **80**(2): p. 900-911.
12. Hilton, L., K. Moganeradj, G. Zhang, Y.H. Chen, R.E. Randall, J.W. McCauley, and S. Goodbourn, *The NPro product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation*. J.Virol., 2006. **80**(23): p. 11723-11732.
13. Rüggli, N., B.H. Bird, L. Liu, O. Bauhofer, J.D. Tratschin, and M.A. Hofmann, *N(pro) of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN-alpha/beta induction*. Virology, 2005. **340**(2): p. 265-276.
14. Lackner, T., A. Müller, M. König, H.J. Thiel, and N. Tautz, *Persistence of bovine viral diarrhea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease*. J Virol, 2005. **79**(15): p. 9746-9755.
15. Rinck, G., C. Birghan, T. Harada, G. Meyers, H.J. Thiel, and N. Tautz, *A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus*. J Virol, 2001. **75**(19): p. 9470-9482.

16. Tautz, N., A. Kaiser, and H.J. Thiel, *NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions*. *Virology*, 2000. **273**(2): p. 351-363.
17. Bolin, S.R., V. Moennig, N.E. Kelso Gourley, and J. Ridpath, *Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups*. *Arch Virol*, 1988. **99**: p. 117-123.
18. Houe, H., *Economic impact of BVDV infection in dairies*. *Biologicals*, 2003. **31**(2): p. 137-143.
19. Peterhans, E., T.W. Jungi, and M. Schweizer, *BVDV and innate immunity*. *Biologicals*, 2003. **31**(2): p. 107-112.
20. Peterhans, E. and M. Schweizer, *BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response*. *Biologicals*, 2012.
21. Peterhans, E. and M. Schweizer, *Pestiviruses: how to outmaneuver your hosts*. *Vet Microbiol*. **142**(1-2): p. 18-25.
22. Schweizer, M., P. Mätzener, G. Pfaffen, H. Stalder, and E. Peterhans, *"Self" and "nonself" manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhoea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells*. *J.Virol.*, 2006. **80**(14): p. 6926-6935.
23. Moennig, V. and P.G.W. Plagemann, *The pestiviruses*. *Adv Vir Res*, 1992. **41**: p. 53-98.
24. Thiel, H.J., P.G.W. Plagemann, V. Moennig, B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Pestiviruses*, in *Fields Virology*. 1996, Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, New York. p. 1059-1073.
25. Meyers, G., A. Ege, C. Fetzer, F.M. von, K. Elbers, V. Carr, H. Prentice, B. Charleston, and E.M. Schürmann, *Bovine viral diarrhoea virus: Prevention of persistent foetal infection by a combination of two mutations affecting the Erns RNase and the Npro protease*. *J.Virol.*, 2007. **0**(JVI.): p. 02372-02306.
26. Meyers, G., A. Saalmüller, and M. Büttner, *Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein e(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation*. *J Virol*, 1999. **73**(12): p. 10224-10235.
27. Hulst, M.M. and R.J. Moormann, *Erns protein of pestiviruses*. *Methods Enzymol.*, 2001. **342**: p. 431-440.
28. Tews, B.A., E.M. Schürmann, and G. Meyers, *Mutation of cysteine 171 of pestivirus E^{rns} RNase prevents homodimer formation and leads to attenuation of classical swine fever virus*. *J Virol*, 2009. **83**(10): p. 4823-4834.
29. Krey, T., F. Bontems, C. Vonrhein, M.C. Vaney, G. Bricogne, T. Rümenapf, and F.A. Rey, *Crystal structure of the pestivirus envelope glycoprotein E^{rns} and mechanistic analysis of its ribonuclease activity*. *Structure*, 2012. **20**(5): p. 862-873.
30. Hausmann, Y., G. Roman-Sosa, H.J. Thiel, and T. Rümenapf, *Classical swine fever virus glycoprotein E rns is an endoribonuclease with an unusual base specificity*. *J.Virol.*, 2004. **78**(10): p. 5507-5512.
31. Schneider, R., G. Unger, R. Stark, E. Schneider-Scherzer, and H.J. Thiel, *Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease*. *Science*, 1993. **261**: p. 1169-1171.
32. Luhtala, N. and R. Parker, *T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles*. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(5): p. 253-259.

33. Iqbal, M., E. Poole, S. Goodbourn, and J.W. McCauley, *Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA*. J.Virol., 2004. **78**(1): p. 136-145.
34. Magkouras, I., P. Mätzener, T. Rümenapf, E. Peterhans, and M. Schweizer, *RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 10): p. 2501-2506.
35. Fetzer, C., B.A. Tews, and G. Meyers, *The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein E(rns) represents an unusual type of membrane anchor*. J.Virol., 2005. **79**(18): p. 11901-11913.
36. Baumgart, T., B.R. Capraro, C. Zhu, and S.L. Das, *Thermodynamics and mechanics of membrane curvature generation and sensing by proteins and lipids*. Annu Rev Phys Chem. **62**: p. 483-506.
37. Burrack, S., D. Aberle, J. Bürck, A.S. Ulrich, and G. Meyers, *A new type of intracellular retention signal identified in a pestivirus structural glycoprotein*. FASEB J, 2012. **26**(8): p. 3292-3305.
38. Tews, B.A. and G. Meyers, *The Pestivirus Glycoprotein Erns Is Anchored in Plane in the Membrane via an Amphipathic Helix*. J.Biol.Chem., 2007. **282**(45): p. 32730-32741.
39. Bintintan, I. and G. Meyers, *A new type of signal peptidase cleavage site identified in an RNA virus polyprotein*. J Biol Chem. **285**(12): p. 8572-8584.
40. Arago, D.-F.-M., Mem. Inst. Fr., 1811. **12**: p. 93.
41. Pasteur, L., C. R. Acad. Sci. Paris, 1848. **26**: p. 535-539.
42. van't Hoff, J.H., *La Chimie dans L'Espace*. 1875.
43. Le Bel, J.A., Bull. Soc. Chim. fr., 1874. **22**: p. 337-347.
44. Bulheller, B.M., A. Rodger, and J.D. Hirst, *Circular and linear dichroism of proteins*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2007. **9**(17): p. 2020-2035.
45. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1751**(2): p. 119-139.
46. Urnes, P. and P. Doty, *Optical rotation and the conformation of polypeptides and proteins*. Adv Protein Chem, 1961. **16**: p. 401-544.
47. Holzwarth, G. and P. Doty, *The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides*. J Am Chem Soc, 1965. **87**: p. 218-228.
48. Wallace, B.A., J.G. Lees, A.J.W. Orry, A. Loble, and R.W. Janes, *Analyses of circular dichroism spectra of membrane proteins*. Protein Sci, 2003. **12**(4): p. 875-884.
49. Bürck, J., S. Roth, P. Wadhvani, S. Afonin, N. Kanithasen, E. Strandberg, and A.S. Ulrich, *Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by OCD*. Biophys J, 2008.
50. Wu, Y., H.W. Huang, and G.A. Olah, *Method of oriented circular dichroism*. Biophys J, 1990. **57**(4): p. 797-806.
51. de Jongh, H.H.J., E. Goormaghtigh, and J.A. Killian, *Analysis of Circular Dichroism Spectra of Oriented Protein-Lipid Complexes: Toward a General Application*. Biochemistry, 1994. **33**(48): p. 14521-14528.

52. Yang, L., T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding, and H.W. Huang, *Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores*. Biophys J, 2001. **81**(3): p. 1475-1485.
53. Levitt, M.H., *spin dynamics - Basic of Nuclear Magnetic Resonance* Vol. Second Edition. 2009: Wiley.
54. Bogomolovas, J., B. Simon, M. Sattler, and G. Stier, *Screening of fusion partners for high yield expression and purification of bioactive viscotoxins*. Protein Expr Purif, 2009. **64**(1): p. 16-23.
55. Harlan, J.E., P.J. Hajduk, H.S. Yoon, and S.W. Fesik, *Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*. Nature, 1994. **371**(6493): p. 168-170.
56. Hinz, H.-J., *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*. 1986, Berlin: Springer-Verlag.
57. le Maire, M., P. Champeil, and J.V. Møller, *Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. **1508**(1-2): p. 86-111.
58. Pace, C.N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray, *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Protein Sci, 1995. **4**(11): p. 2411-2423.
59. Whitmore, L. and B.A. Wallace, *DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W668-673.
60. Whitmore, L. and B.A. Wallace, *Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases*. Biopolymers, 2008. **89**(5): p. 392-400.
61. Johnson, W.C., *Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures*. Proteins, 1999. **35**(3): p. 307-312.
62. Provencher, S.W. and J. Glockner, *Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism*. Biochemistry, 1981. **20**(1): p. 33-37.
63. Sreerama, N. and R.W. Woody, *A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism*. Anal Biochem, 1993. **209**(1): p. 32-44.
64. Hwang, T.L., P.C. van Zijl, and S. Mori, *Accurate quantitation of water-amide proton exchange rates using the phase-modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC (FHSQC) detection scheme*. J Biomol NMR, 1998. **11**(2): p. 221-226.
65. Hammarstrom, M., N. Hellgren, S. van Den Berg, H. Berglund, and T. Hard, *Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in Escherichia coli*. Protein Sci, 2002. **11**(2): p. 313-321.
66. Sun, C., J. Liang, R. Shi, X. Gao, R. Zhang, F. Hong, Q. Yuan, and S. Wang, *Tobacco etch virus protease retains its activity in various buffers and in the presence of diverse additives*. Protein Expr Purif. **82**(1): p. 226-231.
67. Huth, J.R., C.A. Bewley, B.M. Jackson, A.G. Hinnebusch, G.M. Clore, and A.M. Gronenborn, *Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR*. Protein Sci, 1997. **6**(11): p. 2359-2364.
68. Mohanty, P., J. Lee, K.J. Glover, and K. Landskron, *Discoïd Bicelles as Efficient Templates for Pillared Lamellar Periodic Mesoporous Silicas at pH 7 and Ultrafast Reaction Times*. Nanoscale Res Lett. **6**(1): p. 61.
69. Lipowsky, R. and E. Sackmann, *Structure and Dynamics of Membranes*. 1995: Elsevier.

70. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 112-124.
71. Huang, H.W. and Y. Wu, *Lipid-alamethicin interactions influence alamethicin orientation*. Biophys J, 1991. **60**(5): p. 1079-1087.
72. Durr, U.H., M. Gildenberg, and A. Ramamoorthy, *The Magic of Bicelles Lights Up Membrane Protein Structure*. Chem Rev, 2012.
73. Andrec, M., G.T. Montelione, and R.M. Levy, *Estimation of dynamic parameters from NMR relaxation data using the Lipari-Szabo model-free approach and Bayesian statistical methods*. J Magn Reson, 1999. **139**(2): p. 408-421.
74. Mätzner, P., I. Magkouras, T. Rümenapf, E. Peterhans, and M. Schweizer, *The viral RNase E(rns) prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs*. Virus Res, 2008. **140**(1-2): p. 15-23.
75. Von Freyburg, M., A. Ege, A. Saalmüller, and G. Meyers, *Comparison of the effects of RNase-negative and wild-type classical swine fever virus on peripheral blood cells of infected pigs*. J.Gen.Virol., 2004. **85**(Pt 7): p. 1899-1908.
76. Nilsson, I., A.E. Johnson, and G. von Heijne, *Cleavage of a tail-anchored protein by signal peptidase*. FEBS Lett, 2002. **516**(1-3): p. 106-108.
77. Nilsson, I., P. Whitley, and G. von Heijne, *The COOH-terminal ends of internal signal and signal-anchor sequences are positioned differently in the ER translocase*. J Cell Biol, 1994. **126**(5): p. 1127-1132.
78. Iqbal, M. and J.W. McCauley, *Identification of the glycosaminoglycan-binding site on the glycoprotein E(rns) of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis*. J.Gen.Virol., 2002. **83**(Pt 9): p. 2153-2159.
79. Cui, H., E. Lyman, and G.A. Voth, *Mechanism of membrane curvature sensing by amphipathic helix containing proteins*. Biophys J, 2011. **100**(5): p. 1271-1279.
80. Drin, G. and B. Antony, *Amphipathic helices and membrane curvature*. FEBS Lett, 2009. **584**(9): p. 1840-1847.
81. Hatzakis, N.S., V.K. Bhatia, J. Larsen, K.L. Madsen, P.Y. Bolinger, A.H. Kunding, J. Castillo, U. Gether, P. Hedegard, and D. Stamou, *How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(11): p. 835-841.
82. Walther, T.H., C. Gottselig, S.L. Grage, M. Wolf, A.V. Vargiu, M.J. Klein, S. Vollmer, S. Prock, M. Hartmann, S. Afonin, E. Stockwald, H. Heinzmann, O. Nolandt, W. Wenzel, P. Ruggerone, and A.S. Ulrich, *Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a novel charge zipper mechanism*. Cell, 2012. **in press**.
83. Langedijk, J.P., *Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and ribotoxin L3 loop*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5308-5314.
84. Pogodin, S., N.K. Slater, and V.A. Baulin, *Biomolecule surface patterning may enhance membrane association*. ACS Nano, 2012. **6**(2): p. 1308-1313.
85. Iqbal, M., H. Flick-Smith, and J.W. McCauley, *Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans*. J.Gen.Virol., 2000. **81**(Pt 2): p. 451-459.
86. Bhatia, V.K., K.L. Madsen, P.Y. Bolinger, A. Kunding, P. Hedegard, U. Gether, and D. Stamou, *Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing*. Embo J, 2009. **28**(21): p. 3303-3314.

87. Prinz, W.A. and J.E. Hinshaw, *Membrane-bending proteins*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2009. **44**(5): p. 278-291.
88. Stachowiak, J.C., E.M. Schmid, C.J. Ryan, H.S. Ann, D.Y. Sasaki, M.B. Sherman, P.L. Geissler, D.A. Fletcher, and C.C. Hayden, *Membrane bending by protein-protein crowding*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(9): p. 944-949.
89. Pednekar, D., Y. Wang, T.V. Fedotova, and R.J. Wojcikiewicz, *Clustered hydrophobic amino acids in amphipathic helices mediate erlin1/2 complex assembly*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(1): p. 135-140.
90. Dathe, M. and T. Wieprecht, *Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1462**(1-2): p. 71-87.
91. Berneche, S., M. Nina, and B. Roux, *Molecular dynamics simulation of melittin in a dimyristoylphosphatidylcholine bilayer membrane*. Biophys J, 1998. **75**(4): p. 1603-1618.
92. Raghuraman, H. and A. Chattopadhyay, *Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions*. Biosci Rep, 2007. **27**(4-5): p. 189-223.
93. Liu, L., W.M. Westler, J.A. den Boon, X. Wang, A. Diaz, H.A. Steinberg, and P. Ahlquist, *An amphipathic alpha-helix controls multiple roles of brome mosaic virus protein 1a in RNA replication complex assembly and function*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000351.
94. Gouttenoire, J., R. Montserret, A. Kennel, F. Penin, and D. Moradpour, *An amphipathic alpha-helix at the C terminus of hepatitis C virus nonstructural protein 4B mediates membrane association*. J Virol, 2009. **83**(21): p. 11378-11384.
95. Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H.E. Blum, R. Bartenschlager, and D. Moradpour, *Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40835-40843.

Lebenslauf

Zur Person:

Daniel Aberle
Französische Allee 4
72072 Tübingen
geboren am 23.06.1983
in Stuttgart
verheiratet

Schulische Ausbildung:

1989 – 1993	Grundschule Pfingstweideschule in Ostfildern
1993 – 1999	Realschule Riegelhofschule in Ostfildern
1999 – 2002	Naturwissenschaftliches-Technisches Gymnasium Kerschensteinerschule in Stuttgart Feuerbach mit fachgebundener Hochschulreife als Abschluss und Ausbildung zum Chemisch-Technischer Assistenten
Okt. 2003 – Sept. 2008	Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen im Diplomstudiengang Biochemie
Jan. 2008 – Sept. 2008	Diplomarbeit am Friedrich-Loeffler-Institut in Tübingen: <i>„Versuche zur Expression, Reinigung und Strukturellen Charakterisierung des Membranankers eines viralen Glykoproteins“</i>
Okt. 2008 – vor. Feb. 2013	Promotion am Friedrich-Loeffler-Institut in Tübingen seit Juni 2011 am Standort Insel Riems

Praktika während des Studiums:

- Labor für Präklinische Bildgebung, Universitätsklinik Tübingen (6 Wochen)
- Institut für Toxikologie, Universität Tübingen (6 Wochen)
- International Center for Chemical Sciences, University of Karachi, Pakistan (5 Wochen)
- Versuchstierkundliches Privatissimum zur Erlangung Tierschutz- und Versuchstierkundlicher Fachkenntnisse nach §9 Abs. 1 des TSchG, Universität Tübingen (9 x 4h)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 2008 bis Dezember 2012 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gregor Meyers am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit, in Tübingen und auf der Insel Riems angefertigt.

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mich bei dieser Arbeit und in dieser Zeit unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Gregor Meyers für die Überlassung dieses äußerst interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und allen weiteren notwendigen Voraussetzungen. Zusätzlich möchte ich ihm für die Freiräume bei der Arbeit, die stetige Diskussionsbereitschaft und seine kompetente Betreuung danken.

Prof. Dr. Thilo Stehle für seine Bereitschaft diese Arbeit gegenüber der Fakultät zu vertreten und das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Prof. Dr. Anne Ulrich für die Möglichkeit die CD- und NMR-Messungen in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, die fachliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Dr. Jochen Bürck für die Durchführung und Hilfe bei den CD- und OCD-Messungen, der fachlichen Diskussion und die guten Ratschläge bei der Korrektur des CD-Abschnitts dieser Doktorarbeit.

Dr. Claudia Muhle-Goll für die Durchführung und Hilfe bei den NMR-Messungen, der fachlichen Diskussion und für das Korrekturlesen des NMR-Abschnitts dieser Doktorarbeit.

Dr. Hubert Kalbacher für die Möglichkeit und Hilfe bei der HPLC-Aufreinigung der exprimierten Proteine in Tübingen.

Dr. Axel Karger und Barbara Bettin für die Möglichkeit der HPLC-Aufreinigung der exprimierten Proteine und die MALDI-TOF-Analysen auf der Insel Riems.

Der gesamten Arbeitsgruppe Meyers, die mich immer unterstützten, selten zu Weißglut brachten und mit denen ich viele schöne gemeinsame Aktivitäten verbinde. Ich habe viele gute Freunde gefunden, Danke dafür.

Im Einzelnen möchte ich bedanken bei:

Sabine für die schöne Zeit auf der Insel, das Korrekturlesen meiner Arbeit, das gemeinsame Kochen, die Gespräche, ...

Tine für die Unterstützung, wann immer ich Hilfe brauchte oder etwas diskutiert werden musste, ob arbeitsbedingt oder nicht.

Gaby für die schöne Zeit und für das Finden von allen Dingen, die ich nicht finden konnte.

Rene für die Zeit als mein Arbeitsplatznachbar.

Andy für die graphische Darstellung der Modelle.

Zuletzt gilt der Dank natürlich auch meiner Familie: Meinen Eltern, die mich mein ganzes Leben schon unterstützt haben und meiner Ehefrau Patricia, die diese Aufgabe seit zehn Jahren übernommen hat.