

# Strukturelle Charakterisierung von Proteinen onkolytischer Viren

## **Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades (*Dr. rer. nat*)

eingereicht am Fachbereich Chemie, Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

Vorgelegt von Marco Klinge

Hamburg, 2015



Datum der Druckfreigabe: 13.07.2015

1. Gutachter : Dr. Lars Redecke
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Betzel

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2012 bis Mai 2015 in der Arbeitsgruppe von Dr. Lars Redecke im Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung der Universitäten Lübeck und Hamburg und am Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg in der Laboren von Prof. Christian Betzel durchgeführt.

## Publikationsliste

Gati C, Bourenkov G, **Klinge M**, Rehders D, Stellato F, Oberthür D, Yefanov O, Sommer BP, Mogk S, Duszenko M, Betzel C, Schneider TR, Chapman HN, Redecke L. 2014. Serial crystallography on in vivo grown microcrystals using synchrotron radiation. *IUCrJ* 1:87–94.

Galli L, Son S-K, **Klinge M**, Bajt S, Barty A, Bean R, Betzel C, Beyerlein KR, Caleman C, Doak RB, Duszenko M, Fleckenstein H, Gati C, Hunt B, Kirian RA, Liang M, Nanao MH, Nass K, Oberthür D, Redecke L, Shoeman R, Stellato F, Yoon CH, White TA, Yefanov O, Spence J, Chapman HN. 2015. Electronic damage in S atoms in a native protein crystal induced by an intense X-ray free-electron laser pulse. *Struct Dyn* 2:041703.

Schönherr R<sup>a)</sup>, **Klinge M**<sup>a)</sup>, Rudolph JM, Fita K, Rehders D, Lübber F, Schneegans S, Majoul I V., Duszenko M, Betzel C, Brandariz-Nuñez A, Martinez-Costas J, Duden R, Redecke L. 2015. Real-time investigation of dynamic protein crystallization in living cells<sup>a)</sup>. *Struct Dyn* 2:041712. <sup>a)</sup>: authors contributed equally.

**Klinge M**, Weingart S, Manimekalai S, Grüber G, Nüesch J, Rommelaere J, Redecke L. 2015. Manganese(II) binding induces conformational changes within the parvovirus H-1 NS1 N-terminal nuclease domain. In preparation.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Glioblastome.....	1
1.1.1	Therapie von Glioblastomen .....	1
1.2	Onkolytische Viren.....	2
1.3	Parvoviren .....	4
1.3.1	Taxonomie .....	4
1.4	H-1 Parvovirus (H-1PV).....	5
1.4.1	Morphologie .....	6
1.4.2	Genomaufbau und Genprodukte.....	6
1.4.3	Lebenszyklus und DNA Replikation .....	7
1.4.4	Domänenstruktur des NS1.....	9
1.4.5	Zytotoxische Eigenschaften des NS1.....	12
1.4.6	Apoptin.....	14
1.5	Proteinkristallographie.....	15
1.5.1	Konventionelle Röntgenstrukturanalyse.....	15
1.5.2	Moderne Entwicklungen der Röntgenstrukturanalyse.....	17
1.5.3	<i>In vivo</i> Kristallisation .....	20
1.5.4	<i>Trypanosoma brucei</i> Cathepsin B (TbCatB).....	22
1.5.5	GFP- $\mu$ NS des avianen Reovirus .....	23
2	Zielsetzung .....	24
3	Ergebnisse .....	26
3.1	Sequenzanalyse und Klonierung der NS1-Konstrukte für die Expression in <i>E. coli</i> .....	26
3.2	Initiale Expression und Reinigung der klonierten NS1 Domänen.....	27
3.3	Die C-terminale Transaktivierungsdomäne NS1 <sub>543-672</sub> .....	29
3.4	Die N-terminale Nukleasedomäne.....	31
3.4.1	Initiale strukturelle Charakterisierung in Lösung.....	31
3.4.2	Kristallisationsversuche NS1 <sub>1-284</sub> .....	32
3.4.3	Optimierung der Proteinstabilität von NS1 <sub>1-284</sub> .....	34

3.4.4	Kristallisation und Strukturaufklärung von NS1 <sub>1-265</sub> .....	39
3.4.5	Der physiologische Metallionen-Co-Faktor der Nukleasedomäne.....	44
3.5	Apoptin.....	53
3.5.1	Expression, Rückfaltung und Reinigung von Apoptin-His <sub>6</sub> .....	53
3.5.2	Expression und Reinigung von MBP-Apoptin.....	54
3.5.3	Stabilisierung von MBP-Apoptin durch intermolekulare Quervernetzung.....	55
3.5.4	SAXS-Struktur von MBP-Apoptin .....	57
3.6	Kristallisationsversuche von NS1 und von Apoptin in Sf9-Zellen.....	61
3.7	Untersuchungen der intrinsischen Stabilität von TbCatB und GFP- $\mu$ NS-Kristallen .....	62
3.7.1	Optimierung der TbCatB-Kristallisierung.....	63
3.7.2	Stabilitätstests zur Optimierung des TbCatB-Lagerungspuffers.....	64
3.7.3	Einfluss des Vakuums auf die TbCatB-Stabilität .....	66
3.7.4	Stabilitätsuntersuchungen der GFP- $\mu$ NS-Einschlüsse .....	68
3.7.5	SEM- und Pulverdiffraktionsexperimente zum Nachweis des kristallinen Charakters der GFP- $\mu$ NS-Einschlüsse .....	72
3.8	Lokalisation der intrazellulären Proteinkristallisation von TbCatB und GFP- $\mu$ NS.....	73
3.8.1	Herstellung geeigneter Fluoreszenzmarker für Sf9-Zellen .....	74
3.8.2	Co-Lokalisationsstudien der spezifischen Marker mit TbCatB-Kristallen .....	76
3.8.3	Untersuchung des Kristallisationsverhaltens von TbCatB in anderen zellulären Kompartimenten.....	79
3.8.4	Echtzeituntersuchungen der GFP- $\mu$ NS-Kristallisation in lebenden Zellen .....	82
3.9	Entwicklung eines universellen Screening-Systems für die intrazelluläre Proteinkristallisation .....	84
4	Diskussion .....	86
4.1	NS1.....	86
4.1.1	Die C-terminale Transaktivierungsdomäne.....	86
4.1.2	Die N-terminale Nukleasedomäne.....	87
4.2	Apoptin.....	91
4.3	Untersuchung der intrazellulären Proteinkristallisation .....	93
4.3.1	Stabilität von intrazellulären Proteinkristallen.....	94

4.3.2	Zellbiologische Aspekte der intrazellulären Proteinkristallisation .....	97
5	Ausblick.....	100
6	Materialien und Methoden .....	103
6.1	Materialien .....	103
6.1.1	Geräte.....	103
6.1.2	Chemikalien.....	103
6.1.3	Puffer, Medien und Lösungen .....	104
6.1.4	Proteinsequenzen .....	108
6.1.5	E. Coli Stämme.....	109
6.1.6	Vektoren .....	109
6.1.7	Oligonukleotide für die Klonierung.....	109
6.1.8	Verbrauchsmaterialien .....	111
6.1.9	Enzyme .....	111
6.2	Methoden .....	112
6.2.1	Bioinformatische Methoden.....	112
6.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	112
6.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	115
6.2.4	Biophysikalische Methoden.....	120
6.2.5	Insektenzellkultur und Mikroskopie.....	125
7	Literaturverzeichnis.....	129
8	Anhang.....	146
8.1	Gefahrenstoffe nach GHS .....	146
8.1.1	Kommerzielle Kristallisations-Suites .....	148
8.2	Hinweise für Gefahrenstoffe .....	148
9	Danksagung.....	152

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
μ	mikro
Å	Angström
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Akt	Proteinase B
APC/C	<i>anaphase promoting complex/ cyclosome</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
CatB	Cathepsin B
CAV	<i>Chicken Anemia Virus</i>
CD	Zirkulardichroismus
DTT	1,4-Dithiothreitol
CKIIa	Casein-Kinase II a
CT	Computertomographie
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DLS	Dynamische Laserlichtstreuung
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
F	Filamentäres Aktin
f	femto
FEL	Freier Elektronenlaser
GBM	<i>Glioblastoma multiforme</i>
Gy	Gray
H-1PV	H-1 Parvovirus
hBoV	humanes Bocavirus
HUH-Motiv Motiv	Histidin-Hydrophob-Histidin
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LCLS	<i>Linac Coherent Light Source</i>
LRD	Leucin-reiche Domäne
m	Meter
MGy	Megagray
M	molar
Me <sup>2+</sup>	zweiwertiges Metallion
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomatographie

MVM	<i>minute virus of mice</i>
NES	Kernexportsequenz/ nuclear export signal
NLS	Kernlokalizationssignal
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
MBP	Maltose-bindendes Protein
nm	Nanometer
NS	Nichtstrukturprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
nt	Nukleotid
<i>Tb</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
CatB	Cathepsin B
OL	<i>occluding loop</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
ORI	<i>origin of replication</i>
OV	onkolytische Viren
PAA	Polyacrylamid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SAT	<i>small alternativley translated protein</i>
SDS	Natriumdodekylsulfat
SFX	Femtosekunden-Kristallographie
S-Phase	Synthese-Phase
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
SV 40	<i>Simian vacuolating virus 40</i>
tar	<i>trans-activation responsive element</i>
<i>Tb</i>	<i>Trypanosoma bruceii</i>
<i>TEV</i>	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TbCatB	<i>Trypanosome bruceii Cathepsin B</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
trs	<i>terminal resolution site</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VP	Capsidprotein
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT1	Wilms Tumor 1
SAXS	Röntgenkleinwinkelbeugung
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie

## Zusammenfassung

Onkolytische Viren, wie das H-1 Parvovirus (H-1PV), stellen vielversprechende Alternativen für die Behandlung von Tumorerkrankungen dar, da sie in der Lage sind, selektiv in entarteten Zellen zu replizieren und diese zu abzutöten, ohne dabei gesundes Gewebe zu beeinträchtigen. Für H-1PV wurde das multifunktionelle Nichtstrukturprotein 1 (NS1) als Basis für den Onkotropismus identifiziert, welches aus mehreren Domänen besteht und neben seiner zentralen Rolle für die virale Replikation in der Lage ist, molekulare Interaktionen mit verschiedenen, oft hochregulierten Replikationsfaktoren der Tumorzelle einzugehen. Diese Interaktionen resultieren in einer tumorspezifischen NS1-vermittelten Zytotoxizität, deren molekulare Basis jedoch bisher vor allem aufgrund des Fehlens hochauflösender Strukturdaten nicht vollständig verstanden ist.

In dieser Arbeit wurde die Grundlage für die strukturelle Untersuchung der einzelnen NS1-Domänen nach bakterieller Expression geschaffen, wobei sich die N-terminale Nukleasedomäne (NS1<sub>1-265</sub>) als geeignete Zielstruktur herausstellte. Diese Nuklease der HUH-Familie katalysiert die spezifische Spaltung der viralen DNA während der *rolling hairpin* Replikation und ist damit für den Lebenszyklus des Virus essentiell. Nach löslicher Expression und Reinigung konnte NS1<sub>1-265</sub> erfolgreich kristallisiert und ein Strukturmodell mit einer maximalen Auflösung von 2.8 Å postuliert werden, das eine signifikante Übereinstimmung mit der bereits strukturell aufgeklärten homologen Nukleasedomäne des *minute virus of mice* (MVM) aufweist. Das Strukturmodell zeigt deutlich das konservierte HUH-Motiv, das für die Bindung eines zweiwertigen Kations (Me<sup>2+</sup>) verantwortlich ist. Dies ist für die Nukleaseaktivität von NS1<sub>1-265</sub> essentiell, da es die Nukleophilie des katalytischen Tyr-210 für den Angriff auf das Phosphatrückgrat erhöht. Durch *Microscale* Thermophorese (MST) sowie isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Mn<sup>2+</sup>, jedoch nicht Mg<sup>2+</sup> an das HUH-Motiv von NS1<sub>1-265</sub> bindet und zur Aktivierung der Nukleasefunktion führt. Ferner konnte mittels Kleinwinkelstreuung (SAXS) eine spezifische, aber bisher völlig unbekannt Konformationsänderung nach Bindung von Mn<sup>2+</sup> beobachtet werden, was höchstwahrscheinlich durch den Übergang in die aktive Form des Enzyms begründet ist. Basierend auf den hier präsentierten Daten wird Mn<sup>2+</sup> als essentieller nativer Cofaktor für die Nukleaseaktivität von H-1PV NS1<sub>1-265</sub> postuliert.

Ein weiteres onkolytisches Protein ist das Apoptin aus dem Hühner-Anämie-Virus (CAV, aus engl. *chicken anemia virus*), dessen Co-Expression mit H-1PV NS1 in vorherigen Studien zu einem verstärkten onkolytischen Effekt in einer Vielzahl von Tumorzelllinien führte und deshalb in dieser Arbeit ebenfalls strukturell untersucht wurde. Apoptin konnte in Fusion mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP-Apoptin) löslich hergestellt und gereinigt werden und bestätigte die durch vorherige Publikationen bereits gezeigte Ausbildung eines spezifischen Oligomers. Mit Hilfe eines SAXS-Modells konnte gezeigt werden, dass der MBP-Apoptin-Komplex ein ringförmiges Hexadekamer ausbildet, was die erste Strukturinformation dieses Proteins in Lösung darstellt.

Da jedoch weder für Apoptin noch für die weiteren NS1-Domänen Proteinkristalle durch Anwendung der etablierten Kristallisationstechniken gebildet werden konnten, wurde die Möglichkeit der kürzlich publizierten intrazellulären Proteinkristallisation in Sf9-Zellen als alternativer Ansatz untersucht. Nachdem initiale *in vivo*-Kristallisationsversuche nicht erfolgreich waren, wurden am Beispiel von Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei* (TbCatB), dessen hochauflösende Struktur aus intrazellulären Proteinkristallen bereits generiert werden konnte, sowie von GFP- $\mu$ NS aus dem avianen Reovirus, die zellulären Grundlagen für die Kristallisation in lebenden Sf9-Zellen näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass TbCatB im endoplasmatischen Retikulum kristallisiert, während die Kristallisation von GFP- $\mu$ NS im Zytosol der Sf9-Zellen stattfindet. Folglich könnte das Kompartiment der Sf9-Zelle einen ersten wichtigen Parameter zur Erhöhung des intrazellulären Kristallisationserfolgs auch für weitere Proteine darstellen. Des Weiteren wurde für isolierte Kristalle eine starke Stabilitätsabhängigkeit vom verwendeten Lysis- und Lagerungspuffer nachgewiesen, was den Bedarf an neuen Ansätzen zur Etablierung optimaler Messbedingungen für intrazelluläre Proteinkristalle verdeutlicht. Ein besseres Verständnis der intrazellulären Proteinkristallisation sowie die Optimierung der Kristallstabilität werden neue Möglichkeiten zur strukturellen Aufklärung von Proteinen onkolytischer Viren bieten, die bisher mit klassischen Ansätzen nicht kristallisiert werden konnten. Die Strukturaufklärung dieser Proteine wird essentiell sein, um die Entwicklung innovativer Therapien in der Behandlung von Tumorerkrankungen zu ermöglichen

## Summary

Oncolytic viruses, e.g. the H-1 parvovirus (H-1PV), represent promising candidates for the treatment of cancer due to their selective replication in transformed cells, thus leading to tumor cell death without harming healthy tissue. For H-1PV the multidomain and multifunctional nonstructural protein 1 (NS1) was identified to be the basis of the selective oncotropism, featuring pivotal functions for viral replication. Additionally, NS1 interacts with frequently upregulated replication factors of the tumor cell, thus leading to NS1-induced cytotoxicity. However, due to the lack of high-resolution structural information the precise molecular basis for the oncoselectivity of NS1 remains elusive so far.

This work provides the required basis for the structural characterization of the individual NS1 domains, identifying the N-terminal nuclease domain (NS1<sub>1-265</sub>) as a suitable target for structural characterization. This nuclease domain catalyzes the nicking of the dsDNA during viral rolling hairpin replication, thus playing a pivotal role within the viral life cycle. Successful protein crystallization of NS1<sub>1-265</sub> led to the proposal of a structural model at 2.8 Å resolution, which reveals significant structural similarity with that of the homologue minute virus of mice (MVM) NS1<sub>1-255</sub>, also featuring the conserved HUH metal binding site. Metal binding is required to increase the nucleophilicity of the active Tyr-210 residue, thus providing an essential function of the protein. Microscale thermophoresis (MST) and isothermal titration calorimetry (ITC) clearly identified that Mn<sup>2+</sup>, but not Mg<sup>2+</sup> specifically binds to the NS1<sub>1-265</sub> HUH-motif with nanomolar affinity, triggering its specific nuclease activity. In addition, small angle x-ray scattering (SAXS) experiments revealed the induction of a conformational rearrangement upon Mn<sup>2+</sup> binding, converting NS1<sub>1-265</sub> into its active form. Thus, Mn<sup>2+</sup> is suggested to act as the native cofactor for the H1-PV nuclease domain for the first time.

Another oncolytic viral protein is apoptin from chicken anemia virus, which has been shown to increase H-1PV NS1 cytotoxicity in a variety of tumor cells. Apoptin was expressed and purified fused to maltose binding protein (MBP), forming a specific oligomer in solution that was characterized by dynamic light scattering experiments, consistent with previously published results. Applying SAXS techniques, an initial low-resolution model of the MBP-apoptin complex was calculated, indicating a ring-shaped symmetric hexadecamer structure with an apoptin core surrounded by the MBP domains of each molecule.

Since conventional crystallization of apoptin and further NS1 domains could not be established so far, the possibility for intracellular protein crystallization in Sf9 insect cells was initially tested as an alternative approach, however, without any success. Therefore, the cellular basis for this phenomenon was further investigated using intracellularly grown TbCatB crystals, recently reported to be suitable for structural biology at free electron lasers (FEL) and synchrotron sources, and GFP- $\mu$ NS from avian Reovirus as representative examples. For TbCatB, fluorescence microscopy experiments clearly revealed the endoplasmic reticulum to be the cellular compartment of crystal formation, while GFP- $\mu$ NS is supposed to crystallize from the cytosol of the Sf9 cell. Thus, the cellular compartment is suggested to represent an essential parameter for successful intracellular protein crystallization. Furthermore, crystal stability was shown to be strongly dependent on the used buffer, emphasizing the need for new strategies optimizing crystal stability and diffraction quality.

An improved understanding of the mechanisms underlying intracellular crystal formation may open new routes for the structural elucidation of proteins that are difficult to crystallize applying conventional approaches so far, especially proteins from oncolytic viruses. A better understanding of the molecular basis leading to oncoselectivity will finally provide new approaches for the development of antitumoral therapies.





## 1 Einleitung

### 1.1 Glioblastome

Tumorerkrankungen stellen mit 13% eine der weltweit häufigsten Todesursachen dar. Im Jahr 2012 wurden etwa 14 Millionen neue Fälle registriert, von denen 8,2 Millionen tödlich verliefen. Darüber hinaus wird in den nächsten 20 Jahren ein Anstieg der Inzidenz um 70% erwartet, was das Bedürfnis nach neuen, innovativen Therapien in der Behandlung von Krebserkrankungen untermauert<sup>1</sup>. Etwa 2% der Tumorerkrankungen entfallen auf Hirntumore, von denen Gliome mit 34% den größten Anteil darstellen. Glioblastome, insbesondere das *Glioblastoma multiforme* (GBM), werden als die bösartigsten Gliom-Tumore bezeichnet und von der Weltgesundheitsorganisation der höchsten Risikogruppe (Grad IV Tumorerkrankungen) zugeordnet; die 12-Monats-Überlebensrate der Patienten nach Diagnose liegt bei lediglich 20%<sup>2</sup>. GBM zeichnen sich insbesondere durch erhöhte Mitoseraten, schnelles post-operatives Wachstum, Resistenzen gegenüber Radio- und Chemotherapie, sowie einer verstärkten Prävalenz von Rezidiven nach chirurgischer Resektion aus. Des Weiteren tendieren GBM zu einem infiltrierenden Wachstum in angrenzende Areale des Gehirns, was die operative Entfernung des Tumors massiv erschwert<sup>2-5</sup>. Durch das Auswandern einzelner Zellen wird zusätzlich die bildgebende Erfassung durch Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) beeinträchtigt, wodurch diese Zellen von einer chirurgischen Resektion verschont bleiben<sup>6</sup>. Dies führt dazu, dass rekurrende Gliome in der Tumorkavität entstehen, die bedeutend schwieriger zu behandeln sind als der Primärtumor<sup>7-9</sup>. Dies ist größtenteils dadurch bedingt, dass GBM keine homogene Zellpopulation darstellen: Neben den replizierenden Zellen existieren Tumorstammzellen, die eine deutlich geringere Teilungsrate aufweisen. Da klassische Tumortherapien in erster Linie auf replizierende Zellen abzielen, werden Tumorstammzellen häufig nicht erfasst und können das Wachstum eines neuen Tumors mit einem veränderten Genprofil hervorrufen<sup>10,11</sup>. Somit sind für die erfolgreiche Behandlung von GBM unterschiedliche Strategien notwendig, die sowohl auf replizierende als auch auf Tumorstammzellen abzielen.

#### 1.1.1 Therapie von Glioblastomen

Um die Überlebensrate von GBM-Patienten zu erhöhen, werden derzeit neben der Optimierung der Effizienz von Chemo- und Radiotherapie verschiedene alternative

Therapieansätze verfolgt. Einer davon wird als molekulare Therapie bezeichnet und zielt auf die Entwicklung von Wirkstoffen gegen spezifische Tumormarker ab. Dazu zählt unter anderem der Tyrosinkinase-Rezeptor *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Da dieser bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Krebsarten hochreguliert ist und eine zentrale Rolle in der Tumorgenese spielt<sup>12</sup>, bestand Hoffnung, dass eine Inhibition von EGFR zu einer besseren Prognose bei GBM-Patienten führen würde. Jedoch zeigte eine klinische Phase I/II Studie von Chakravarti *et al.* kürzlich, dass die Behandlung von GBM-Patienten mit dem EGFR-Inhibitor Gefitinib zusätzlich zur Radiotherapie nicht zu einer erhöhten Überlebensrate oder -dauer führte und EGFR somit nicht als prognostischer Marker in Frage kommt<sup>13</sup>. Da GBM stark vaskularisiert sind, wurde der Effekt der zusätzlichen Anwendung von Bevacizumab, einem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), in einer randomisierten Phase III Studie mit 978 registrierten Patienten getestet. Jedoch führte auch dieser Ansatz nicht zu einer erhöhten Überlebensrate, weshalb VEGF-gezielte Therapien ebenfalls nicht als erfolgsversprechend angesehen werden<sup>14</sup>.

Eine weitere Alternative zur Behandlung von GBM stellt die Immuntherapie dar, bei der das körpereigene Immunsystem auf die Erkennung von GBM-Zellen trainiert werden soll. Dies kann unter anderem durch eine Vakzinierung von Patienten mit tumorspezifischen Antigen-Peptiden erfolgen. Beispiele dafür stellen die konstitutiv aktivierte EGFRvIII Variante sowie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Wilms Tumor 1 (WT1) dar, die in GBM im Gegensatz zu gesunden Zellen überexprimiert werden<sup>15,16</sup>. Diverse klinische Studien mit einer Peptid-Vakzinierung dieser beiden Faktoren zeigten eine Verlängerung der mittleren Überlebensdauer von 8-10 Monaten<sup>17,18</sup>. Es zeigte sich jedoch für EGFRvIII die Herunterregulation der Expression, was vermutlich durch Immunevasionsmechanismen der Tumorstammzellen bedingt ist<sup>18,19</sup>. Dennoch wird diese Strategie als vielversprechend angesehen, weshalb seine Effizienz derzeit in weiteren Studien in Kombination mit bisherigen Standardtherapien geprüft wird (Studiennummer: NCT01480479).

Einen sehr viel versprechenden Ansatz stellt die Therapie mit onkolytischen Viren dar, die in der Lage sind, sich selektiv in Tumorzellen zu vermehren und diese dadurch zu töten.

## **1.2 Onkolytische Viren**

Als onkolytische Viren werden natürlich auftretende oder genetisch modifizierte Viren bezeichnet, die in der Lage sind, selektiv Tumorzellen zu infizieren, sich in diesen zu vermehren und sie zu töten, ohne dabei gesunde Zellen zu beeinträchtigen. Der größte

Vorteil gegenüber jeder klassischen Tumorthherapie besteht in der exponentiellen Amplifikation der wirksamen Dosis im Zielgewebe, was im Idealfall zu einer vollständigen Auslöschung des Tumors führt. Die Mechanismen, die zum Tod der Tumorzelle führen, unterscheiden sich dabei je nach Virus und beinhalten vor allem die direkte Virusvermittelte Zytotoxizität sowie die indirekte Antwort durch Aktivierung der Immunantwort des Wirtsorganismus. Aufgrund dieser Eigenschaften gelten onkolytische Viren als vielversprechende Therapiemöglichkeit für die Behandlung von Tumorerkrankungen, da sie im Gegensatz zu den meisten anderen Therapien, wie Chemotherapie oder Bestrahlung, keine schwerwiegenden Nebenwirkungen zeigen.

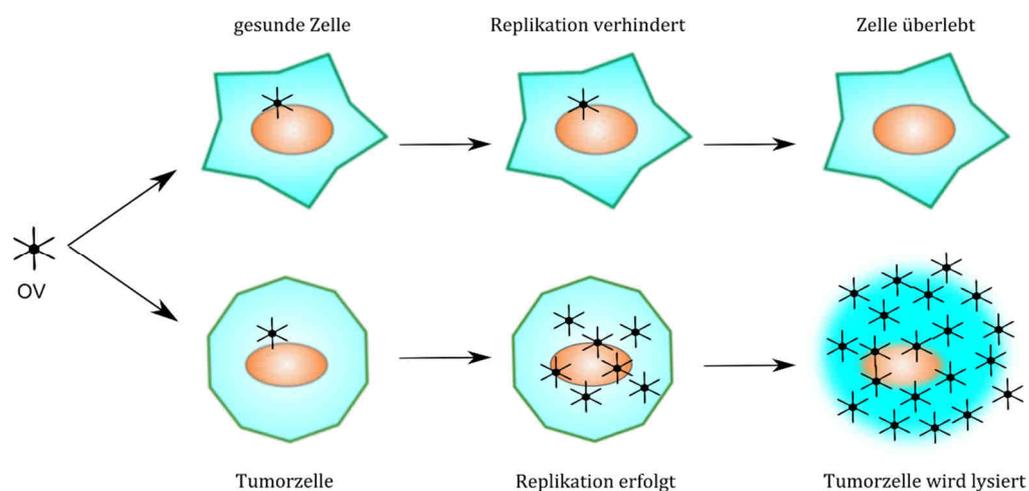


Abbildung 1: Wirkungsprinzip onkolytischer Viren (OV). Bei Infektion einer gesunden Zelle kann keine virale Replikation erfolgen und die Infektion wird vom Immunsystem der Wirtszelle bereinigt. In sich teilenden Tumorzellen dagegen kann das onkolytische Virus effizient replizieren, was schließlich zur Lyse der Tumorzelle unter Freisetzung einer Vielzahl neuer Viruspartikel führt, die wiederum neue Tumorzellen befallen. Angepasst nach <sup>20</sup>.

Die ersten Berichte über den positiven Effekt viraler Infektionen auf Tumorerkrankungen gehen bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts zurück, als bei einer Frau mit Gebärmutterhalskrebs ein Rückgang des Tumors nach Applikation des viralen Tollwut-Lebendimpfstoffes festgestellt wurde<sup>21</sup>. In den folgenden Jahren häuften sich Berichte über Tumorregressionen in Folge von viralen Infektionen, was 1949 zur ersten klinischen Studie mit 43 Hodgkin-Lymphom Patienten führte<sup>22</sup>. Den Patienten wurde Serum entnommen und mit dem Hepatitis-Virus vereint, welches zu der Zeit noch nicht genauer definiert werden konnte. Anschließend wurde das infizierte Serum reinjiziert und die Patienten über mehrere Monate untersucht. Bei sieben der Patienten konnte ein positiver Effekt auf die Tumorerkrankung nachgewiesen werden, was eine vielversprechende Grundlage für die

Anwendbarkeit von Viren zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen darstellte. Der Beginn der modernen Ära der onkolytischen Virotherapie führt auf eine Studie aus dem Jahr 1991 zurück, in der Martuza *et al.* eine Thymidinkinase-defiziente Mutante des Herpes Simplex Virus entdeckten, die einen onkolytischen Effekt in einem murinen Glioblastom-Modell zeigte<sup>23</sup>. Dies resultierte in einem enorm wachsenden Interesse in der Gesellschaft, sodass zahlreiche präklinische Studien mit unterschiedlichen Viren für die Anwendung auf die unterschiedlichsten Tumormodelle durchgeführt wurden. Für die Behandlung von Glioblastomen haben es nach heutigem Stand 6 verschiedene Viren in klinische Studien geschafft, in denen zurzeit die Sicherheit und Toleranz an austherapierten Patienten getestet wird (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Onkolytische Viren in klinischen Studien für die Anwendung bei Gliomen.\*: Studie ist bereits abgeschlossen.

Virus	Genom	Wirt	Klinische Phase	Studiennr.
Herpes Simplex Virus	dsDNA, umhüllt	Mensch	Phase I/II	NCT02031965
Newcastle Disease Virus	(-)ssRNA, umhüllt	Vögel	Phase I/II	NCT01174537
Adenovirus	dsDNA, nicht umhüllt	Mensch	Phase I*	NCT01582516
Reovirus	dsRNA, nicht umhüllt	Mensch	Phase I*	NCT00528684
Poliovirus	(+)ssRNA, nicht umhüllt	Mensch	Phase I	NCT01491893
H-1 Parvovirus	ssDNA, nicht umhüllt	Ratte	Phase I/II	NCT01301430
Masernvirus	(-)ssRNA, umhüllt	Mensch	Phase I	NCT00390299

Ein vielversprechender Kandidat ist das H-1 Parvovirus (H-1PV), das bereits in Ratten die vollständige Regression eines Glioblastom-*Xenografts* innerhalb von 7 Tagen nach Applikation zeigte<sup>24</sup>. Aufgrund seiner Rolle in dieser Arbeit wird der Hintergrund der Parvoviren und im speziellen der des H-1PV nachfolgend im Detail vorgestellt.

## 1.3 Parvoviren

### 1.3.1 Taxonomie

Parvoviren sind kleine, nicht-integrierende, nicht-umhüllte Viren die ein einzelsträngiges, lineares Genom mit einer Gesamtgröße von ca. 5.1 kb aufweisen, womit sie zu den

kleinsten bisher bekannten Viren gehören. Die Familie der *Parvoviridae* teilt sich in die Unterfamilien der *Parvovirinae* sowie der *Densovirinae* auf, von denen letztere ausschließlich Insekten sowie Anthropoden befallen und in dieser Arbeit nicht näher behandelt werden. Mitglieder der *Parvovirinae* replizieren dagegen ausschließlich in Vertebraten. Die am besten untersuchten Viren der *Parvovirinae* stellen die Gattungen *Dependovirus*, *Erythroparvovirus*, *Bocaparvovirus* sowie *Protoparvovirus* dar, von denen Dependoparvoviren als einzige Helferviren (meist Adenoviren oder Herpesviren) für ihre Replikation benötigen. Sie werden aus diesem Grund auch nicht autonom replizierende Parvoviren genannt. Erythroparvoviren besitzen einen Tropismus, in hämatopoetischen Vorläuferzellen zu replizieren und sind dabei abhängig vom Zellzyklus der Wirtszelle. Der Name der Gattung *Bocavirus* ist aus den Bezeichnungen *bovin* (Rind) und *canin* (Hund) entstanden, da eine große genetische Homologie zum bovinen Parvovirus sowie zum *canine minute virus* besteht. 2005 wurde jedoch ein humanes Bocavirus (hBoV) entdeckt, das insbesondere bei Kindern und Neugeborenen im Zusammenhang mit Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege in Verbindung gebracht wird<sup>25</sup>. Beachtlicherweise zeigt das H-1 Parvovirus der Gattung *Protoparvovirus* einen selektiven Onkotropismus, der zum Absterben von infizierten Tumorzellen führt. Alle weiteren Eigenschaften der onkolytischen Parvoviren werden im Folgenden auf Basis des H-1 Parvovirus und des phylogenetisch eng verwandten *minute virus of mice* (MVM) erläutert.

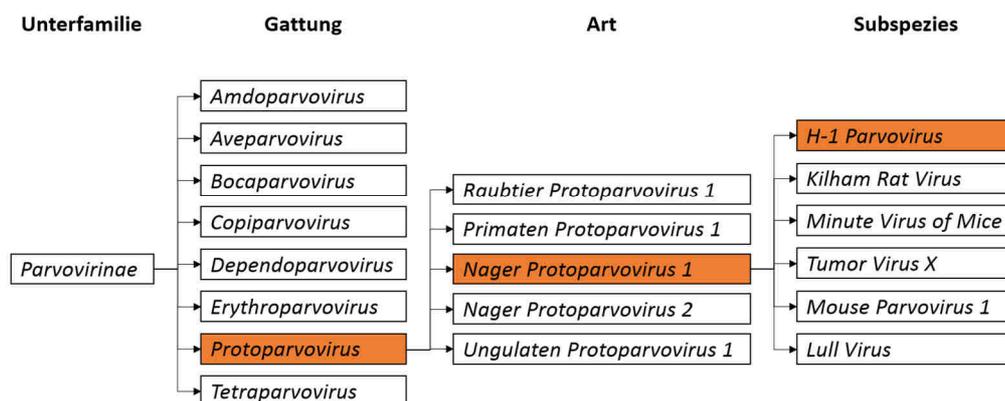


Abbildung 2: Taxonomie des H-1 Parvovirus (Ausschnitt).

#### 1.4 H-1 Parvovirus (H-1PV)

Die meisten im Folgenden dargestellten Untersuchungen wurden mit dem *minute virus of mice* (MVM) durchgeführt. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zum H-1PV von über 92% werden jedoch die meisten Eigenschaften innerhalb zwischen beiden Viren als identisch angesehen.

### 1.4.1 Morphologie

Das Virion des H-1PV hat einen Durchmesser von 18-26 nm und weist ein ikosaedrische T=1 Symmetrie auf. Es besteht zum Großteil aus den beiden Capsidproteinen VP1 und VP2, die im Verhältnis 1:5 vorliegen und aus zwei unterschiedlichen Spleißvarianten der gleichen Vorläufer-mRNA entstehen<sup>26</sup>. Das Capsid setzt sich aus 20 identischen Trimeren der VP-Proteine zusammen, die in einer 5-3-2 Punktgruppenrotationssymmetrie angeordnet sind und die einzelsträngige genomische DNA des Virus umgeben<sup>27,28</sup>. Während der Infektion entstehen durch posttranslationale Proteolyse außerdem geringe Mengen des Capsid-Proteins VP3, welches eine um 25 Aminosäuren N-terminal trunke Variante des VP2 repräsentiert, dessen Funktion bisher unbekannt ist<sup>29,30</sup>. Die Oberfläche des Capsids zeichnet sich durch Vorsprünge an der dreifachen Symmetrieachse, kleine Einstülpungen entlang der zweifachen Symmetrieachse sowie eine Pore an der fünffachen Symmetrieachse aus<sup>31</sup>. Durch die Pore werden 24 Nukleotide des viralen Genoms exponiert, welche während der Capsid-Assemblierung vom Nichtstrukturprotein 1 (NS1) kovalent gebunden werden<sup>32,33</sup>.

### 1.4.2 Genomaufbau und Genprodukte

Das H1-PV Genom besteht aus einer linearen, 5176 nt langen ssDNA mit negativer Polarität. Am 5'- und am 3'- Ende der linearen ssDNA befinden sich jeweils palindromische Sequenzen, die als *terminal inverted repeats* bezeichnet werden<sup>34-36</sup>. Das ca. 120 nt lange 3'-Palindrom ist unter den Protoparvoviren hochkonserviert, während die Sequenz des 5'-Palindrom Subspezies-spezifische ist und bei H-1PV aus 245 nt besteht<sup>37</sup>. In Folge der Y-förmigen Telomerbildung am 3'-Palindrom kommt es durch Basenfehlpaarung zwischen den Nukleotiden 25-26 (GA) und 89-91 (GAA) zur Ausbildung einer Blase, die essentiell für die Initiation der viralen *rolling hairpin* Replikation sind (siehe 1.4.3)<sup>38</sup>. Der codierende Teil des H-1PV Genoms besteht aus lediglich zwei offenen Leserastern (*open reading frames*, ORF), wobei einer für die beiden Capsidproteine (VP1, VP2) und einer für mindestens sechs regulatorische Nichtstrukturproteine (NS1, NS2 in drei Spleißvarianten, NS3, SAT) codiert, die durch alternatives Spleißen der jeweiligen mRNA entstehen. Die beiden ORFs werden dabei von unterschiedlichen Promotoren reguliert: Während die Expression der regulatorischen Gene unter Kontrolle des „frühen“ P4 Promotors steht<sup>39</sup>,

werden die Strukturgene vom P38 Promotor kontrolliert, welcher erst in der späten Phase der viralen Replikation aktiviert wird (Abbildung 3)<sup>40,41</sup>.

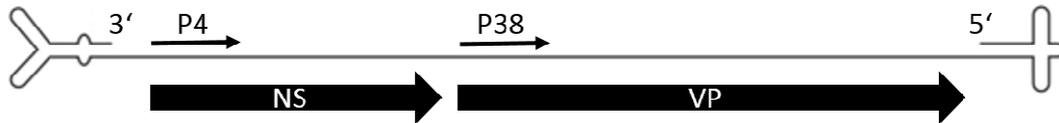


Abbildung 3: Genomstruktur des H-1PV. Am 5' und 3' Ende befinden sich palindromische Sequenzen, die zur Ausbildung von Haarnadel- bzw. Kaninchenohr-Strukturen führen, was für die Initiation der viralen Replikation essentiell ist. Während die Nichtstrukturproteine (NS) unter Kontrolle des P4 Promotors stehen, wird die Expression der Capsidproteine (VP) vom P38 Promotor gesteuert. Modifiziert nach<sup>42</sup>.

Das 83 kDa Nichtstrukturprotein 1 (NS1) ist das einzige regulatorische Protein, das für eine effiziente virale Replikation zwingend erforderlich ist<sup>36,43-46</sup>. Durch seine Multidomänen-Natur ist NS1 in der Lage, viele zentrale Funktionen innerhalb des viralen Lebenszyklus auszuführen. Aufgrund seiner Komplexität und seiner zentralen Bedeutung für diese Arbeit wird auf die Funktionen von NS1 in einem separaten Kapitel genauer eingegangen.

Das hauptsächlich zytoplasmatisch vorliegende 25 kDa schwere NS2 entsteht durch alternatives Spleißen aus der NS1-NS2 prä-mRNA und ist in seinen N-terminalen 84 Aminosäuren identisch mit NS1<sup>39</sup>. Seine Funktion für die virale Replikation ist bisher nicht eindeutig geklärt, jedoch wird eine Rolle in der Assemblierung der viralen Partikel spekuliert<sup>42</sup>. Des Weiteren wird vermutet, dass NS2 eine Rolle im Export viraler Partikel aus dem Zellkern der natürlichen Wirtszelle spielt<sup>47</sup>.

Das *small alternatively translated protein* (SAT) stellt ein spätes regulatorisches Protein dar, das auf derselben mRNA wie VP2 codiert wird und in der Membran des ER lokalisiert ist. Seine Funktion ist bisher weitgehend unbekannt, jedoch wird ihm eine Rolle in der Immunevasion des Virus zugesprochen<sup>48</sup>.

### 1.4.3 Lebenszyklus und DNA Replikation

H-1PV gelangt zunächst über einen Sialinsäure-haltigen, bisher unbekanntem Rezeptor durch Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zielzelle<sup>49-51</sup>. Anschließend erfolgt der Transport über frühe und späte Endosomen in den perinuklearen Raum<sup>52,53</sup>. Durch den sauren pH-Wert im Endosom wird die Phospholipase A<sub>2</sub>-Domäne des VP1 aktiviert, was zum Abbau der endosomalen Membran und somit zur Freisetzung der Viruspartikel

führt<sup>54,55</sup>. Dadurch wird außerdem das *nuclear localization signal* (NLS) des VP1-Proteins exponiert, was zum Import der Viruspartikel in den Nukleus führt. Dort kommt es zu einer strukturellen Konformationsänderung des Capsids, wodurch die einzelsträngige genomische DNA freigesetzt und für die Replikation zugänglich gemacht wird<sup>56,57</sup>. Die Replikation von H-1PV ist abhängig von der S-Phase der Zielzelle und von der Anwesenheit zahlreicher zellulärer Faktoren<sup>26,42,58,59</sup>. Sie verläuft nach dem Prinzip des *rolling hairpin* Mechanismus, welcher eine lineare Anpassung der weiter verbreiteten *rolling circle replication* darstellt<sup>60</sup> (Abbildung 4).

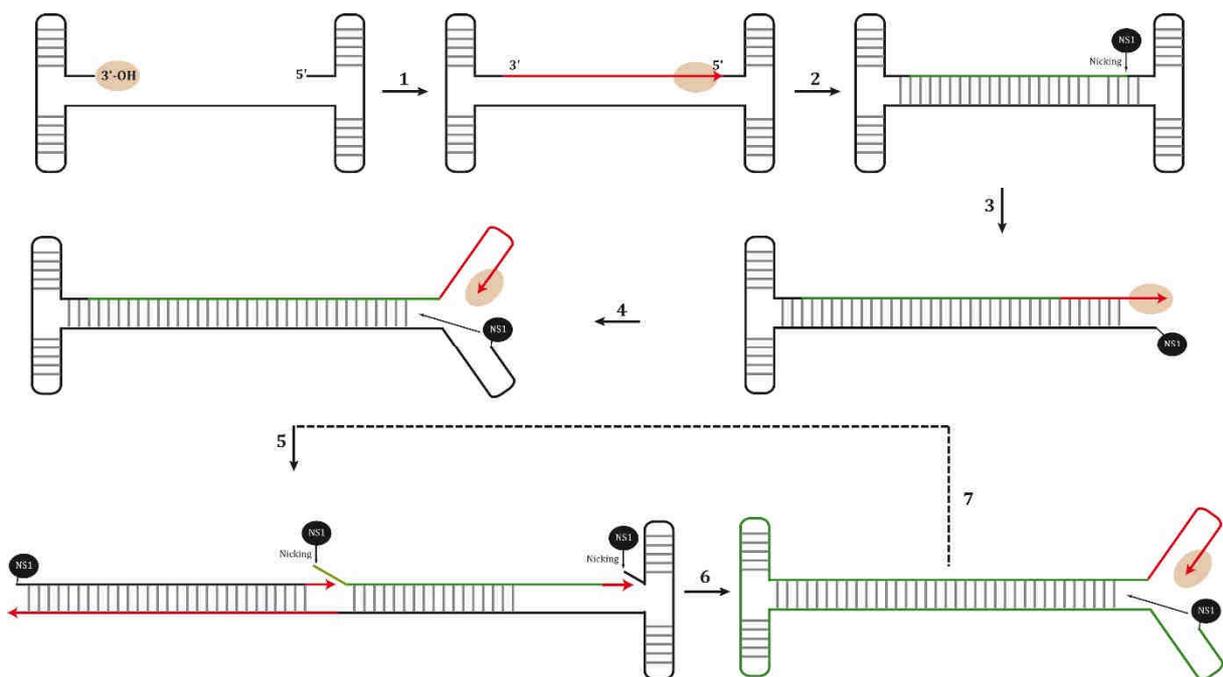


Abbildung 4: *Rolling hairpin* Replikation von H-1PV. Durch wiederholtes Falten und Entfalten von spezifischen Haarnadelstrukturen kann das parvovirale Genom mit Hilfe des zellulären Replikationskomplexes (rosa Oval) sowie des NS1 (schwarzer Kreis) amplifiziert werden. Das virale Ursprungsgenom ist in schwarz, bereits replizierte DNA in grün und gerade neu entstandene DNA in Rot dargestellt. Modifiziert nach<sup>61</sup>.

Sobald die Wirtszelle in die S-Phase eintritt, kann die 3'-Haarnadelsequenz als interner Primer für die DNA Polymerase  $\delta$  dienen, wodurch die Konversion zur doppelsträngigen parvoviralen DNA erfolgt (Abbildung 4, Schritt 1). Diese dsDNA wird anschließend vom Reparatursystem der Zelle kovalent verbunden, wodurch ein zirkuläres Duplex-Intermediat entsteht. Dieses wird durch die Endonuklease-Aktivität des NS1 Proteins an einer definierten Stelle gespalten<sup>33</sup> (Schritt 2+3), woraufhin die NS1 Helikasedomäne den vorliegenden Doppelstrang ATP-abhängig entwindet, sodass die Replikation fortgesetzt werden kann und ein dimeres parvovirales Genom entsteht (Schritte 4+5)<sup>38,62</sup>. Das

replizierte Genom wird anschließend wiederum von NS1 an der spezifischen Erkennungssequenz nukleolytisch gespalten, wodurch die neu synthetisierten genomischen DNA-Stränge freigesetzt werden (Schritt 6). Diese können im Anschluss für einen neuen Replikationszyklus bereitgestellt oder in das virale Capsid verpackt werden (Schritt 7). Sobald das erste Duplex-Intermediat amplifiziert wurde, findet unter Anwesenheit bestimmter zellulärer Transkriptionsfaktoren (E2F, ATF, STF) die Aktivierung des P4 Promotors und somit die Expression von NS1 und NS2 statt<sup>63,64</sup>. Durch die Akkumulation von ausreichend NS1 kommt es zur NS1-abhängigen *trans*-Aktivierung des viralen P38 Promotors und somit zur Expression der Capsidproteine VP1 und VP2<sup>65</sup>. Während des gesamten viralen Lebenszyklus kontrolliert NS1 die DNA-Replikation durch Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren TBP, TFIIA und SP1/3<sup>63</sup> sowie mRNA prozessierenden Enzymen<sup>66</sup>. Nach Assemblierung des Capsids bleibt ein NS1 Molekül kovalent an den 24 außerhalb des Capsids liegenden Nukleotiden des DNA Genoms gebunden und ist auf der Oberfläche des Virions exponiert<sup>33</sup>. Schließlich kommt es durch die hohe Last intrazellulärer Viruspartikel zur Lyse der Tumorzellen und somit zur Freisetzung der Virionen, wodurch weitere umliegende Tumorzellen infiziert werden können.

#### **1.4.4 Domänenstruktur des NS1**

Trotz seiner limitierten Größe von 83 kDa ist NS1 in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen und Interaktionen einzugehen. Dies liegt vor allem am Vorhandensein von mindestens fünf funktionell unterschiedlichen Domänen und Motiven<sup>67</sup> (siehe Abbildung 5).

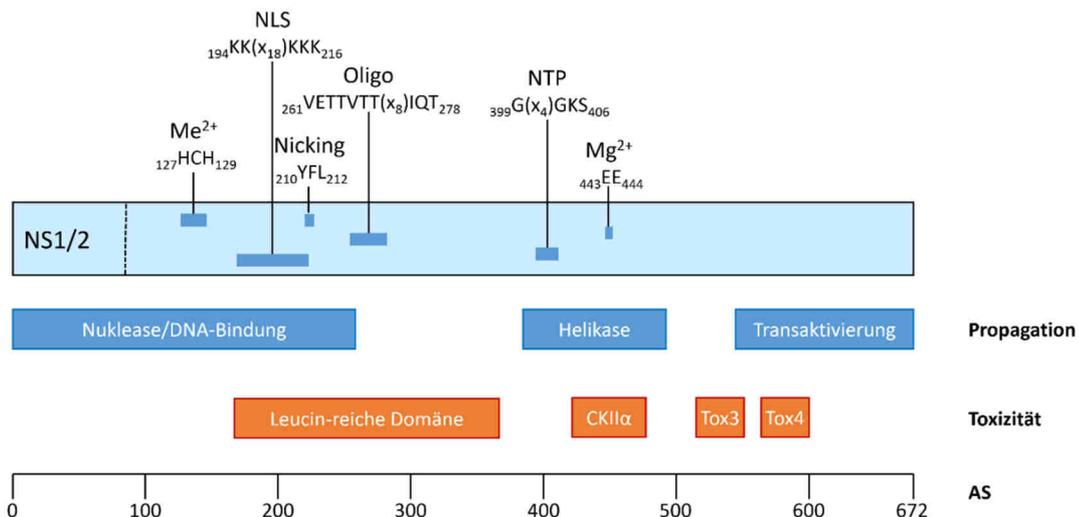


Abbildung 5: Die wichtigsten Domänen und Motive des NS1-Proteins. Me<sup>2+</sup>: Metallbindungsstelle; NLS: Kernimportsequenz; Nicking: Aktives Zentrum der Nukleasedomäne; Oligo: Oligomerisierungsdomäne; NTP: Nukleotidbindungsstelle; Mg<sup>2+</sup>: Magnesium-Bindungsstelle innerhalb der Helikasedomäne. CKII $\alpha$ : Bindestelle für die Caseinkinase II $\alpha$ . Tox3 und Tox4: Toxizitätsdomänen. Angepasst nach<sup>68</sup>.

#### 1.4.4.1 Die N-terminale Nuklease-Domäne

Am N-Terminus des NS1 ist die Nuklease-Domäne lokalisiert, die für die Bindung sowie das *nicking* der DNA (AS 16-275) während der *rolling hairpin replication* zuständig ist<sup>62</sup>. Sie enthält außerdem die NLS, das aus dem Motiv  $194\text{KK}(\text{x}_{18})\text{KKK}_{216}$  besteht und für den effizienten Transport von NS1 in den Zellkern verantwortlich ist<sup>69</sup>. Die Bindung der DNA erfolgt über repetitive [ACCA]<sub>2-3</sub> Sequenzen, die sich vor allem in beiden Replikationsursprüngen (ORI, von engl. *origin of replication*) sowie im *trans-activation responsive element* (tar) befinden<sup>35,70,71</sup>. Erst nach Bindung der dsDNA erfolgt das *nicking* mit Hilfe des aktiven Tyr-210 sowie eines für die Katalyse notwendigen zweiwertigen Kations (Me<sup>2+</sup>), dessen Bindungszentrum innerhalb der HUH-Endonuklease Familie konserviert ist (Histidin-Hydrophob-Histidin)<sup>72,73</sup>. Bei der Spaltung der DNA findet eine Umesterung zwischen dem aktiven Tyrosin und dem 5'-Phosphat der parvoviralen genomischen DNA an der spezifischen Spaltstelle statt<sup>42,62,74-76</sup>. Dabei sorgt das gebundene Metallion für eine erhöhte Nukleophilie des Tyr-210, um eine effiziente Umesterung zu ermöglichen<sup>77,78</sup>. Welches Metallion als nativer Co-Faktor für H-1PV NS1 fungiert, ist bisher nicht bekannt. Für das homologe NS1 des Adeno-assoziierten Virus Typ 5 (AAV-5) konnte für Mn<sup>2+</sup>, aber nicht für Mg<sup>2+</sup> die Bindung an das HUH-Motiv nachgewiesen werden<sup>73</sup>. Dagegen zeigt die kürzlich aufgeklärte hochauflösende 3D-Struktur der MVM Nuklease-Domäne (AS 1-255) eine bemerkenswerte Vielseitigkeit in der Bindung verschiedener

zweiwertiger Kationen ohne erkennbaren Einfluss auf die Struktur des Proteins<sup>79</sup>, dessen biologische Relevanz bisher jedoch nicht durch funktionelle Daten verifiziert werden konnte.

#### 1.4.4.2 Die SF3 Helikasedomäne

Die der Superfamilie SF3 angehörige Helikasedomäne erstreckt sich bei H-1PV NS1 über die Aminosäuren 394-486 und ist für die Entwindung der dsDNA während der *rolling hairpin* Replikation verantwortlich. Für die Entwindung von dsDNA wird Energie benötigt, welche bei SF3 Helikasen durch die Hydrolyse von ATP bereitgestellt wird. Dafür ist das unter ATPasen konservierte Walker-Motiv (GXXXXGK[T/S]) zuständig, welches im Falle von H-1PV NS1 die Reste <sup>399</sup>G(x<sub>4</sub>)GKS<sub>406</sub> beinhaltet<sup>40,80</sup>. Dabei ist Lys-405 für den Kontakt mit dem  $\alpha$ -Phosphat des ATP verantwortlich und essentiell für die effiziente Propagation des Virus<sup>40</sup>. Des Weiteren wird das für die ATP-Hydrolyse als Co-Faktor essentielle Mg<sup>2+</sup> über Glu-443 und Glu-444 gebunden, während Asp-467 mit dem Nukleosid interagiert<sup>40,81</sup>. Im Falle des SV40 *Large* T-Antigens (SV40 LTA) kommt es nach Bindung des ATP zur Ausbildung einer hexameren Ringstruktur. Dabei fungiert ein *trans*-Argininfinger zwischen jeweils zwei Helikase-Molekülen als Sensor, der kontrolliert, ob die Bindungstasche des benachbarten Moleküls besetzt ist, was zu einem kooperativen Bindungsmodus führt<sup>82</sup>. Des Weiteren weist die hochauflösende Struktur des SV40 LTA fünf anti-parallele  $\beta$ -Faltblätter auf, die von mehreren  $\alpha$ -Helices umgeben sind<sup>83,84</sup>. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie innerhalb der SF3 Helikase-Familie wird der strukturelle Aufbau als universal postuliert und gilt somit wahrscheinlich auch für H-1PV NS1, was jedoch experimentell bisher nicht bewiesen wurde.

#### 1.4.4.3 Die C-terminale Transaktivierungsdomäne

Am C-Terminus des NS1 befindet sich eine saure Transaktivierungsdomäne (AS 545-672), die für die Expression der P38-abhängigen Capsidproteine verantwortlich ist<sup>41</sup>. Für die Transaktivierung sind lediglich die C-terminalen 67 Aminosäuren essentiell<sup>85</sup>, jedoch sorgen die Reste 545-605 für eine vollständige Aktivität<sup>85</sup>. Die genaue Funktionsweise dieser Domäne ist bisher nicht bekannt, allerdings wird eine Rolle bei der Sequenz-spezifischen DNA Bindung der Nuklease-Domäne diskutiert<sup>86</sup>.

#### 1.4.4.4 Weitere Domänen und Motive

Neben den für die Viruspropagation essentiellen Domänen existieren weitere Motive im NS1, die für die Toxizität des Proteins in Tumorzellen verantwortlich sind (für Details siehe 1.4.5). Darunter befindet sich das hydrophobe Motiv  $_{261}\text{VETTVTT}(\text{x}8)\text{IQT}_{278}$ , welches für eine effiziente Oligomerisierung des NS1 verantwortlich ist<sup>81</sup>. NS1 wird außerdem während des viralen Lebenszyklus an einer Vielzahl von Stellen phosphoryliert, was die Interaktion mit zellulären Proteinen oft erst ermöglicht. Bisher wurden insgesamt sechs Aminosäuren eindeutig nachgewiesen, die allesamt von der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden<sup>45</sup> (S283, T403, T435<sup>87</sup>, S473<sup>88</sup>, T585, S588<sup>89</sup>). Des Weiteren befindet sich im Bereich der AS 180-380 eine Leucin-reiche Domäne (LRD), die auch als *targeting*-Domäne bezeichnet wird, da sie die Interaktion mit zellulären Proteinen mediiert<sup>90</sup>. So wird z.B. durch die LRD die Casein-Kinase II  $\alpha$ -Untereinheit (CKII $\alpha$ ), die innerhalb der NS1 Helikase-Domäne (AS 435-473) bindet, zu zellulären Proteinen dirigiert, die in Folge dessen von der CKII $\alpha$  phosphoryliert werden, was zu unmittelbaren toxischen Effekten führt<sup>90</sup>. Durch zielgerichtete Mutagenese wurde gezeigt, dass zwei Sequenzabschnitte in der Nähe der Transaktivierungsdomäne (Tox3 und Tox4) ebenfalls zur Induktion zytotoxischer Effekte beitragen, ihre detaillierte Funktion jedoch bisher nicht bekannt ist<sup>68</sup>.

#### 1.4.5 Zytotoxische Eigenschaften des NS1

Für die onkolytische Aktivität von H-1PV wurde NS1 als Haupteffektor der Induktion zytotoxischer Effekte in Tumorzellen identifiziert<sup>68,87,91,92</sup>. Dabei spielt insbesondere der Phosphorylierungszustand von NS1 eine entscheidende Rolle. Da Kinasen in Tumorzellen oft stark überexprimiert sind, ist die Phosphorylierung von NS1 höchstwahrscheinlich einer der wesentlichen Faktoren für den selektiven Onkotropismus von H-1PV. So kommt es erst durch PKC-abhängige Phosphorylierung von S473 zur Interaktion der NS1-Helikasedomäne mit der CKII $\alpha$ <sup>93</sup>. Dieser Komplex hat entscheidende Auswirkungen auf das Zytoskelett der Wirtszelle. So wird der NS1-CKII $\alpha$ -Komplex über die LRD zum Zytoskelettprotein Tropomyosin dirigiert, welches durch die CKII $\alpha$  anschließend abnormal phosphoryliert und dadurch von der Wirtszelle degradiert wird<sup>90</sup>. Auch auf Aktin-Ebene wirkt der NS1-CKII $\alpha$ -Komplex, indem er Gelsolin phosphoryliert, welches für die Kontrolle der F-Aktin Polymerisation verantwortlich ist. Durch Phosphorylierung wird es verstärkt aktiviert und sorgt somit für eine verringerte F-Aktin-Polymerisationsrate<sup>94</sup>. Des Weiteren wird das *Wiscott-Aldrich Syndrome* Protein, welches die Nukleation von neuem F-Aktin

durch Interaktion mit dem Arp2/3 Komplex bewirkt, nach einem bisher unbekanntem Mechanismus reprimiert, was insgesamt zu einer nicht kompensierbaren Schädigung des Zytoskeletts und folglich zum Absterben der Tumorzelle führt<sup>94,95</sup>.

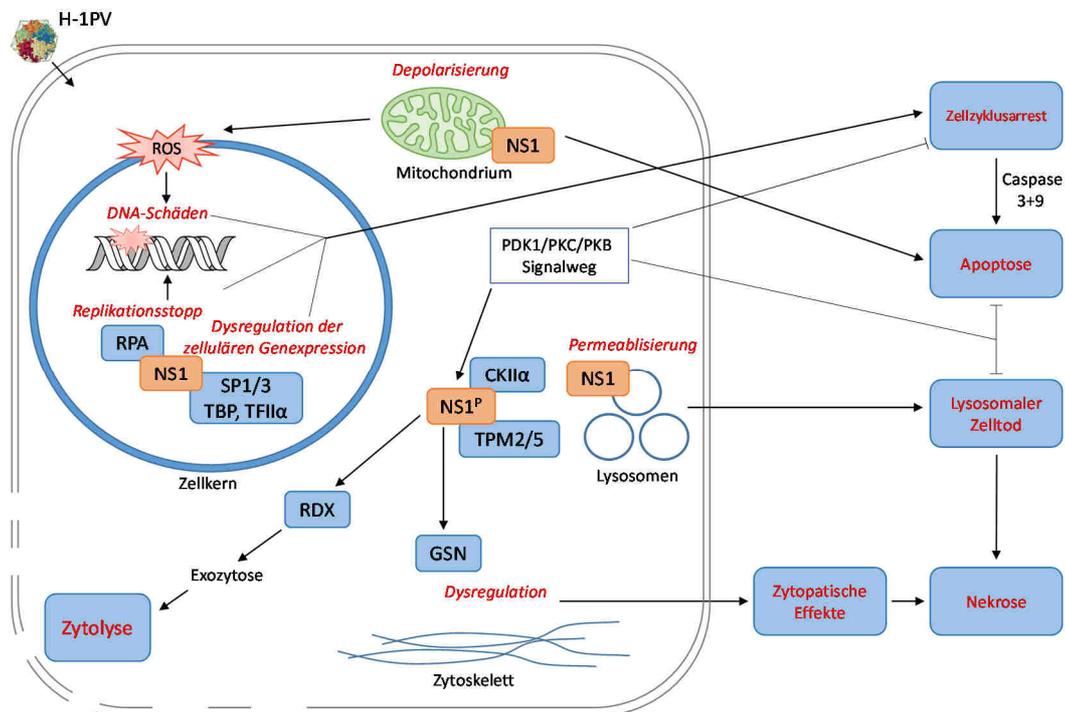


Abbildung 6: NS1-vermittelte Zytotoxizität. Durch Wirkung auf mehreren Ebenen kommt es in Tumorzellen zum NS1-induzierten Zelltod durch Apoptose oder Nekrose. Details zu den Interaktionen sind im Text beschrieben. ROS: Reaktive Sauerstoffspezies; RPA: Replikationsprotein A; TBP: TATA-bindendes Protein; TFII $\alpha$ : Transkriptionsfaktor II $\alpha$ ; CKII $\alpha$ : Caseinkinase II $\alpha$ ; TPM2/5: Tropomyosin; GSN: Gelsolin; RDX: Rodoxin; PDK1: *Phosphoinositide-dependent kinase 1*; PKC: Proteinkinase C; PKB: Proteinkinase B.

Auch auf anderen Ebenen übt NS1 zytotoxische Effekte auf transformierte Zellen aus. So kommt es durch Expression von NS1 zur Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran, was zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und in Folge dessen zu massiven DNA-Schädigungen und zum Zellzyklusarrest führt<sup>96</sup>. Die Rekrutierung von zellulären Replikationsfaktoren wie die DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\delta$ , RPA, RF-C und PCNA durch NS1 für die virale Replikation führt außerdem zum Stehenbleiben der zellulären Replikation und somit zum Zellzyklusarrest in der S/G2 Phase<sup>97-100</sup>. In den meisten Fällen führen die zytotoxischen Effekte zur Induktion der Caspase-3/9-abhängigen Apoptose<sup>101,102</sup>. Jedoch konnte in GBM-Zellen neben dem der Apoptose auch ein lysosomal hervorgerufener Zelltod festgestellt werden, wobei eine Vermehrung und Lyse von sauren Vesikeln beobachtet wurde. Dies führt zur erhöhten Freisetzung von funktionellen Cathepsinen im Zytosol sowie zu dessen Ansäuerung, wodurch die Zelle unweigerlich

lysiert wird<sup>103</sup>. Auch eine Rolle der Cathepsine in der Reifung der Virionen vor der Zelllyse wird diskutiert, jedoch liegt bisher für diese Vermutung keine Evidenz vor.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Expression von Apoptin, einem weiteren onkolytisch wirkenden Protein aus dem *Chicken Anemia Virus* (CAV), die onkolytische Effizienz von H-1PV in Tumorzellen signifikant erhöht<sup>104</sup>. Aufgrund seiner Rolle in der vorliegenden Arbeit wird das onkolytische Potential von Apoptin im Folgenden beschrieben.

### 1.4.6 Apoptin

Das 121 Aminosäuren umfassende Apoptin, oder auch VP3, ist ein Nichtstrukturprotein des Hühner-Anämie-Virus (CAV, aus engl. *chicken anemia virus*), das ausschließlich in neu geschlüpften Küken zum Virus-assoziierten Tod führt. Zwei Wochen nach dem Schlüpfen sind die Hühner bereits vollständig resistent gegenüber CAV-Infektionen<sup>105</sup>. Als 1994 erstmals festgestellt wurde, dass VP3 der Haupteffektor für die Induktion von Apoptose in Hühner-T-Lymphozyten darstellt, wurde das Protein folglich in Apoptin umbenannt<sup>106</sup>. Im Gegensatz zu T-Lymphozyten konnte in Hühner-Fibroblasten keine Apoptin-spezifische Zytotoxizität festgestellt werden, wodurch erstmals sein onkolytisches Potential vermutet wurde<sup>106</sup>. Dies wurde in den folgenden Jahren durch eine Vielzahl weiterer Studien belegt, sodass Apoptin heute als Induktor von Apoptose in transformierten Zellen akzeptiert und zur Anwendung als Therapeutikum bei Tumorerkrankungen diskutiert wird<sup>107-110</sup>.

#### 1.4.6.1 Sequenz und Domänenstruktur

Für das 14 kDa schwere Apoptin ist bisher keine Sequenz- oder Strukturhomologie zu anderen zellulären oder viralen Proteinen bekannt<sup>105</sup>. Der C-Terminus des Proteins enthält ein zweigeteiltes NLS, welches sich über die Aminosäuren 82-88 (NLS1) sowie 111-121 (NLS2) erstreckt<sup>111,112</sup>. Zwischen den beiden NLS-Domänen befindet sich von AS 97-105 eine Kernexportsequenz (NES, von engl. *nuclear export signal*), wodurch ein beidseitiger Transport des Moleküls ermöglicht wird. Ähnlich zum NS1 befindet sich von AS 33-46 eine Leucin-reiche Sequenz, die für die Oligomerisierung sowie für die Bindung weiterer zellulärer Proteine verantwortlich ist<sup>108,113</sup>. Die Oligomerisierung von 30-40 Apoptin-Molekülen zu einem globulären Multimer ist dabei für die Ausübung seines onkolytischen Potentials essentiell<sup>114</sup>. Innerhalb der NLS2 befindet sich außerdem ein

Threonin-Rest (Thr-108), welcher im Laufe der viralen Infektion phosphoryliert wird und weitere Interaktionen mit Proteinen der Wirtszelle ermöglicht<sup>115</sup>.

#### 1.4.6.2 Apoptin-vermittelte Zytotoxizität

Der Transport von Apoptin in den Zellkern ist essentiell, aber alleine nicht ausreichend, um zytotoxische Effekte zu induzieren<sup>111,112</sup>. Vielmehr sind weitere direkte und indirekte Interaktionen mit Komponenten der Tumorzelle erforderlich, um das vollständige onkolytische Potential von Apoptin zu entfalten. Seine Multimerisierung und seine basische Natur ermöglichen dem Protein, direkt mit Chromatin-DNA zu interagieren und einen heterogenen Komplex zu bilden<sup>114,116,117</sup>. Weitere Studien zeigen, dass Apoptin in der Lage ist, spezifisch mit dem APC-Protein aus dem *anaphase promoting complex/cyclosome* (APC/C) zu interagieren<sup>118</sup>. Dadurch wird die Ubiquitin-Ligase-Funktion des Komplexes inhibiert, wodurch der Zellzyklusarrest in der G2/M Phase induziert und als Folge dessen Apoptose ausgelöst wird<sup>118</sup>. Außerdem interagiert Apoptin mit der p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), wodurch diese konstitutiv aktiviert wird und verstärkt die Proteinkinase Akt phosphoryliert. Dies führt zur Translokation von Akt in den Nukleus, was eine pro-apoptotische Wirkung hervorruft<sup>119</sup>. Somit scheint Apoptin auch indirekt für ein verstärktes Apoptose-Signal zu sorgen. Dies wird bestärkt durch die Tatsache, dass bei Herunterregulation von p85 ein Export von Apoptin aus dem Nukleus stattfindet, wodurch seine zytotoxischen Effekte signifikant reduziert werden<sup>120</sup>. Die genauen Mechanismen, die letztendlich zur Apoptin-induzierten Apoptose in transformierten Zellen führen, sind bisher nicht endgültig geklärt. Jedoch gilt die Induktion der p53-unabhängigen Apoptose als gesichert, da keine Unterschiede in der Zytotoxizität von Apoptin zwischen p53-defizienten oder p53-exprimierenden Tumorzellen erkennbar sind<sup>121</sup>. Weitere Studien deuten darauf hin, dass Apoptin durch Aktivierung des intrinsischen Caspase-Signalwegs die Apoptose in Tumorzellen auslöst, wobei das aus dem Mitochondrium freigesetzte Cytochrom c an das Adapterprotein Apaf-1 bindet und dies zur Aktivierung des Caspase 9-Signalwegs und somit zur Lyse der Zelle führt<sup>122-124</sup>.

## 1.5 Proteinkristallographie

### 1.5.1 Konventionelle Röntgenstrukturanalyse

Die Funktion eines Proteins wird durch seine dreidimensionale Struktur vorgegeben. Somit ist die Aufklärung der 3D-Struktur eine Grundvoraussetzung dafür, komplexe

Reaktionsmechanismen und Funktionsweisen von Enzymen und anderen Proteinen zu verstehen. Die Röntgenstrukturanalyse stellt dabei eine effektive Methode dar, durch deren Anwendung hochauflösende Strukturen von Makromolekülen in kristalliner Form erhalten werden können<sup>125,126</sup>. Mit Hilfe dieser Methode wurden bis heute 90% der knapp 110000 in der Proteindatenbank (PDB, [www.pdb.org](http://www.pdb.org)) hinterlegten Strukturen aufgeklärt, was deren zentrale Bedeutung im Bereich der Strukturaufklärung betont. Dabei wird das Zielprotein zunächst in hoher Konzentration isoliert und anschließend mit Hilfe von präzipitierenden Agenzien wie Salzen oder Polymeren in ein hochgeordnetes Kristallgitter überführt. Für den Erfolg der Nukleation ist das Erreichen einer kritischen Übersättigung der Proteinlösung notwendig, was durch direktes Mischen von Protein und Präzipitant im statischen (*Microbatch*) oder dynamischen System (Dampfdiffusion) erfolgen kann. Dieser Prozess lässt sich mit dem Phasendiagramm veranschaulichen (Abbildung 7). Bei Erreichen der erforderlichen Protein- sowie Präzipitantenkonzentration gelangt das zu kristallisierende Protein in die Nukleationsphase, in der erste Kristallisationskeime entstehen. Dadurch wird der Anteil an Protein in Lösung gleichzeitig reduziert, so dass das System in die metastabile Phase zurückkehrt. Im Idealfall kommt es anschließend zum Wachstum der Kristalle durch Anlagerung der frei in Lösung befindlichen Proteinmoleküle an die bereits entstandenen Nuklei. Dabei ist das richtige Verhältnis der Protein- und Präzipitantenkonzentration essentiell: Während eine zu niedrige Konzentration zur Untersättigung und damit zum Ausbleiben der Nukleation führt, kommt es bei zu hoher Konzentration zur amorphen, meist nicht reversiblen Präzipitation des Zielproteins<sup>127</sup>.

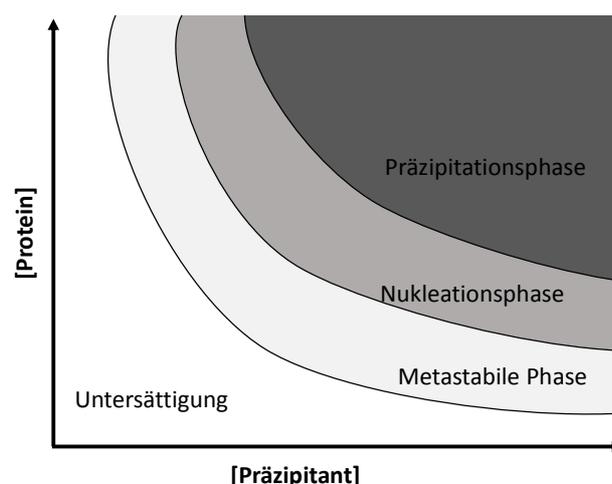


Abbildung 7: Phasendiagramm zur Veranschaulichung der Proteinkristallisation. Erreichen Protein- und Präzipitantenkonzentration die Nukleationsphase, kommt es zur Ausbildung initialer Kristallisationskeime, wodurch die Konzentration freier Proteinmoleküle in Lösung herabgesetzt wird. In der metastabilen Phase kommt es anschließend zum Wachstum der nukleierten Proteinkristalle.

Die Limitation dieser Methode ist jedoch die Tatsache, dass die Bedingungen, unter denen ein Protein in Kristallform gebracht werden kann, nicht vorhersehbar sind und somit empirisch bestimmt werden müssen. Der Erfolg der Kristallisation ist von einer Vielzahl von Parametern wie Reinheit und Homogenität des Proteins, Temperatur, pH-Wert, Salzen und anderen chemischen Substanzen abhängig, die heutzutage meist in Roboterunterstützten Hochdurchsatzverfahren untersucht werden<sup>128</sup>. Trotz der zahlreichen Optimierungen in den letzten Jahren gibt es jedoch keine Garantie dafür, dass ein beliebiges Protein kristallisierbar ist.

Nach erfolgreicher Kristallisation werden die Kristalle mit Röntgenstrahlen bestrahlt, die an den Gitterebenen der Kristalle gebeugt werden und aus deren Detektion die räumlichen Informationen für die Anordnung der Atome abgeleitet werden kann. Dabei wird der Kristall z.B. in einer Nylon-Schleife oder in einer Kapillare montiert und diese zwischen der Aufnahme der einzelnen Beugungsbilder rotiert, um Strukturdaten aus allen Orientierungen des Kristalls zu generieren, was zum Lösen des dreidimensionalen Datensatzes notwendig ist. Die zu erreichende Auflösung ist dabei hauptsächlich abhängig von der Ordnung des Kristalls. Um Strahlenschädigungen während der Datensammlung zu minimieren werden Kristalle meist in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und in einem kontinuierlichen Stickstoffstrom bei einer Temperatur von etwa 100 K vermessen<sup>129</sup>. Jedoch lässt sich dadurch kein vollständiger Schutz der Kristalle erreichen, was zur dosisabhängigen Strahlenschädigung der Kristalle und damit zur Abnahme der Beugungsqualität führt<sup>129,130</sup>. Eine Verringerung der Strahlungsdosis zur längeren Verwendbarkeit der Kristalle ist in vielen Fällen nicht praktikabel, da dies auch zu einem Verlust an Beugungsintensität und somit zu fehlenden Strukturinformationen führt. Somit wird eine kritische Kristallgröße benötigt, um die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes zu ermöglichen, was für viele schwierige Zielproteine wie Membran- oder Multidomänenproteine kaum umsetzbar ist. Aus diesem Grund wurden im Laufe der letzten Jahre an vielen Stellen Optimierungen vorgenommen, die das Generieren von Strukturdaten auch mit kleineren Kristallen ermöglichen<sup>131</sup>.

### **1.5.2 Moderne Entwicklungen der Röntgenstrukturanalyse**

Neben herkömmlichen Röntgenquellen werden heutzutage hauptsächlich Synchrotronstrahlungsquellen zur Strukturaufklärung von Proteinen verwendet. Die erste Generation von Synchrotrons wurde in den frühen 1980er Jahren etabliert und zeichnete sich durch

eine etwa 16-fach höhere Brillanz gegenüber konventioneller Röntgenstrahlung aus, wodurch ein wesentlich höheres Beugungspotential erreicht werden konnte. Diese Strahlungsquellen wurden in den folgenden Jahren weiter optimiert und vor allem die Fokussierung des Strahls auf kleine Kristalle implementiert<sup>132-134</sup>. Damit lässt sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgrund der geringeren Hintergrundstreuung massiv verbessern<sup>135</sup>. Moderne Synchrotron-Einrichtungen der dritten Generation ermöglichen die Fokussierung des Strahls auf eine Fläche von unter  $10 \mu\text{m}^2$ , was die Verwendung von extrem kleinen Kristallen unterhalb von  $1000 \mu\text{m}^3$  möglich macht<sup>133</sup>. Jedoch lässt sich auch dadurch das maximale Dosislimit von 30 MGy pro Kristall bei 100 K nicht unterschreiten, was die Generierung von Datensätzen aus einzelnen kleinen Kristallen weiterhin erschwert<sup>136</sup>. Aus diesem Grund ist in den letzten Jahren der Ansatz der Mikrokristallographie (auch serielle Kristallographie) entstanden, bei der im Gegensatz zu konventionellen Verfahren Strukturdaten aus mehreren identischen Kristallen gesammelt und anschließend miteinander vereint werden, um somit vollständige Strukturinformationen zu erhalten<sup>137</sup>. Dabei werden in der Regel eine Vielzahl von Kristallen in einer Nylon-Schleife oder in einem feinen Gitter aus röntgengängiger Kapton®-Folie montiert und mit Synchrotronstrahlung nacheinander bestrahlt, bis eine Abnahme der Beugungsqualität des einzelnen Kristalls erkannt wird. Anschließend wird der nächste Kristall bestrahlt und das Verfahren fortgesetzt, bis ausreichend Strukturdaten zur Lösung des Datensatzes generiert wurden. Zur längeren Haltbarkeit der Kristalle werden häufig sogenannte helikale Scans verwendet, da durch die schraubenartige Rotation des Loops der selbe Kristall optimal aus verschiedenen Positionen bestrahlt werden kann, was Strahlungsschäden und systematische Fehler bei der Kombination mit Strukturdaten anderer Kristalle minimiert<sup>138</sup>. Die Daten werden dann mit Hilfe spezieller Software miteinander vereint und analog zu Methoden der konventionellen Kristallographie prozessiert. Mit Hilfe der Mikrokristallographie konnten in den letzten Jahren eine Reihe von neuen Kristallstrukturen aufgeklärt werden, was eine solide Grundlage für kristallographisch bisher als schwierig erachtete Projekte darstellt.<sup>139-145</sup>

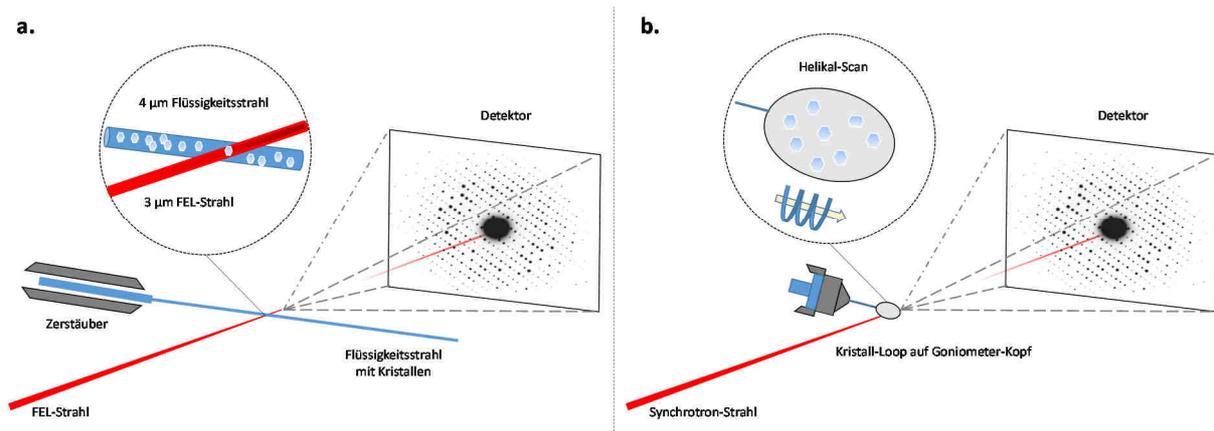


Abbildung 8: Experimenteller Aufbau für die serielle Mikrokristallographie mit zwei verschiedenen technischen Ansätzen. **a.**: Bei der Femtosekunden-Kristallographie (SFX) trifft der gepulste Strahl eines FELs auf einen Flüssigkeitsstrahl identischer Kristalle, die Aufnahme der Daten erfolgt nach dem *diffraction-before-destruction*-Prinzip. Aufgrund der Zerstörung der Kristalle ist ein ständiger Nachschub frischer Kristalle notwendig. **b.**: Bei Synchrotron-basierten Ansätzen befinden sich die Kristalle in einem Loop, der meist in helikalen Abfolgen rotiert wird, um Strahlenschädigungen der Kristalle zu minimieren. Der Datensatz wird anschließend aus den Beugungsdaten mehrerer Kristalle zusammengesetzt.

Ein weiterer Meilenstein in der Strukturaufklärung von Proteinen stellt die Entwicklung der freien Elektronenlaser (FEL) dar, mit deren Hilfe kohärente Röntgenpulse im Femtosekunden-Bereich (fs) mit einer um bis zu 10 Größenordnungen höheren Brillanz im Vergleich zu modernen Synchrotronquellen erzeugt werden können. Der erste FEL mit harter Röntgenstrahlung in Stanford (USA), die *Linac Coherent Light Source (LCLS)*, nahm 2009 seinen Betrieb auf und gilt bis heute als die brillanteste Quelle weltweit<sup>146</sup>. Mit Hilfe von FELs kann das Dosislimit von 30 MGy durch das bereits 2000 von Neutze *et al.* theoretisch postulierte *diffraction-before-destruction*-Prinzip im Gegensatz zur konventionellen Kristallographie überwunden werden<sup>147,148</sup>. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass genügend Beugungsdaten durch einen fs-Puls generiert und mit Hilfe eines ultra-schnellen Detektors aufgezeichnet werden können, bevor die ersten Anzeichen von Strahlungsschäden im Kristall erkennbar sind<sup>147</sup>. Aufgrund der sofortigen Zerstörung der Kristalle ist allerdings eine große Anzahl an identischen Kristallen erforderlich, was diesen Ansatz signifikant von konventioneller Röntgenkristallographie unterscheidet. Das *diffraction-before-destruction*-Prinzip konnte zunächst am weichen FEL FLASH, der Strahlung im weichen Röntgenbereich (DESY, Hamburg) und sechs Jahre später am LCLS unter Verwendung eines Flüssigkeitsstrahls mit zehntausenden identischen Photosystem I Kristallen erfolgreich experimentell bestätigt werden, woraufhin der Begriff der seriellen Femtosekunden-Kristallographie (SFX) für diese Methode eingeführt wurde<sup>149-151</sup>. Seitdem

wurden vier weitere Proteinstrukturen mit Hilfe der SFX-Technik aufgeklärt, darunter auch die des nativ inhibierten Cathepsin B aus dem Parasiten *Trypanosoma brucei*, das während der rekombinanten Überexpression spontan in Sf9 Insektenzellen kristallisierte und die erste neue FEL-generierte biologische Information darstellt<sup>152-155</sup>. Aufgrund der Bedeutung der intrazellulären Proteinkristallisation (*in vivo* Kristallisation) für diese Arbeit wird dieses Thema in einem separaten Kapitel beschrieben.

### **1.5.3 *In vivo* Kristallisation**

Das Phänomen der Kristallisation von Proteinen in lebenden Zellen (*in vivo* Kristallisation) ist bereits seit über 100 Jahren bekannt und wurde bisher als natürliches, aber selten auftretendes Ereignis betrachtet<sup>156</sup>. Intrazelluläre Kristalle sind an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt. So lagern z.B. Pflanzen überschüssige Energie oftmals in Form von Speicherproteinen, die in hohen Konzentrationen innerhalb der Zelle kristallisieren können<sup>157</sup>. Auch das menschliche Insulin wird innerhalb der  $\beta$ -Zellen im Pankreas in Form von Zink-koordinierten Kristallen gespeichert und erst bei Anstieg des Blutzuckerspiegels in löslicher Form freigesetzt<sup>158</sup>. Des Weiteren kommt es in Hefen zur Kristallisation von Enzymen innerhalb von Peroxisomen, die mit Hilfe von Oxidoreduktasen eine Entgiftung der Zelle bewirken<sup>159</sup>. Aber *in vivo* Kristallisation ist nicht nur auf Eukaryoten begrenzt; auch Bakterien wie *Bacillus thuringiensis* sind in der Lage, Toxine in Form von Kristallen intrazellulär zu speichern. All dies sind natürlich auftretende Prozesse, deren molekulare und zelluläre Grundlagen bisher weitgehend unbekannt sind.

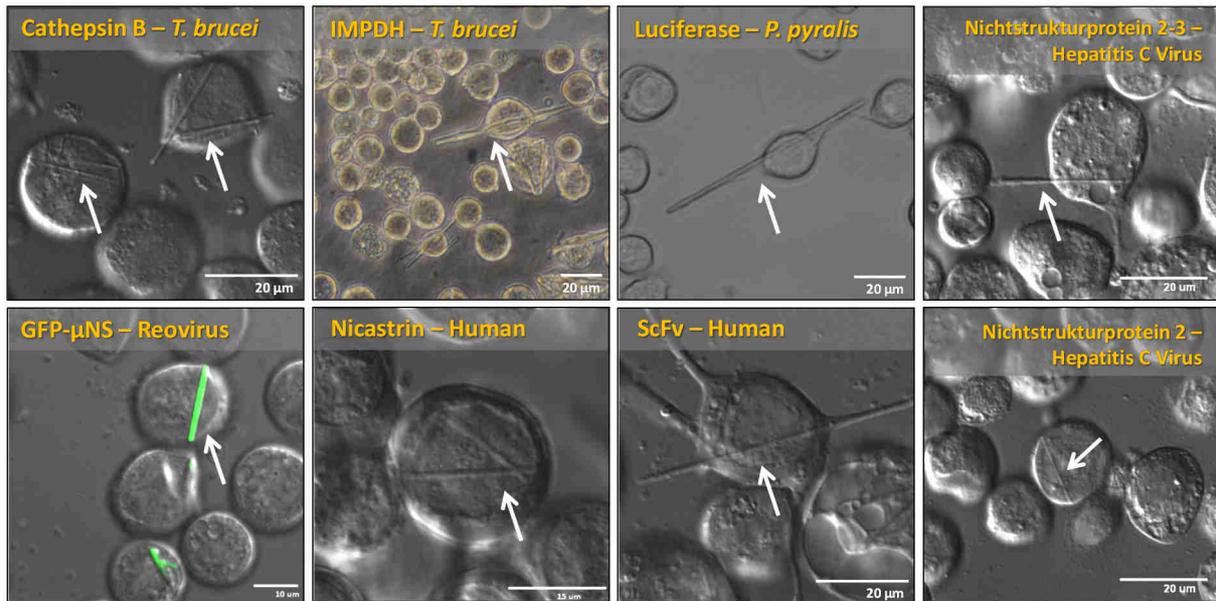


Abbildung 9: Innerhalb der Arbeitsgruppe in Sf9-Zellen kristallisierte Proteine. Für CatB, IMPDH und Luciferase konnte der kristalline Charakter bereits mit Hilfe von Diffraktionstests nachgewiesen werden. IMPDH: Inosinmonophosphat-Dehydrogenase; ScFv: *single chain variable fragment* Antikörper.

Darüber hinaus ist es auch möglich, rekombinant hergestellte Proteine in lebenden Zellen zu kristallisieren. Das wohl prominenteste Beispiel dafür stellt das ca. 28 kDa schwere Polyhedrin von Mitgliedern der ausschließlich Invertebraten infizierenden *Baculoviridae* dar<sup>160</sup>. Das Virus exprimiert große Mengen von Polyhedrin während der späten Phase der Infektion, welches sodann in einem extrem stabilen kristallinen Aufbau um das Virion herum assembliert, um dieses nach Austreten aus der Zielzelle vor Umwelteinflüssen zu schützen<sup>145,161</sup>. Die hochauflösende Struktur von intrazellulär gewachsenen Polyhedrin-Kristallen des Baculovirus-ähnlichen Cypovirus wurde 2006 von Coulibaly *et al.* aufgeklärt und weist einen extrem niedrigen Flüssigkeitsanteil von nur 19% auf, wodurch die hohe Stabilität dieser Kristalle zu erklären ist<sup>145</sup>.

Die hohe Aktivität des baculoviralen Polyhedrin-Promotors wird heutzutage routinemäßig ausgenutzt, um rekombinante Proteine in Insektenzelllinien wie Sf9, Sf21 oder High-5 mit posttranslationalen Modifikationen herzustellen. Dabei wird das Polyhedrin-Gen gegen das rekombinante Zielgen ausgetauscht, was in den meisten Fällen zur Produktion von großen Proteinmengen führt<sup>162</sup>. In einigen wenigen Fällen der rekombinanten Proteinherstellung wurde in Sf9 Zellen das Auftreten intrazellulärer Proteinkristalle beobachtet, was jedoch als seltenes und atypisches Verhalten betrachtet und aus diesem Grund nicht näher untersucht wurde<sup>163</sup>. Des Weiteren bestand die weitverbreitete Ansicht, dass das intrazelluläre Kristallwachstum durch die Größe der Zelle limitiert ist, was daher die

Herstellung von diffraktionstauglichen Kristallen bisher nicht zuließ<sup>156,164</sup>. Mit der Entwicklung der FELs hat sich dieses Bild jedoch massiv verändert (siehe 1.5.2), als erstmalig Beugungsdaten von spontan in Sf9 Zellen gewachsenen Kristallen der lysosomalen Protease Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei* am LCLS in Stanford bis zu einer Auflösung von 1.9 Å generiert werden konnten. Ein Jahr später konnte die Kristallstruktur des vollständig glykosylierten sowie nativ inhibierten Pro-Cathepsin B mit einer Auflösung von 2.1 Å bestimmt werden, was die erste neue biologische Information darstellt, die mit einem FEL generiert wurde<sup>155</sup>. Mit Hilfe der gleichen Kristalle konnten vergleichbare Strukturdaten an der Mikrofokus-*Beamline* P14 des Speicherrings PETRAIII (DESY, Hamburg) unter Verwendung eines helikalen Scans generiert werden, was die generelle Verwendbarkeit von *in vivo* Kristallen für die Strukturbiologie auch an Synchrotron-Strahlungsquellen demonstriert<sup>144</sup>. In der Zwischenzeit sind in dieser Arbeitsgruppe *in vivo* Kristalle von weiteren Proteinen erzeugt worden, deren Beugung teilweise bereits durch SFX-Technik oder mittels Synchrotronstrahlung verifiziert werden konnte (Abbildung 9). Die Mechanismen, die zur intrazellulären Kristallbildung führen, sind bisher völlig unbekannt, da aufgrund des bisherigen geringen Interesses keine systematischen Studien in diesem Feld durchgeführt worden sind.

#### 1.5.4 *Trypanosoma brucei* Cathepsin B (TbCatB)

Der Parasit *Trypanosoma brucei* (Tb) ist als Auslöser der afrikanischen Schlafkrankheit identifiziert worden, die für den Tod von jährlich 30000 Menschen verantwortlich ist<sup>165</sup>. Tb wird durch die Tse-Tse-Fliege auf den Menschen übertragen und gelangt über das lymphatische System ins Gehirn, woraufhin sich das Krankheitsbild innerhalb von wenigen Wochen manifestiert<sup>165</sup>. Bei der Suche nach einem potentiellen, spezifischen Inhibitor des Parasitenwachstums wurden lysosomale Cysteinproteasen wie TbCatB als geeignete Zielstrukturen identifiziert<sup>166-168</sup>.

TbCatB gehört zu den Papain-ähnlichen Cysteinproteasen und katalysiert den Abbau von Peptiden im Lysosom mit Hilfe einer katalytischen Diade, die aus Cys-122 und His-282 besteht. Dabei wirkt TbCatB sowohl als Exo- als auch als Endoprotease, wobei die Freisetzung einzelner Aminosäuren essentiell für die Metabolismus-Homöostase des Parasiten ist<sup>169</sup>. Während der Translation entsteht am N-Terminus der naszierenden Proteinkette ein 22 AS langes Signalpeptid, das den co-translationalen Import von TbCatB ins endoplasmatische Retikulum (ER) verursacht<sup>170</sup>. Die Tertiärstruktur von TbCatB zeichnet sich durch zwei über Disulfidbrücken stabilisierte Domänen aus, zwischen denen

sich das 71 AS umfassende Propeptid gebunden wird, welches das aktive Zentrum des TbCatB inhibiert. Dieses Propeptid enthält außerdem an Asn-58 eine Glykosylierungsstelle, die im ER mit Mannose-6-Phosphat versehen wird, was den zielgerichteten Transport von TbCatB über den ER-Golgi-Weg ins Lysosom bewirkt<sup>171</sup>. Die Dissoziation des Propeptids erfolgt durch die Absenkung des pH-Wertes im Lysosom und die damit verbundene Umstrukturierung des für die CatB-Familie charakteristischen *occluding loops* (OL, AS 193-207)<sup>155</sup>: Bei neutralem pH-Wert kann das Propeptid zahlreiche Interaktionen mit der Substrat-Bindestelle sowie mit dem hoch-flexiblen OL ausüben, wodurch seine Bindung im aktiven Zentrum stabilisiert wird. Dagegen wird durch den sauren pH-Wert im Lysosom His-194 des OL protoniert, was ihm ermöglicht eine Salzbrücke mit Asp-115 auszubilden. Dies führt zur Blockierung der S2'-Bindestelle, wodurch das Propeptid verdrängt wird und das Enzym in seine aktive Form übergeht<sup>155,172</sup>. Aufgrund der signifikanten Unterschiede der Propeptid-Bindung zwischen TbCatB und humanem CatB wird das TbCatB Propeptid als potenter Startpunkt für die Entwicklung eines selektiven Inhibitors betrachtet<sup>155</sup>.

### 1.5.5 GFP- $\mu$ NS des avianen Reovirus

Das aviane Reovirus ist ein Hühner-Pathogen, das in der Geflügelindustrie für einen großen wirtschaftlichen Schaden verantwortlich ist<sup>173</sup>. Dabei stellt das  $\mu$ NS-Protein einen essentiellen Teil der viralen Replikationsmaschinerie dar, indem es als oligomeres Gerüstprotein für die virale RNA und zelluläre Replikationsfaktoren dient<sup>174,175</sup>. Seine genaue Funktion im viralen Lebenszyklus ist jedoch bisher weitestgehend unbekannt. Aufgrund seiner Tendenz zur Aggregation konnten für  $\mu$ NS bisher keine strukturellen Daten generiert werden, was die funktionelle Charakterisierung massiv erschwert. Bei der Überexpression der C-terminalen  $\mu$ NS-Domäne (AS 448-605) in Fusion mit dem Grünfluoreszierenden Protein (GFP) in Sf9-Zellen konnte die Ausbildung geordneter Einschlüsse beobachtet werden, die einem kristallähnlichen Aufbau gleichen<sup>175</sup>. Das Vorhandensein kristalliner Ordnung konnte jedoch bisher noch nicht nachgewiesen werden.

## 2 Zielsetzung

Onkolytische Viren stellen einen vielversprechenden, innovativen Ansatz in der Behandlung von Tumorerkrankungen dar, da sie entartete Zellen abtöten, ohne dabei gesunde Zellen in Mitleidenschaft zu ziehen. Insbesondere konnte für das H-1PV gezeigt werden, dass eine Infektion zu einer selektiven Zytotoxizität in unterschiedlichen Tumorzellmodellen führt. Dabei wurde das virale Nichtstrukturprotein 1 (NS1) bereits als Hauptverursacher für den Onkotropismus identifiziert. Dieses Multidomänenprotein besitzt eine Reihe essentieller Funktionen für die virale Replikation und ist darüber hinaus in der Lage, spezifische Interaktionen mit Proteinen der Tumorzelle einzugehen, die letztendlich zur NS1-induzierten Zytotoxizität führen. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Expression von NS1 mit Apoptin, einem onkolytischen Protein aus dem Hühner-Anämie-Virus (CAV, von engl. *chicken anemia virus*), zu einer Verstärkung der Zytotoxizität in Tumorzellen führt. Die genaue molekulare Basis für den onkolytischen Effekt des NS1 ist bisher nicht bekannt, was vor allem durch das Fehlen hochauflösender Strukturdaten bedingt ist. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die molekulare Grundlage für die strukturelle Untersuchung von NS1 und Apoptin geschaffen werden. Da sich die Strukturaufklärung von Multidomänenproteinen häufig als problematisch erweist, sollte NS1 in seine für die virale Propagation essentiellen Domänen unterteilt und diese separat untersucht werden. Im Falle einer erfolgreichen, löslichen bakteriellen Expression sollten diese mittels struktureller Methoden charakterisiert werden, um initiale Einblicke in die molekularen Mechanismen der onkospezifischen Zytotoxizität zu gewähren.

In der Regel stellt die Kristallisation der Proteine die größte Limitation der klassischen Röntgenkristallographie dar. Um einen maximalen Erfolg der Strukturaufklärung zu ermöglichen, sollte neben den gut etablierten Kristallisationsmethoden auch der innovative Ansatz der Kristallisation von Proteinen in lebenden Zellen weiterentwickelt und getestet werden. Kürzlich wurde am Beispiel des nativ inhibierten TbCatB gezeigt, dass sich diese Kristalle für serielle Datensammlungs-Ansätze in die Strukturbioogie gut eignen. Die Beobachtung weiterer intrazellulärer Proteinkristalle innerhalb der Arbeitsgruppe lässt einen generellen Mechanismus für dieses Phänomen vermuten, jedoch ist die zelluläre Basis für den Erfolg der intrazellulären Kristallbildung bisher nicht verstanden. Da mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine Doppelmembran um die TbCatB-Kristalle nachgewiesen werden konnte, liegt die

Vermutung nahe, dass die Kristalle in einem abgetrennten Zellkompartiment entstanden sind. Deshalb sollte am Beispiel von TbCatB und GFP- $\mu$ NS, einem weiteren intrazellulär kristallisierendem Protein aus dem avianen Reovirus, untersucht werden, ob das Zellkompartiment einen initialen *Screening*-Parameter für die intrazelluläre Proteinkristallisation darstellen kann. Da TbCatB-Kristalle nachgewiesenermaßen eine hohe chemische und mechanische Stabilität aufweisen, sollte an diesem Beispiel außerdem ein Stabilitätstest entwickelt werden, um zukünftig optimale Isolierungsbedingungen der Kristalle für Diffraktionsexperimente identifizieren zu können. Diese Erkenntnisse werden dazu beitragen, das Phänomen der intrazellulären Proteinkristallisation besser zu verstehen und die Wahrscheinlichkeit der spontanen Kristallisation weiterer Proteine in lebenden Zellen zu erhöhen. Nach Anwendung der Erkenntnisse auf NS1 und Apoptin steigt ebenfalls die Chance, vollständige Strukturdaten für diese Proteine zu generieren. Dies ist von großer Bedeutung, um die molekularen Mechanismen der onkolytischen Aktivität besser zu verstehen und wird einen essentiellen Beitrag leisten, optimierte Therapien in der Bekämpfung von Tumorerkrankungen entwickeln zu können.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Sequenzanalyse und Klonierung der NS1-Konstrukte für die Expression in *E. coli*

Das H-1PV NS1 besteht aus einer Vielzahl an Domänen, von denen die N-terminale Nukleasedomäne, die zentrale Helikasedomäne sowie die C-terminale Transaktivierungsdomäne für die Propagation des Virus eine entscheidende Rolle spielen (siehe auch 1.4.4). Das genaue Zusammenspiel der einzelnen Domänen wurde bisher jedoch nicht vollständig verstanden, was vor allem mit fehlenden Strukturinformationen über das Protein im Zusammenhang steht. Da sich die Strukturaufklärung von Multidomänenproteinen oft als schwierig erweist, werden diese häufig in ihre funktionellen Domänen aufgeteilt und dann einzeln untersucht. Zur Festlegung der zu klonierenden NS1-Domänen wurde zunächst eine Sequenzanalyse durchgeführt, um diese dann neben dem Volllänge-NS1 einzeln in *E. coli* exprimieren und reinigen zu können. Als Basis für die Festlegung der Domänen wurde die SF3-Helikasedomäne verwendet, da zu Beginn der Arbeit nur für diese Domäne bereits Kristallstrukturen zweier homologer Proteine vorlagen: das SV40 large T-Antigen (PDB: 1SVM, Sequenzidentität: 8.9%) sowie das Rep40 des AAV-2 (PDB: 19SH, 36.7%)<sup>83,176</sup>. Aufgrund der wesentlich höheren Sequenzidentität zu AAV-2 Rep40 wurde zunächst ein Sequenz-Vergleich mit H-1PV NS1 durchgeführt (Abbildung 10).

H-1PV	FLS <b>K</b> KKICTS	PPR <b>D</b> GGYFLS	SDSGW <b>K</b> TN <b>F</b> L	<b>K</b> EGERHLV <b>S</b> K	LYT <b>D</b> EM <b>K</b> PET	VETT <b>V</b> TTAQ <b>E</b>	AK <b>R</b> GRIQ <b>T</b> R <b>K</b>	280
AAV-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---G-----	1
							*	
H-1PV	E <b>V</b> SI <b>K</b> TT <b>L</b> KE	L <b>V</b> H <b>K</b> R <b>V</b> T <b>S</b> PE	D <b>W</b> M <b>M</b> M <b>Q</b> P <b>D</b> SY	I <b>E</b> M <b>M</b> A <b>Q</b> P <b>G</b> GE	N <b>L</b> L <b>K</b> N <b>T</b> L <b>E</b> IC	T <b>L</b> T <b>L</b> A <b>R</b> T <b>K</b> T <b>A</b>	F <b>D</b> L <b>L</b> E <b>K</b> A <b>E</b> T	350
AAV-2	---M <b>E</b> L <b>V</b> G <b>W</b>	L <b>V</b> D <b>K</b> G <b>I</b> T <b>S</b> E <b>K</b>	Q <b>W</b> I <b>Q</b> E <b>D</b> Q <b>A</b> SY	I <b>S</b> F <b>N</b> A <b>A</b> S <b>N</b> S <b>R</b>	S <b>Q</b> I <b>K</b> A <b>A</b> L <b>D</b> N <b>A</b>	G <b>K</b> I <b>M</b> S <b>L</b> T <b>K</b> T <b>A</b>	P <b>D</b> Y <b>L</b> V <b>G</b> Q <b>Q</b> P <b>V</b>	67
	:	:.*	:.*	:.*	:.*	:.*	:.*	
H-1PV	S <b>K</b> L <b>A</b> N <b>F</b> S <b>M</b> A <b>S</b>	T <b>R</b> T <b>C</b> R <b>I</b> F <b>A</b> E <b>H</b>	G <b>W</b> N <b>Y</b> I <b>K</b> V <b>C</b> H <b>A</b>	I <b>C</b> C <b>V</b> L <b>N</b> R <b>Q</b> G <b>G</b>	<b>K</b> R <b>N</b> T <b>V</b> L <b>F</b> H <b>G</b> P	A <b>S</b> T <b>G</b> K <b>S</b> I <b>I</b> A <b>Q</b>	A <b>I</b> A <b>Q</b> A <b>V</b> G <b>N</b> V <b>G</b>	420
AAV-2	E <b>D</b> I <b>S</b> -----	S <b>N</b> R <b>I</b> Y <b>K</b> I <b>L</b> E <b>L</b> N	G <b>Y</b> D <b>P</b> Q <b>Y</b> A <b>A</b> S <b>V</b>	F <b>L</b> G <b>W</b> A <b>T</b> K <b>K</b> F <b>G</b>	<b>K</b> R <b>N</b> T <b>I</b> W <b>L</b> F <b>G</b> P	A <b>T</b> G <b>K</b> T <b>N</b> I <b>A</b> E	A <b>I</b> A <b>H</b> T <b>V</b> P <b>F</b> Y <b>G</b>	132
	..:	*	.*	.*	.*	.*	.*	72
H-1PV	C <b>Y</b> N <b>A</b> A <b>N</b> V <b>N</b> F <b>P</b>	F <b>N</b> D <b>C</b> T <b>N</b> K <b>N</b> L <b>I</b>	W <b>V</b> E <b>E</b> A <b>G</b> N <b>F</b> G <b>Q</b>	Q <b>V</b> N <b>Q</b> F <b>K</b> A <b>I</b> C <b>S</b>	G <b>Q</b> T <b>I</b> R <b>I</b> D <b>Q</b> K <b>G</b>	<b>K</b> G <b>S</b> K <b>Q</b> I <b>E</b> P <b>T</b> P	V <b>I</b> M <b>T</b> T <b>N</b> E <b>N</b> I <b>T</b>	490
AAV-2	C <b>V</b> N <b>W</b> T <b>N</b> E <b>N</b> F <b>P</b>	F <b>N</b> D <b>C</b> V <b>D</b> K <b>M</b> V <b>I</b>	W <b>W</b> E <b>E</b> G <b>K</b> M <b>T</b> A <b>K</b>	V <b>V</b> E <b>S</b> A <b>K</b> A <b>I</b> L <b>G</b>	G <b>S</b> K <b>V</b> R <b>V</b> D <b>Q</b> K <b>C</b>	<b>K</b> S <b>S</b> A <b>Q</b> I <b>D</b> P <b>T</b> P	V <b>I</b> V <b>T</b> S <b>N</b> T <b>N</b> M <b>C</b>	202
	* * :*	***.:	* * *	..	*.:	***	*.:	119
H-1PV	V <b>V</b> R <b>I</b> G <b>C</b> E <b>E</b> R <b>P</b>	E <b>H</b> T <b>Q</b> P <b>I</b> R <b>D</b> R <b>M</b>	L <b>N</b> I <b>H</b> L <b>T</b> R <b>T</b> L <b>P</b>	G <b>D</b> F <b>G</b> L <b>V</b> D <b>K</b> H <b>E</b>	W <b>P</b> L <b>I</b> C <b>A</b> W <b>L</b> V <b>K</b>	N <b>G</b> Y <b>Q</b> S <b>T</b> M <b>A</b> C <b>Y</b>	C <b>A</b> K <b>W</b> G <b>K</b> V <b>P</b> D <b>W</b>	560
AAV-2	A <b>V</b> I <b>D</b> G <b>N</b> S <b>T</b> T <b>F</b>	E <b>H</b> Q <b>Q</b> P <b>L</b> Q <b>D</b> R <b>M</b>	F <b>K</b> F <b>E</b> L <b>T</b> R <b>R</b> L <b>D</b>	H <b>D</b> F <b>G</b> K <b>V</b> T <b>K</b> Q <b>E</b>	V <b>K</b> D <b>F</b> F <b>R</b> W <b>A</b> K <b>D</b>	H <b>V</b> V <b>E</b> V <b>E</b> H <b>E</b> F <b>Y</b>	V <b>K</b> K <b>G</b> G-----	267
	.* *	** **:	***	** *	: *	: *	* *	151
H-1PV	S <b>E</b> D <b>W</b> A <b>E</b> P <b>K</b> L <b>D</b>	T <b>P</b> I <b>N</b> S <b>L</b> G <b>S</b> M <b>R</b>	S <b>P</b> S <b>L</b> T <b>P</b> R <b>S</b> T <b>P</b>	L <b>S</b> Q <b>N</b> Y <b>A</b> L <b>T</b> P <b>L</b>	A <b>S</b> D <b>L</b> A <b>D</b> L <b>A</b> L <b>E</b>	P <b>W</b> S <b>T</b> P <b>N</b> T <b>P</b> V <b>A</b>	G <b>T</b> A <b>A</b> S <b>Q</b> N <b>T</b> G <b>E</b>	630
AAV-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	267

Abbildung 10: Sequenzvergleich von H-1PV NS1 (AS 211-630) und AAV-2 Rep40 (AS 1-267, PDB: 19SH). Im Bereich zwischen AS 291 und 555 des H-1PV NS1 ist eine hohe Sequenzidentität der beiden Proteine zu erkennen. Negativ geladene Reste sind in Blau, positiv geladene in Rot dargestellt. Stern: identischer AS-Rest; Doppelpunkt: Rest mit ähnlichen Ladungs- und Struktureigenschaften; Punkt: Rest mit weniger ausgeprägten ähnlichen Eigenschaften. Erstellt mit<sup>177</sup>.

Es lässt sich erkennen, dass NS1 zwischen den AS 291 und 555 viele identische und ähnliche Reste im Vergleich zu AAV-2 Rep40 aufweist. Aus diesem Grund wurde diese homologe Region als initiale Grundlage für die Klonierung der Helikasedomäne verwendet, mit einigen Modifikationen. Um das spätere Entfernen des His<sub>6</sub>-Tags zu erleichtern, wurde der N-Terminus der Helikasedomäne um eine 6 AS lange native Linker-Region erweitert, wodurch Lys-285 die erste kodierende AS darstellt. Am C-Terminus wurde hingegen das Konstrukt um 10 AS verkürzt und endet bei Gly-542, um eine Überlappung mit der C-terminalen Transaktivierungsdomäne zu verhindern<sup>41</sup>. Aus diesen Begrenzungen ergeben sich folglich die drei für die Viruspropagation essentiellen Domänen des H1-PV NS1, wobei die Nukleasedomäne die Reste 1-284, die Helikasedomäne die Reste 285-542 und die Transaktivierungsdomäne die Reste 543-672 umfasst (Abbildung 11). Die Genabschnitte dieser Domänen sowie das Volllänge NS1-Gen wurden mit Hilfe der in 6.1.7 aufgeführten Oligonukleotide in den pRSETA Vektor (Invitrogen) kloniert, um die zugehörigen Proteine für die bakterielle Expression und die anschließende Reinigung zugänglich zu machen.

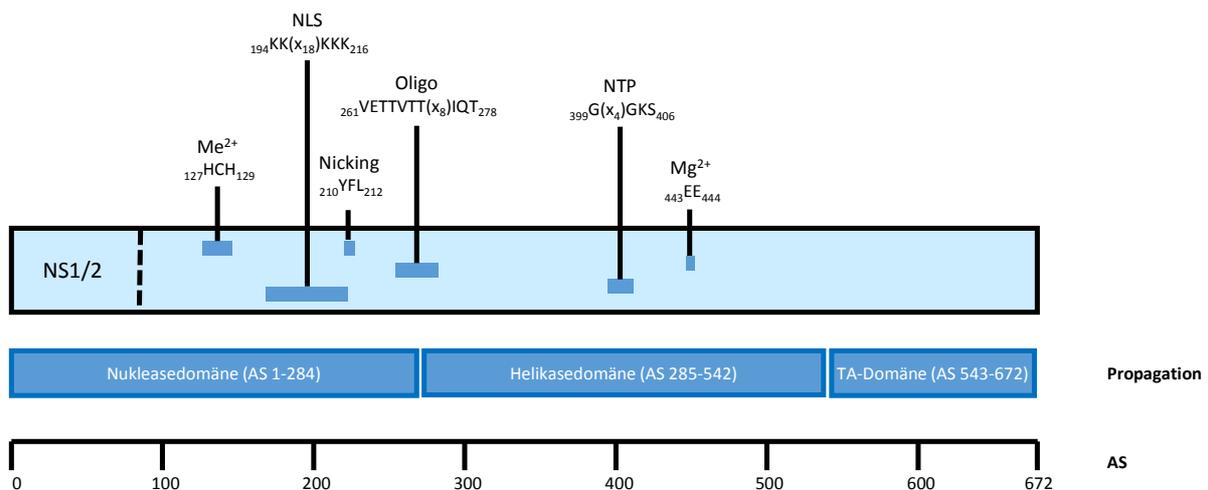


Abbildung 11: Klonierte NS1 Domänen für die Expression in *E. coli*. Me<sup>2+</sup>: Metallbindungsstelle; NLS: Kernimportsequenz; Nicking: Aktives Zentrum der Nukleasedomäne; Oligo: Oligomerisierungsdomäne; NTP: Nukleotidbindungsstelle; Mg<sup>2+</sup>: Magnesium-Bindungsstelle innerhalb der Helikasedomäne. TA: Transaktivierungsdomäne. Angepasst nach<sup>68</sup>.

### 3.2 Initiale Expression und Reinigung der klonierten NS1 Domänen

Um NS1 und seine Domänen für die Strukturbiologie zugänglich zu machen, wurden sie zunächst unter verschiedenen Expressionsbedingungen in unterschiedlichen *E. coli* Stämmen exprimiert. Dabei erfolgte die Induktion der rekombinanten Genexpression durch Zugabe von 0.5-1 mM IPTG bei verschiedenen Inkubationstemperaturen zwischen 18 °C und 37 °C. Für das Volllänge-NS1 konnte unter keinen Bedingungen die erfolgreiche

Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), weshalb sich im Folgenden schwerpunktmäßig auf die Expression der einzelnen Domänen konzentriert wurde. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Abbildung 12 zusammengefasst. Im Gegensatz zum Volllänge-NS1 zeigte sich für die Nukleasedomäne in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21 Star (DE3) bei 37 °C eine mit der Zeit zunehmende Expression des Zielproteins, was zu einer löslichen Protein-Ausbeute von 4 mg/L Zellkultur führte. Eine geringere Expressionstemperatur sowie die Verringerung der Induktor-Konzentration führten nicht zur Erhöhung der löslichen Proteinfraction, jedoch war die Ausbeute ausreichend, um erste strukturelle Untersuchungen durchzuführen.

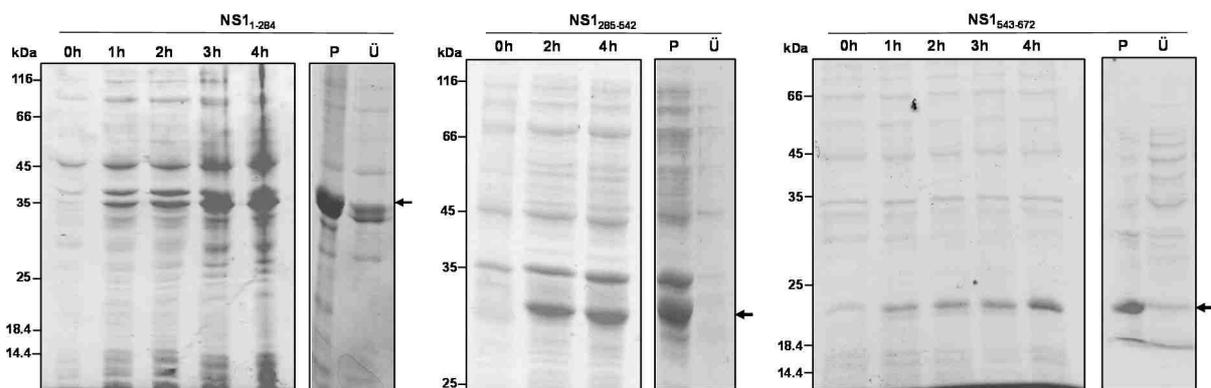


Abbildung 12: SDS-PAGE (12% PAA) der Expression der klonierten NS1 Domänen. Für alle Domänen ist eine Zunahme der spezifischen Bande mit fortschreitender Zeit nach Induktion erkennbar (Pfeil). Somit konnten alle drei Domänen in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen erfolgreich hergestellt werden. Während NS1<sub>1-284</sub> und NS1<sub>543-672</sub> in ausreichenden löslichen Mengen produziert wurden (Ü), bildete NS1<sub>285-542</sub> lediglich unlösliche *inclusion bodies* (P).

Auch für die 30 kDa schwere Helikasedomäne (NS1<sub>285-542</sub>) konnte ein deutlicher Anstieg der spezifischen Expression in *E. coli* BL21 (DE3) über die Zeit beobachtet werden, jedoch bildeten sich wider Erwarten ausschließlich unlösliche *inclusion bodies*. Das Verringern der Temperatur und der Induktor-Konzentration, um die Proteinsynthese-Rate für eine optimierte Faltung der Proteine zu reduzieren, führte in keinem Fall zu einer verbesserten Löslichkeit. Versuche, funktionelle Helikase durch Denaturierung und Rückfaltung aus den *inclusion bodies* herzustellen, blieben im Rahmen einer Masterarbeit innerhalb des Arbeitskreises ebenso ohne Erfolg<sup>178</sup>. In einer weiteren Masterarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe konnte die Helikasedomäne schließlich durch Fusion an das Löslichkeitsvermittelnde Maltose-bindende Protein (MBP) gereinigt und deren korrekte Faltung mit Hilfe eines Aktivitätstests nachgewiesen werden<sup>179</sup>. Aufgrund der

ausführlichen Beschreibung in den beiden genannten Arbeiten wird die Untersuchung dieser Domäne nach bakterieller Expression und Reinigung hier nicht näher diskutiert.

Die C-terminale Transaktivierungsdomäne konnte in geringen Mengen löslich in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen hergestellt werden (0.5 mg/L Zellkultur). Auch hier führten eine Reduktion der Temperatur sowie das Variieren der NaCl- bzw. Glycerinkonzentration im Lysispuffer nicht zur Steigerung der löslichen Proteinfraction.

Aufgrund ihrer löslichen Expression wurden die C-terminale Transaktivierungsdomäne (NS1<sub>543-672</sub>) sowie die N-terminale Nukleasedomäne (NS1<sub>1-284</sub>) im Folgenden näher auf ihre Eignung für die Anwendung zur Strukturaufklärung untersucht.

### 3.3 Die C-terminale Transaktivierungsdomäne NS1<sub>543-672</sub>

NS1<sub>543-672</sub> wurde wie zuvor beschrieben in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen hergestellt und zunächst mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 13A). Dies führte jedoch zu einer unzureichenden Reinheit des Proteins. Aus diesem Grund wurde versucht, die Reinheit durch Größenausschlusschromatographie mit einer *Superdex 200 16/60 prep Grade* Säule zu erhöhen. Das Retentionsprofil zeigt dabei eine heterogene Verteilung des Proteins über eine Vielzahl der Elutionsfraktionen mit einem Maximum nahe des Ausschlussvolumens der Säule, was für eine unspezifische Aggregation des Proteins spricht (Abbildung 13B). Außerdem kann der Nachweis des Zielproteins in zahlreichen Elutionsfraktionen auf eine unspezifische Interaktion von NS1<sub>543-672</sub> mit dem Chromatographiematerial hindeuten. Auch die Reinheit des NS1<sub>543-672</sub> konnte dabei kaum verbessert werden, da vermutlich unspezifische Wechselwirkungen zwischen NS1<sub>543-672</sub> und den bei der Ni-NTA coeluierten Verunreinigungen stattfanden.

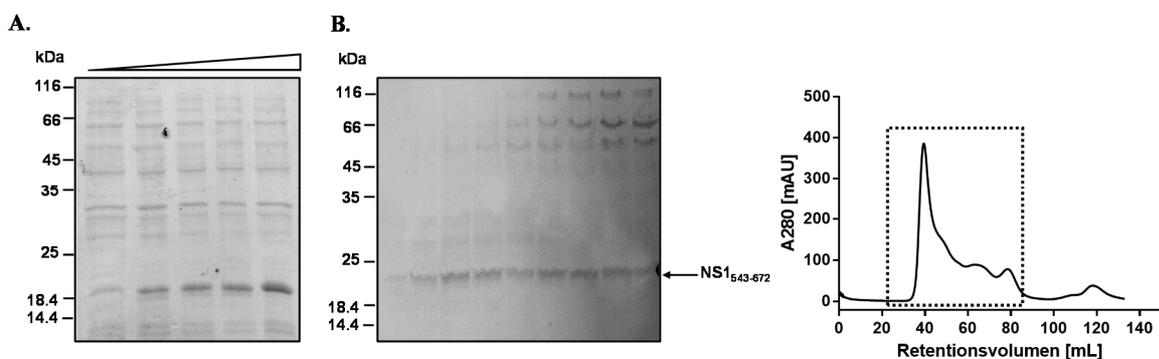


Abbildung 13A: SDS-PAGE (12% Polyacrylamid) der Elutionsfraktionen der Ni-NTA Affinitätschromatographie zur Reinigung von NS1<sub>543-672</sub> mit einem stufenweisen Imidazolgradienten von 50 – 500 mM. Neben der Bande des Zielproteins bei einem Molekulargewicht von XX kDa (Pfeil) ist eine Vielzahl von coeluiierenden *E. coli* Proteinen erkennbar. **B:** Größenausschlusschromatographie von Ni-NTA-

gereinigtem NS1<sub>543-672</sub>. Die umrahmten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (12% PAA) untersucht, wobei das Protein zusammen mit den Verunreinigungen über einen großen Volumenbereich eluiert, was eine unspezifische Interaktion mit dem Chromatographiematerial bzw. mit anderen Zielproteinen andeutet.

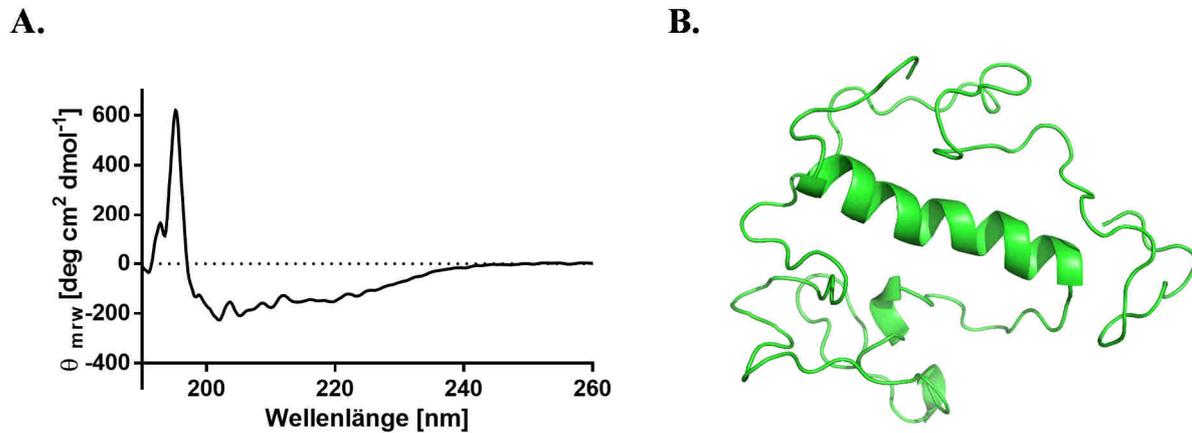


Abbildung 14A: CD-Spektrum von NS1<sub>543-672</sub>. Für die Analyse wurde die erste Fraktion der Größenausschlusschromatographie verwendet, da diese die vergleichsweise höchste Reinheit aufwies (Abbildung 13B) Die geringe molare Elliptizität zeigt eindeutig, dass das Protein lediglich ein geringes Maß an Sekundärstrukturelementen aufweist. B: Mit Hilfe des Phyre2-Algorithmus<sup>180</sup> berechnetes *in silico* Modell von NS1<sub>543-672</sub>. Das Modell weist eine dominierende  $\alpha$ -Helix auf, der restliche Teil des Proteins ist jedoch unstrukturiert.

Ferner wurde die erste Fraktion der Größenausschlusschromatographie, die die höchste Reinheit aufwies, für CD-spektroskopische Analysen verwendet. Das zugehörige Spektrum weist eine minimale molare Elliptizität von -200 deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup> auf, was auf einen sehr geringen Anteil an vorhandenen Sekundärstrukturelementen hindeutet (Abbildung 14A). Aufgrund der unzureichenden Reinigungseffizienz kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das gemessene CD-Signal durch weitere Proteine in der Lösung beeinflusst wird. Eine Änderung der initialen Pufferbedingungen bei der Lyse der Zellen konnte nicht zu einer verbesserten Löslichkeit und Reinigung des Proteins führen. Der große Anteil an unstrukturierten Bereichen wird durch ein mit Hilfe des Phyre2-Algorithmus berechneten *in silico*-Modells des NS<sub>543-672</sub>, welches lediglich einen kurzen  $\alpha$ -helikalen Bereich aufweist (Abbildung 14B). Jedoch wäre zu erwarten, dass dieser strukturierte Bereich während der CD-spektroskopischen Untersuchungen detektierbar ist. Somit führt die bakterielle Expression des Proteins unter den getesteten Pufferbedingungen wahrscheinlich zu einem Protein mit unvollständiger oder nicht korrekter Faltung. Unter diesen Voraussetzungen ist das bakteriell exprimierte und isolierte NS1<sub>543-672</sub> unter den gegebenen Bedingungen nicht für eine strukturelle Charakterisierung geeignet, da dafür homogene, monodisperse

Proteinlösungen erforderlich sind, und wurde folglich keinen weiteren Untersuchungen unterzogen.

### 3.4 Die N-terminale Nukleasedomäne

#### 3.4.1 Initiale strukturelle Charakterisierung in Lösung

NS1<sub>1-284</sub> konnte in *E. coli* BL21 (DE3) mit einer löslichen Ausbeute von 4 mg/L Zellkultur erfolgreich produziert und mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt werden. Um die Reinheit von NS1<sub>1-284</sub> weiter zu erhöhen und sein Dispersitätsverhalten zu untersuchen, wurde nach Entfernen des His<sub>6</sub>-Tags durch Proteolyse mittels TEV-Protease eine Größenausschlusschromatographie auf einer kalibrierten *Superdex 200 16/60 prep grade* Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Dies resultierte in der Elution des Proteins mit einer Reinheit von über 95% bei einem Retentionsvolumen von 86.6 mL (Abbildung 15D), welches einem berechneten Molekulargewicht von 34.0 kDa und damit einem Monomer in Lösung entspricht (erwartetes Molekulargewicht: 33.1 kDa). Die Monodispersität der Lösung konnte durch anschließende DLS-Experimente bestätigt werden. Über einen weiten Konzentrationsbereich von 1-10 mg/mL konnte keine Änderungen des hydrodynamischen Radius nachgewiesen werden (Abbildung 15E). Um die Faltungsqualität des bakteriell hergestellten NS1<sub>1-284</sub> zu validieren, wurden CD-spektroskopische Experimente im Wellenlängenbereich von 260-180 nm durchgeführt. Zur Minimierung der Chloridionen-abhängigen Hintergrundabsorption wurde NS1<sub>1-284</sub> vorher gegen NaF-haltigen Puffer dialysiert. Das CD-Spektrum zeigt eine klare Dominanz von  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturanteilen, die mit Hilfe des von Raussens *et al.* entwickelten Algorithmus auf 36% gegenüber 13%  $\beta$ -Faltblatt-Anteil bestimmt werden konnten (Abbildung 15 A+C)<sup>181</sup>. Dies steht im Einklang mit bisher aufgeklärten Kristallstrukturen homologer Proteine, weshalb von einer weitestgehend korrekten Faltung des NS1<sub>1-284</sub> ausgegangen werden kann (Abbildung 15 C)<sup>73,79,18</sup>. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität von NS1<sub>1-284</sub> wurden CD-basierte Schmelzkurven im Temperaturbereich zwischen 20-90 °C aufgenommen, aus denen der Schmelzpunkt des Proteins auf 45.3 °C bestimmt wurde (Abbildung 15 B), was auf eine geringe thermische Stabilität unter den gewählten Pufferbedingungen hindeutet. Diese initialen Ergebnisse, insbesondere die hohe Reinheit, die gute Faltungsqualität sowie die Monodispersität in Lösung, stellen eine vielversprechende Grundlage für die Kristallisation von NS1<sub>1-284</sub> dar.

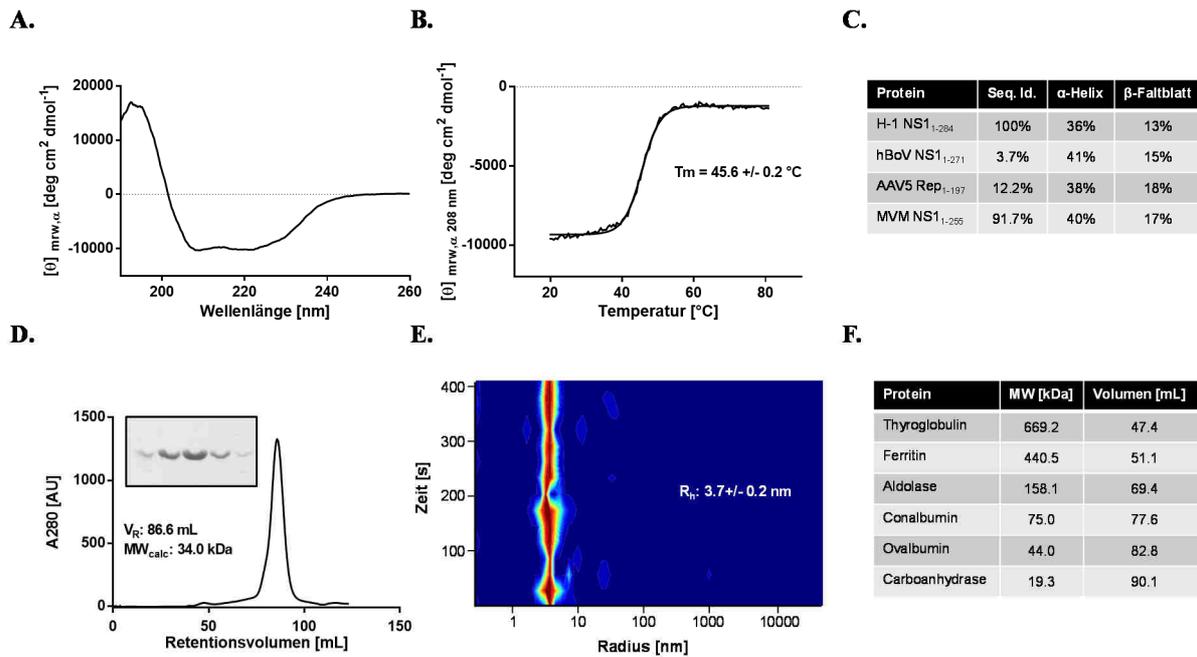


Abbildung 15: Initiale Charakterisierung von NS1<sub>1-284</sub> in Lösung. **A:** CD-Spektrum im Wellenlängenbereich von 260-180 nm zur Bestimmung des Gehalts an Sekundärstrukturelementen (Puffer: 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaF). **B:** Schmelzkurve erstellt anhand der Abnahme des CD-Signals bei 208 nm mit steigender Temperatur. **C:** Sekundärstrukturanteile von NS1<sub>1-284</sub> berechnet nach<sup>181</sup>. Zum Vergleich sind die Sekundärstrukturanteile strukturell homologer, bereits strukturell aufgeklärter Domänen dargestellt (PDB hBoV NS1: 4KW3; AAV5 Rep: 1M55; MVM NS1: 4PP4). **D:** Retentionsprofil von NS1<sub>1-284</sub> nach Größenausschlusschromatographie mit einer *Superdex 200 16/60 prep grade*-Säule (GE Healthcare) **E:** DLS-basierte Bestimmung des hydrodynamischen Radius von NS1<sub>1-284</sub> in Abhängigkeit von der Zeit bei einer Konzentration von 4.5 mg/mL. **F:** Aufstellung der kommerziell erhältlichen Standardproteine, mit denen die *Superdex 200 16/60 prep grade*-Säule zur Bestimmung des Molekulargewichts von NS1<sub>1-284</sub> kalibriert wurde (GE-Healthcare).

### 3.4.2 Kristallisationsversuche NS1<sub>1-284</sub>

Um NS1<sub>1-284</sub> zu kristallisieren wurden zunächst eine Vielzahl von Roboter-assistierten *Screening*-Experimenten mit verschiedenen Proteinkonzentrationen zwischen 4-13.5 mg/mL durchgeführt, um initiale Bedingungen für eine erfolgreiche Proteinkristallisation zu ermitteln. Unter den ca. 2000 getesteten Ansätzen konnten einige vielversprechende Bedingungen identifiziert werden, in denen die Entstehung von Phasentrennung (Abbildung 16 D), kleineren Makrokristallen (Abbildung 16 E) oder Mikrokristallen (Abbildung 16 A) beobachten werden konnte.

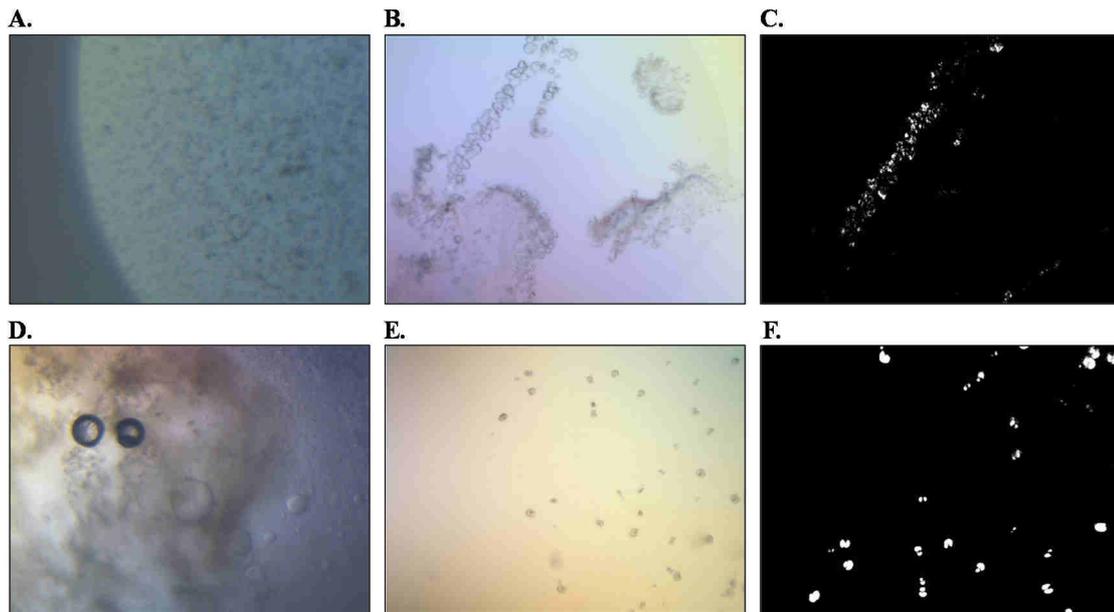


Abbildung 16: Lichtmikroskopische Untersuchung der Kristallisationsversuche mit NS<sub>1-284</sub> unter verschiedenen Pufferbedingungen. Beim *Screening* mit einer Proteinkonzentration von 13.5 mg/mL wurden neben der Entstehung von Phasentrennung (**D**; 0.2 M Zinkacetat, 0.1 M Natriumacetat pH 4.6, 2.0 M Ammoniumsulfat) die Ausbildung kleiner Mikrokrystalle beobachtet (**A**; 2.4 M Natriummalonat, pH 7.0), die nach *streak seeding* in einem neuen Proteintropfen zum Heranwachsen größerer Kristalle entlang der *seeding*-Achse führte (**B**). Diese zeigten außerdem ein positives Signal bei Untersuchung mittels SONICC-Technik (**C**), was ihren kristallinen Charakter beweist. Neben den Mikrokrystallen wurde ebenfalls eine Bedingung detektiert, in der Makrokristallen (ca. 80 x 80 µm) entstanden (**E**), welche ebenfalls beim SONICC-Test ein positives Signal aufwiesen (**F**; 0.2 M Lithiumsulfat, 0.1 M Tris pH 8.5, 40% (v/v) PEG400).

Da durch Änderung von pH-Wert, Präzipitanten- und Proteinkonzentration keine Optimierung der Kristallmorphologie sowie -größe erzielt werden konnte, wurden die Mikrokrystalle in Bruchteile zerkleinert und für *streak seeding*-Experimente eingesetzt, was zur Ausbildung von größeren Kristallen entlang der *seeding*-Achse führte (Abbildung 16B). Diese Kristalle zeigten auch ein positives Signal bei der Untersuchung mittels SONICC-Technik (*Second Order Nonlinear Imaging of Chiral Crystals*), mit deren Hilfe chirale Kristalle von nicht-chiralen Kristallen unterschieden werden können (Abbildung 16 C). Ein entsprechendes SONICC-Signal konnte auch für die erhaltenen Makrokristalle detektiert werden (Abbildung 16 F), was den kristallinen Charakter der Strukturen beweist. Jedoch zeigte sich bei Diffraktionstests an einem herkömmlichen Röntgengenerator, dass es sich in beiden Fällen um Salzkristalle handelte, weshalb eine Optimierung dieser Bedingungen nicht weiter verfolgt wurde.

Die Pufferbedingungen, bei denen Phasentrennung beobachtet werden konnte, wurde bezüglich des pH-Wertes sowie der Präzipitanten- und Proteinkonzentration variiert, um

die Wahrscheinlichkeit der Kristallbildung zu erhöhen, was jedoch in keinem Fall zum Erfolg führte. Überraschenderweise konnte das Ergebnis der Phasentrennung selbst unter exakt identischen Bedingungen wie im Hochdurchsatzexperiment weder mit derselben Protein-Charge noch mit frisch gereinigtem NS1<sub>1-284</sub> reproduziert werden. Dies deutet auf ein Problem mit der Proteinintegrität unter den verwendeten Pufferbedingungen hin, wodurch die erfolgreiche Ausbildung eines geordneten Kristallgitters verhindert wird. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass das Protein bereits 3 Tage nach der Reinigung trotz Lagerung bei 4 °C zu präzipitieren begann. Somit wurde im Folgenden versucht, die Stabilität von NS1<sub>1-284</sub> in Lösung und damit den Erfolg der Kristallisation zu erhöhen.

### 3.4.3 Optimierung der Proteinstabilität von NS1<sub>1-284</sub>

#### 3.4.3.1 Limitierte Proteolyse

Die initiale Stabilität des Proteins in Lösung ist für den Erfolg der Kristallisation essentiell. Zur Untersuchung, ob flexible Bereiche innerhalb der Proteinstruktur von NS1<sub>1-284</sub> die Kristallisation negativ beeinflussen, wurde zunächst eine limitierte Proteolyse mit verschiedenen Proteasen durchgeführt. Dabei entstanden nach Verdau von NS1<sub>1-284</sub> mit geringen Mengen Trypsin (1:100 w/w) neben dem unverdauten Protein drei stabile Intermediate, die als Banden mittels SDS-PAGE detektiert werden konnten (Abbildung 17A). Zur Identifikation der Sequenz der einzelnen Fragmente wurden die Banden nach der SDS-PAGE ausgeschnitten, das Protein im Gel mit Trypsin vollständig verdaut und weiterführende MALDI-TOF-basierte massenspektrometrische Experimente durchgeführt. Dabei wurden zunächst eindimensionale MS-Spektren der tryptischen Peptide aufgenommen und anschließend ausgewählte, prominente Peptide durch *collision-induced dissociation* (CID) an der Peptidbindung gespalten, um eine Sequenzierung der Fragmente zu ermöglichen. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 17D exemplarisch für Bande 2 und das Signal mit dem Masse-Ladungs-Verhältnis  $m/z=1010.445$  dargestellt. Für die anderen Banden wurde analog dazu vorgegangen. Die Analyse ergab, dass es sich bei Bande 2 um ein C-terminal trunkiertes Protein und bei den Banden 3 und 4 um ein N-terminal trunkiertes Protein handelt (Abbildung 17C), was darauf hindeutet, dass während der limitierten Proteolyse interne Schleifenstrukturen innerhalb des NS1<sub>1-284</sub> entfernt wurden. Um die Fragmente einzeln kristallisieren zu können, wurde zunächst versucht diese durch Größenausschlusschromatographie, voneinander zu trennen. Allerdings eluierten alle

Fragmente in einer gemeinsamen Fraktion mit einem zum unverdauten Protein vergleichbaren Retentionsvolumen, was auf eine spezifische Interaktion der Fragmente untereinander hindeutet (Abbildung 17B).

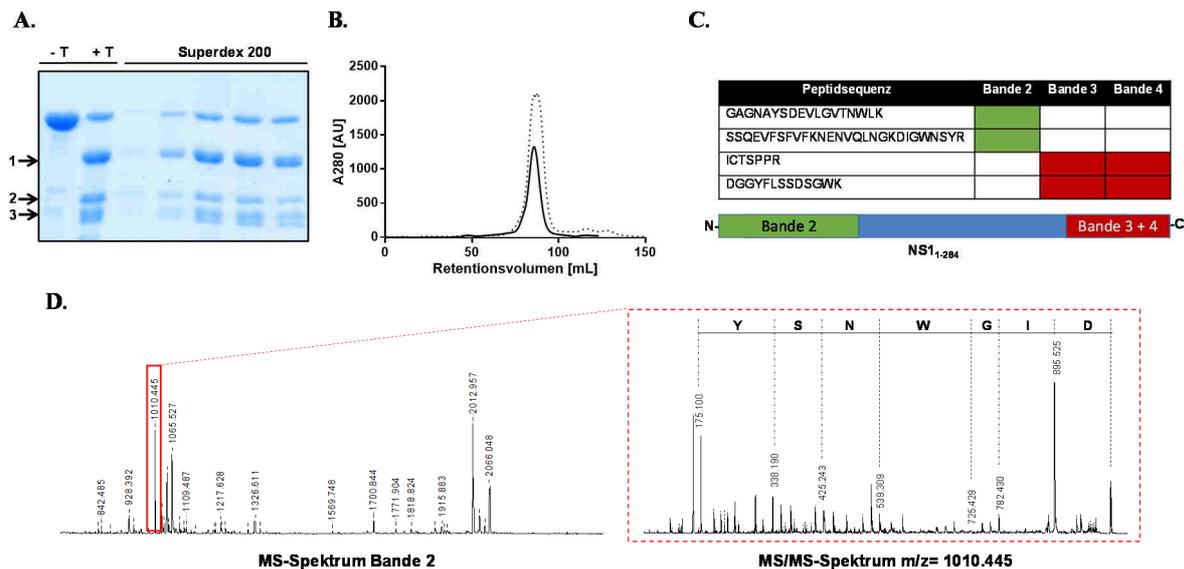


Abbildung 17: Limitierte Proteolyse von NS1<sub>1-284</sub>. **A+B**: Verdau mit Trypsin im Verhältnis 1:100 (w/w) für 30 min resultiert in der Ausbildung von drei stabilen Intermediaten, die mittels SDS-PAGE (12 % PAA) detektiert (**A**,-T: unverdautes Protein;+T :trypsiniertes Protein), jedoch durch Größenausschluss-chromatographie nicht voneinander getrennt werden konnten, was auf ihre spezifische Interaktion hindeutet (**B**, Chromatogramm. durchgezogene Linie: NS1<sub>1-284</sub> verdaut; gepunktete Linie: NS1<sub>1-284</sub> unverdaut). **C+D**: Durch MS/MS-Analysen konnte Bande 2 dem N-Terminus und die Banden 3+4 dem C-Terminus von NS1<sub>1-284</sub> zugeordnet werden. Links ist das 1D-MS -Spektrum exemplarisch für Bande 2, rechts das zugehörige MS-MS-Spektrum des Signals bei m/z=1010.445 dargestellt, aus dem die Sequenz direkt abgeleitet werden konnte.

Somit wurden weitere Kristallisations-Screenings mit dieser Mischfraktion in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, da die Kristallisationswahrscheinlichkeit nach proteolytischer Entfernung flexibler Schleifenstrukturen deutlich erhöht sein könnte. Jedoch konnte auch mit dem fragmentierten NS1<sub>1-284</sub> keine geeignete Bedingung zur Herstellung diffraktionstauglicher Kristalle gefunden werden.

### 3.4.3.2 Thermofluor-Test

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Proteinstabilität stellt die Optimierung der Pufferbedingungen des Proteins dar. Um diese zu untersuchen, wurde ein Thermofluor-Assay durchgeführt, bei dem die zunehmende Exposition hydrophober Regionen während der Temperatur-induzierten Denaturierung des Proteins durch den fluoreszenten Farbstoff

*SYPRO Orange* (Life Technologies) über die Zeit quantifiziert wird. Eine verzögert ansteigende detektierbare Fluoreszenz korreliert dabei mit einer höheren Proteinstabilität. Mit Hilfe dieses Assays wurde der Einfluss von unterschiedlichen Puffersystemen und pH-Werten, Salzkonzentrationen sowie Additiven auf die Stabilität von NS1<sub>1-284</sub> untersucht. Die relevantesten Ergebnisse dieses Tests sind in Abbildung 18 dargestellt. Eine optimale Proteinstabilität wurde u.a. bei einem pH-Wert zwischen 7.0 und 8.0 sowie einer minimalen NaCl-Konzentration von 200 mM nachgewiesen, was den bisher für die Kristallisationsversuche verwendeten Pufferbedingungen entspricht. Da NS1<sub>1-284</sub> ein zweiwertiges Metallbindungszentrum besitzt<sup>67</sup>, wurde außerdem der Einfluss unterschiedlicher zweiwertiger Kationen auf die Proteinstabilität analysiert. Dies führte zu dem Ergebnis, dass MnCl<sub>2</sub> die Stabilität von NS1<sub>1-284</sub> signifikant erhöht, während ZnCl<sub>2</sub> und CuCl<sub>2</sub> zu einer sofortigen Denaturierung des Proteins führen. Die Zugabe von MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> sowie EDTA zeigte dagegen keinen nennenswerten Effekt auf die Stabilität von NS1<sub>1-284</sub>. Um auszuschließen, dass eine MnCl<sub>2</sub>-induzierte Aggregation für die Erhöhung der Proteinstabilität verantwortlich ist, wurden vergleichende DLS-Experimente mit NS1<sub>1-284</sub> unter Anwesenheit von MnCl<sub>2</sub> und EDTA durchgeführt, wobei kein Unterschied der zugehörigen hydrodynamischen Radien erkennbar war (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass Mn<sup>2+</sup> spezifisch an das bekannte HUH-Motiv des NS1<sub>1-284</sub> bindet und damit die Stabilisierung des Proteins induziert.

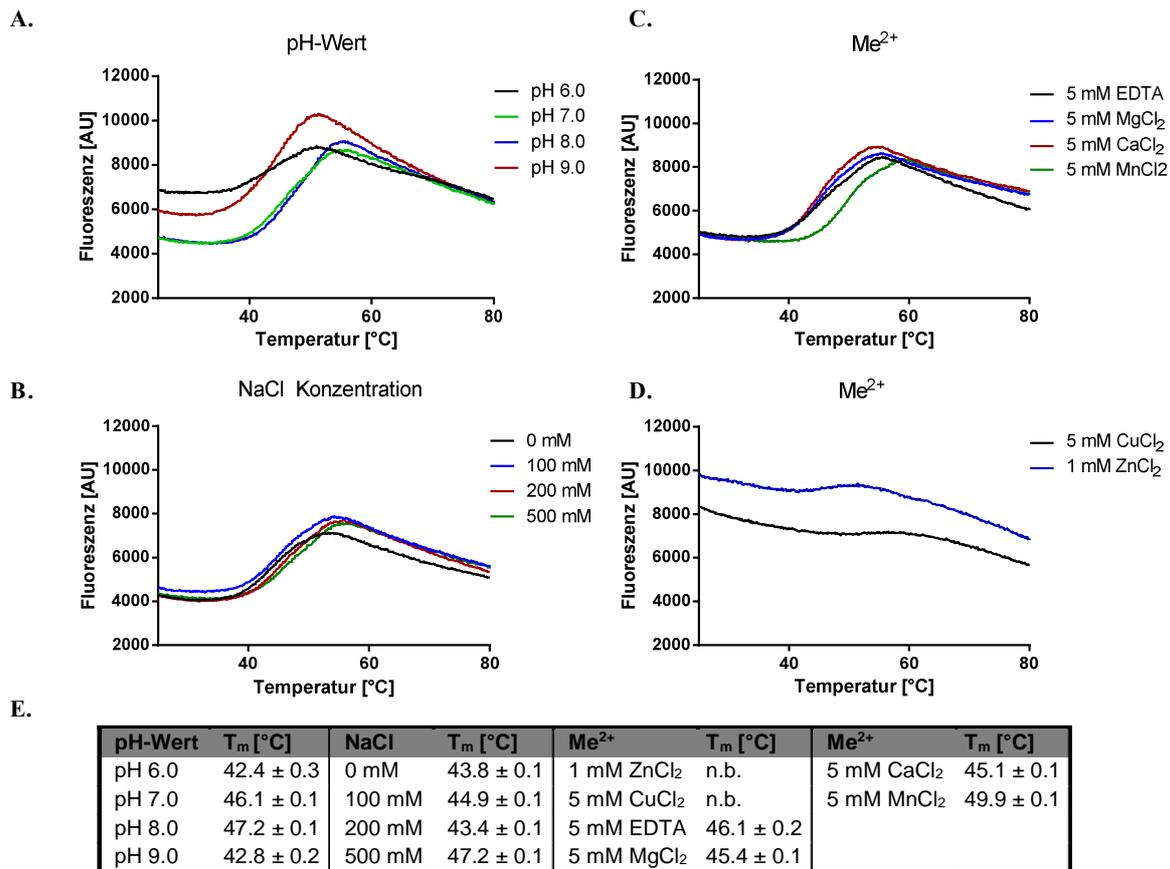


Abbildung 18: Stabilitätsuntersuchungen von NS1<sub>1-284</sub> mittels Thermofluor-Test, der den jeweiligen Einfluss von pH-Wert (A), NaCl-Konzentration (B) sowie zweiwertige Kationen (C+D) zeigt. Die aus den Messwerten berechneten Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub>) für die jeweiligen Bedingungen sind unter E tabellarisch zusammengefasst.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden anschließend Optimierungsversuche der bereits zuvor getesteten Kristallisationsbedingungen sowie neue Hochdurchsatzkristallisationsexperimente von NS1<sub>1-284</sub> nach Zugabe von 1 mM MnCl<sub>2</sub> durchgeführt. Jedoch führte auch dies nicht zur erhofften Verbesserung des Kristallisationsverhaltens, weshalb in nächster Konsequenz eine Neuklonierung des Konstruktes in Erwägung gezogen wurde.

### 3.4.3.3 Bioinformatische Ansätze zur Herstellung eines optimierten Nuklease-Konstrukts

Nachdem vorherige Versuche fehlschlagen, NS1<sub>1-284</sub> auch unter optimierten Pufferbedingungen zu kristallisieren, wurde eine erneute Sequenzanalyse der Nukleasedomäne mit einer Reihe bioinformatischer Programme vorgenommen, um durch Klonierung eines neuen Konstrukts eine optimierte, kristallisierbare Version des Proteins zu generieren. Eine häufig verwendete Software ist das Webserver-basierte Tool

*XtalPred*<sup>18</sup>, das auf Grundlage der Proteinsequenz Sekundärstrukturelemente sowie ungeordnete Bereiche vorhersagt und unter Berücksichtigung von weiteren biophysikalischen Eigenschaften (isoelektrischer Punkt, Molekulargewicht, Oberflächenentropie etc.) einen *Score* für die hypothetische Kristallisierbarkeit des Proteins berechnet. Bei der entsprechenden Analyse der NS1<sub>1-284</sub> Sequenz wurde am C-Terminus des Proteins im Bereich der AS 266-284 ein potentiell ungeordneter Bereich detektiert, der große Teile des Oligomerisierungsmotivs von NS1 enthält (Abbildung 19, grüne Markierung)<sup>81</sup>.

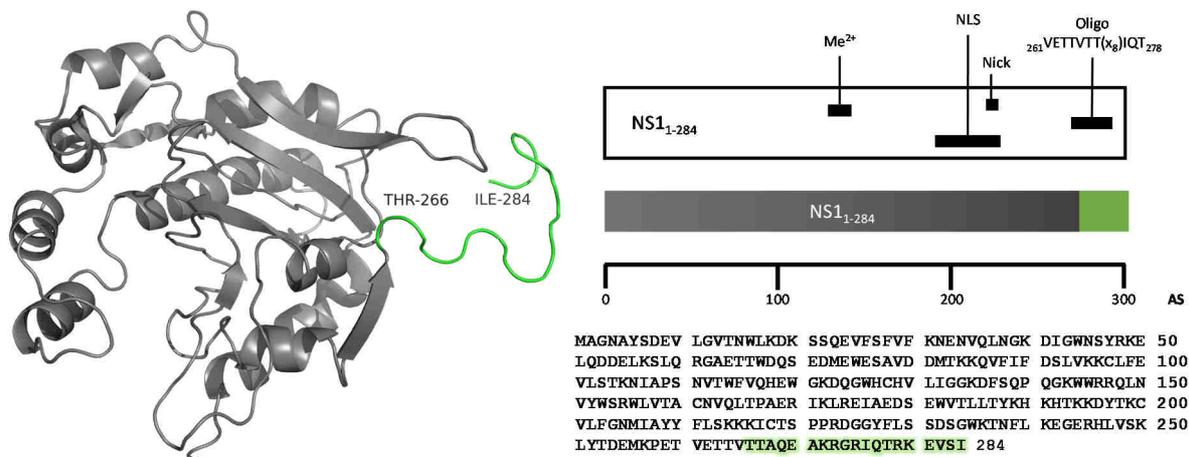


Abbildung 19: Strukturvorhersage sowie berechnetes *in silico* Modell von NS1<sub>1-284</sub>. Mit Hilfe von *XtalPred*<sup>183</sup> konnte ein ungeordneter Bereich innerhalb des Proteins von Thr-266 bis Ile-284 detektiert werden, der einen großen Teil des Oligomerisierungsmotivs enthält. Diese Vorhersage konnte durch Erstellung eines *in silico* Modells mit dem Phyre2-Algorithmus<sup>180</sup> bestätigt werden, in dem dieser AS-Bereich als unstrukturierte Schleifenstruktur vorliegt.

Zur gleichen Zeit wurde die hochauflösende Kristallstruktur der Nukleasedomäne des genetisch verwandten humanen Bocavirus (hBoV) aufgeklärt, welches die erste bekannte Nukleasedomänenstruktur eines autonom replizierenden Parvovirus bis dahin darstellte<sup>182</sup>. Trotz der geringen Sequenzidentität von 22% zu NS1<sub>1-284</sub> kann aufgrund der konservierten Proteinfunktionen von einer weitestgehend ähnlichen Faltung ausgegangen werden. Deshalb wurde mit Hilfe des Phyre2-Algorithmus<sup>180</sup> ein erstes *in silico* Modell von NS1<sub>1-284</sub> auf Grundlage des hBoV NS1 durchgeführt. Dieses bestätigt die Vorhersage des *XtalPred*-Servers, dass ein unstrukturierter Linker-Bereich am C-Terminus der Nukleasedomäne vorhanden ist. Da durch die Flexibilität dieser Domäne die Ausbildung eines geordneten Kristallgitters gestört sein könnte, stellt dieses Motiv einen möglichen Grund für die beschriebenen Probleme bei der Kristallisation des NS1<sub>1-284</sub> dar.

Folglich wurde beschlossen, eine um den als ungeordnet vorhergesagten Bereich trunkeierte Version der Nukleasedomäne zu klonieren, welche die Reste 1-265 umfasst. Entsprechend wurde durch Einführung eines Stopp-Codons nach Val-265 durch zielgerichtete Mutagenese das Konstrukt NS1<sub>1-265</sub> kloniert. Initiale Expressions- und Löslichkeitsstudien in *E. coli* BL21(DE3) Zellen resultierten nicht in nennenswerten Unterschieden zu NS1<sub>1-284</sub>. Auch die Isolierung des Proteins mittels Ni-NTA Affinitäts- sowie Größenausschlusschromatographie führte zu einer vergleichbaren Reinheit von über 95% (Daten nicht gezeigt). Alle weiteren Experimente zur funktionellen sowie strukturellen Charakterisierung, unter anderem die Wiederholung der Kristallisationsversuche, wurden daher im Folgenden mit NS1<sub>1-265</sub> durchgeführt.

#### 3.4.4 Kristallisation und Strukturaufklärung von NS1<sub>1-265</sub>

Analog zu den entsprechenden Kristallisationsversuchen mit NS1<sub>1-284</sub> wurden zunächst initiale Roboter-gestützte *Screening*-Ansätze durchgeführt, um geeignete Bedingungen für die Kristallisation von NS1<sub>1-265</sub> zu ermitteln. Insgesamt wurden 384 Bedingungen der JCSG-, Cryos-, Morpheus- sowie Ammoniumsulfat-*Suites* mit Proteinkonzentrationen zwischen 4-10.5 mg/mL im *sitting drop* Verfahren getestet. Dabei konnte nach Inkubation für 5 Tage bei 20 °C in einem Ansatz, der 6.2 mg/mL Protein sowie 100 mM Bis-Tris pH 5.5 und 25% PEG3350 (w/v) enthielt, die Ausbildung feiner Nadelcluster detektiert werden (Abbildung 20 A+B). Diese eindimensionalen Kristalle sind wahrscheinlich aus einem einzigen Kristallisationskeim gewachsen und aufgrund ihrer geringen Größe und Ordnung in dieser Form für die Röntgenstrukturanalyse nicht geeignet. Deshalb wurden die Nadeln mit Hilfe eines *seeding beads* (Hampton Research) zerkleinert (*seed stock*) und die Fragmente als Kristallisationskeime in neuen Kristallisationsansätzen verwendet. Dafür wurde zunächst 1 µL Proteinlösung mit 1 µL Präzipitantenlösung (100 mM Bis-Tris pH 5.5 und 12% PEG3350) gemischt und nach 30-minütiger Inkubation 0.5 µL *seed stock* hinzugefügt. Nach 96 Stunden bei 20 °C waren zweidimensionale, rautenförmige Kristalle mit einer Größe von bis zu 400 µm Kantenlänge erkennbar, die weiterhin aus einem zentralen Ursprung heraus gewachsen sind (Abbildung 20 C, E+F). Außerdem fluoreszierten die Kristalle bei Illumination mit UV-Licht, was darauf hindeutet, dass es sich um Proteinkristalle handelt (Abbildung 20 D). Bei höheren PEG3350-Konzentrationen und pH-Werten konnte dagegen kein Kristallwachstum beobachtet werden.

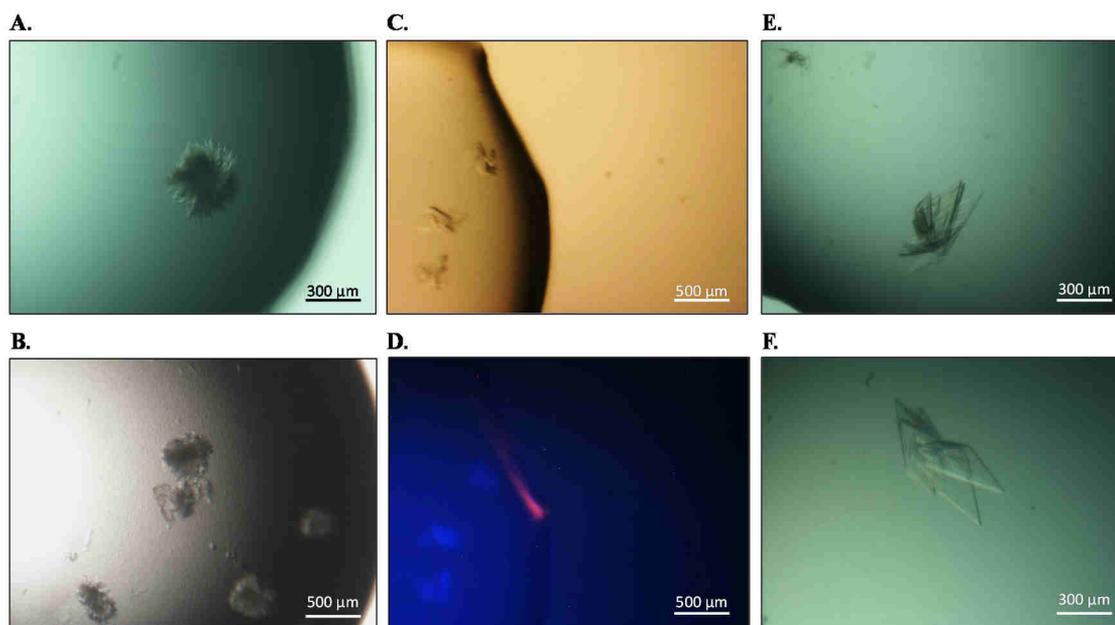


Abbildung 20: Lichtmikroskopische Untersuchung von Kristallisationsexperimenten mit NS11-265. Bei initialen Hochdurchsatzscreenings konnte die Ausbildung feiner Nadel-Cluster beobachtet werden (A+B, 100 mM Bis-Tris pH 5.5, 25% PEG 3350). Nach *microseeding* der Nadeln in neue Kristallisationsansätze (100 mM Bis-Tris pH 5.5, 12% PEG 3350) kam es zur Ausbildung makroskopischer 2D-Kristalle mit einer Kantenlänge von bis zu 400 µm (C, E, F), die bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoreszieren (D) und somit höchstwahrscheinlich aus Protein bestehen.

Zur Datensammlung wurden die verwachsenen Kristalle mit einem Nylon-Loop vorsichtig voneinander getrennt und durch Hinzufügen von 40% Glycerin (v/v) zum Kristallisationspuffer kryokonserviert, um die Ausbildung von Eiskristallen während des Diffraktionsexperiments zu minimieren. Anschließend wurden sie in einem 400 µm Nylon-Loop montiert und an der P11-Beamline des PETRAIII Speicherrings am DESY in Hamburg bei einer Wellenlänge der Synchrotron-Strahlung von 1.023 Å, einer Belichtungszeit von 0.2 s sowie einer Rotation des Kristalls um 0.2° vermessen. Die generierten Diffraktionsbilder weisen Bragg-Beugungssignale bis zu einer maximalen Auflösung von 2.6 Å auf. Somit wurde eindeutig bewiesen, dass es sich um Proteinkristalle von NS11-265 handelt (Abbildung 21A). Bei einer Kristallrotation von 90° kam es jedoch zur zunehmenden Verbreiterung der Diffraktionssignale (Abbildung 21B), was auf eine Anisotropie des Kristalls hindeuten könnte. Die Daten wurden dennoch mit XDS<sup>184</sup> in der Raumgruppe  $P 1 2 1$  integriert und skaliert, wobei für den Auflösungsbereich von 47.4 - 2.8 Å mit einem  $R_{\text{merge}}$  von 12.3% die besten Strukturparametern erzielt wurden (Tabelle 2).

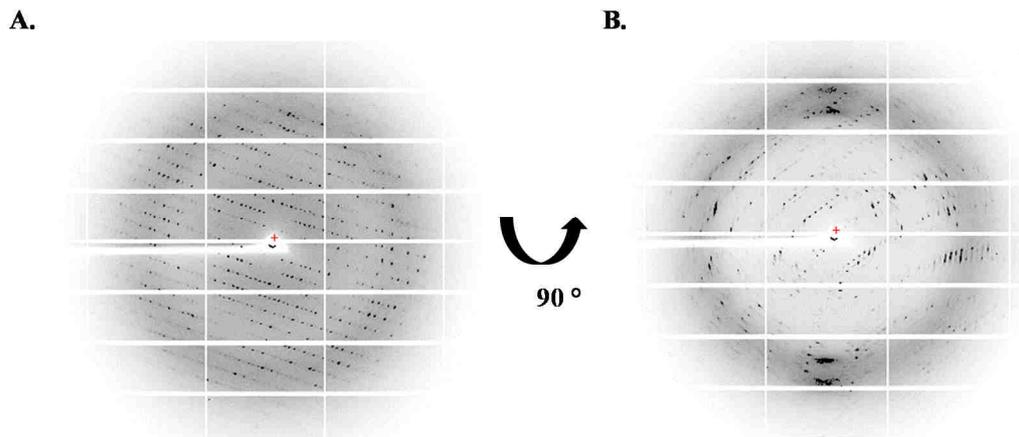


Abbildung 21: An der P11-Beamline der Synchrotronstrahlungsquelle PETRA III (DESY, Hamburg) aufgenommene Diffractionsbilder der NS11-265 Kristalle aus zwei jeweils um 90 ° rotierten Orientierungen. Die unterschiedliche Diffractionsqualität deutet auf eine Anisotropie der Kristalle hin.

Ein berechneter Matthews-Koeffizient<sup>185</sup> von  $2.34 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  sowie ein korrespondierender Lösungsmittelanteil von 47.5% deuten auf die Anwesenheit von zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit hin. Die Phasierung mittels molekularem Ersatz wurde folglich mit MOLREP<sup>186</sup> unter Verwendung der MVM-NS11-255 Kristallstruktur (PDB: 4PP4, Sequenzidentität: 91.7%) durchgeführt und ergab eine eindeutige Lösung. Mit Hilfe der Programme Phenix<sup>187</sup> und Coot<sup>188</sup> wurde anschließend ein initiales Arbeitsmodell erzeugt, das bis zu einem R-Faktor von 24.1% und einem freien R-Faktor von 27.1% verfeinert werden konnte (Tabelle 2). Während der Verfeinerung wurden 19 Wassermoleküle in die Elektronendichte eingebaut.

Das kristallographische NS11-265-Dimer weist eine Gesamtfläche von  $24179.4 \text{ \AA}^2$  auf, von der lediglich  $1025.4 \text{ \AA}^2$  auf Kristallkontakte entfallen (berechnet mit dem Programm ArealMol aus der CCP4 Suite<sup>189</sup>). Die Gesamtstruktur wird eindeutig von insgesamt sieben  $\alpha$ -Helices dominiert, die einen zentralen fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt-Bereich umgeben (Abbildung 22). Dieser enthält das für die Metallbindung hochkonservierte HUH-Motiv mit den Resten His-127, His-129 und Glu-119 sowie das für die Nuklease-Funktion katalytisch aktive Tyr-210 (Abbildung 23A). Die hochflexible DNA-Bindungsregion, die aus den AS 190-195 besteht, konnte in der Elektronendichte nicht vollständig aufgelöst werden und ist in Form einer gepunkteten Linie angedeutet (Abbildung 22). Die mit Hilfe der Software Superpose erstellte Überlagerung der H-1PV NS1-Struktur und der Struktur des bekannten MVM-NS11-255 resultierte in einer nahezu vollständigen Deckung der Sekundärstruktur- sowie Schleifenelemente (Abbildung 23B). Die gemittelte Standardabweichung (RMSD) von  $0.802 \text{ \AA}$  weist dabei eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit der beiden Moleküle

zueinander hin. Insgesamt ließ die Qualität der Beugungsdaten zwar die Prozessierung und die Erstellung eines grundlegenden Strukturmodells dar, jedoch führen die hohe Mosaizität sowie die geringe Multiplizität nicht zu optimalen Statistiken. Trotz dessen kann aufgrund der vorliegenden Strukturdaten von einer nahezu identischen Funktionalität zu MVM-NS11-255 ausgegangen werden.

Tabelle 2: Datensammlung und Strukturverfeinerung für NS11-265. Die Werte in den Klammern stellen die Parameter in der höchsten Auflösungsschale dar.

### Datensammlung

Beamline	P11 Beamline PETRAIII (Hamburg)
Temperatur [K]	100
Wellenlänge [Å]	1.023
Auflösungsbereich [Å]	47.71 - 2.8 (2.9 - 2.8)
Raumgruppe	<i>P</i> 1 2 1
Einheitszellparameter <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> [Å]	80.89, 40.00, 98.12
Einheitszellparameter <i>a</i> , <i>β</i> , <i>γ</i> [°]	90.00, 103.48, 90.00
Anzahl gemessener Reflexe	93187 (8516)
Anzahl einzigartiger Reflexe	15382 (1505)
Multiplizität	3.3 (3.2)
Vollständigkeit [%]	99.4 (98.8)
Mosaizität	0.78
<i>I</i> / <i>σ</i> ( <i>I</i> ) gemittelt	6.1 (2.8)
<i>R</i> <sub>merge</sub> <sup>1</sup> [%]	12.3 (31.4)
CC1/2	0.980 (0.892)

### Strukturverfeinerung

Anzahl Reflexe für <i>R</i> <sub>free</sub>	717
<i>R</i> <sub>work</sub> [%]	24.9 (28.7)
<i>R</i> <sub>free</sub> [%]	26.1 (32.1)
Proteinatome	3887
Wassermoleküle	19
RMS(Bindungslängen)	0.014
RMS(Bindungswinkel)	1.56
Ramachandran-Region favorisiert [%]	95.1
Ramachandran-Region erlaubt [%]	4.9
Ramachandran-Region nicht erlaubt [%]	0.0
Mittlerer B-Faktor Proteinatome [Å <sup>2</sup> ]	41.30
Mittlerer B-Faktor Wassermoleküle [Å <sup>2</sup> ]	43.30

<sup>1</sup>):  $R_{merge} = \frac{\sum hkl \sum i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum hkl \sum i I_i(hkl)}$ , wobei  $\langle I(hkl) \rangle$  die gemittelte Intensität von  $I_i(hkl)$  darstellt.

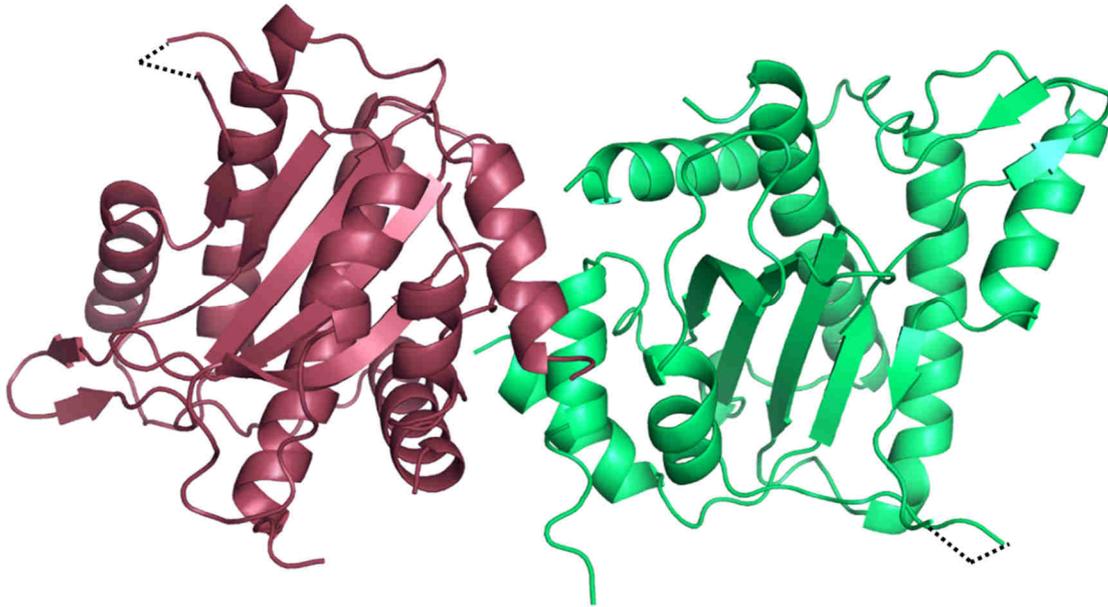


Abbildung 22: Bei 2.8 Å gelöste Kristallstruktur von NS<sub>1-265</sub> in der Cartoon-Darstellung. Das Protein bildet ein kristallographisches Dimer in der Raumgruppe P121 dar und wird von  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturanteilen dominiert, die einen zentralen  $\beta$ -Faltblatt-Bereich umgeben. Der gepunktete Bereich stellt die in der Elektronendichte nicht definierten Aminosäurereste 190-195 dar, die eine hochflexible Schleifenstruktur ausbilden und für die virale DNA-Bindung essentiell sind.

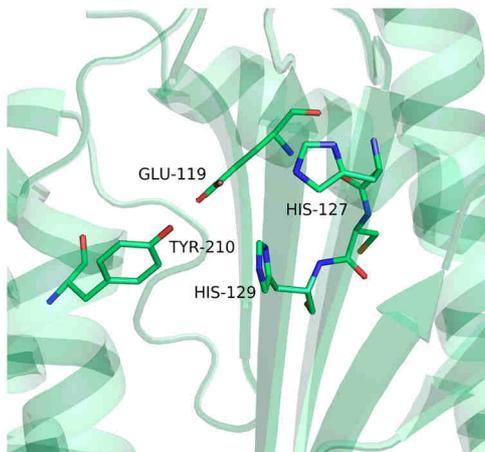
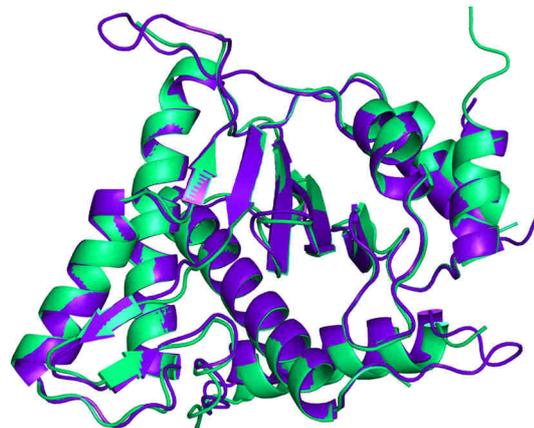
**A.****B.**

Abbildung 23A: Aktives Zentrum von NS<sub>1-265</sub>. Für die Katalyse ist ein zweiwertiges Kation notwendig, das über Glu-119, His-127, His-129 und Tyr-210 koordiniert wird. Tyr-210 ist dabei für den nukleophilen Angriff auf das Phosphatrückgrat der viralen DNA im Rahmen der Nukleasereaktion verantwortlich. B: Überlagerung der NS<sub>1-265</sub> Struktur aus H1-PV (Grün) mit der bereits bekannten Kristallstruktur der MVM-Nukleasedomäne (Blau, PDB: 4PP4). Der RMSD-Wert von 0.802 Å deutet auf eine hohe Ähnlichkeit der Moleküle untereinander hin, was in der Abbildung deutlich wird.

### 3.4.5 Der physiologische Metallionen-Co-Faktor der Nukleasedomäne

Die NS1 Nukleasedomäne besitzt ein konserviertes HUH-Motiv, das die Bindung eines zweiwertigen Kations erlaubt, welches für die *Nicking*-Aktivität des Proteins essentiell ist<sup>72,73</sup> (Abbildung 23A). Im Laufe dieser Arbeit wurden die hochauflösenden Strukturen der 91.7% sequenzidentischen MVM-NS1 Nukleasedomäne in Komplex mit einer Reihe von unterschiedlichen zweiwertigen Kationen aufgeklärt, was auf eine extrem vielseitige Metallbindungsstelle hindeutet<sup>79</sup>. Bisher konnte jedoch nicht identifiziert werden, welches dieser Metallionen als physiologischer Cofaktor für die H-1PV Nukleasedomäne fungiert. Die universelle Verwendbarkeit von zweiwertigen Kationen als Cofaktor wird als unwahrscheinlich angesehen, da für die meisten bis heute bekannten Nukleasen ausschließlich  $Mn^{2+}$  sowie  $Mg^{2+}$  als Cofaktoren identifiziert wurden, was sich in erster Linie durch die relativ hohe intrazelluläre  $Mg^{2+}$ -Konzentration sowie durch die ähnliche Koordinationskonfiguration von  $Mn^{2+}$  erklären lässt. Somit wird auch für H-1PV davon ausgegangen, dass eines dieser beiden Ionen als physiologischer Cofaktor dient<sup>79</sup>. Aus diesem Grund wurde im Folgenden eine Reihe funktioneller sowie struktureller Experimente durchgeführt, die zur Aufklärung des physiologischen Cofaktors von H-1PV NS1 beitragen sollten.

#### 3.4.5.1 Bestimmung der Bindungsaffinität von $Mn^{2+}$ und $Mg^{2+}$

Bereits im Thermofluor-Assay konnte ein direkter Effekt von  $Mn^{2+}$ -Ionen auf die Stabilität von NS1<sub>1-284</sub> nachgewiesen werden, wohingegen  $Mg^{2+}$  die thermische Stabilität des Proteins nicht erhöhen konnte (siehe 3.4.3.2). Diese Ergebnisse konnte erwartungsgemäß für NS1<sub>1-265</sub> reproduziert werden. Bereits ab einer Konzentration von 1 mM  $MnCl_2$  wurde eine deutliche Verschiebung des Schmelzpunktes nachgewiesen, was auf eine spezifische Bindung von  $Mn^{2+}$  an das HUH-Motiv der Nukleasedomäne hindeutet (Abbildung 24A). Um die Bindung von  $Mn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  an NS1<sub>1-265</sub> näher zu charakterisieren, wurde die zugehörige Affinität zunächst mittels *Mircoscale*-Thermophorese (MST) quantifiziert. Bei dieser Methode wird die Änderung des thermophoretischen Verhaltens von Makromolekülen nach Bindung eines Liganden detektiert, so dass eine spezifische Bindungskonstante bestimmt werden kann. Hierzu wurde NS1<sub>1-265</sub> mit dem Farbstoff NT-647 (Nanotemper) an primären Amingruppen markiert und 47 nM des Proteins wurden gegen steigende Konzentrationen an  $Mg^{2+}$  bzw.  $Mn^{2+}$  titriert. Nach Induktion eines Hitzeimpulses mit einem Anstieg von 2 K wurde die Änderung der Fluoreszenz bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen bei einer Wellenlänge von 650 nm detektiert.

Dies führte zu dem Ergebnis, dass NS1<sub>1-265</sub> für die Bindung von Mn<sup>2+</sup> eine für Protein-Ionen-Wechselwirkungen ungewöhnlich hohe spezifische Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 858  $\mu\text{M}$  aufweist (Abbildung 24B). Im Gegensatz dazu konnte für Mg<sup>2+</sup> keine Bindung detektiert werden, was konsistent mit den vorherigen Erkenntnissen des Thermofluor-Tests ist.

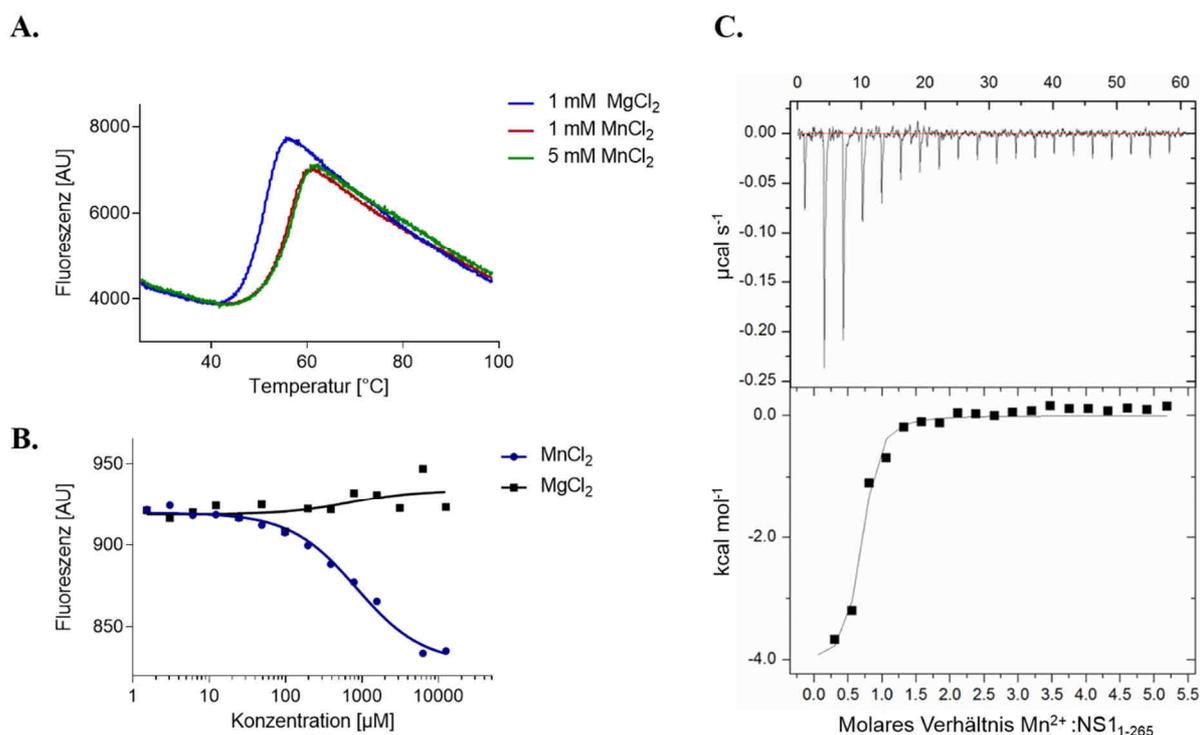


Abbildung 24: Analyse der Mn<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Bindung an NS1<sub>1-265</sub>. **A:** Der Thermofluor-Test zeigt eine maximale Stabilisierung von NS1<sub>1-265</sub> bereits bei einer Mn<sup>2+</sup>-Konzentration von 1 mM. **B:** Mittels *Microscale*-Thermophorese konnte eine eindeutige Bindung von Mn<sup>2+</sup> nachgewiesen werden, während für Mg<sup>2+</sup> keine Bindung an NS1<sub>1-265</sub> detektiert werden konnte. **C:** Titration von Mn<sup>2+</sup> gegen NS1<sub>1-265</sub> mittels ITC. Die Ergebnisse weisen auf die spezifische Bindung eines Mn<sup>2+</sup>-Ions mit einer Bindungskonstanten von 476 nM hin. Alle Messergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Parameter zur Bestimmung der Mn<sup>2+</sup>-Bindungsaffinität für NS1<sub>1-265</sub>. n.b.: nicht bestimmt.

<b>MST-Parameter</b>	
$K_D$ Mn <sup>2+</sup> [ $\mu\text{M}$ ]	$858 \pm 316$
$K_D$ Mg <sup>2+</sup> [ $\mu\text{M}$ ]	n.b.
<b>Thermofluor-Parameter</b>	
$T_m$ 1 mM MnCl <sub>2</sub> [°C]	$54.0 \pm 0.5$
$T_m$ 5 mM MnCl <sub>2</sub> [°C]	$53.4 \pm 0.4$
$T_m$ 1 mM MgCl <sub>2</sub> [°C]	$48.7 \pm 0.4$

ITC-Parameter	
N (Bindestellen)	0.6 ± 0.02
$\Delta H$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	-4.03 ± 0.23
$\Delta S$ [cal mol <sup>-1</sup> deg <sup>-1</sup> ]	15.2
$K_D$ ITC [ $\mu$ M]	0.49 ± 0.12

Da im Thermofluor-Assay bereits  $MnCl_2$ -Konzentrationen von 1 mM zu einer vollständigen Verschiebung des Schmelzpunktes führen und keine weitere Verschiebung bei höheren Konzentrationen erkennbar war, kann von einer vollständigen Absättigung des Proteins mit  $Mn^{2+}$  ausgegangen werden. Bei einer Bindungskonstante von 858  $\mu$ M wäre eine Sättigung von etwa 50% und damit eine stärkere Verschiebung des Schmelzpunktes bei Erhöhung der  $Mn^{2+}$ -Konzentration zu erwarten, was jedoch nicht beobachtet wurde. Somit lässt sich vermuten, dass der durch MST bestimmte  $K_D$ -Wert nicht der realen Bindungsaffinität zwischen NS1<sub>1-265</sub> und  $Mn^{2+}$  entspricht. Um diese Vermutung zu bestätigen und die tatsächliche Bindungskonstante von  $Mn^{2+}$  an NS1<sub>1-265</sub> zu ermitteln, wurde diese im Folgenden durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) erneut quantifiziert. Bei der ITC wird die frei werdende Bindungsenthalpie während einer molekularen Interaktion gemessen, woraus der  $K_D$ -Wert zwischen zwei Molekülen direkt bestimmt wird. Außerdem lässt sich aus der Bindungsenthalpie die Änderung der Interaktionsentropie berechnen, die Rückschlüsse auf eventuelle Konformationsänderungen zulässt. Für das Experiment wurden 200  $\mu$ M  $MnCl_2$  gegen 20  $\mu$ M NS1<sub>1-265</sub> titriert, was in einer exothermen Reaktion mit einer freien Enthalpieänderung von  $\Delta H = -4.08$  kcal/mol und einer Bindungskonstanten von  $K_D = 476$  nM resultierte, die damit in etwa um das 1000-fache geringer ausfällt als die durch MST bestimmte Bindungskonstante (Abbildung 24C). Interessanterweise konnten neben enthalpischen auch entropische Effekte der Komplexbildung beobachtet werden, da die berechnete Entropie einen positiven Wert von  $\Delta S = 15.2$  cal mol<sup>-1</sup> deg<sup>-1</sup> ergibt. Dieses Ergebnis deutet auf eine Konformationsänderung des NS1<sub>1-265</sub> in Folge der Komplexbildung hin, was für die Funktion der Nukleasedomäne essentiell sein könnte. Um dies zu beweisen, wurde im Folgenden der Einfluss von  $Mn^{2+}$  auf die DNA-Bindungs- und Nukleaseaktivität von NS1<sub>1-265</sub> untersucht.

### 3.4.5.2 DNA-Bindungsstudien und Bestimmung der *Nicking*-Aktivität

Während der viralen *rolling hairpin* Replikation bindet die Nukleasedomäne zunächst die entstandene dsDNA, um sie anschließend an der vorgesehenen Erkennungssequenz spezifisch zu spalten (*Nicking*), damit die Replikation fortgesetzt werden kann (1.4.3). Für das *Nicking* wird ein Metall-Cofaktor benötigt, der die Nukleophilie des aktiven Tyr-210 erhöht und somit den Angriff auf das Phosphatrückgrat erst ermöglicht. Um die nachgewiesene Bindung von  $Mn^{2+}$  auf diese funktionellen Aspekte hin zu untersuchen, wurde NS1<sub>1-265</sub> mit verschiedenen einzel- sowie doppelsträngigen DNA-Sequenzen inkubiert und die potentielle Komplexbildung mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) analysiert. Dabei konnte für eine 43 bp lange dsDNA-Sequenz, die den viralen *origin of replication* (ORI) enthielt, aber auch für zwei nicht verwandte, ähnlich lange Sequenzen eine spezifische Bindung an NS1<sub>1-265</sub> nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde kein Unterschied der Bindungsspezifität in Anwesenheit von  $MnCl_2$  festgestellt, was darauf hindeutet, dass der Cofaktor ausschließlich für die Spaltung der DNA benötigt wird. Überraschenderweise konnte kein Komplex mit dem 23 bp langen, in vorherigen Experimenten als DNA-Bindungs-Minimalsequenz bestimmten ORI gebildet werden<sup>71</sup>, auch nicht in der Anwesenheit von  $MnCl_2$ . Außerdem konnte keine Komplexbildung zwischen NS1<sub>1-265</sub> und ssDNA-Molekülen nachgewiesen werden, was jedoch aufgrund der Funktion der Nukleasedomäne während der viralen Replikation zu erwarten war (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4: Im EMSA getestete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Funktion	Länge [bp]	Bindung?
CTCCCTGAACCGCTTATCATTTTTAGAACTGACCAACCATGTTTCAC GAGGGACTTGGCGAATAGTAAAAATCTTGACTGGTTGGTACAAGTG	ORI footprint, dsDNA	46	ja
CTTTTAAAGCAAAAAGAAATAGTGTACCAGTCCACCAAGGGACG GAAAAATTCGTTTTCTTTATCACATGGTCAGGTGGTTCCCTGC	Kontrolle 1, dsDNA	44	ja
CTAAAAGAAAGCTTGATTACCAGAACTCCAGCCGACCCCGAAC GATTTTCTTTCGAACTAATGGCTTTGAGGGTCGGCTGGGGCTTG	Kontrolle 2, dsDNA	44	ja
AGAACTGACCAACCATGTTTCAC TCTTGACTGGTTGGTACAAGTG	minimaler ORI, dsDNA	23	nein
AGAACTGACCAACCATGTTTCAC	minimaler ORI, ssDNA, frw	23	nein
TCTTGACTGGTTGGTACAAGTG	minimaler ORI, ssDNA, rev	23	nein

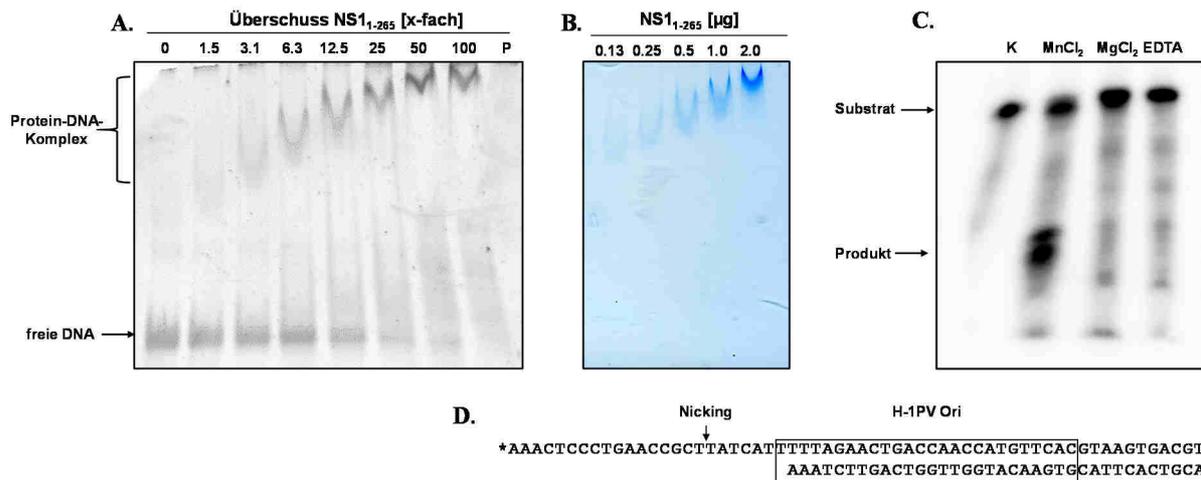


Abbildung 25: DNA-Bindungsstudien mittels EMSA in einem nativen 12% Polyacrylamidgel. Anhand der Verschiebung der detektierten Bande zu höheren Molekulargewichten konnte eine spezifische Komplexbildung zwischen dsDNA und NS1<sub>1-265</sub> detektiert werden (A). Die zunehmende Verschiebung der detektierten DNA-Banden ist durch die Aggregation von NS1<sub>1-265</sub> bei zunehmenden Proteinkonzentrationen zu erklären, was durch das Auftragen des isolierten Proteins ohne Zugabe von DNA deutlich wird (B). C+D: Nuklease-Assay zur Bestimmung der *Nicking*-Aktivität. Für den Assay wurde ein partielles DNA-Doppelstrang-Substrat verwendet, das die *ori*-Bindungssequenz (schwarzer Rahmen) sowie die *terminal resolution site* (*Nicking*) von NS1 aufweist. Der längere Strang wurde dabei am 5'-Ende mit P32- $\gamma$ -ATP markiert (D, Stern). Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C ist eine MnCl<sub>2</sub>-abhängige *Nicking*-Aktivität des Proteins erkennbar, während MgCl<sub>2</sub> die Nukleaseaktivität von NS1<sub>1-265</sub> nicht aktivieren kann (C). K: Kontrolle ohne Protein.

Zur Untersuchung der *Nicking*-Aktivität wurde ein Nuklease-Assay entwickelt, bei dem ein partielles Doppelstrang-DNA-Substrat verwendet wurde, das im doppelsträngigen Bereich den ORI des H-1PV für die Komplexbildung mit NS1<sub>1-265</sub> aufweist (Abbildung 25D). Des Weiteren ist im einzelsträngigen Bereich die Erkennungssequenz lokalisiert, die vom aktiven Tyr-210 der Nuklease gespalten wird. Aufgrund der fehlenden Helikasedomäne in NS1<sub>1-265</sub> muss diese Erkennungssequenz bereits zu Beginn als Einzelstrang exponiert sein, da sonst kein *Nicking* an der vorgesehenen Position stattfinden kann. Durch die 5'-Phosphorylierung des Einzelstrangüberhangs mit P32- $\gamma$ -ATP kann folglich die Spaltung der DNA in einem denaturierenden Polyacrylamidgel detektiert werden. Nach dreistündiger Inkubation des Substrats mit NS1<sub>1-265</sub> bei 37 °C konnte eine spezifische *Nicking*-Aktivität für NS1<sub>1-265</sub> unter Anwesenheit von MnCl<sub>2</sub> detektiert werden, während MgCl<sub>2</sub> sowie die Abwesenheit von zweiwertigen Kationen nicht zu einer Aktivierung der Nuklease-Funktion führten. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der vorher identifizierten spezifischen Bindung

von  $Mn^{2+}$  und führt zu der Schlussfolgerung, dass  $Mn^{2+}$  allem Anschein nach den nativen Cofaktor für die H-1PV NS1 Nukleasedomäne darstellt.

### 3.4.5.3 Einfluss der $Mn^{2+}$ -Bindung auf die NS1<sub>1-265</sub>-Struktur

Die Ergebnisse der ITC deuteten bereits auf eine durch  $Mn^{2+}$ -induzierte Konformationsänderung von NS1<sub>1-265</sub> hin. Um den Einfluss des Metallions auf die Sekundärstruktur von NS1<sub>1-265</sub> zu untersuchen, wurden vergleichende CD-spektroskopische Experimente im Fern-UV Bereich unter An- und Abwesenheit von  $MnCl_2$  durchgeführt. Diese zeigen jedoch keinen nennenswerten Effekt im Sekundärstrukturbereich, die aus den Messungen resultierenden Kurven weisen einen nahezu identischen Verlauf auf (Abbildung 26 A). Neben der Sekundärstrukturzusammensetzung lassen sich bei hohen Proteinkonzentration im Nah-UV-Bereich zwischen 260 und 320 nm vergleichende Vorhersagen über Änderungen der Tertiärstruktur machen, da in diesem Wellenlängenbereich das CD-Signal der aromatischen Aminosäuren detektiert werden kann, das stark abhängig von ihrer chemischen Umgebung ist<sup>190</sup>. Diese Messungen resultierten in einem leicht verringerten CD-Effekt für das  $Mn^{2+}$ -gebundene Protein zwischen 270-280 nm, was auf eine geringfügige Änderung der chemischen Umgebung eines Phenylalanin- oder Tyrosin-Restes hindeutet, da diese von 250-275 nm ein charakteristisches CD-Signal aufweisen<sup>191</sup>.

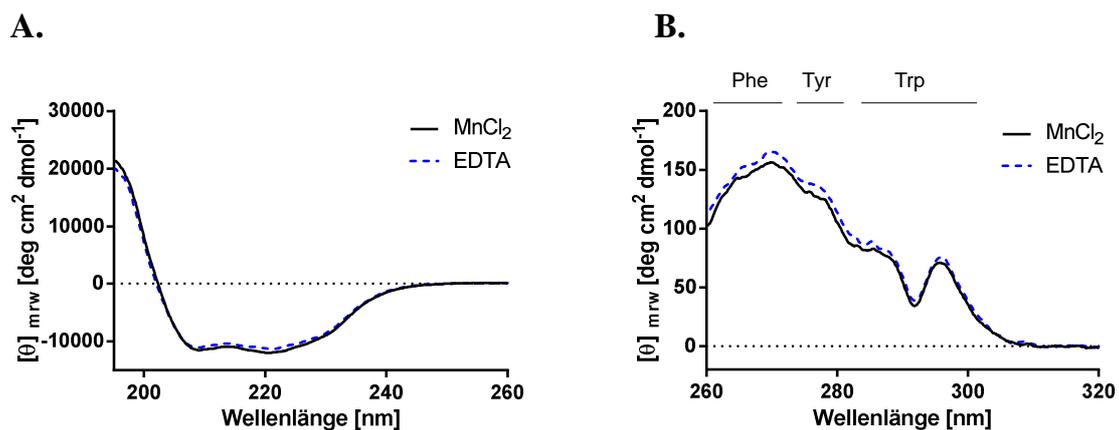


Abbildung 26: CD-Spektroskopische Untersuchung von NS1<sub>1-265</sub> unter dem Einfluss von  $Mn^{2+}$ . Das Spektrum im Fern-UV-Bereich zeigt keine nennenswerte Änderungen der Sekundärstrukturanteile nach Bindung von  $Mn^{2+}$  (A), während im Nah-UV-Bereich eine leichte Änderung der chemischen Umgebung von Tyrosin- oder Phenylalanin-Resten detektiert werden kann (B).

Da sich mit Hilfe CD-spektroskopischer Experimente die Tertiärstrukturänderung nur auf Grundlage der aromatischen Aminosäuren bestimmen lässt, wurden weiterführende Untersuchungen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (*small angle X-ray scattering*, SAXS) durchgeführt, da mit dieser Methode ein Protein-Strukturmodell für monodisperse Lösungen bei niedriger Auflösung berechnet werden kann. Konformationsänderungen können somit direkt in Lösung detektiert werden, was einen großen Vorteil gegenüber der Röntgenkristallographie darstellt, da so mit höherer Wahrscheinlichkeit der nativen Zustand des untersuchten Proteins untersucht werden kann. Die SAXS-Messungen wurden in Kooperation mit Prof. Gerhard Grüber an der Nanyang Technological University (NTU) in Singapur mit Proteinkonzentrationen zwischen 1.8 und 3.7 mg/mL für die Apoform sowie die Mn<sup>2+</sup>-gebundene Form an einem BRUKER NANOSTAR Gerät durchgeführt (Tabelle 5). Für die Analyse wurde die Streuintensität  $I$  gegen den Streuvektor  $s$  aufgetragen, was für beide getesteten Konzentrationen in einem ähnlichen Kurvenverlauf resultierte (Abbildung 27A). Folglich wurden alle weiterführenden Analysen mit einer Proteinkonzentration von 3.7 mg/mL durchgeführt, um eine höhere Sensitivität zu erreichen. Der *Guinier-Plot*, bei dem die Streuintensität für sehr kleine Winkel untersucht wird, zeigt für beide Kurven einen linearen Verlauf, was auf eine gute Probenqualität ohne Proteinaggregation hindeutet (Abbildung 27A, Kasten)<sup>192</sup>. Ebenfalls aus dem *Guinier-Plot* ergibt sich der Streumassenradius  $R_g$ , der für die Apoform  $20.98 \pm 0.27 \text{ \AA}$  und für die Mn<sup>2+</sup>-gebundene Form  $22.34 \pm 0.38 \text{ \AA}$  aufweist. Als weitere Qualitätskontrolle wurde der *Kratky-Plot* verwendet, mit dessen Hilfe aus der Auftragung  $I(s) \times s^2$  gegen  $s$  die Faltungsqualität des Proteins bestimmt werden kann<sup>193</sup>. Der Gaußkurven-ähnliche Verlauf der Streuwerte bei niedrigen Winkeln deutet auf eine gute Faltung des Proteins mit weitestgehend globulärer Form hin und stimmt mit der als Referenz verwendeten Kurve für Lysozym größtenteils überein (Abbildung 27 C). Folglich wurden die Daten weiterprozessiert und zunächst mit Hilfe der Software GNOM die Abstandsverteilungsfunktion zur Abschätzung des maximalen Partikeldurchmessers berechnet. Diese zeigt mit  $74 \pm 3 \text{ \AA}$  einen etwas größeren maximalen Durchmesser ( $D_{MAX}$ ) des Mn<sup>2+</sup>-gebundenen NS1<sub>1-265</sub> im Vergleich zu  $66 \pm 2 \text{ \AA}$  bei der Apoform, was auf eine Elongation des Proteins nach Bindung des Cofaktors hindeutet (Abbildung 27 B). Des Weiteren wurde mit der Software CRY SOL<sup>194</sup> eine theoretische Streukurve aus der MVM NS1<sub>1-255</sub> Kristallstruktur (PDB: 4PP4) berechnet und mit den experimentellen Streukurven der Apoform sowie des Mn<sup>2+</sup>-gebundenen NS1<sub>1-265</sub> verglichen. Dabei zeigte sich für beide Proteine eine weitest gehende Überlagerung mit der theoretisch berechneten Kurve (Abbildung 27 D), charakterisiert

durch einen  $\chi^2$ -Wert von 0.475 für die Apoform und von 0.748 für die  $Mn^{2+}$ -Form. Dieser etwas geringere  $\chi^2$ -Wert für die Apoform deutet auf eine bessere Übereinstimmung mit der theoretischen Streukurve des 4PP4-Modells hin, was die Hypothese der induzierten Konformationsänderung durch  $Mn^{2+}$  weiter bestärkt (Tabelle 5). Um ein erstes Modell für NS1<sub>1-265</sub> in Lösung zu generieren, wurden auf Grundlage der Abstandsverteilungsfunktion mit DAMMIF die *ab initio* Strukturen für die Apoform und für die  $Mn^{2+}$ -gebundene Form berechnet. Diese zeigen eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten, die in beiden Fällen nur geringe Abweichungen mit Werten von  $\chi^2 = 0.361$  (Apo) und  $\chi^2 = 0.370$  ( $Mn^{2+}$ ) aufweisen. Dabei wird die Entstehung einer zusätzlichen Domäne von 6.2 x 20.1 Å bei der  $Mn^{2+}$ -gebundenen Form deutlich, was in der Elongation des Proteins resultiert (Abbildung 27 E). Zusätzlich wurden die *ab initio* Strukturen mit der hochauflösenden Kristallstruktur von MVM NS1<sub>1-255</sub> überlagert, was in beiden Fällen eine hohe Übereinstimmung zeigt. Wie bereits beim Vergleich mit der theoretischen Streukurve von MVM NS1<sub>1-255</sub> ergibt sich jedoch eine deutlich geringere Standardabweichung für die Apoform ( $\chi^2 = 1.57$ ) im Vergleich zur  $Mn^{2+}$ -Form ( $\chi^2 = 0.361$ ), was alles in allem die induzierte Konformationsänderung von NS1<sub>1-265</sub> durch Bindung seines nativen Co-Faktors bestätigt.

Tabelle 5: Strukturparameter der durchgeführten SAXS-Experimente mit NS1<sub>1-265</sub>.

Strukturparameter*	Apo-Form	$Mn^{2+}$ -Form
I(0) (cm <sup>-1</sup> ) [aus P(r)]	38.98 ± 0.24	39.88 ± 0.3
R <sub>g</sub> (Å) [aus P(r)]	21.08 ± 0.14	22.72 ± 0.18
I(0) (cm <sup>-1</sup> ) (Guinier-Plot)	40.16 ± 0.45	39.76 ± 0.38
R <sub>g</sub> (Å) (Guinier-Plot)	20.98 ± 0.27	22.34 ± 0.36
D <sub>max</sub> (Å)	66 ± 2	74 ± 3
<i>Porod</i> -Volumen (Å <sup>3</sup> )	~48939	~55072
theoretisches Molekularvolumen (Å <sup>3</sup> )	~37468	~37468
$\chi^2$ -Wert des Fits mit CRY SOL (4PP4)	0.475	0.748
<b>Molekulargewichtsbestimmung (kDa) *</b>		
Basierend auf <i>Porod</i> -Volumen	29 ± 3	33 ± 3
Basierend auf <i>Ausschlussvolumen</i>	28 ± 3	32 ± 3
Basierend auf <i>SAXS MoW</i>	31 ± 3	33 ± 3

\* Alle Werte für eine Proteinkonzentration von 3.7 mg/mL

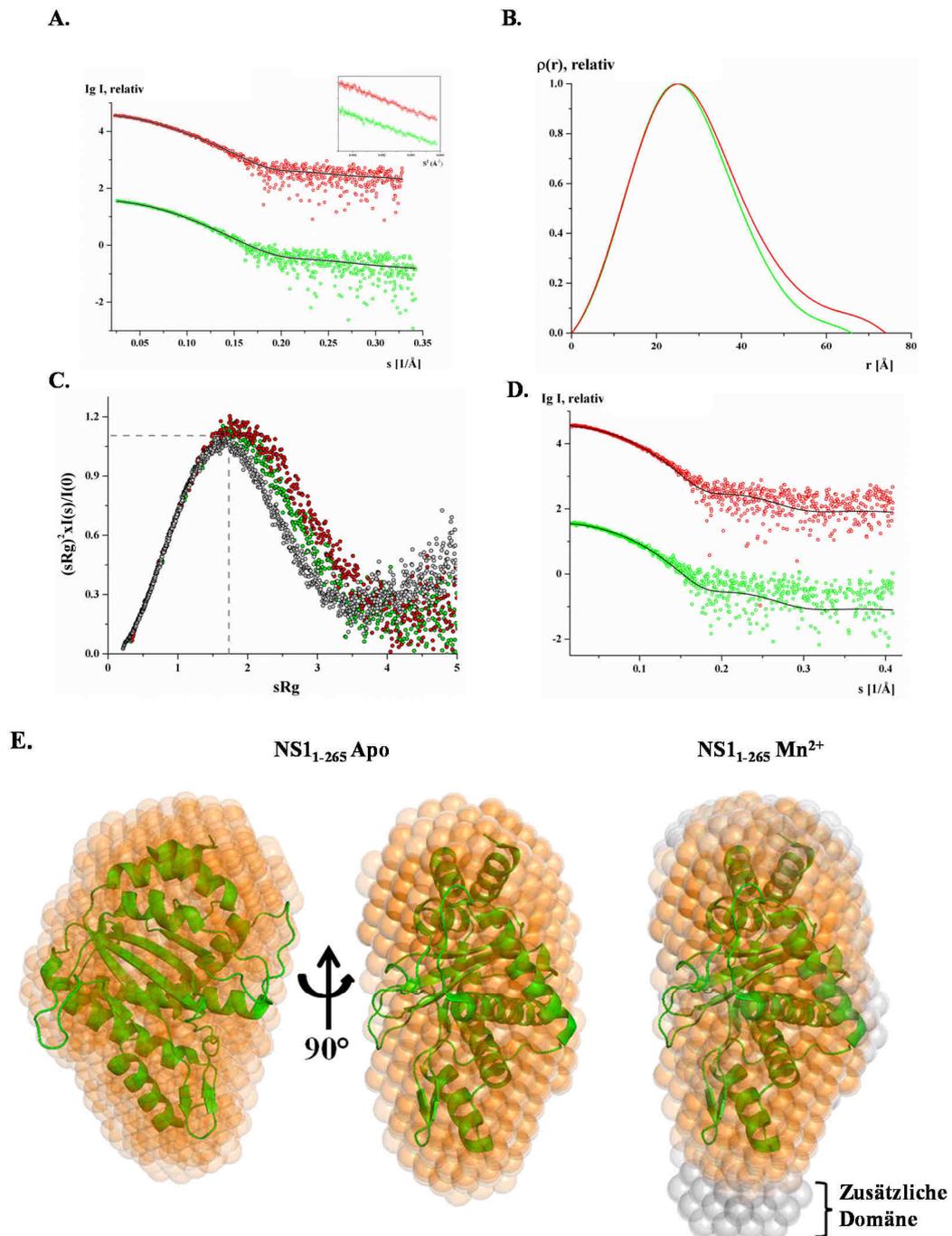


Abbildung 27: SAXS-Ergebnisse für NS<sub>1-265</sub> in der Apoform (grün) und in der Mn<sup>2+</sup>-gebundenen Form (rot). **A:** Primäre Streukurve nach Auftragung der logarithmischen Streuintensität  $I$  gegen den Streuvektor  $s$  bei einer Proteinkonzentration von 3.7 mg/mL. Die Kurven weisen im kleinen Winkelbereich lediglich geringe Schwankungen der Streuintensität auf, was für eine gute Datenqualität spricht. Der linear verlaufende *Guinier*-Plot (Kasten) deutet auf ein monodisperses System ohne Proteinaggregation hin. **B:** Abstandsverteilungsfunktion zur Berechnung des maximalen Partikeldurchmessers. Es ist ein leicht elongiertes Partikelvolumen für die Mn<sup>2+</sup>-gebundene Form erkennbar. **C:** Der Kratky-Plot weist für beide Proteine ähnliche Werte im Vergleich zum globulären Referenzprotein Lysozym (grau) auf, was auf eine gute Faltung und ein nahezu globuläres Partikelvolumen hindeutet. **D:** Vergleich der experimentellen Streudaten mit der theoretisch berechneten Streukurve des MVM NS<sub>1-255</sub> (PDB: 4PP4). Der geringere  $\chi^2$ -Werte von

0.475 für die Apoform im Vergleich von 0.748 für die  $Mn^{2+}$ -gebundene Form spricht für eine induzierte Konformationsänderung. **E:** Die Überlagerung des berechneten *ab initio* Modells mit der Kristallstruktur von MVM NS1<sub>1-255</sub>. Es ist eine deutliche Elongation des NS1<sub>1-265</sub> durch die Bindung von  $Mn^{2+}$  erkennbar.

## 3.5 Apoptin

### 3.5.1 Expression, Rückfaltung und Reinigung von Apoptin-His<sub>6</sub>

Zur Expression in *E. coli* wurde das Apoptin-Gen in den pASK-IBA33 Vektor kloniert, welcher einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag zur Reinigung des rekombinanten Proteins enthält. Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen für 4h bei 37 °C, was zu einer Gesamtausbeute von bis zu 3 mg Apoptin pro Liter Zellkultur führte. Jedoch konnte Apoptin analog zu vorherigen Arbeiten lediglich in Form von unlöslichen *inclusion bodies* exprimiert werden<sup>114</sup>. Auch die Variation des Zellstammes, der Induktorkonzentration sowie der Wachstumstemperatur zeigten keine erhöhte Löslichkeit von Apoptin, weshalb Strategien zur Renaturierung des Proteins aus den unlöslichen *inclusion bodies* entwickelt werden mussten. Dabei werden die *inclusion bodies* zunächst mit Hilfe von chaotropen Salzen aufgelöst, wodurch das Zielprotein in Lösung gelangt. Anschließend wird versucht, durch Anpassen der Pufferbedingungen die native Faltung des Proteins wiederherzustellen. Nach Aufschluss der *inclusion bodies* mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) wurde Apoptin über den His<sub>6</sub>-Tag an eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie-Matrix gebunden und nach intensivem Waschen durch sofortige Zugabe von GuHCl-freiem Puffer renaturiert. Die Elution erfolgte anschließend mit zunehmender Konzentration von Imidazol, was in einer Reinheit des Proteins von ca. 90% resultierte (Abbildung 28 A). Als Qualitätskontrolle wurden zunächst DLS-Experimente durchgeführt, die einen hydrodynamischen Radius des Proteins von  $13.8 \pm 0.8$  nm ergaben, welcher somit der erwarteten Oligomerisierung von Apoptin entsprach (Abbildung 28 B)<sup>114</sup>. Um den Erfolg der Rückfaltung weiterhin zu validieren, wurden CD-spektroskopische Experimente durchgeführt, die anhand der geringen molaren Elliptizität zeigen, dass Apoptin nach dieser Rückfaltungsstrategie nur ein geringes Maß an Sekundärstrukturelementen aufweist (Abbildung 28 C).

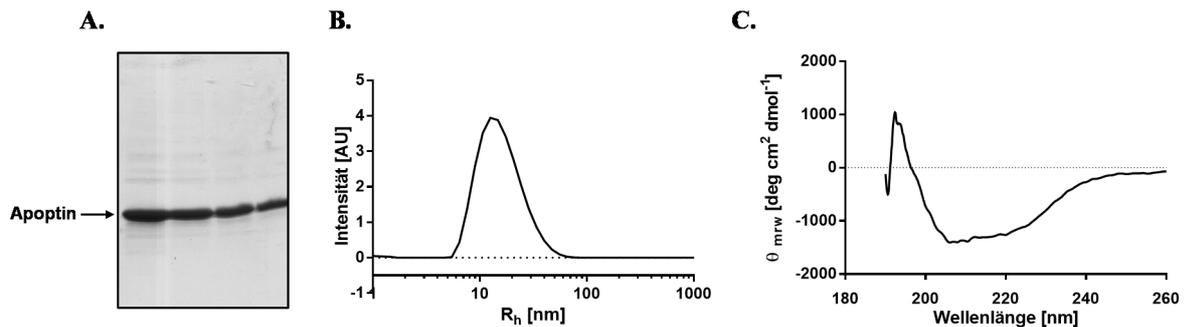


Abbildung 28: Reinigung und initiale Charakterisierung von Apoptin-His<sub>6</sub>. **A:** SDS-PAGE (XX % T) der Elutionsfraktionen nach der Rückfaltung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. Das Protein konnte mit einer Effizienz von etwa 90% gereinigt werden. **B:** Hydrodynamischer Radius von Apoptin ( $R_h$ :  $13.8 \pm 0.8$  nm) bei einer Konzentration von 0.5 mg/mL ermittelt durch DLS-Messung. **C:** Das CD-Spektrum des renaturierten Apoptins weist lediglich geringe  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturanteile auf.

Des Weiteren führte der Versuch, Apoptin auf mehr als 0.5 mg/mL zu konzentrieren, zu einer zunehmenden Präzipitation des Proteins, was auf eine geringe Stabilität durch fehlende Faltung hindeutet. Andere Rückfaltungsstrategien wie die Entfernung von chaotropen Salzen durch Dialyse oder durch einen linearen Gradienten an der Ni-NTA-Festphase resultierten in einer sofortigen Denaturierung des Proteins und sind somit für die Renaturierung von Apoptin nicht geeignet. Aufgrund der geringen Löslichkeit nach Rückfaltung konnten außerdem keine weiterführenden strukturellen Experimente mit diesem Konstrukt durchgeführt werden.

### 3.5.2 Expression und Reinigung von MBP-Apoptin

Als alternative Strategie wurde Apoptin in den pMAL-c2x Vektor kloniert, welcher die N-terminale Fusion des Zielproteins an das löslichkeitsvermittelnde Maltose-bindende Protein (MBP) ermöglicht. Im Gegensatz zum Wildtyp-Protein konnte MBP-Apoptin durch Expression für 4h bei 37 °C in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit einer löslichen Ausbeute von bis zu 15 mg/L Zellkultur hergestellt und mittels Amylose-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Zur Abtrennung des bei der Expression entstehenden freien MBP wurde im Anschluss eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, bei der MBP-Apoptin am Ausschlussvolumen der Säule eluierte, was eine Molekulargewichtsberechnung an Hand des Elutionsvolumens verhinderte.

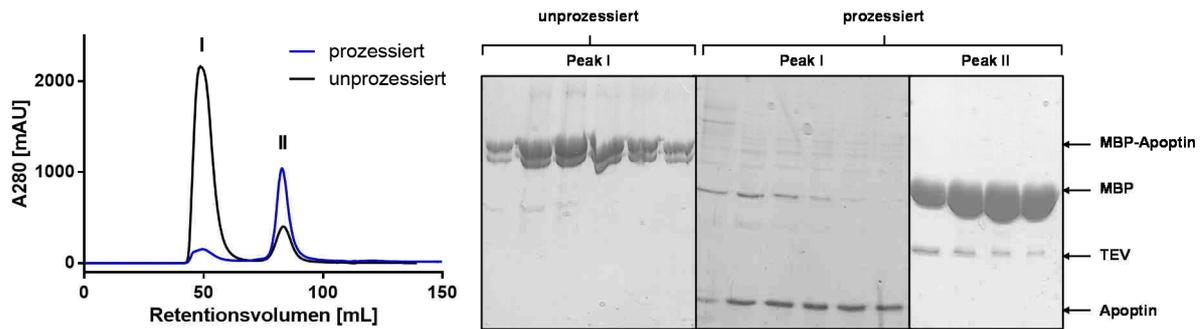


Abbildung 29: Größenausschlusschromatographie (*Superdex 200 16/60 prep grade*) von MBP-Apoptin in *TEV*-prozessierter und unprozessierter Form. Links sind die Retentionsprofile für prozessiertes (Blau) und unprozessiertes Protein (Schwarz), rechts die dazugehörigen SDS-Gele (12% PAA) der einzelnen Peaks dargestellt. Aus den Daten geht hervor, dass Apoptin den Haupteffektor der Oligomerisierung darstellt.

Zum Vergleich wurde die Größenausschlusschromatographie mit durch *TEV*-Protease prozessiertem MBP-Apoptin durchgeführt, wobei interessanterweise das frei entstehende Apoptin ein ähnliches Retentionsvolumen wie das Fusionsprotein aufweist. Jedoch konnte im Vergleich zum renaturierten Apoptin keine erhöhte Löslichkeit nach *TEV*-Verdau detektiert werden, was für ein generelles Faltungsproblem des isolierten Apoptins spricht. Dagegen wird das freie MBP vollständig vom Fusionsprotein sowie vom freien Apoptin abgetrennt und eluiert mit einem Retentionsvolumen von 82.8 mL, was einem berechneten Molekulargewicht von 43.9 kDa und damit erwartungsgemäß einem Monomer entspricht (erwartetes MW: 43.7 kDa). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die Oligomerisierung von MBP-Apoptin ausschließlich auf Apoptin basiert und somit dieses Konstrukt für die Generierung erster valider Strukturinformationen geeignet ist. Alle weiteren Studien wurden daher mit MBP-Apoptin durchgeführt.

### 3.5.3 Stabilisierung von MBP-Apoptin durch intermolekulare Quervernetzung

Apoptin zeigt nach Abspaltung von MBP sowie nach Rückfaltung aus *inclusion bodies* eine geringe Löslichkeit und Stabilität. Jedoch konnte mittels Größenausschlusschromatographie gezeigt werden, dass es trotz Fusion an MBP zur Ausbildung eines spezifischen Oligomers kommt. Daher wurde im Folgenden versucht, das MBP-Apoptin-Oligomer zunächst durch intermolekulare Quervernetzung zu stabilisieren, um dadurch die Stabilität des Komplexes weiter zu erhöhen. Im Anschluss wurde versucht, mit Hilfe der *TEV*-Protease das quervernetzte Apoptin freizusetzen, um es unabhängig von MBP zu charakterisieren. Außerdem sollte die Quervernetzung der Stabilisierung für

optimierte Kristallisationsversuche mit dem MBP-Apoptin Fusionsprotein dienen. Dafür wurde MBP-Apoptin zunächst mit 0.05% Glutaraldehyd für 3 min bei RT inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 100 mM Tris gestoppt. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt eine deutliche Verschiebung der MBP-Apoptin Bande zu höheren Molekulargewichten was auf eine erfolgreiche Durchführung der spezifischen intermolekularen Quervernetzung hinweist. Jedoch konnte im Anschluss das MBP nicht mehr mit Hilfe der *TEV*-Protease abgespalten werden. Dies deutet auf eine verminderte Zugänglichkeit der *TEV*-Erkennungssequenz hin. Die auf der erwarteten Höhe entstehende Bande in der SDS-PAGE stellt höchstwahrscheinlich ausschließlich das freie MBP aus nicht quervernetztem Fusionsprotein dar.

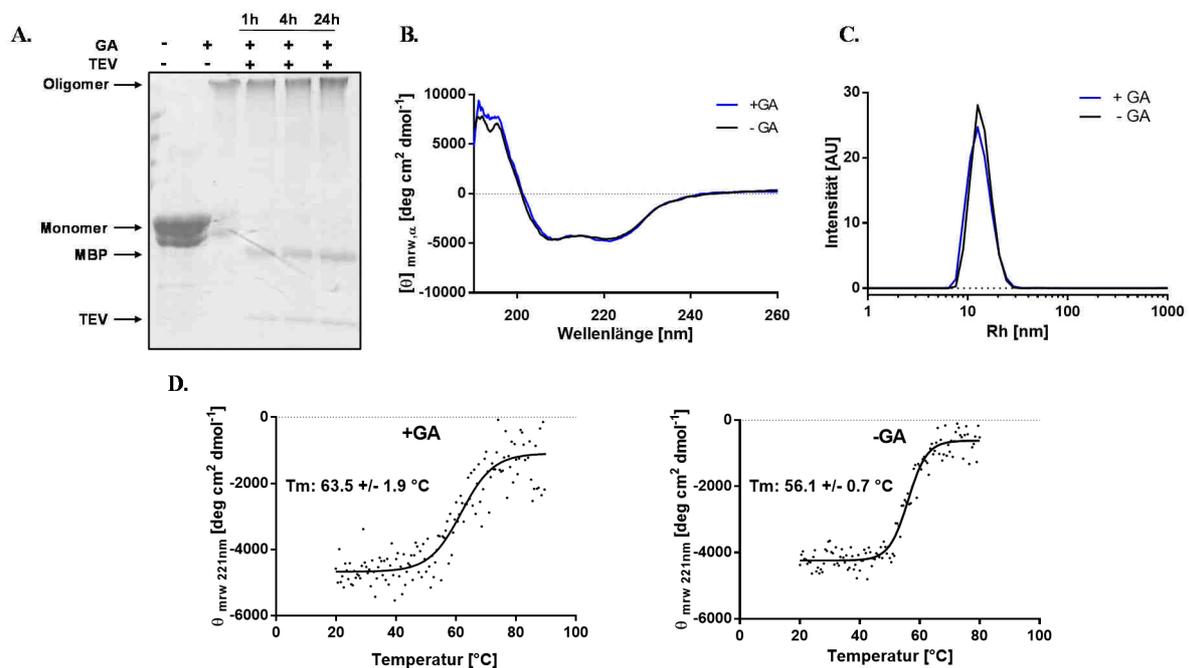


Abbildung 30: Quervernetzung von MBP-Apoptin mit Glutaraldehyd (GA). **A:** Nach 3 Minuten sind bereits 90% des MBP-Apoptins quervernetzt, was anhand der Bandenverschiebung in der SDS-PAGE (12 % PAA) erkennbar ist. Jedoch lässt sich lediglich das nicht quervernetzte MBP-Apoptin mit Hilfe der *TEV*-Protease spalten, da keine weitere Zunahme der MBP-Bande mit fortlaufender Zeit beobachtet werden kann. **B+C:** CD-Spektren sowie DLS-Experimente vor und nach Quervernetzung von MBP-Apoptin mit Glutaraldehyd. In beiden Fällen ist keine Änderung der Struktur oder des hydrodynamischen Radius erkennbar. **D:** Die CD-basierten Schmelzkurven von quervernetztem und nicht quervernetztem MBP-Apoptin zeigen eine thermische Stabilisierung des Proteins von über 7 °C.

Um den Einfluss der Quervernetzung auf die Sekundärstrukturanteile und die Proteinstabilität zu untersuchen, wurden CD-spektroskopische Analysen mit MBP-Apoptin vor und nach der Quervernetzung durchgeführt. Während keine nennenswerten Änderungen der Sekundärstrukturzusammensetzung erkennbar sind, zeigt sich bei der

Schmelzkurvenanalyse eine um mehr als 7 °C erhöhte Stabilität des quervernetzten MBP-Apoptins. Der Schmelzpunkt des Proteins stieg von 56.1 °C auf 63.5 °C an. Zur Untersuchung des Einflusses auf den Oligomerisierungszustand wurden zusätzlich DLS-Messungen durchgeführt, die ebenfalls keine Veränderung des hydrodynamischen Radius von MBP-Apoptin nach Quervernetzung zeigen, was eine vielversprechende Grundlage für weiterführende Kristallisationsexperimente darstellt. Trotz erhöhter Proteinstabilität konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine Bedingungen für eine erfolgreiche Kristallisation von MBP-Apoptin identifiziert werden.

#### 3.5.4 SAXS-Struktur von MBP-Apoptin

Apoptin ist in der Lage, Tumorzellen nach Assemblierung zu einem globulären Multimer selektiv zu töten<sup>114</sup>. Jedoch konnte bisher nicht identifiziert werden, aus wie vielen monomeren Untereinheiten sich das Apoptin-Multimer zusammensetzt. Versuche, Apoptin alleine oder als Fusionsprotein zu kristallisieren, um hochauflösende Strukturdaten zu generieren, führten bisher nicht zum Erfolg. Um das Oligomerisierungsverhalten von MBP-Apoptin in Lösung zu untersuchen, wurden deshalb SAXS-Studien an der P12-*Beamline* des PETRA III-Speicherringes (DESY, Hamburg) durchgeführt. Vorherige DLS-Ergebnisse zeigten keine Unterschiede des hydrodynamischen Radius in Abhängigkeit von der Apoptin-Konzentration im Bereich von 3-9 mg/mL, weshalb von einem spezifischen Oligomer ausgegangen werden kann (Abbildung 31A). Für die SAXS-Messungen wurde MBP-Apoptin daher auf Konzentrationen von 1.7-10.5 mg/mL eingestellt und in einem Probenvolumen von 20 µL mit einer Belichtungszeit von 15 s vermessen. Zwischen jeder Proteinmessung wurde der identische Puffer gemessen, dessen Streusignal automatisch von dem der Proteinlösung subtrahiert wurde. In Abbildung 31B+C sind die reduzierten Streukurven für unterschiedliche MBP-Apoptin-Konzentrationen dargestellt, die einen gleichmäßigen Verlauf sowie die erwarteten konzentrationsabhängigen Unterschiede in der Streuintensität aufweisen. Die Streukurven wurden anschließend auf die konzentrationsabhängige Streuintensität extrapoliert und diese nach *Guinier* aufgetragen (Abbildung 31D). Dabei zeigt sich ein weitestgehend linearer Verlauf bei sehr kleinen Winkeln, weshalb von einer guten experimentellen Qualität ohne nennenswerte unspezifische Proteinaggregation ausgegangen werden kann. Aus dem *Guinier*-Plot wurden die charakteristischen Parameter  $R_g=8.23\pm 0.22$  nm und  $I(0)=247325.3\pm 826.9$  mit einem Zuverlässigkeits-Score von 0.86 bestimmt, was die gute Datenqualität der Messungen bestätigt.

Der normalisierte *Kratky*-Plot für MBP-Apoptin zeigt einen Gauss-ähnlichen Kurvenverlauf bei kleinen Winkeln, erst bei größeren Winkeln ist ein leichter Anstieg der Kurve erkennbar, was auf einen geringen Anteil von flexiblen Strukturen im Protein hindeutet. Dieser resultiert wahrscheinlich in erster Linie aus der Linkerregion zwischen MBP und Apoptin. Zum Vergleich ist der *Kratky*-Plot des als Standardprotein verwendeten BSA dargestellt, dessen Kurve einen ähnlichen Verlauf annimmt, weshalb von einem vorwiegend strukturierten Protein ausgegangen werden kann (Abbildung 31F). Mit Hilfe des Programms GNOM<sup>195</sup> wurde anschließend die Abstandsverteilungsfunktion  $p(R)$  berechnet, aus der ein maximaler Partikelabstand von  $D_{\text{MAX}}=25.5$  nm und ein *Porod*-Volumen von  $2479.5$  nm<sup>3</sup> für den MBP-Apoptin-Komplex resultiert (Abbildung 31G). Alle für die Datenprozessierung relevanten Daten sind außerdem in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Aus den durchgeführten SAXS-Experimenten ermittelte Strukturparameter für MBP-Apoptin.

<b>Strukturparameter</b>	
$I(0)$ (cm <sup>-1</sup> ) ( <i>Guinier</i> -Plot)	$247325 \pm 826.29$
$R_g$ (nm) ( <i>Guinier</i> -Plot)	$8.23 \pm 0.19$
$D_{\text{max}}$ (nm) [aus $P(r)$ ]	$25.5 \pm 0.8$
<i>Porod</i> -Volumen (nm <sup>3</sup> )	$\sim 2479$
<b>Molekulargewichtsbestimmung (kDa) <sup>196</sup></b>	
$V_c$ [nm <sup>3</sup> ]	31.21
$Q_R$	118.40
Theoretisches MW [kDa]	961.83
Anzahl Monomere	16.06
<b>DAMMIF-Parameter</b>	
$\chi^2$	1.451
NSD	$0.946 \pm 0.146$

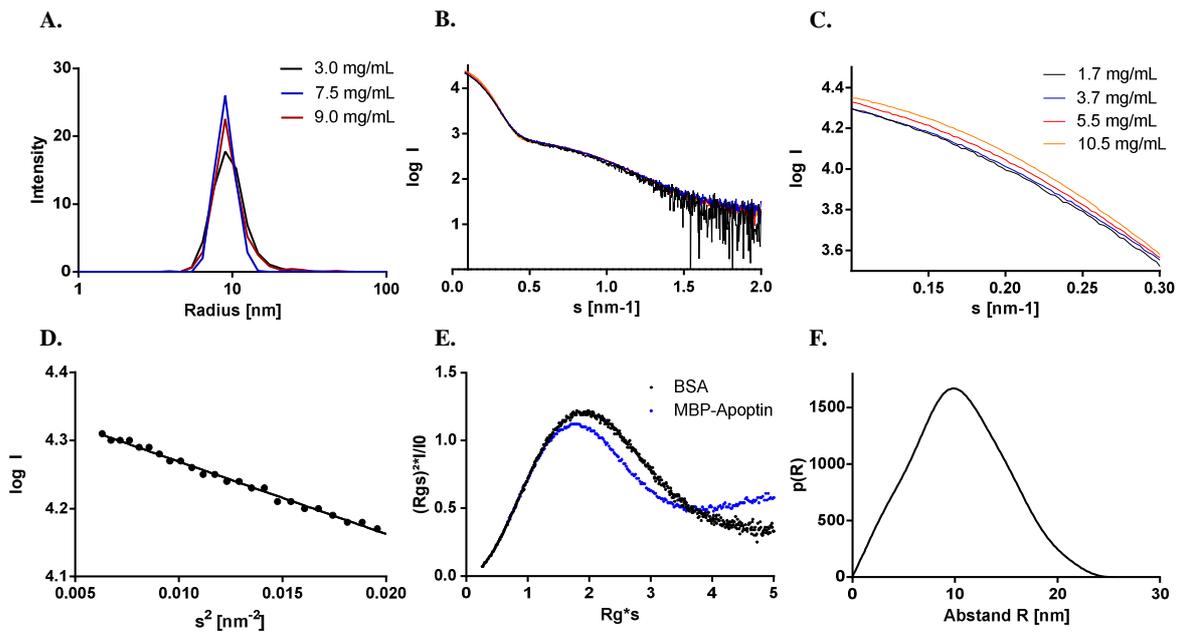


Abbildung 31: Strukturelle Untersuchung von MBP-Apoptin in Lösung **A:** DLS-Experimente zeigen keine Veränderung des hydrodynamischen Radius mit zunehmender Proteinkonzentration. **B+C:** Die primären SAXS-Streukurven für verschiedene MBP-Apoptin Konzentrationen zeigen einen ähnlichen Verlauf und unterscheiden sich lediglich konzentrationsabhängig in der Intensität. Unter **B** ist die gesamte Streukurve und unter **C** die Streukurve im kleinen Winkelbereich bis  $0.3 \text{ nm}^{-1}$  dargestellt. **D:** Der *Guinier*-Plot der nach Null-Konzentration extrapolierten Streukurve verläuft weitestgehend linear, weshalb von guter Datenqualität ohne unspezifische Aggregation der Proteine ausgegangen werden kann. **E:** Der normalisierte *Kratky*-Plot von MBP-Apoptin zeigt wie der von BSA einen Gausskurven-ähnlichen Verlauf, was auf eine weitestgehende Faltung des Proteins hindeutet. **F:** Die mit dem Programm GNOM berechnete Abstandsverteilungsfunktion von MBP-Apoptin resultiert in einem maximalen Abstand von  $D_{\text{MAX}} = 32.2 \text{ nm}$  sowie in einem *Porod*-Volumen von  $V_{\text{Porod}} = 2684.9 \text{ nm}^3$ .

Um zu untersuchen, aus wie vielen monomeren Untereinheiten der MBP-Apoptin-Komplex zusammengesetzt ist, wurde mit Hilfe von  $R_g$  und dem Korrelationsvolumen  $V_c$ , welches den Quotienten aus  $I(0)$  und der integrierten Fläche der Auftragung von  $I*s$  gegen  $s$  darstellt, das theoretische Molekulargewicht des Proteins nach der von Rambo & Tainer postulierten Methode bestimmt<sup>196</sup>. Das dabei errechnete Molekulargewicht für MBP-Apoptin beträgt  $MW = 961.83 \text{ kDa}$ , was bei einem monomeren Molekulargewicht von  $59.7 \text{ kDa}$  einem Multimer aus 16 (Berechnet: 16.06) Untereinheiten entspricht. Aus diesen Daten wurden anschließend mit Hilfe des Software-Pakets DAMMIF<sup>197</sup> unter Vorgabe eines 16-mers zehn ab initio Modelle berechnet, die anschließend mit Hilfe von DAMAVR gemittelt wurden. Dieses *ab initio* Modell zeigte einen  $\chi^2$  Wert von 1.451, was für eine gute Anpassung der experimentellen Daten an das Modell spricht. Des Weiteren konnte eine normalisierte räumliche Diskrepanz (NSD) von  $0.946 \pm 0.146$  ermittelt werden. Da Werte

unterhalb von 1 für eine hohe Ähnlichkeit der Einzelmodelle sprechen, kann von einer zuverlässigen Vorhersage der *ab initio* Struktur ausgegangen werden. Das zugehörige mit dem Programm DAMAVR gemittelte *ab initio* Modell ist in Abbildung 32 dargestellt und zeigt einen weitestgehend flachen Aufbau, der aus einem inneren und einem äußeren Ring besteht. Der Komplex weist außerdem Dimensionen von  $17.2 * 25.7 * 25.7$  nm auf, was gut mit dem von DAMMIF berechneten maximalen Molekülabstand von  $D_{MAX}=25.5$  nm übereinstimmt. Da Apoptin auch in Abwesenheit von MBP Oligomere bildet, ist es wahrscheinlich, dass die Apoptin-Domänen nach innen orientiert sind und das Oligomer durch spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisieren, während die MBP-Domänen nach außen gerichtet sind. Um die Anordnung im Molekül zu veranschaulichen, wurde die hochauflösende Kristallstruktur von MBP (PDB: 1OMP) mit der *ab initio* Form von MBP-Apoptin übereinandergelegt (Abbildung 32B). Der rot eingefärbte Bereich stellt den C-Terminus des MBP dar, der aufgrund der kovalenten Verknüpfung mit Apoptin nach innen orientiert ist. Dabei wird deutlich, dass sich 16 MBP-Untereinheiten gut in die *ab initio* Form integrieren lassen, weshalb die dargestellte Molekülanordnung plausibel erscheint. Das restliche, nicht durch MBP-Moleküle belegte Volumen wird im Inneren von den Apoptin-Domänen des jeweiligen Fusionsproteins gefüllt. Aufgrund des Fehlens einer hochauflösenden Apoptin-Modellstruktur konnte dieses jedoch nicht entsprechend dargestellt werden.

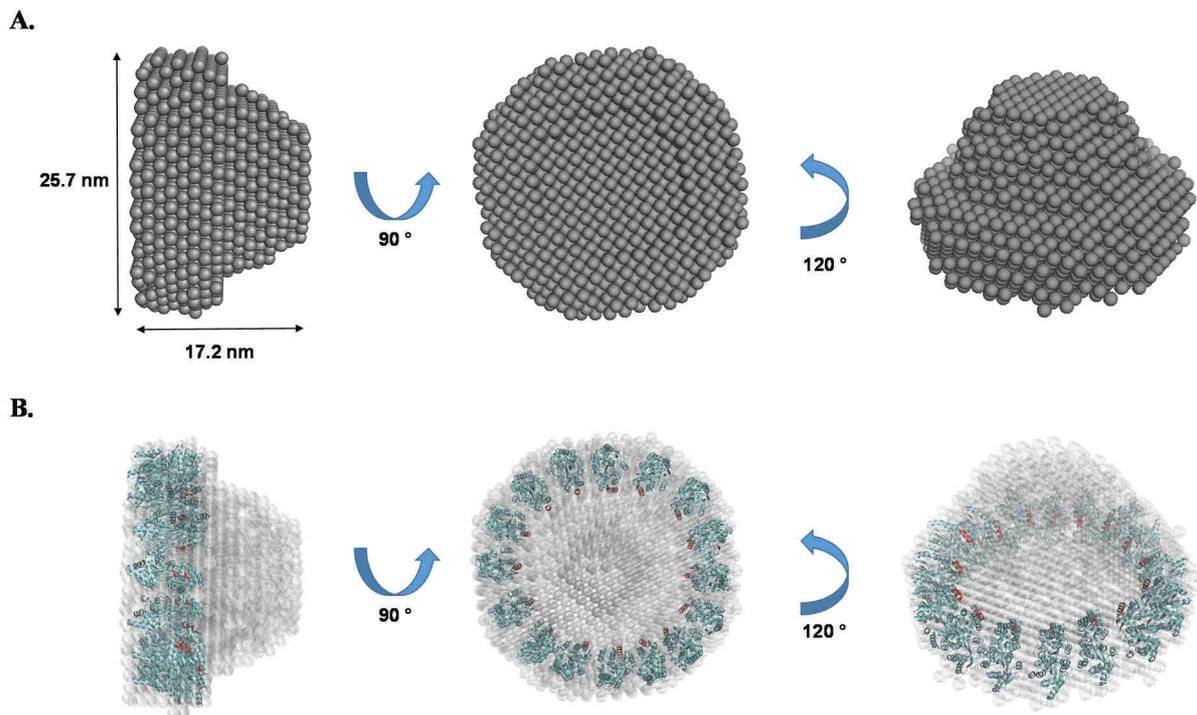


Abbildung 32A: Mit dem Programm DAMMIF erstelltes *ab initio*-Modell von MBP-Apoptin. Der Komplex besteht aus 16 MBP-Apoptin-Molekülen und weist eine ringförmige Anordnung mit Dimensionen von  $17.2 \times 25.7 \times 25.7$  nm auf. **B:** Überlagerung des *ab initio* Modells mit der hochauflösenden Struktur von MBP (PDB: 10MP). Dabei sind die MBP-Domänen ringförmig nach außen um den Apoptin-Kern herum orientiert, was durch die grüne Molekülstruktur dargestellt ist. Der rot eingefärbte Teil stellt den C-Terminus des Moleküls dar, der aufgrund der Fusion mit Apoptin nach innen orientiert sein muss.

### 3.6 Kristallisationsversuche von NS1 und von Apoptin in Sf9-Zellen

Die hochauflösende Struktur des nativ inhibierten TbCatB aus intrazellulär gewachsenen Proteinkristallen stellt die erste neue Bioinformation dar, die mit Hilfe eines FELs generiert werden konnte<sup>155</sup>. Zu Beginn dieser Arbeit war die intrazelluläre Kristallisation von drei weiteren Proteinen in Sf9-Zellen zufällig beobachtet worden (IMPDH aus *T. brucei*, GFP- $\mu$ NS aus dem avianen Reovirus und Luciferase aus *Photinus pyralis*). Auch die TbIMPDH-Kristalle zeigten in initialen FEL-Experimenten eindeutige Diffraktionssignale, was eine generelle Anwendbarkeit intrazellulär gewachsener Kristalle für die Strukturbiologie vermuten lässt. Da die Aufklärung der hochauflösenden Kristallstrukturen für die NS1-Domänen sowie für Apoptin bislang nicht erfolgreich war, wurde im Folgenden getestet, ob es bei Überexpression in Sf9-Insektenzellen zur spontanen intrazellulären Proteinkristallisation kommt. Dazu mussten die zugehörigen Gensequenzen zunächst den pFastBac1-Vektor kloniert werden, der einen Shuttle-Vektor zum Einbringen des

rekombinanten Zielgens in das baculovirale Genom (Bacmid) darstellt. *E. coli* DH10Bac-Zellen wurden folglich mit den pFastBac1-Vektoren transformiert, wobei das Zielgen mittels homologer *in vivo* Rekombination das baculovirale Bacmid integriert wurde. Dieses enthält alle für die virale Replikation essentiellen Gene und führt nach Transfektion in Sf9-Zellen zur Herstellung baculoviraler Partikel. Nach mehrfacher Amplifikation des Virustiters durch wiederholte Infektion von Sf9-Zellen wurden diese über einen Zeitraum von 7 Tagen regelmäßig auf das Wachstum von Kristallen untersucht. Jedoch konnte bei diesen initialen Untersuchungen für keines der Konstrukte die Entstehung von intrazellulären Proteinkristallen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bis zu diesem Zeitpunkt ist völlig unklar, welche zellulären und molekularen Mechanismen bei den oben genannten Proteinen zur erfolgreichen intrazellulären Kristallisation geführt haben. Jedoch konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen für TbCatB festgestellt werden, dass die Kristalle von einer Doppelmembran umgeben sind<sup>198</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die Kristalle in einem Kompartiment der Zelle entstanden sein könnten. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Eigenschaften der Kristalle sowie die zellulären Mechanismen, die mit der Proteinkristallisation in Verbindung stehen könnten, am Beispiel von TbCatB und GFP- $\mu$ NS initial untersucht.

### **3.7 Untersuchungen der intrinsischen Stabilität von TbCatB und GFP- $\mu$ NS-Kristallen**

Die TbCatB-Kristalle weisen augenscheinlich eine ungewöhnlich hohe Stabilität gegenüber mechanischen sowie chemischen Einflüssen auf, was die Bestimmung der hochauflösenden Kristallstruktur enorm erleichterte<sup>199</sup>. Eine hohe Stabilität der intrazellulär hergestellten Proteinkristalle nach Isolation ist somit auch für weitere Proteine essentiell, um hochauflösende Strukturdaten in Diffraktionsexperimenten zu generieren. Im Gegensatz zur konventionellen Proteinkristallographie können die Bedingungen für intrazelluläre Proteinkristalle, unter denen sie eine optimale Stabilität aufweisen, nicht ohne weiteres vorhergesagt werden, da sie in einer deutlich heterogeneren Umgebung entstehen. Demnach ist es von Bedeutung, für jede Art von Proteinkristallen die optimalen Isolations- und Lagerungsbedingungen zu identifizieren, um eine maximale Diffraktionsqualität zu erzielen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss verschiedener Puffersubstanzen und Lösungen auf TbCatB- und GFP- $\mu$ NS-Kristalle im Folgenden systematisch untersucht.

### 3.7.1 Optimierung der TbCatB-Kristallisolierung

In bisherigen Experimenten wurden die TbCatB-Kristalle durch Lyse der Sf9-Zellen mit RIPA-Puffer und anschließender differentieller Zentrifugation isoliert, bis ein angemessener Reinheitsgrad der Kristalle mikroskopisch beobachtet werden konnte. Jedoch konnte durch Anwendung dieses Protokolls oftmals eine große Menge an Zelltrümmern nicht von den Kristallen abgetrennt werden, was insbesondere bei der Aufnahme von Strukturdaten am FEL mittels SFX-Technik zu Verstopfungen des Jet-Systems während der Probenapplikation führte (Lars Redecke, persönliche Mitteilung). Dies ließ sich in erster Linie auf freigesetzte DNA aus dem Zellkern der Sf9-Zellen zurückführen, die durch unspezifische Wechselwirkungen zur Verklebung der isolierten TbCatB-Kristalle führte<sup>199</sup>. Aus diesem Grund sollte der Reinigungsprozess der Kristalle optimiert werden, um bei zukünftigen Messungen diesem Problem zu entgehen.

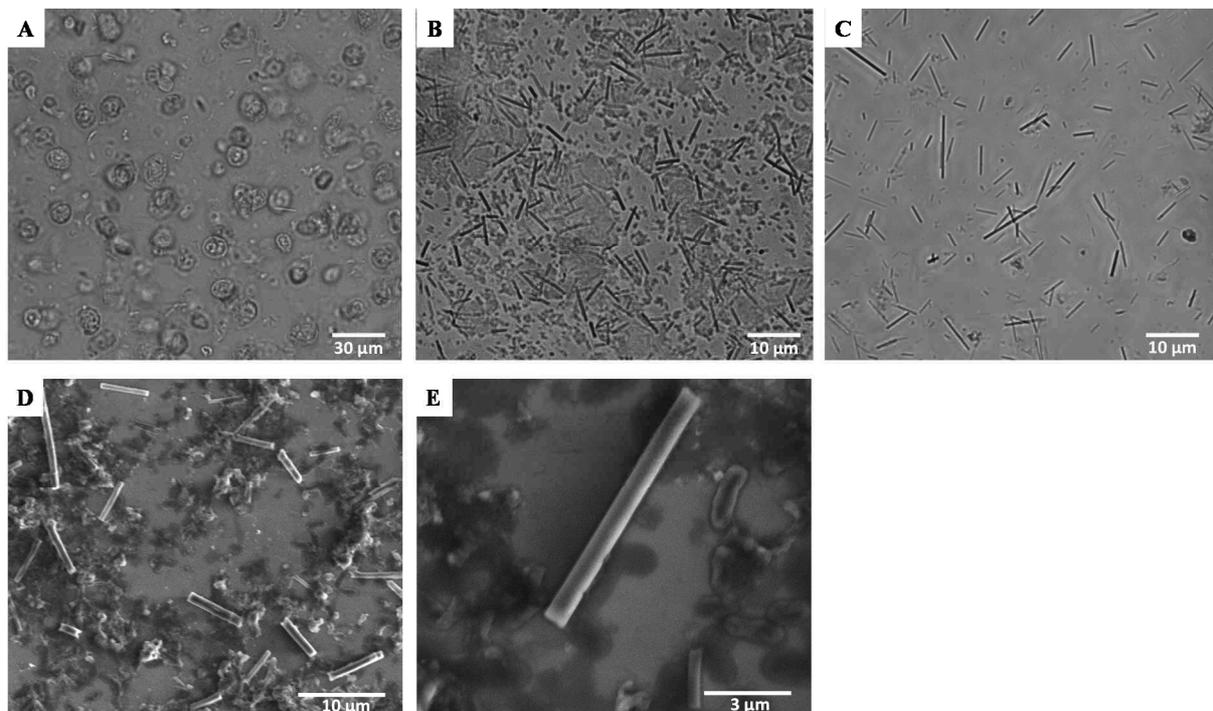


Abbildung 33: Lichtmikroskopische Kontrolle der Isolation von TbCatB-Kristallen aus Sf9-Zellen. Nach Lyse der Zellen in hypotonem Puffer wurden die Zellkerne zunächst durch Zentrifugation bei 200 x g abgetrennt **(A)** und die Kristalle aus dem Überstand abgenommen **(B)**. Das anschließende Waschen der Kristalle mit RIPA-Puffer führte zu einer hochreinen Kristalllösung ohne nennenswerte Verunreinigung durch Zelltrümmer **(C)**. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Verwendung von hypotonem Puffer die Stabilität der Kristalle augenscheinlich nicht negativ beeinflusst **(D, E)**.

Dafür wurden die Sf9-Zellen im Gegensatz zum vorher verwendeten RIPA-Puffer in hypotonem Puffer (10 mM HEPES pH 7.5, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert, der aufgrund des geringeren osmotischen Drucks zu einem Einfluss von Wasser in die

Sf9-Zellen führt, sodass diese dem steigenden mechanischen Druck nicht mehr standhalten können. Bei der Verwendung von RIPA-Puffer wird die Membran der Zellkerne aufgrund der enthaltenen Detergenzien zerstört, was durch die Verwendung von hypotonem Puffer verhindert wird. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde das Lysat nacheinander bei verschiedenen Geschwindigkeiten zentrifugiert, um eine optimale Abtrennung der Zelltrümmer von den Kristallen zu ermöglichen. Dabei zeigte sich, dass die Zentrifugation bei 200 x g für 10 min zur Abtrennung eines Großteils der noch intakten Zellkerne führt. Die im Überstand befindliche Kristallfraktion wurde anschließend noch einmal mit RIPA-Puffer gewaschen, wodurch restliche Membrantrümmer abgetrennt werden konnten, was zu einer sehr reinen, zellkernfreien Kristalllösung führte. Zur Validierung der Kristallqualität wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Kristalle erstellt. Diese zeigen eindeutig Partikel mit scharfen Kanten im Größenbereich von 5-15 µm und ähneln damit den bereits publizierten Aufnahmen isolierter TbCatB Kristalle, die mit RIPA-Puffer isoliert wurden<sup>155</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass die Verwendung von hypotonem Puffer zur Zellyse keinen negativen Einfluss auf die Stabilität der Kristalle hat.

### **3.7.2 Stabilitätstests zur Optimierung des TbCatB-Lagerungspuffers**

In vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass isolierte TbCatB-Kristalle eine für Proteinkristalle ungewöhnlich hohe chemische und mechanische Stabilität aufweisen<sup>198</sup>, jedoch wurde dieses Phänomen nicht näher untersucht. Bisher wurden die TbCatB-Kristalle nach der Isolierung in PBS resuspendiert und bis zur Verwendung für Diffraktionsexperimente gelagert. Jedoch ist nicht sicher, ob dieser Puffer die optimalen Bedingungen für eine längere Kristalllagerung darstellt. Deshalb wurde im Folgenden die Stabilität der isolierten Kristalle in Lösung unter den verwendeten Pufferbedingungen untersucht. Außerdem sollte geklärt werden, ob sich TbCatB-Kristalle zusätzlich zu den bisher durchgeführten FEL-Experimenten auch für die Anwendung an Synchrotron-Strahlungsquellen eignen. Da bei Synchrotron-Experimenten im Gegensatz zu FEL-Experimenten die Verwendung von kryogenen Bedingungen notwendig ist, mussten geeignete Reagenzien zum Schutz der TbCatB-Kristalle vor Eisbildung identifiziert werden, die dennoch eine optimale Stabilität der Kristalle in Lösung gewährleisten.

Die Stabilität der Kristalle in verschiedenen Lösungen sollte systematisch mittels Western Blot-Technik untersucht werden. Da bisher kein spezifischer Antikörper zum Nachweis von TbCatB verfügbar war, musste dieser zunächst hergestellt werden. . Hierzu wurden die

TbCatB-Kristalle nach Isolation zunächst durch Inkubation in saurem Puffer (50 mM Na-Acetat pH 3.5) aufgelöst. Zusätzlich wurde 1 mM PMSF hinzugefügt, um die Protease-Aktivität von TbCatB zu inhibieren. Im Anschluss wurde das Protein gegen PBS dialysiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Das reine TbCatB zeigte ein charakteristisches Dreifach-Bandenmuster bei einem apparenten Molekulargewicht um 37 kDa (Abbildung 34, links). Die obere Bande entspricht dabei der doppelt glykosylierten Form, während die mittlere sowie die untere Bande eine der jeweils einfach glykosylierten Formen des TbCatB darstellen. Dies wurde bereits in vorherigen Experimenten gezeigt und entspricht damit dem erwarteten Ergebnis<sup>199</sup>. Die Herstellung des spezifischen Antikörpers erfolgte durch die Firma Bioscience (Göttingen, Deutschland). Dabei wurde die isolierte Proteinlösung zur mehrfachen Immunisierung eines Kaninchens verwendet und das Serum in Abständen von jeweils zwei Wochen aus dem Kaninchenblut isoliert. Um zu untersuchen, ob das Serum TbCatB-spezifische Antikörper enthält, wurden Sf9-Zellen mit einem rekombinanten TbCatB-Baculovirus infiziert und nach Lyse mittels Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich nach der 3. Blutung eine deutliche Steigerung der Intensität der Bande des detektierten Zielproteins, während in nicht-infizierten Sf9-Zellen kein TbCatB-Protein nachgewiesen werden konnte, was für eine hohe Spezifität des generierten Antiserums spricht (Abbildung 34). Die Untersuchung der TbCatB-Kristallstabilität erfolgte anschließend ebenfalls über die Quantifizierung von löslichem TbCatB mittels Western Blot. Dafür wurden 5 µL der TbCatB-Kristall-Suspension in 20 µL unterschiedlicher Pufferlösungen für 1h bei RT inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 x g pelletiert. Die während der Inkubationszeit freigesetzte lösliche Proteinmenge dient dabei als Maß für die Kristallstabilität unter den gewählten Pufferbedingungen. Dabei konnten im pH-Bereich zwischen 5.0 und 7.0 kaum lösliche Mengen von TbCatB nachgewiesen werden, was für eine hohe Kristallstabilität unter diesen Pufferbedingungen spricht. Dagegen zeigte sich bei hohen pH-Werten zwischen 8.0 und 10.0 eine zunehmende Destabilisierung der Kristalle, weshalb diese Bedingungen als Lagerungspuffer nicht geeignet sind. Bei sauren pH-Werten zwischen 3.0 und 4.0 ist eine Prozessierung des TbCatB zu beobachten, was durch die Abspaltung des im aktiven Zentrum bindenden Propeptids durch die pH-induzierte Protease-Aktivierung zu erklären ist<sup>155</sup>. Somit wird bestätigt, dass der bisher verwendete PBS-Puffer (pH 7.2) für die Lagerung der TbCatB-Kristalle am besten geeignet ist.

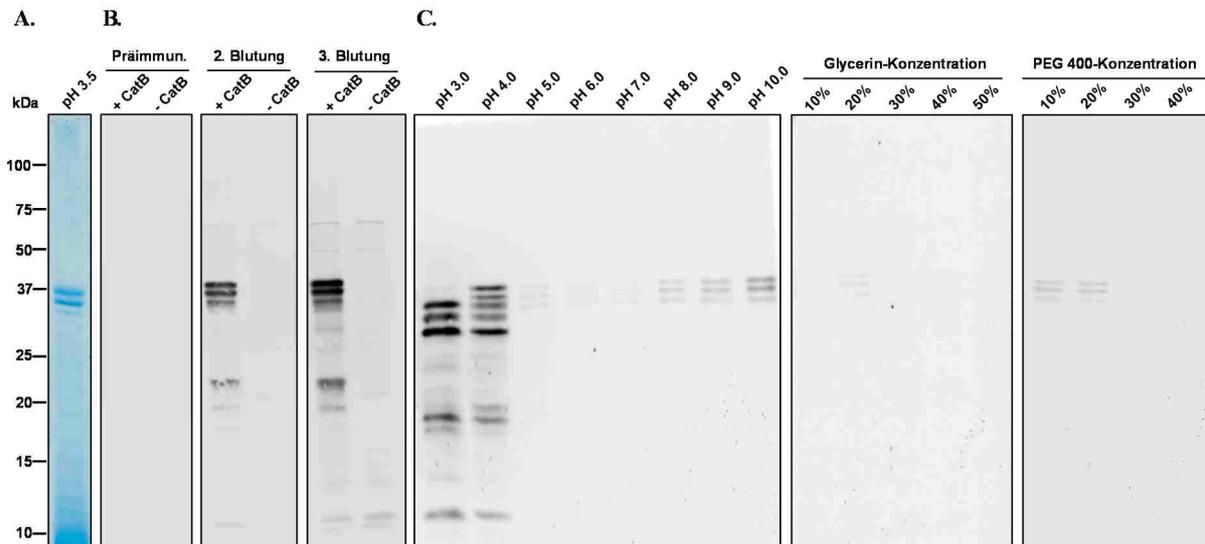


Abbildung 34: Untersuchung der TbCatB-Kristallstabilität mittels Western Blot. Kristalle wurden isoliert und bei pH 3.5 rückgelöst, was zu einer hohen Reinheit der Proteinfraktion von 95% führte **(A)**. Die detektierten Banden bei ca. 37 kDa stellen dabei das doppelt glykosylierte (oben), das einfach glykosylierte (Mitte) sowie das unglykosylierte Protein (unten) dar. Das Antiserum wurde durch Kaninchen-Immunsierung mit dem isolierten TbCatB-Protein hergestellt und zeigt eine zunehmende spezifische Detektion der TbCatB-Zielbanden **(B)**. Bei den Stabilitätsanalysen zeigt sich eine gute Kristallstabilität im Bereich von pH 5.0 – pH 7.0 sowie bei Glycerin- und PEG400-Konzentrationen von über 30% **(C)**. Die Verschiebung der Bande zu kleineren Molekulargewichten bei sauren pH-Werten lässt sich durch die Aktivierung der Protease-Funktion von TbCatB und dem Abspalten des Propeptids erklären. Das Antiserum wurde mit einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, die Detektion erfolgte Chemilumineszenz mit einer 1:5000 Verdünnung eines HRP-markierten  $\alpha$ -Kaninchen Sekundärantikörpers.

Zur Identifizierung geeigneter Kryoprotektanten wurden folglich Stabilitätstests mit PBS durchgeführt, welches mit verschiedenen Konzentrationen an PEG 400 oder Glycerin supplementiert wurde. Dabei konnte für beide Reagenzien bei steigenden Konzentrationen eine Verringerung der detektierten löslichen TbCatB-Menge nachgewiesen werden, was für eine Stabilisierung der Kristalle durch PEG 400 und Glycerin spricht. Somit sind beide Reagenzien für die Kryokonservierung während Synchrotron-basierter Diffraktionsexperimente geeignet.

### 3.7.3 Einfluss des Vakuums auf die TbCatB-Stabilität

Bei Diffraktionsexperimenten am FEL wird eine Vielzahl von identischen Kristallen benötigt, da die Generierung von Strukturdaten nach dem *diffraction-before-destruction*-Prinzip verläuft<sup>147</sup>. Der Kristall wird unmittelbar nach Aufnahme eines Beugungsbilds zerstört, so dass anschließend keine weitere Beugungsinformation mehr detektiert werden

kann. Die Kristalle werden in einem Flüssigkeitsstrahl (*liquid jet*) in den gepulsten Laserstrahl im Vakuum injiziert. Die Trefferrate ist aufgrund des feinen FEL-Strahlendurchmessers mit ca. 3% bis max. 10% sehr gering, was einen enormen Verbrauch an Kristallen ohne Generierung von Strukturinformationen verursacht. Aus diesem Grund werden derzeit Techniken entwickelt, die eine Wiederverwendung von Kristallen ermöglichen sollen, die nicht durch den Laser getroffen wurden. Eine Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die Kristalle bei diesem Prozess das Durchqueren des Vakuums überstehen, um somit eine gleichbleibende Kristall-Qualität bei der Generierung von Strukturdaten zu gewährleisten. Deshalb wurde die Stabilität von TbCatB-Kristallen nach Injektion ins Vakuum mit Hilfe eines Injektorsystems in den Laboren der XFEL GmbH (Hamburg) untersucht. Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Kristalle zeigen im Vergleich zu denen von frisch isolierten Kristallen bei keine nennenswerten Unterschiede, in allen Fällen sind die definierten Kanten der Kristalle deutlich erkennbar. Des Weiteren ist auch kein Unterschied in der Größenverteilung der Kristalle zu erkennen. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die TbCatB-Kristalle durch das Vakuum nicht signifikant geschädigt werden.

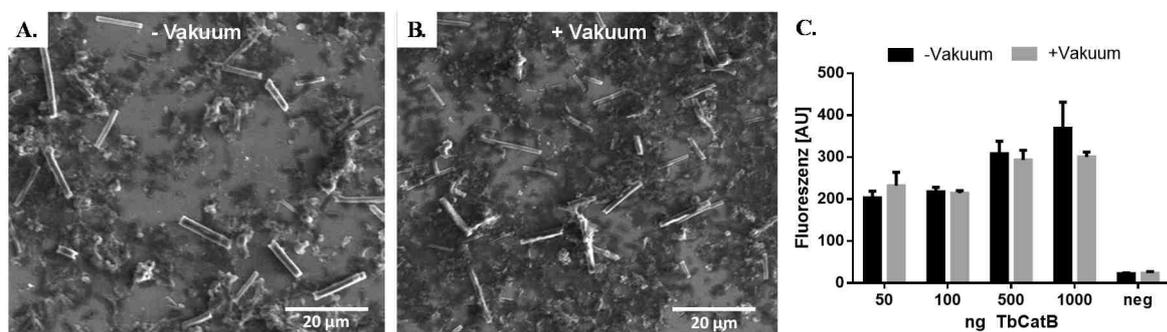


Abbildung 35: Untersuchung der Morphologie und Aktivität von TbCatB-Kristallen nach Durchquerung des FEL-Vakuums. Der Vergleich per Rasterelektronenmikroskopie zeigt keine nennenswerten Unterschiede bezüglich Größenverteilung und Morphologie zwischen frisch isolierten **(A)** und aufgefangenen **(B)** TbCatB-Kristallen. **C:** TbCatB-Aktivitätstest mit frisch isolierten (-Vakuum) sowie aufgefangenen TbCatB-Kristallen (+Vakuum) nach Rücklösung bei pH 3.5. Die Fluoreszenz des umgesetzten CatB-Substrats wurde mit einer Wellenlänge von 400 nm angeregt und die Emission bei 505 nm detektiert.

Zur weiteren Validierung wurden die Kristalle in saurem Puffer rückgelöst und ein Aktivitätstest mit Hilfe des kommerziell erwerblichen fluorimetrischen *Cathepsin B Activity Assay Kits* (Biovision) durchgeführt, bei dem die CatB-spezifische Abspaltung des fluoreszierenden Amino-4-Trifluormethylcumarin (AFC) von einem Arginin-Dipeptid detektiert wird. Dabei wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen eingesetzt und die

Aktivität im Vergleich zur inhibierten Negativkontrolle bestimmt. Der Test zeigt einen leichten Anstieg der TbCatB-Aktivität mit zunehmender Proteinkonzentration, jedoch verhält sich die Zunahme nicht wie erwartet linear zur eingesetzten Proteinmenge. Dies liegt vermutlich daran, dass das verwendete Kit für humanes CatB optimiert ist und somit abweichende Aktivitäten unter Verwendung von TbCatB festgestellt werden. Der Test zeigt jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität von frisch isolierten (-FEL) und aufgefangenen TbCatB-Kristallen (+FEL). Folglich haben die kurzzeitigen Vakuumbedingungen sowohl die Kristallmorphologie als auch die Struktur und somit die Funktion der Proteine im Kristall nicht geschädigt.

#### **3.7.4 Stabilitätsuntersuchungen der GFP- $\mu$ NS-Einschlüsse**

Das  $\mu$ NS-Protein aus dem avianen Reovirus ist in infizierten Zellen in der Lage, geordnete intrazelluläre Komplexe auszubilden, was für die virale Replikation eine zentrale Rolle spielt<sup>174,175</sup>. Bisherige Versuche,  $\mu$ NS mit Hilfe konventioneller Methoden zu kristallisieren, führte bisher nicht zum Erfolg, was vermutlich durch die intrinsische Tendenz des Proteins zur Aggregation bedingt ist. Bei der rekombinanten Herstellung des GFP-gekoppelten  $\mu$ NS C-Terminus (AS 448-605) in Sf9-Zellen konnte die Ausbildung von geordneten Strukturen detektiert werden, die augenscheinlich einen kristallähnlichen Aufbau aufweisen (Abbildung 36)<sup>175</sup>. Jedoch konnte der kristalline Charakter dieser Strukturen bisher nicht bewiesen werden. Neben der Validierung des kristallinen Aufbaus der assemblierten GFP- $\mu$ NS-Komplexe wurde im Folgenden die intrinsische Stabilität der Einschlüsse nach Isolierung aus Sf9-Zellen untersucht sowie die intrazelluläre Assemblierung des Proteins zu definierten Komplexen fluoreszenzmikroskopisch verfolgt.

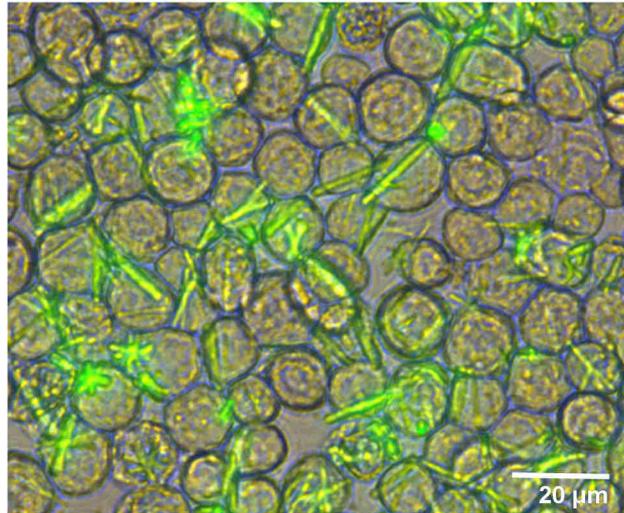


Abbildung 36: Überlagerung einer licht- und einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von GFP- $\mu$ NS exprimierende Sf9-Zellen 3 Tage nach rekombinanter Baculovirusinfektion. Das Fusionsprotein bildet intrazelluläre Einschlüsse aus, die einem kristallähnlichen Aufbau gleichen.

Um die Stabilität der GFP- $\mu$ NS-Strukturen bei verschiedenen Pufferbedingungen zu untersuchen, wurden zunächst Sf9-Zellen mit dem entsprechenden rekombinanten Baculovirus infiziert, was nach 3 Tagen zur Ausbildung intrazellulärer, fluoreszierender Einschlüsse führte. Analog zu TbCatB wurden die Zellen in hypotonem Puffer (50 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) lysiert und die Einschlüsse durch differentielle Zentrifugation von den Zellkernen abgetrennt. Die initiale Untersuchung der Stabilität erfolgte anschließend mittels Dot Blot unter Anwendung verschiedener pH-Werte und KCl-Konzentrationen im Puffer. Dafür wurden die Einschlüsse zunächst durch Zentrifugation pelletiert und anschließend in einem geeigneten Analysepuffer resuspendiert. Für die Dot Blot Analysen wurden die Einschlüsse nach definierten Zeitintervallen erneut zentrifugiert und aus dem Überstand 1  $\mu$ L auf eine Nitrocellulosemembran pipettiert, um das Protein anschließend mit einem monoklonalen  $\alpha$ -GFP-Antikörper (Roche) immunologisch nachzuweisen (Abbildung 37). Als Kontrolle wurde eine gleiche Menge an Kristallen im hypotonem Puffer durch Erhitzen denaturiert und analog auf die Nitrocellulose-Membran aufgetragen (C). Dabei zeigte sich über einen weiten pH-Bereich von pH 3.0 – pH 8.0 eine gleichbleibende Intensität des nachgewiesenen Proteins, was für eine hohe Stabilität der Einschlüsse unter diesen Pufferbedingungen spricht. Im Gegensatz dazu zeigt sich für pH 10.0 eine Zunahme der Intensität bereits nach 1h, was auf eine Destabilisierung der Einschlüsse durch alkalische Pufferbedingungen hindeutet. Der Vergleich zur Kontrolle zeigt, dass nach 4 Stunden bereits alle Einschlüsse in Lösung übergegangen sind. Des

Weiteren beeinflussen KCl-Konzentrationen bis 0.2 M die Stabilität der Einschlüsse kaum. Ab 0.5 M KCl kommt es hingegen zur Destabilisierung der Einschlüsse, was an der zunehmenden Intensität des nachgewiesenen Proteins zu erkennen ist. Folglich ist der hypotone Puffer für die Lagerung der GFP- $\mu$ NS-Einschlüsse gut geeignet.

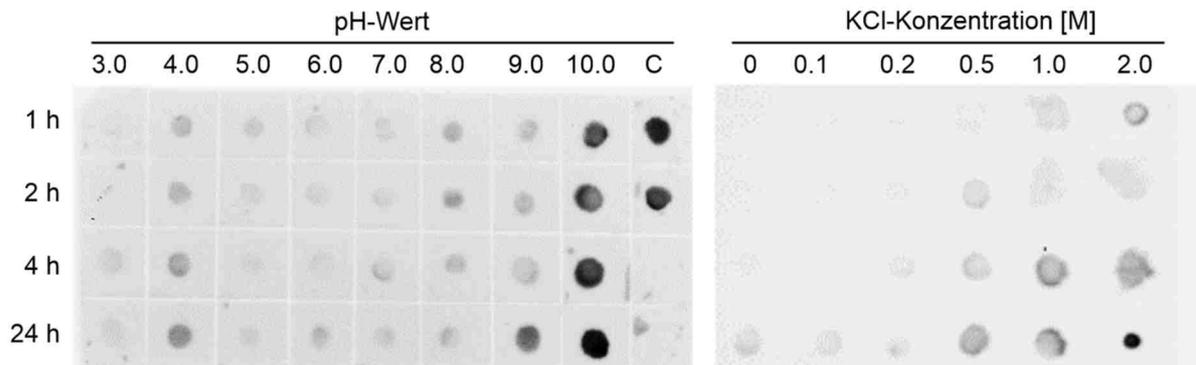


Abbildung 37: Dot Blot zum Nachweis der GFP- $\mu$ NS Einschlüsse unter verschiedenen Pufferbedingungen. Aus den Einschlüssen gelöstes Protein wurde mit einem monoklonalen Maus  $\alpha$ -GFP Antikörper (Roche, 1:1000) nachgewiesen, gefolgt von der Detektion mit einem HRP-markierten sekundären Antikörper (Santa Cruz, 1:5000). C: Kontrolle nach 10-minütiger Hitzedenaturierung der GFP- $\mu$ NS Einschlüsse (doppelt aufgetragen).

Anschließend wurde ebenfalls mittels Dot Blot die Stabilität der Einschlüsse in Gegenwart der beiden Kryoschutzreagenzien PEG 400 und Glycerol getestet, um anschließende Diffraktionsexperimente unter Kryobedingungen zum Nachweis der kristallinen Ordnung zu ermöglichen. Dabei zeigte sich, dass weder Glycerin noch PEG 400 in Konzentrationen von 10-40 % einen negativen Einfluss auf die Stabilität der Einschlüsse hat, so dass beide Substanzen für die Verwendung als Kryoschutz geeignet sind (Abbildung 38A).

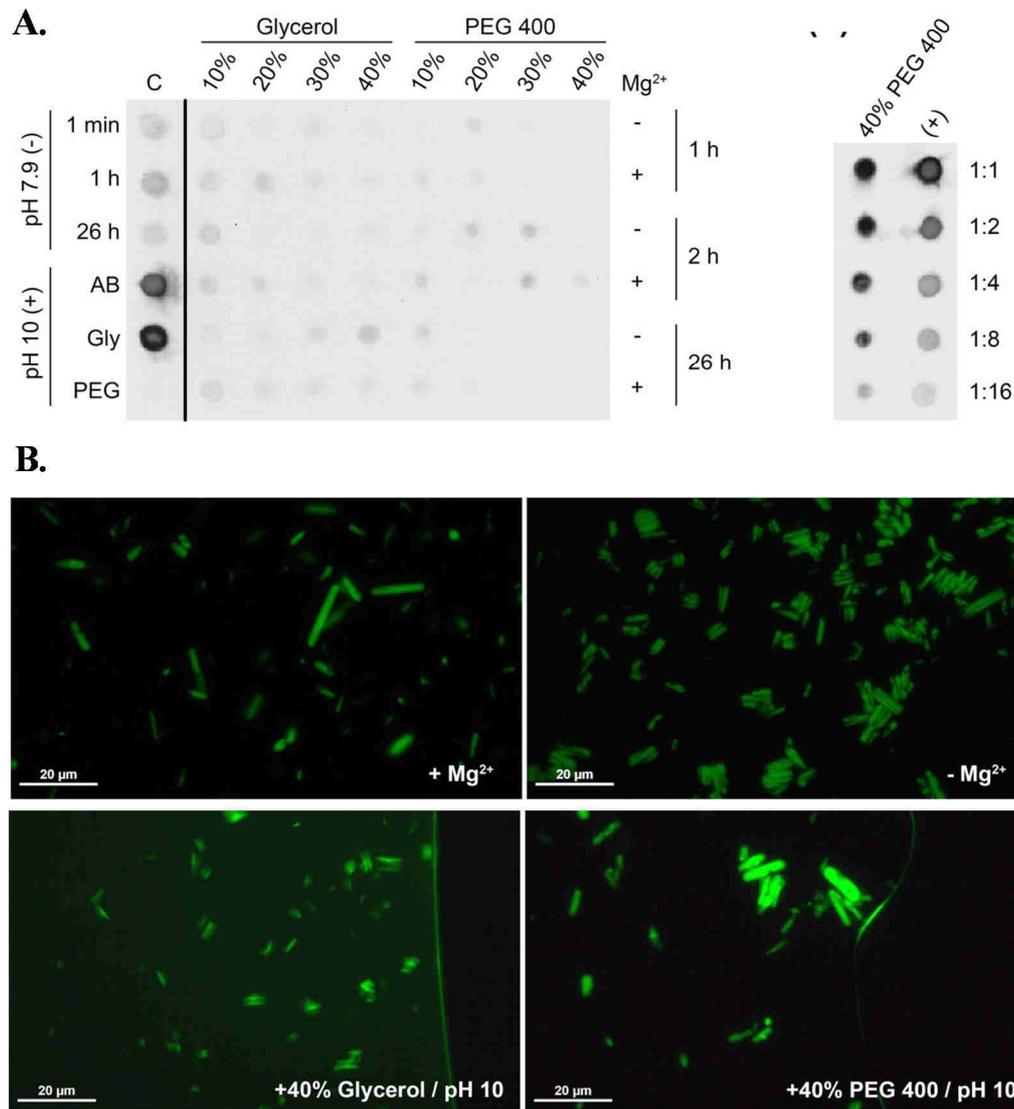


Abbildung 38: Stabilitätsuntersuchungen der isolierten GFP- $\mu$ NS-Einschlüsse zur Vorbereitung von Diffraktionsexperimenten. **A:** Dot Blot Analyse des Einflusses von PEG 400, Glycerol und Magnesium auf die GFP- $\mu$ NS-Stabilität über einen Zeitraum von 26 h. Als Kontrollen (C) dienen GFP- $\mu$ NS Einschlüsse in hypotonem Lagerungspuffer (Negativkontrolle) sowie bei pH 10 vollständig aufgelöste Einschlüsse (Positivkontrolle) unter Verwendung des Ausgangspuffers (AB), 40 % Glycerol (Gly) sowie 40 % PEG 400 (PEG). **B:** Fluoreszenzmikroskopie der potentiellen GFP- $\mu$ NS-Kristalle in verschiedenen Pufferlösungen. Die Einschlüsse zeigen eine intrinsische Stabilität in hypotonem Puffer, fächern jedoch bei Entfernen von Mg<sup>2+</sup> durch Zugabe von EDTA auf. Des Weiteren deutet die hohe Hintergrundfluoreszenz bei pH 10.0 auf ein Auflösen der Einschlüsse hin, was durch die Zugabe von 40 % PEG 400 verhindert wird.

Als zusätzliche Qualitätskontrolle wurden die isolierten Einschlüsse fluoreszenzmikroskopisch untersucht, um eventuelle destabilisierende Effekte optisch zu detektieren (Abbildung 38B). Dabei zeigte sich eine hohe intrinsische Stabilität der Einschlüsse in hypotonem Puffer, was die im Dot Blot nachgewiesene Stabilität in Puffern mit neutralem pH-Wert und niedriger KCl-Konzentration bestätigt. Interessanterweise

resultierte die Entfernung des im hypotonen Puffer vorhandenen  $Mg^{2+}$  in einem Auffächern der GFP- $\mu$ NS Einschlüsse, was darauf hindeutet, dass diese durch Komplexierung mit  $Mg^{2+}$  zusammengehalten werden. Jedoch konnte in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  keine zunehmende Proteinmenge im Dot Blot nachgewiesen werden. Folglich führt das Auffächern nicht zu einer intrinsischen Destabilisierung, sondern lediglich zu einer Umordnung der GFP- $\mu$ NS-Einschlüsse. Die steigende Hintergrundfluoreszenz bei pH 10.0 deutet auf ein Auflösen der Einschlüsse hin, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Dot Blot Analyse. Während durch Zugabe von Glycerol das Auflösen bei pH 10.0 nicht verhindert werden kann, zeigt die Zugabe von PEG 400 dagegen eine stabilisierende Wirkung auf die Einschlüsse, sowohl im Dot Blot als auch bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Daher stellt der hypotone Puffer in Kombination mit 40% PEG 400 die optimalen Pufferbedingungen für initiale Diffraktionstests dar.

### **3.7.5 SEM- und Pulverdiffraktionsexperimente zum Nachweis des kristallinen Charakters der GFP- $\mu$ NS-Einschlüsse**

Um zu untersuchen, ob es sich bei den GFP- $\mu$ NS-Einschlüssen tatsächlich um Proteinkristalle handelt, wurden zunächst SEM-Experimente zur Charakterisierung der Oberflächenbeschaffenheit der Einschlüsse durchgeführt. Diese zeigten, ähnlich wie für TbCatB beobachtet, eine intrinsische Stabilität mit glatter Oberfläche selbst unter Vakuumbedingungen. Allerdings weisen die Kanten der Einschlüsse starke Rundungen auf, was bisher eher selten für Proteinkristalle beschrieben wurde. Um den kristallinen Zustand eindeutig zu validieren wurden im Anschluss Pulverdiffraktionsexperimente an der P14-*Beamline* des PETRA III Speicherringes am DESY in Hamburg durchgeführt. Hierzu wurden die Einschlüsse 4 Tage nach Infektion mit dem entsprechenden rekombinanten Baculovirus aus den Sf9-Zellen wie zuvor beschrieben isoliert und durch Zentrifugation in Glaskapillaren pelletiert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Einschlüsse mit einer Photonendichte von  $10^{12}$  ph/sec sowie Belichtungszeiten von 0.1-1 Sekunde.

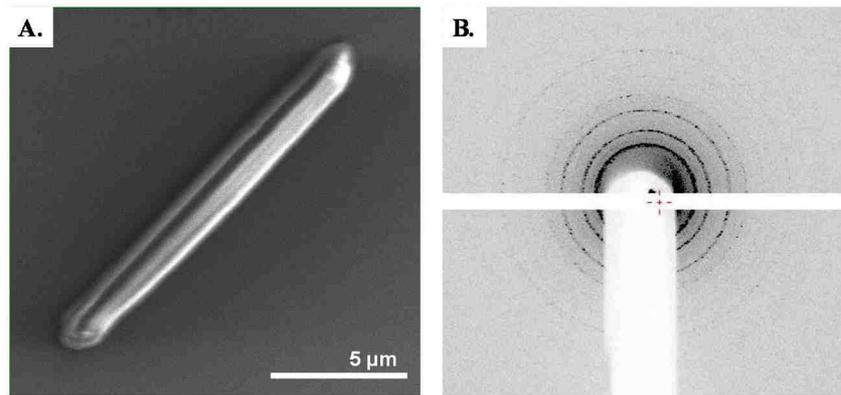


Abbildung 39: Validierung des kristallinen Zustands der GFP-µNS-Einschlüsse. A: SEM-Aufnahme eines einzelnen isolierten GFP-µNS-Kristalls. Es ist eine deutliche glatte Oberfläche sowie ein Abrunden der Kanten zu erkennen. B: Pulverdiffraktionsexperiment mit pelletierten GFP-µNS Kristallen an der P14-Beamline (PETRA III, DESY, Hamburg). Es sind Diffraktionsringe mit einer maximalen Auflösung von 30 Å erkennbar, was den kristallinen Zustand der Partikel eindeutig beweist.

Dies resultierte in der Aufnahme deutlicher *Debye-Scherrer*-Diffraktionsringe auf dem Pilatus 6M Detektor, die charakteristisch für den kristallinen Zustand von Proteinen sind. Die Ringe stellen dabei die Summe der konstruktiven Interferenz der GFP-µNS-Einschlüsse aus allen Raumorientierungen dar und beweisen damit eindeutig ihren Proteinkristallcharakter. Jedoch ist die maximale Auflösung mit etwa 30 Å sehr gering, weshalb keine strukturellen Informationen unter diesen Bedingungen generiert werden können. Folglich wurde versucht, durch Optimierung der Kryobedingungen die Diffraktionsqualität sowohl in Kapillaren als auch in herkömmlichen Nylonschleifen zu erhöhen, was jedoch in keinem Fall zum Erfolg führte (Daten nicht gezeigt).

### 3.8 Lokalisation der intrazellulären Proteinkristallisation von TbCatB und GFP-µNS

Natives TbCatB beinhaltet eine N-terminale Signalsequenz für den Import ins ER, was aufgrund seiner Funktion als lysosomale Protease essentiell ist, da der ER-Import den ersten Schritt des sekretorischen Signalwegs darstellt<sup>171</sup>. Im Gegensatz zu TbCatB besitzen Luciferase und TbIMPDH, die ebenfalls in Sf9-Zellen kristallisiert werden konnten, eine C-terminale Tripeptid-Sequenz, die aus den Aminosäuren SKL besteht. Dieses Motiv dient in einer Reihe von eukaryotischen Zellen als Lokalisationssignal für den Import des Proteins in Peroxisomen<sup>200</sup>. Jedoch ist bisher nicht bekannt, ob diese Sequenz auch in Sf9-Zellen den spezifischen Import von Proteinen in Peroxisomen induziert. Im Gegensatz zu den anderen

Proteinen konnte für GFP- $\mu$ NS keine intrinsische Signalsequenz identifiziert werden, was auf eine zytosolische Lokalisation der Kristalle schließen lässt.

TbCatB	1	MHLMRACITF	CIASTAVVAV	NAALVAEDAP	VLSKAFVDRV	NRLNRGIWKA	50
TbIMPDH	463	QDIGEVSFDA	IREKVVYEGQV	LFNRRTLTAQ	SEGAVHSLHH	YERKLFASKL	512
Luciferase	501	YVASQVTTAK	KLRGGVVFVD	EVPKGLTGKL	DARKIREILI	KAKKGGKSKL	550

Abbildung 40: Sequenzanalyse der bisher in Sf9-Insektenzellen kristallisierten Proteine. TbCatB beinhaltet eine 23 AS lange Signalsequenz, die für den Transport des Proteins ins ER notwendig ist (grün). Dagegen weisen TbIMPDH und Luciferase das C-terminale Tripeptid SKL auf, welches den Import von Proteinen in Peroxisomen initiiert (orange). Für GFP- $\mu$ NS konnte kein Lokalisationssignal detektiert werden (nicht gezeigt).

Diese initialen Erkenntnisse legen nahe, dass die Kompartimentierung eine entscheidende Rolle beim Kristallisationsprozess spielt und es möglicherweise eine optimale intrazelluläre Umgebung für jedes individuelle Zielprotein gibt, unter denen es zur Ausbildung von Kristallen kommt. Um die Anwendung der intrazellulären Proteinkristallisation auch auf weitere, bisher unbekannte Proteine auszuweiten, müssen zunächst die grundlegenden zellulären Mechanismen verstanden werden, die zur Ausbildung der Kristalle führen. Daher wurde die in vivo Kristallisation von TbCatB sowie von GFP- $\mu$ NS als Modellsysteme verwendet, um den Beitrag der Zelle zur intrazellulären Kristallisation zu untersuchen.

### 3.8.1 Herstellung geeigneter Fluoreszenzmarker für Sf9-Zellen

Eine besonders gut geeignete Methode zur subzellulären Lokalisationsbestimmung stellt die Co-Expression des zu kristallisierenden Zielproteins mit einem fluoreszenzgekoppelten Protein dar, das ein spezifisches Kompartiment der Zelle anfärbt. Somit kann mikroskopisch verfolgt werden, ob es zu einer Co-Lokalisation der Kristalle mit dem jeweiligen Marker kommt und dadurch das Kristallisationskompartiment des Proteins bestimmt werden kann. Da bisher keine spezifischen Marker für Co-Lokalisationsstudien in Sf9-Zellen verfügbar waren, mussten zunächst geeignete Proteine identifiziert werden, die die spezifische Zuordnung eines Kompartiments eindeutig ermöglichen. Dabei wurde sich zunächst an den vorhandenen Markern für Zellen aus *Drosophila melanogaster* (S2-Zellen) orientiert, da aufgrund der genetischen Verwandtschaft zu Sf9 Zellen eine ähnliche Funktion der Proteine wahrscheinlich ist. Daher wurde die Phosphatidylethanolamin-*N*-Methyltransferase (PEMT) als Marker für das ER verwendet, welche die Umsetzung von

Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin katalysiert<sup>201</sup>. Als Golgi-Marker wurde die *O*-Glykosyltransferase *Fringe* verwendet, welche eine zentrale Rolle im *Notch*-Signalweg während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* spielt<sup>201</sup>. Beide Marker wurden mittels PCR mit dem GFP-Gen fusioniert und mit Hilfe des *Bac-to-bac* Expressionssystems (Invitrogen) wurden anschließend rekombinante Baculoviren hergestellt. Zum Nachweis der lysosomalen Lokalisation wurde der kommerziell erhältliche Farbstoff LysoTracker® (Invitrogen) verwendet, der membrangängig ist und spezifisch saure Organellen innerhalb der Zelle anfärbt. Zur Analyse, ob eine peroxisomale Lokalisation von rekombinanten Proteinen in Sf9-Zellen grundsätzlich möglich ist, wurde GFP am C-Terminus mit dem peroxisomalen Transportsignal SKL versehen. Die Expression erfolgte dabei ebenfalls nach baculoviraler Infektion.

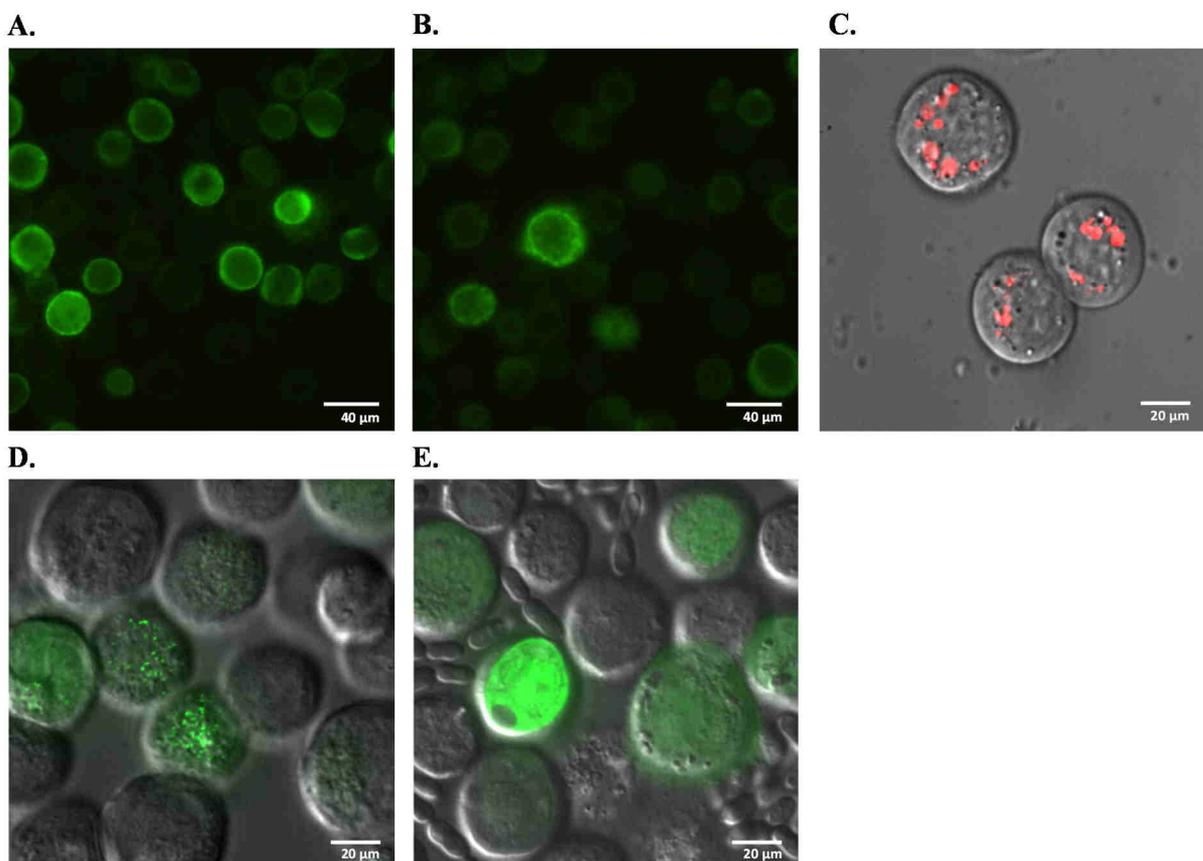


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Sf9-Zellen mit spezifischer Anfärbung von Kompartimenten. Die Fluoreszenz von PEMT-GFP zeigt eine ER-spezifische Lokalisation (A), während die punktartigen Akkumulationen von Fringe-GFP-Fluoreszenz für eine Lokalisation im Golgi sprechen (B). Der kommerzielle LysoTracker®-Farbstoff zeigt dagegen eine spezifische Anfärbung saurer Kompartimente (C). GFP-SKL wird spezifisch in Peroxisomen transportiert, was an der punktförmigen Anfärbung innerhalb der Zelle erkennbar ist (D). Dagegen zeigt sich für GFP-SKLG eine homogene Verteilung der Fluoreszenz über die gesamte Zelle, was auf eine ubiquitäre Expression hindeutet (E).

3 Tage nach Infektion von Sf9-Zellen mit dem jeweiligen rekombinanten Baculovirus wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich für PEMT-GFP die erwartete Verteilung der Fluoreszenz mit leichter Akkumulation in den Bereichen um den Zellkern herum, was einer spezifischen luminalen ER-Lokalisation entspricht (Abbildung 41A). Dagegen zeigt die Fluoreszenz von Fringe-GFP deutliche punktförmige Strukturen, die dem Golgi der Sf9-Zellen entsprechen (Abbildung 41B). Auch der kommerzielle Lysotracker® zeigt eine spezifische Anfärbung von punktförmigen Strukturen. Da der Farbstoff nur bei saurem pH fluoresziert, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um angefärbte Lysosomen (Abbildung 41C). Für GFP-SKL konnte ebenfalls eine eindeutige punktförmige Lokalisation festgestellt werden, wobei die peroxisomalen Strukturen deutlich kleiner als die angefärbten Lysosomen sind (Abbildung 41D). Dagegen zeigt die um eine Aminosäure erweiterte GFP-SKLG-Variante, wodurch das peroxisomale Importsignal nicht mehr von der Zelle erkannt wird, eine homogene Verteilung der Fluoreszenz über die gesamte Zelle. Somit ist es wahrscheinlich, dass ein spezifischer Import in Peroxisomen durch das SKL-Lokalisationspeptid in Sf9-Zellen ausgelöst wird. Letztlich kann aus diesem Experiment geschlossen werden, dass die ausgewählten Marker für die Co-Lokalisationsstudien mit den TbCatB-Kristallen geeignet sind.

### **3.8.2 Co-Lokalisationsstudien der spezifischen Marker mit TbCatB-Kristallen**

TbCatB ist eine lysosomale Protease, die zunächst co-translational ins ER importiert und anschließend über den Golgi ins Lysosom weitertransportiert wird, wo die Aktivierung des Enzyms durch Absenkung des pH-Wertes erfolgt<sup>155,171</sup>. In vorherigen Studien wurde mittels EM-Untersuchungen gezeigt, dass TbCatB-Kristalle in Sf9-Zellen von einer Doppelmembran umgeben sind, deren Herkunft bisher nicht eindeutig bestimmt werden konnte<sup>198</sup>. Dies ist jedoch ein Indiz dafür, dass die Kristallisation in einem Kompartiment innerhalb des sekretorischen Signalwegs stattfindet, da vermutlich die dort vorherrschenden Pufferbedingungen sowie die hohe lokale Proteinkonzentration optimale Bedingungen für die Proteinkristallisation darstellen. Zur detaillierten Untersuchung der Kompartiment-Lokalisation der Kristallisation von TbCatB wurden Co-Expressionsstudien mit den vorher klonierten Marker-Proteinen durchgeführt. Dafür wurden Sf9-Zellen mit TbCatB-codierendem Baculovirus sowie mit einem für einen Marker codierenden Baculovirus co-infiziert und die Zellen 4 Tage nach Infektion mittels Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) sowie Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich

keine Co-Lokalisation der TbCatB-Kristalle mit dem für saure Kompartimente spezifischen Lysotracker, weshalb ein Wachstum der Kristalle in Lysosomen ausgeschlossen werden kann (Abbildung 42A). Analog verhält es sich bei der Co-Infektion mit Fringe-GFP, bei der eine spezifische Färbung des Golgis eindeutig erkennbar ist, jedoch keine Co-Lokalisation mit den Kristallen detektiert wurde (Abbildung 42B). Im Gegensatz dazu lässt sich eine Co-Lokalisation von TbCatB mit dem für das ER spezifischen PEMT-GFP Marker erahnen, die jedoch auf Grund der unzureichenden Anfärbung der Region um den Kristall nicht besonders aussagekräftig ist (Abbildung 42C). Folglich wurde als zusätzlicher ER-Marker das Fluoreszenzprotein mCherry mit einer N-terminalen ER-Signalsequenz sowie dem C-terminalen Peptid KDEL kloniert, das durch Bindung des KDEL-Rezeptors im *cis*-Golgi für die Verpackung des Proteins in COP1-Vesikel und somit für seinen Rücktransport ins ER sorgt<sup>202</sup>. Die Co-Infektion mit diesem Konstrukt zeigt eine deutliche Anfärbung um den TbCatB-Kristall, was eindeutig die Nukleation und das Kristallwachstum von TbCatB im ER beweist (Abbildung 42D).

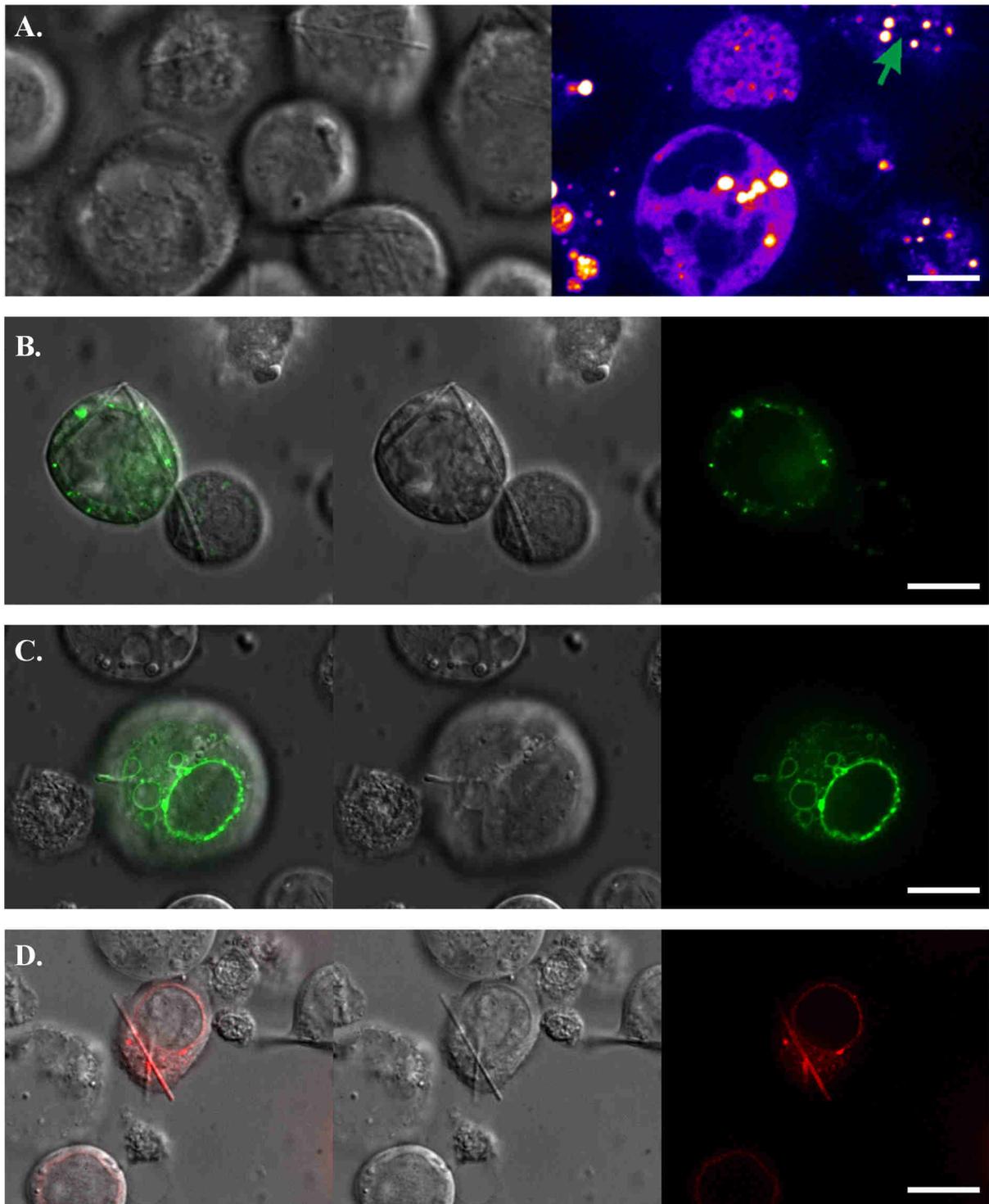


Abbildung 42: DIC- (Mitte) und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (rechts) zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der TbCatB-Kristalle nach Co-Infektion mit jeweils einem spezifischen Kompartiment-Marker. In der linken Spalte ist jeweils die Überlagerung beider Bilder dargestellt. Während keine Co-Lokalisation der TbCatB-Kristalle (grüner Pfeil, **A**) mit den Markern für Lysosomen (Lysotracker, **A**) und Golgi-Apparat (Fringe-GFP, **B**) erkennbar ist, lässt sich eine ER-spezifische Membranfärbung um den Kristall bei der Co-Infektion mit PEMT-GFP erahnen (**C**). Die Co-Infektion mit dem ebenfalls als ER-Marker fungierenden mCherry-KDEL bestätigt eindeutig die Lokalisation der TbCatB-Kristalle im ER. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.8.3 Untersuchung des Kristallisationsverhaltens von TbCatB in anderen zellulären Kompartimenten

Aus dem vorherigen Ergebnisteil lässt sich vermuten, dass das ER optimale Umgebungsbedingungen für die Kristallisation von TbCatB bereitstellt. Wie bereits erwähnt konnte auch für die Luciferase aus *Photinus pyralis* die intrazelluläre Kristallisation in Sf9-Zellen beobachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Kooperation mit Robert Schönherr und Rainer Duden (Universität zu Lübeck) kürzlich eindeutig bestätigt werden, dass die Luciferase in Peroxisomen kristallisiert, da eine vollständige Co-Lokalisation der Kristalle mit dem spezifischen Peroxisomenmarker pEX26 detektiert wurde<sup>203</sup>. Deshalb ist es denkbar, dass TbCatB auch in anderen Kompartimenten der Zelle Kristalle ausbilden kann. Um dies näher zu untersuchen, wurde neben dem nativen TbCatB mit N-terminalem ER-Signalpeptid (SP) eine Variante kloniert, die ausschließlich das C-terminale SKL-Peptid enthält, um das Kristallisationsverhalten in Peroxisomen zu untersuchen (-SP/+SKL). Bei einem weiteren Konstrukt wurde die N-terminale ER-Importsequenz entfernt, um die Kristallisation von CatB im Zytosol zu verfolgen (-SP/-SKL). Mit Hilfe einer Variante, die sowohl die N-terminale Importsequenz sowie das C-terminale SKL-Peptid enthält, wurde untersucht, ob es zu konkurrierenden Effekten beider Lokalisationssignale kommt (+SP/+SKL). Nach Herstellung der jeweiligen rekombinanten Baculoviren wurden Sf9-Zellen mit diesen infiziert und die Zellen 3 Tage nach Infektion mikroskopisch auf das Wachstum von Kristallen untersucht. Dabei konnten für das native Konstrukt erwartungsgemäß Kristalle mit einer durchschnittlichen Länge von  $15.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$  detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte kein Kristallwachstum nach Expression des peroxisomal oder zytosolisch lokalisierten TbCatB nachgewiesen werden. Überraschenderweise bildete das Konstrukt mit beiden Lokalisationssignalen signifikant längere Kristalle mit durchschnittlich  $24.9 \pm 0.9 \mu\text{m}$  aus. Da das ER an der Ausbildung neuer Peroxisomen beteiligt ist, lag zunächst die Vermutung nahe, dass TbCatB nach co-translationalem Import ins ER in Peroxisomen weitertransportiert wurde. Jedoch konnten Co-Lokalisationsstudien mit mCherry-KDEL zeigen, dass die Kristalle weiterhin im ER lokalisiert sind.

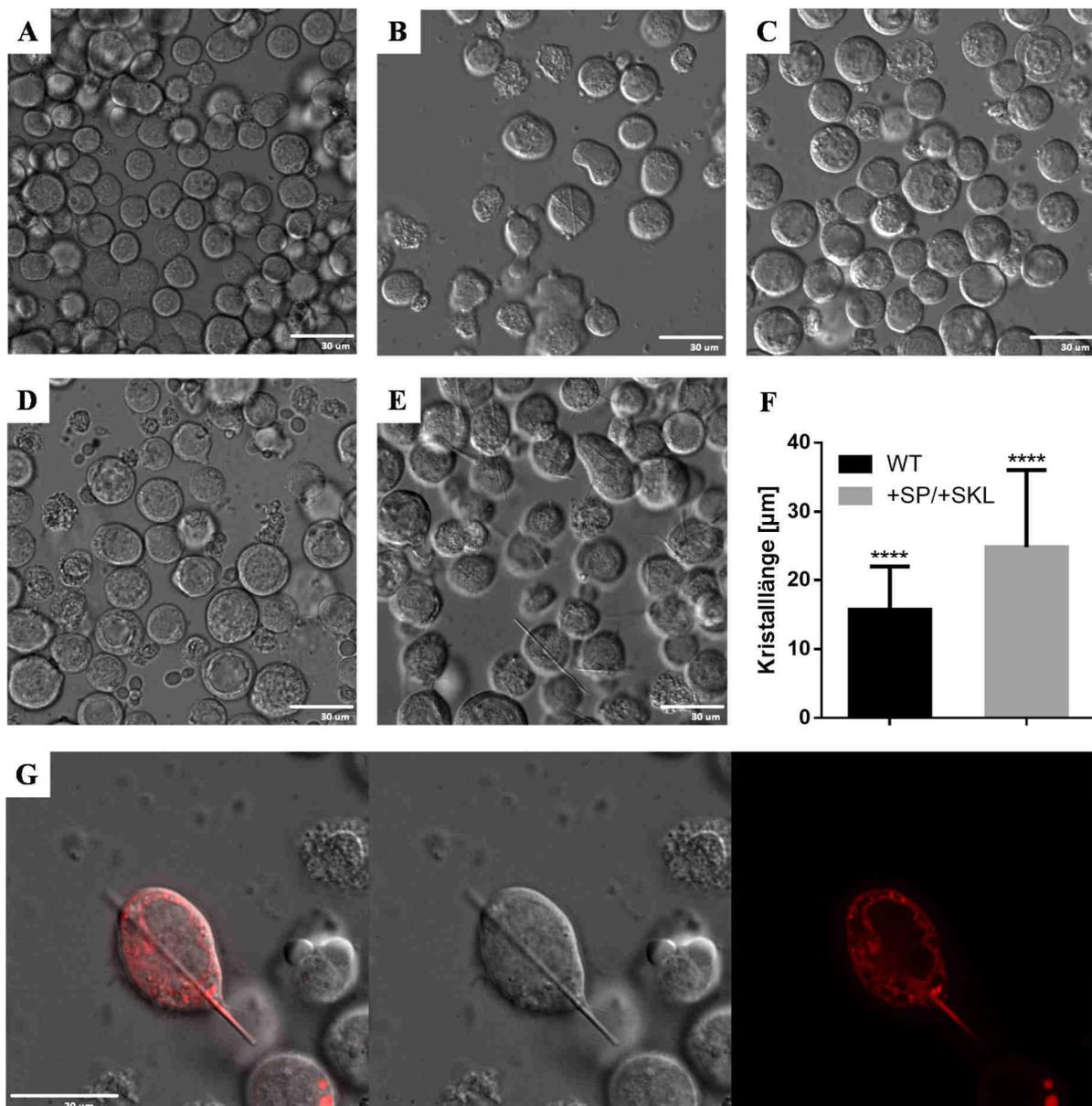


Abbildung 43: Untersuchung des Kristallisationsverhaltens der CatB-Varianten mit unterschiedlichen Transportsignalen 3 Tage nach baculoviraler Infektion. Nicht-infizierte Sf9-Zellen wurden vergleichend als Kontrolle verwendet (A). Für das native TbCatB-Konstrukt sind wie zu erwarten nadelförmige Kristalle mit einer durchschnittlichen Länge von 15 µm erkennbar (B). Dagegen ist für das zytosolische (-SP/-SKL, C) sowie das peroxisomale Konstrukt (-SP/+SKL, D) kein intrazelluläres Kristallwachstum zu beobachten. Für das Konstrukt mit beiden Lokalisationssignalen (+SP/+SKL, E) ist eine signifikante Verlängerung der Kristalle von durchschnittlich 15,7 auf 24,9 µm zu erkennen (F). Die Co-Infektion mit dem ER-Marker mCherry-KDEL beweist außerdem, wie beim nativen TbCatB, ein Wachstum der Kristalle im ER (G).

Um zu untersuchen, ob die ausbleibende Kristallisation des peroxisomal sowie zytosolisch lokalisierten CatB auf die fehlende Expression der Konstrukte zurückzuführen ist, wurden zusätzlich 3 Tage nach Infektion mit einem Virustiter von 1 Viruspartikel/ Zelle vergleichende Western Blot Analysen durchgeführt. (Abbildung 44). Dabei zeigten die ER-

lokalisierten Konstrukte das für TbCatB typische Doppelbandenmuster, wobei die obere das zweifach glykosylierte und die untere das einfach glykosylierte Protein darstellt. Im Gegensatz dazu ist für das zytosolische und das peroxisomale Konstrukt nur eine charakteristische, im Vergleich etwas kleinere Bande zu beobachten, da durch den fehlenden ER-Import keine Glykosylierung des Proteins stattfinden kann. Außerdem weisen die nicht im ER-lokalisierten Konstrukte stärkere Degradierung auf, was auf einen erhöhten proteasomalen Abbau hindeutet. Die beiden zusätzlichen Banden auf Höhe von ca. 60 und 75 kDa werden auch in der nicht infizierten Sf9-Zellkontrolle erkannt, weshalb es sich dabei nicht um den Nachweis von rekombinant exprimiertem TbCatB handeln kann, und diese Banden somit für die Auswertung des Western Blots zu vernachlässigen sind. Aufgrund der Tatsache, dass für alle Konstrukte vergleichbare Expressionslevel detektiert wurden, kann das Fehlen ausreichender Proteinmengen nicht als Grund für das Ausbleiben der Kristallisation betrachtet werden. Somit lässt sich abschließend sagen, dass die intrazelluläre Kristallisation von TbCatB anscheinend auf das ER der Sf9-Zellen limitiert ist.

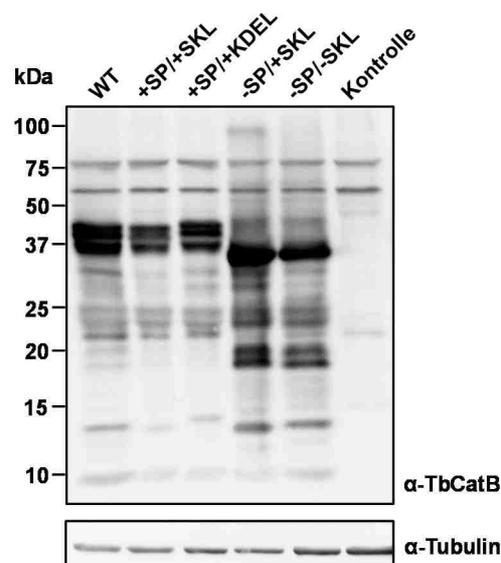


Abbildung 44: Expressionsanalyse der TbCatB-Konstrukte mit unterschiedlichen Lokalisationssignalen 3 Tage nach Infektion mit dem entsprechenden rekombinanten Baculovirus. Die Immundetektion erfolgte mit einem spezifischen  $\alpha$ -TbCatB-Antiserum. Als Ladungskontrolle wurde ein Tubulin-Nachweis mittels monoklonalem  $\alpha$ -Tubulin Antikörper verwendet. Der Nachweis erfolgte über einen sekundären HRP-markierten Antikörper unter Verwendung der ECL-Methode. Für alle Konstrukte ist ein ähnliches Expressionlevel des zugehörigen Proteins erkennbar. Die Doppelbande bei den ER-importierten Konstrukten resultiert aus der spezifischen Glykosylierung von TbCatB.

### 3.8.4 Echtzeituntersuchungen der GFP- $\mu$ NS-Kristallisation in lebenden Zellen

In den vorherigen Experimenten konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei den GFP- $\mu$ NS-Einschlüssen um Proteinkristalle handelt. Deswegen war es von Interesse, die Kristallisation von GFP- $\mu$ NS in lebenden Zellen zu verfolgen, um Erkenntnisse über die Dynamik sowie den eventuellen Ort der Kristallisation zu gewinnen. Dafür wurden Lebendzellmikroskopie-Experimente in Kooperation mit Robert Schönherr und Rainer Duden an der Universität zu Lübeck durchgeführt. Zunächst wurden Sf9-Zellen auf einen Glasobjektträger ausplattiert und mit rekombinantem P3-Baculovirus infiziert. 72 Stunden nach Infektion wurde das Wachstum der Kristalle in den Sf9-Zellen über die Detektion der intrinsischen GFP-Fluoreszenz mit einem Lebendzellmikroskop über mehrere Stunden beobachtet und mit der integrierten Kamera kontinuierlich aufgenommen. Zu Beginn der Untersuchungen kann eine über die gesamte Zelle verteilte GFP-Fluoreszenz detektiert werden, was auf eine zytosolische Expression des GFP- $\mu$ NS hindeutet (Abbildung 45A). Mit zunehmender Zeit bilden sich in der Zelle fokale Akkumulationen der GFP-Fluoreszenz, was auf die Entstehung von Nukleationskeimen hindeuten könnte (Abbildung 45B). Die meisten dieser Nuklei konnten jedoch nur über einen kurzen Zeitraum detektiert werden und führten nicht zur Ausbildung intrazellulärer Kristalle. Einige wenige Nukleationskeime konnten 4 Tage nach Infektion zu nadelförmigen Kristallen mit durchschnittlichen Dimensionen von 10 x 3  $\mu$ m heranwachsen, wobei die natürliche Dimension der Zelle nicht überschritten wurde (Abbildung 45B). Aufgrund der initialen Verteilung der Fluoreszenz über die gesamte Zelle sowie der Instabilität transient entstehender Nukleationskeime kann geschlussfolgert werden, dass die Kristallisation von GFP- $\mu$ NS höchstwahrscheinlich im Zytosol der Sf9-Zelle erfolgt.

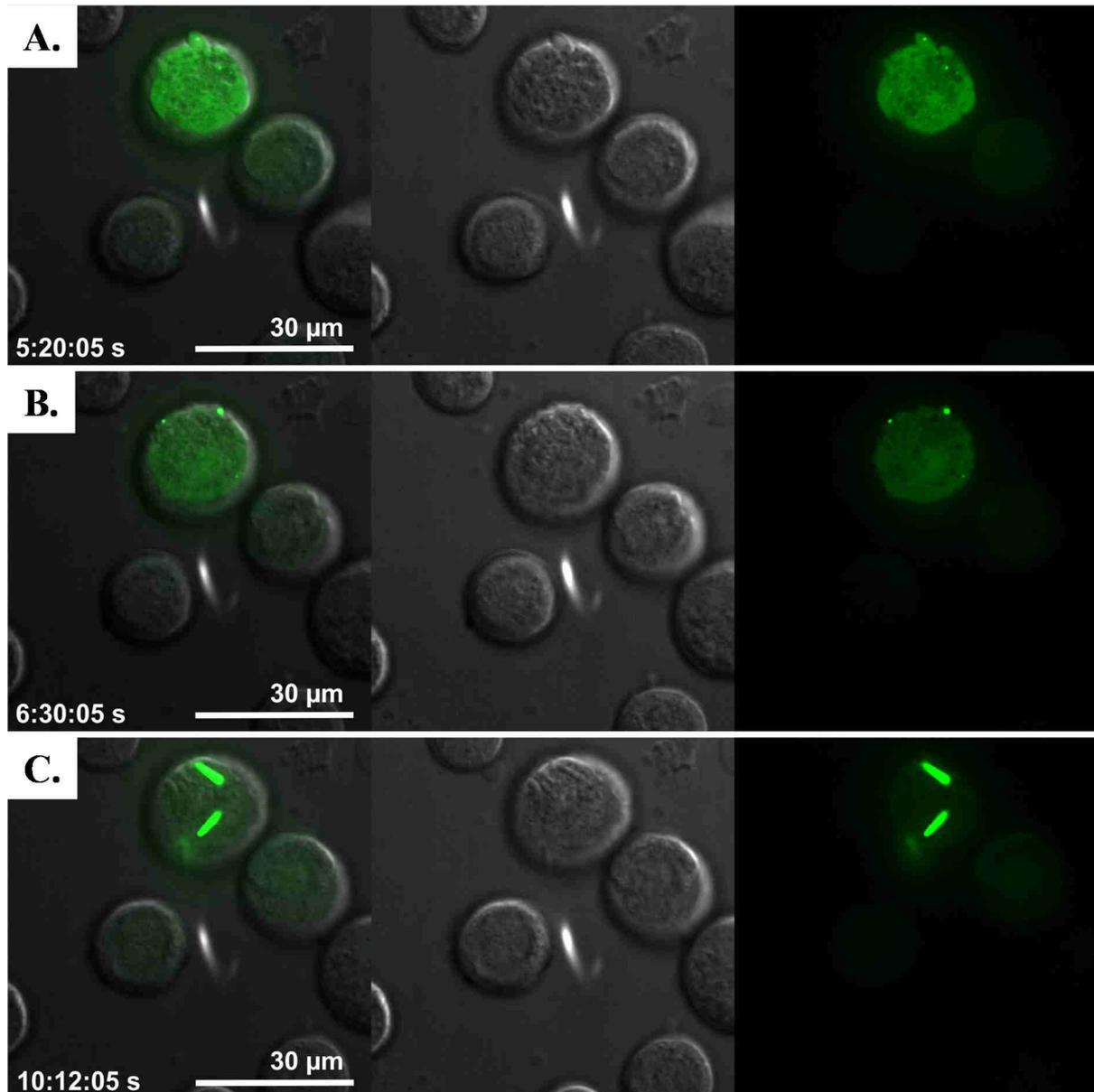


Abbildung 45: Mikroskopische Echtzeitverfolgung der intrazellulären GFP- $\mu$ NS-Kristallisation. In der Mitte ist das DIC-Bild, rechts das Fluoreszenzbild und links die Überlagerung beider Bilder dargestellt. Zunächst lässt sich eine ubiquitäre Verteilung der GFP-Fluoreszenz erkennen, was die zytosolische Expression des Proteins widerspiegelt (A). In einigen Fällen kommt es zur Ausbildung von Nukleationskeimen, was durch einen fokalen Anstieg der GFP-Fluoreszenz erkennbar ist (B). Diese Nukleation resultiert teilweise in der Ausbildung nadelförmiger GFP- $\mu$ NS-Kristalle innerhalb der Sf9-Zelle (C). Die Aufnahmen wurden 72h nach Infektion gestartet und repräsentieren einen Zeitraum von etwa 5 Stunden.

### 3.9 Entwicklung eines universellen Screening-Systems für die intrazelluläre Proteinkristallisation

Durch die bisherigen Experimente konnte gezeigt werden, dass TbCatB eindeutig im ER der Sf9-Zellen kristallisiert, während die Kristallisation von Luciferase in Peroxisomen stattfindet<sup>203</sup>. Für GFP- $\mu$ NS wurden bisher keine Lokalisationsstudien durchgeführt, doch aufgrund der fehlenden Lokalisationssignale kann von einer zytosolischen Kristallisation ausgegangen werden. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der Erfolg der intrazellulären Proteinkristallisation von der subzellulären Lokalisation des Zielproteins abhängig ist. Um die Kristallisationswahrscheinlichkeit weiterer Proteine in Sf9-Zellen zu maximieren, muss folglich jedes Zielprotein durch Fusion von spezifischen Lokalisationssignalen in die unterschiedlichen Zellkompartimente dirigiert werden, damit anschließend der Erfolg der Kristallisation mikroskopisch verfolgt werden kann. Die Klonierung der Lokalisationssignale mittels Fusions-PCR ist jedoch mühsam, da für jedes einzelne Protein eine große Anzahl an spezifischen Oligonukleotiden benötigt wird, was mit einem hohen Kosten- sowie Arbeitsaufwand verbunden ist. Deshalb wurde in dieser Arbeit abschließend ein Klonierungssystem entwickelt, das die effiziente Fusion eines minimal chemisch veränderten Zielproteins an verschiedene Lokalisationssignale unter Verwendung eines einzelnen Oligonukleotid-Paares erlaubt. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 46 dargestellt. Zunächst wurden unterschiedliche Oligonukleotide kommerziell erworben, die die Nukleinsäuresequenzen für Startcodon, Stoppcodon sowie für das gewünschte Lokalisationssignal am N- oder C-Terminus des codierten Proteins enthalten (siehe Tabelle 7). Zwischen den N- und C-terminal codierenden Sequenzen wurde außerdem eine *SfoI*-Erkennungssequenz (5'...-GGCGCC...-3') platziert, die bei Restriktion mit dem entsprechenden Enzym in der Ausbildung zweier *Blunt Ends* resultiert (GGC↓GCC). Nach erfolgter PCR des Zielgens kann dieses mittels *Blunt End*-Ligation in die jeweils für ein Zellkompartiment codierenden, linearisierten Zielvektoren eingesetzt werden. Aufgrund der vektorseitigen Codierung von Start- und Stoppcodon sowie Lokalisationssignalen führt dies zur einfachen, schnellen *in-frame* Klonierung des gewünschten Zielgens in unterschiedliche Vektoren, wobei lediglich ein N-terminales Glycin- (GGC) sowie ein C-terminales Alanin (GCC) zur klonierten nativen Proteinsequenz hinzugefügt wird. Die einzelnen Vektoren können anschließend wie gewohnt in das Bac-to-Bac Expressionssystem eingebracht werden, um mit Hilfe rekombinanter Baculoviren die Kristallisation des Zielgens in unterschiedlichen Kompartimenten zu untersuchen.

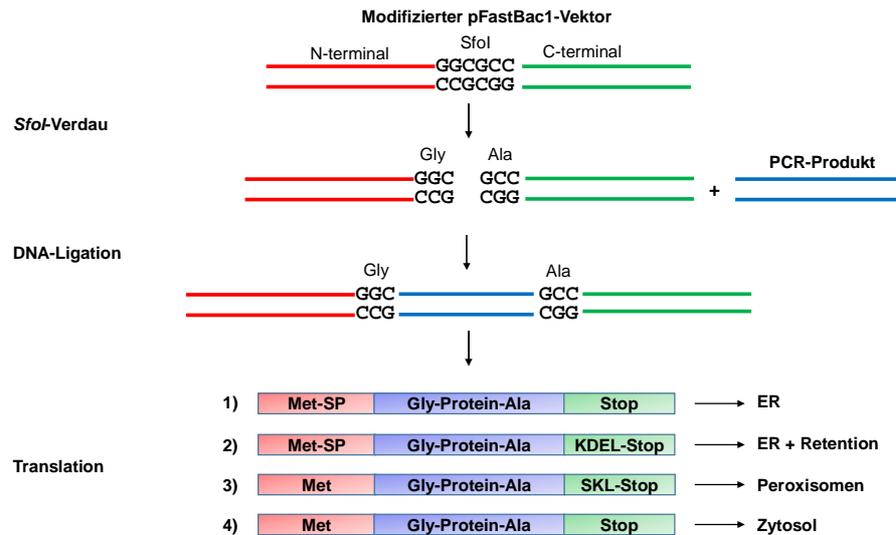


Abbildung 46: Klonierungssystem zum systematischen Screening der intrazellulären Proteinkristallisation. Zunächst wurden modifizierte pFastBac1-Vektoren hergestellt, die jeweils die codierenden Sequenzen für Start- und Stoppcodon sowie für spezifische N- und C-terminale Lokalisationssignale enthalten. Zusätzlich enthalten die Sequenzen eine *SfoI*-Schnittstelle zwischen den N- und C-terminal codierenden Bereichen. Nach Prozessierung der *SfoI*-Schnittstelle kann das per PCR generierte Zielgen in die Vektoren eingesetzt und rekombinante Baculoviren hergestellt werden, die zu einem unterschiedlichen Transport des codierten Zielproteins in subzelluläre Kompartimente führen.

Tabelle 7: Verwendete Sequenzen für die modifizierten pFastBac1-Vektoren. \*: Stopp-Codon.

Konstrukt	N-terminale Sequenz	C-terminale Sequenz	Zielkompartiment
pFastBac1 ER	MHLMRACITFCIASTAVVAVNA	*	ER
pFastBac1 ER-KDEL	MHLMRACITFCIASTAVVAVNA	KDEL*	ER, Retentionssignal
pFastBac1 SKL	M	SKL*	Peroxisomen
pFastBac1_	M	*	Zytosol

## 4 Diskussion

### 4.1 NS1

Das Glioblastoma Multiforme (GBM) stellt die aggressivste Form von Hirntumoren dar. Nach Diagnose beträgt die durchschnittliche Überlebensrate lediglich 20 %. Für das onkolytische H-1 Parvovirus (H-1PV) konnte mit Hilfe eines Rattenmodells gezeigt werden, dass dieses Virus in der Lage ist, selektive zytotoxische Effekte in GBM-Zellen zu induzieren, ohne dabei gesundes Gewebe zu beeinträchtigen<sup>204</sup>. Aus diesem Grund stellt es einen vielsprechenden neuen Ansatz bei der Behandlung von GBM-Patienten dar. Dabei wurde das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) als der Haupteffektor der selektiven Zytotoxizität identifiziert. Das NS1 besteht aus einer N-terminalen Nuklease- sowie einer zentralen Helikasedomäne, die bei der *rolling hairpin* Replikation des Virus eine zentrale Rolle spielen<sup>61</sup>, sowie einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne, die für die Aktivierung der Capsidprotein-Expression verantwortlich ist<sup>86</sup>. Neben den essentiellen Funktionen für die virale Propagation ist das Multidomänenprotein in der Lage, zahlreiche Interaktionen mit Wirtszellproteinen auszuüben, die schließlich zur Lyse von Tumorzellen führen<sup>68</sup>. Aufgrund fehlender Strukturinformationen von NS1 ist der genaue Mechanismus der tumorspezifischen Zellyse bisher jedoch nicht bekannt. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit erste Grundlagen zur strukturellen Charakterisierung der NS1-Domänen geschaffen und diese mit Hilfe konventioneller sowie neuer strukturbioologischer Ansätze untersucht werden. Dazu wurden die einzelnen Domänen zunächst in *E. coli*-Zellen exprimiert und anschließend charakterisiert.

#### 4.1.1 Die C-terminale Transaktivierungsdomäne

Die C-terminale Transaktivierungsdomäne konnte im Rahmen dieser Arbeit nur mit geringer Ausbeute hergestellt werden. Sowohl die geringe Löslichkeit nach bakterieller Expression als auch die beobachtete Interaktion mit Chromatographiematerial bzw. anderen *E. coli*-Proteinen verhinderten die Isolation von Proteinmengen, die ausreichend für eine strukturbioologische Charakterisierung gewesen wären. Außerdem deutet der mittels CD-Spektroskopie bestimmte geringe Anteil an definierten Sekundärstrukturelementen auf eine hohe strukturelle Flexibilität der Transaktivierungsdomäne hin, was eine Strukturuntersuchung mittels Röntgenkristallographie zusätzlich erschwert. Bei der Transaktivierung des späten viralen P38-Promotors bindet zunächst die N-terminale Nukleasedomäne an das

Transaktivierungsmotiv *tar*, wodurch die Transaktivierungsdomäne in die unmittelbare Umgebung des Promotors gebracht wird und dieser folglich aktiviert werden kann. In Experimenten mit einem künstlich hergestellten viralen NS1-Konstrukt, bei dem die Helikasedomäne gegen das grün-fluoreszierende Protein (GFP) ausgetauscht wurde, konnte wie für das WT-NS1 die Aktivierung der Capsidexpression induziert werden<sup>205</sup>. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Fusion der MVM TA-Domäne an das bakterielle DNA-bindende Protein LexA ebenfalls zur Transaktivierung des P38-Promotors führte<sup>69</sup>. Diese Studien legen nahe, dass die TA-Domäne über ein Adapterprotein in die Nähe des P38-Promotors transportiert werden muss, damit die Transaktivierung stattfinden kann. Aufgrund der Tatsache, dass sich GFP und LexA strukturell massiv von der eigentlich zentral befindlichen Helikasedomäne unterscheiden, muss die TA-Domäne eine gewisse Flexibilität aufweisen. Die in dieser Arbeit durchgeführten CD-spektroskopischen Untersuchungen stehen somit im Einklang mit den bereits publizierten Daten und sind daher nicht als Artefakt einer fehlerhaften Faltung während der bakteriellen Überexpression anzusehen, sondern repräsentieren weitestgehend die native Faltung der TA-Domäne. Der geringe definierte Sekundärstrukturanteil ist wahrscheinlich auch der Grund für die Vielzahl an unspezifischen Interaktionen, sowohl mit dem Chromatographiematerial als auch mit anderen *E. coli* Proteinen. Durch die hohe Flexibilität können zahlreiche Konformationen angenommen werden, die schließlich die Wechselwirkung mit anderen Molekülen erleichtern. Insofern ist es beachtlich, dass NS1 in der Lage ist, mit Hilfe des Zusammenspiels der einzelnen Domänen eine spezifische Funktion dieses unstrukturierten Proteins zu induzieren. Möglicherweise sind während der viralen Replikation weitere zelluläre, derzeit noch unbekannte Faktoren beteiligt, die eine spezifische Faltung der TA-Domäne induzieren, damit diese schließlich den P38-Promotor binden und ihre aktivierende Wirkung ausüben kann.

#### **4.1.2 Die N-terminale Nukleasedomäne**

Die N-terminale Nukleasedomäne NS1<sub>1-265</sub> konnte mit guter Ausbeute löslich in *E. coli*-Zellen hergestellt und mit einem Reinheitsgrad etwa 95 % isoliert werden. Somit wurde erstmalig lösliche und reine H-1PV Nukleasedomäne in *E. coli* ohne Verwendung eines Löslichkeitsvermittelnden Fusionsproteins dargestellt. Aufgrund der guten Verfügbarkeit wurden im Rahmen dieser Arbeit diverse strukturelle und funktionelle Studien mit der Nukleasedomäne durchgeführt.

#### 4.1.2.1 DNA-Bindung und *Nicking*-Aktivität

Die Nukleasedomäne autonomer Parvoviren spielt eine zentrale Rolle bei der *rolling hairpin* Replikation<sup>61</sup>. Die einzelsträngige virale DNA wird dabei zunächst von der zellulären DNA-Polymerase in Doppelstrang-DNA umgewandelt und im Anschluss vom DNA-Reparatursystem kovalent an den Enden verknüpft. Die Nukleasedomäne erkennt dort sequenzspezifische Motive der viralen DNA, bindet diese und führt mit Hilfe des aktiven Tyr-210 eine spezifische Nukleasereaktion (*Nicking*) aus, wodurch die vorher ligierte DNA wieder gespalten wird, so dass die DNA-Replikation fortgesetzt werden kann. Für das MVM Volllänge-NS1 wurde gezeigt, dass dabei hauptsächlich repetitive [ACCA]<sub>2-3</sub> Sequenzen erkannt und gebunden werden, die sich besonders im ORI des viralen Genoms häufen<sup>71</sup>. Für H1-PV NS1<sub>1-265</sub> konnte in dieser Arbeit die Bindung an dsDNA-Sequenzen bestätigt werden, was die Funktionalität des bakteriell hergestellten Proteins beweist. Jedoch konnten Unterschiede im sequenzspezifischen Bindungsverhalten gegenüber bereits publizierten Arbeiten festgestellt werden. So zeigte sich nicht nur eine eindeutige Interaktion mit einem 43 bp dsDNA-Fragment, das die ORI-Sequenz der H-1PV enthielt, sondern auch mit zwei weiteren unabhängigen, aber ähnlich langen dsDNA-Sequenzen. Im Gegensatz zum MVM-NS1 konnte jedoch keine Bindung an ein 23 bp dsDNA Fragment nachgewiesen werden, das den in vorherigen Experimenten bestimmten minimalen ORI enthält<sup>71</sup>. In den vorherigen DNA-Bindungsstudien wurden die spezifischen DNA-Sequenzen allerdings nicht als Oligonukleotide verwendet, sondern in geeignete Zielvektoren kloniert. Diese wurden anschließend mit spezifischen Restriktionsenzymen prozessiert, sodass 100 bis 300 bp lange DNA-Sequenzen generiert wurden, die die spezifischen Bindungssequenzen enthielten<sup>70,71</sup>. Somit können die Ergebnisse nicht direkt mit den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen verglichen werden, jedoch scheint eine 23 bp-Sequenz nicht ausreichend lang zu sein, um eine Bindung der Nukleasedomäne zu ermöglichen. Folglich handelt es sich bei der DNA-Bindung der isolierten Nukleasedomäne lediglich um eine längen-, aber nicht um eine sequenzspezifische Bindung von dsDNA. Vorherige Studien zeigten, dass die Bindungsspezifität des Volllänge-NS1 bezüglich bestimmten Sequenzmotiven direkt von der gewählten NaCl-Konzentration des Bindungspuffers abhängig ist<sup>70,71</sup>. Außerdem ist ein GST-NS1-Fusionskonstrukt, das die Aminosäuren 16-275 enthält, ebenfalls in der Lage, spezifische ORI-DNA zu binden<sup>70</sup>. Möglicherweise ist eine Multimerisierung der Nukleasedomäne durch Interaktionen mit weiteren NS1-Domänen notwendig, um eine spezifische Erkennung von ACCA-Sequenzen zu induzieren. Mit dieser Hypothese kann auch die spezifische Erkennung von ACCA-

Sequenzen durch das GST-NS1<sub>16-275</sub> erklärt werden: Da GST bekanntermaßen Dimere ausbildet<sup>206,207</sup>, induziert dies wahrscheinlich ebenfalls die Dimerisierung der Nukleasedomäne, wodurch die ACCA-Sequenzen erkannt werden können. Ein derartiger Mechanismus ist jedoch im Falle des in dieser Arbeit verwendeten H1-PV NS1<sub>1-265</sub> nicht möglich, da das Protein nachweislich als Monomer in Lösung existiert.

Des Weiteren wurde die *Nicking*-Aktivität der Nukleasedomäne untersucht, bei der sich eine spezifische Umsetzung des Substrats in Anwesenheit von Mn<sup>2+</sup> beobachten ließ. Hier war zu erwarten, dass die vorhandene Nukleaseaktivität in der Entstehung nur eines weiteren spezifischen DNA-Fragments resultiert, wie es für das AAV-5 Rep-Protein bereits gezeigt werden konnte<sup>208</sup>. Jedoch konnten im Autoradiogramm zwei ähnlich große Banden detektiert werden, die auf eine gewisse Unspezifität der Nukleasereaktion hindeuten. Dies lässt sich vermutlich ebenfalls durch die unspezifische DNA-Bindung erklären: Da das Substrat variabel von NS1<sub>1-265</sub> gebunden werden kann, kommt es in einigen Fällen zu einer nicht optimalen Spaltung des Substrats, was in der Freisetzung von zwei leicht unterschiedlich großen Fragmenten resultiert, die aufgrund des verwendeten hochprozentigen PAA-Gels unterschieden werden können. Dies ist auch insofern plausibel, als dass die Spaltstelle zwei konsekutive Thymidin-Reste aufweist und es aufgrund der variablen Bindung des Substrats somit zu einer Erkennung des falschen Thymidins kommen kann. Im Vergleich zu den Experimenten mit AAV-5 Rep führte der Nuklease-Assay nur mit einer deutlich höheren Proteinkonzentration (5 µM statt 0.32 µM) zu einer entsprechenden Aktivität, was die Hypothese der variablen Bindung weiter bekräftigt. Aus den hier dargestellten Ergebnissen lässt sich außerdem schließen, dass die *Nicking*-Reaktion an sich eine deutlich höhere Spezifität als die DNA-Bindung aufweist, da ansonsten eine komplette Zersetzung der DNA in viele kleine Bruchstücke zu beobachten wäre.

#### 4.1.2.2 Konformationsänderung durch den nativen Cofaktor Mn<sup>2+</sup>

Die NS1 Nukleasedomäne benötigt einen zweiwertigen Metallionen-Cofaktor für die *Nicking*-Aktivität. Jedoch konnte die Art des nativen Metalls in vorherigen Studien bislang nicht aufgeklärt werden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen nun erstmalig, dass Mn<sup>2+</sup> essentiell nicht nur für die Stabilisierung der Struktur in Lösung, sondern auch für die spezifische *Nicking*-Aktivität der Nukleasedomäne ist. Dies stimmt auf den ersten Blick nicht gänzlich mit bisherigen Untersuchungen anderer parvoviraler Nukleasen überein. So konnte für das homologe MVM-NS1 (Sequenzidentität: 91.7 %) eine spezifische

*Nicking*-Aktivität in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  detektiert werden<sup>74</sup>. Des Weiteren wurden kürzlich die Kristallstrukturen von MVM-NS1<sub>1-255</sub> in Komplex mit verschiedenen zweiwertigen Kationen ( $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) aufgeklärt, was auf eine enorme Vielseitigkeit der Metallbindungsstelle hindeutet<sup>79</sup>. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass in dem von Tewary *et al.* durchgeführten Experiment das Protein zunächst kristallisiert und die erhaltenen Kristalle anschließend in Lösungen mit einer hohen Konzentration des jeweiligen Kations getaucht wurden. Somit könnte es sich bei den Strukturen um Kristallisationsartefakte handeln, welche nicht unbedingt die nativen Eigenschaften des Proteins widerspiegeln. Außerdem wurden die Experimente zur *Nicking*-Aktivität mit MVM Volllänge-NS1 durchgeführt. Bei der Reinigung dieses Proteins aus Sf9-Zellen wurde die Verwendung des Metallchelators EDTA vollständig vermieden, da dies zu einer sofortigen Präzipitation des Proteins führte (Jürg Nüesch, persönliche Mitteilung). Somit ist denkbar, dass die Nukleasedomäne in diesen Versuchen bereits  $Mn^{2+}$  gebunden hatte, welches in geringen Mengen im Zellkulturmedium enthalten ist. Die Experimente wurden außerdem mit vollständiger dsDNA durchgeführt, was ein vorheriges Entwinden der DNA durch die  $Mg^{2+}$ -abhängige Helikasedomäne für eine erfolgreiche *Nicking*-Reaktion voraussetzt. Von daher könnte der Trugschluss entstanden sein, dass die Nukleaseaktivität von  $Mg^{2+}$  abhängig ist, dessen Zugabe jedoch stattdessen die Helikasefunktion des Proteins aktiviert. Diese Erkenntnisse werden ebenfalls durch Studien mit dem verwandten AAV-5 Rep gestützt, für das *in vitro* ebenfalls eine  $Mn^{2+}$ -spezifische *Nicking*-Aktivität nachgewiesen wurde, während die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  nicht zur Umsetzung des DNA-Substrates führte<sup>208,209</sup>.

Durch SAXS-Experimente konnte nachgewiesen werden, dass die  $Mn^{2+}$ -Bindung eine spezifische Konformationsänderung von NS1<sub>1-265</sub> induziert, die in einer Elongation des Proteins um ca. 6 Å resultiert. Diese Erkenntnisse werden zusätzlich von der mittels ITC detektierten positiven Entropie von  $\Delta S = 15.2 \text{ cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$  gestützt, die ebenfalls auf eine Konformationsänderung nach spezifischer  $Mn^{2+}$ -Bindung hindeutet. Diese Änderung der Struktur der Nukleasedomäne erscheint plausibel, da auch nur in Anwesenheit von  $Mn^{2+}$  eine spezifische *Nicking*-Aktivität beobachtet werden konnte. Jedoch lässt sich anhand der vorliegenden Daten keine Aussage darüber treffen, welcher Teil des Proteins an der Konformationsänderung beteiligt ist. Die in dieser Arbeit dargestellte NS1<sub>1-265</sub>-Kristallstruktur weist keine  $Mn^{2+}$ -Bindung am konservierten HUH-Motiv auf, weshalb sich mit dessen Hilfe keine Aussage über eventuelle strukturelle Änderungen treffen lässt. Beachtlicherweise führte jedoch die Zugabe von  $MnCl_2$  in keinem Fall zur Ausbildung von

NS1<sub>1-265</sub> Kristallen unter ansonsten identischen Pufferbedingungen, was einen zusätzlichen indirekten Nachweis für die Änderung der molekularen Struktur des Proteins darstellt. Da die CD-Daten auf eine identische Sekundärstrukturzusammensetzung von NS1<sub>1-265</sub> unabhängig von der Mn<sup>2+</sup>-Bindung hindeuten, sind höchstwahrscheinlich flexible Schleifenstrukturen an der Elongation des Proteins beteiligt. Zur näheren Charakterisierung der Mn<sup>2+</sup>-Bindung und deren struktureller Auswirkungen sollten zukünftig Röntgenabsorptionsspektroskopie-Experimente durchgeführt werden, bei denen durch spezifische Anregung der Mn<sup>2+</sup>-Absorptionskante Hinweise auf die chemische Umgebung und den Oxidationszustand des Metallions erhalten werden können.

Die Abhängigkeit von Mn<sup>2+</sup> für die *Nicking*-Aktivität könnte ebenfalls einen weiteren Faktor für die tumorspezifische Selektivität von H1-PV darstellen. Die Mn<sup>2+</sup>-Konzentration in Astrozytoma- und Mammakarzinomzellen ist bekanntermaßen im Vergleich zu gesunden Zellen häufig hochreguliert<sup>210-212</sup>. Eine höhere Konzentration an freien Mn<sup>2+</sup>-Ionen resultiert in einer verstärkten *Nicking*-Aktivität der Nukleasedomäne, wodurch die Effizienz der viralen Replikation gesteigert wird. Des Weiteren konnte in einer Vielzahl von verschiedenen Tumorarten eine Herunterregulation oder ein vollständiges Fehlen der Mangan-Superoxiddismutase-Expression (MnSOD) nachgewiesen werden<sup>213</sup>. Bei niedrigen Konzentrationen der Mn<sup>2+</sup>-bindenden MnSOD kommt es zu einer erhöhten Konzentration freier intrazellulärer Mn<sup>2+</sup>-Ionen, die folglich von der NS1-Nukleasedomäne gebunden werden könnten, wodurch wiederum die *Nicking*-Aktivität induziert wird. Um diese Hypothese zu untermauern, sollten Zellkulturexperimente mit Zugabe von Mn<sup>2+</sup> durchgeführt und die Replikationsfähigkeit von H-1PV in unterschiedlichen Zelllinien untersucht werden. Neben den vielen zellulären Interaktionen von NS1 mit Wirtszellfaktoren könnte die Spezifität der Nukleasedomäne für Mn<sup>2+</sup>-Ionen als essentieller Cofaktor einen weiteren Grund für die tumorspezifische Selektivität von H-1PV darstellen.

## 4.2 Apoptin

Apoptin ist ein ebenfalls onkolytisch wirkendes Protein aus dem Hühner-Anämie-Virus (CAV), das zum selektiven Zelltod in verschiedenen Tumorzelllinien führt<sup>214</sup>. Die kombinierte Co-Expression von Apoptin mit H-1PV NS1 führte in vorherigen Studien zu einer erhöhten Zytotoxizität in Tumorzellen<sup>104</sup>, der präzise Wirkmechanismus ist jedoch auch in diesem Fall bislang aufgrund fehlender Strukturdaten nicht bekannt. Zur Herstellung großer Mengen an löslichem und reinem (>90%) Apoptin war die N-terminale

Fusion des löslichkeitsvermittelnden Proteins MBP essentiell. In Abwesenheit von MBP wurde nach bakterieller Herstellung von Apoptin-His<sub>6</sub> ausschließlich *inclusion bodies* erhalten, deren Renaturierung nicht erfolgreich war. Wie in vorherigen Studien bereits beschrieben zeigen auch die experimentellen Daten dieser Arbeit eine spezifische Oligomerisierung von MBP-Apoptin. Unabhängig von der Proteinkonzentration wurde ein hydrodynamischer Radius von 10.4 nm bestimmt<sup>114</sup>. Ein Abspalten des MBP mittels *TEV*-Protease führte jedoch ebenfalls zur Präzipitation des isolierten Apoptins, weshalb das MBP-Fusionskonstrukt für eine initiale strukturelle Charakterisierung verwendet wurde. SAXS-Daten des MBP-Apoptin-Komplexes in Lösung ermöglichten die Berechnung eines niedrig aufgelösten *ab initio* Modells, welches die ersten erhaltenen Strukturdaten eines Apoptin-Konstruktes darstellt. 16 Moleküle bilden ein ringförmiges Oligomer mit Dimensionen von 25.7 \* 25.7 \* 17.2 nm aus, in dem die MBP-Moleküle nach außen orientiert sind, während die Apoptin-Domänen das innere Zentrum des Komplexes bilden. Dieses grundlegende Strukturmodell wird durch die durchgeführten Größenausschlusschromatographie-Experimente validiert, die eindeutig nachweisen, dass die Oligomerisierung von MBP-Apoptin ausschließlich durch den Apoptin-Teil induziert wird. In vorherigen Studien konnte außerdem mittels DLS gezeigt werden, dass durch Rückfaltung hergestelltes Apoptin einen wesentlich kleineren hydrodynamischen Radius im Gegensatz zu MBP-Apoptin aufweist<sup>114</sup>. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Apoptin *in vivo* auch in Abwesenheit von MBP Oligomere bildet<sup>108</sup>, ist der vorgeschlagene strukturelle Aufbau des spezifischen MBP-Apoptin-Oligomers, in dem die MBP-Moleküle nach außen orientiert sind und Apoptin durch Selbstinteraktion das Oligomer zusammenhält, als wahrscheinlich anzusehen. In bisherigen Arbeiten konnte nicht genau definiert werden, aus wie vielen Untereinheiten das Apoptin-Oligomer zusammengesetzt ist. *In vivo* Studien postulieren mittels Elektronenmikroskopie die Ausbildung eines weitestgehend globulären Apoptin-Komplexes, der aus 20-30 Untereinheiten besteht<sup>114,116</sup>. Gerade die bisherige Annahme dieses globulären Aufbaus des Apoptin-Oligomers kann in der Überschätzung des Molekulargewichts resultieren. Das SAXS-Modell zeigt eine flache Anordnung der Moleküle im MBP-Apoptin-Komplex, was darauf hindeutet, dass Apoptin eher eine ringförmige Struktur anstelle eines globulären Multimers ausbildet. Somit lässt sich auch der mittels DLS bestimmte relativ große hydrodynamische Radius von 8.5 nm für freies Apoptin in Lösung erklären: Bei DLS-Messungen wird der gemittelte hydrodynamische Radius des Partikels in Lösung bestimmt. Dabei definiert der maximale Partikelabstand den augenscheinlichen Radius des untersuchten Moleküls. Die ringförmige

Anordnung resultiert aufgrund der freien Bewegung des Oligomers in alle Raumrichtungen somit zu einer Überschätzung des tatsächlichen Molekulargewichts.

Auf funktioneller Ebene konnte im Rahmen dieser Arbeit für MBP-Apoptin nachgewiesen werden, dass der spezifische Komplex mehrere DNA-Bindungsstellen ausbildet. In einer vorherigen Arbeit wurde für MBP-Apoptin die Bindung von insgesamt 8 DNA-Molekülen nach einem kooperativen Bindungsmechanismus postuliert<sup>116</sup>. Dies könnte mit Hilfe des vorliegenden SAXS-Modells wie folgt begründet werden: Bei einem Komplex aus 16 Untereinheiten sind jeweils zwei MBP-Apoptin-Moleküle an der Bindung eines DNA-Moleküls beteiligt. Eine Interaktion mit DNA an einer Bindungsstelle fungiert anschließend als Sensor für die benachbarten Moleküle, was zu einer erhöhten Bindungsaffinität für weitere DNA-Moleküle führt. Dieses Prinzip setzt sich fort, bis alle 8 Bindungsstellen mit DNA belegt sind. Um diese Hypothese zu validieren, sollten zukünftig zeitaufgelöste SAXS-Studien durchgeführt werden, bei denen Strukturänderungen des MBP-Apoptin-Komplexes nach Zugabe von DNA über die Zeit verfolgt werden. Aufgrund des geringen Auflösungsvermögens der SAXS-Technik muss allerdings berücksichtigt werden, dass nur bei ausreichend drastischen Strukturänderungen ein Effekt beobachten werden könnte. Außerdem sollte der ringförmige Aufbau des MBP-Apoptin-Komplexes durch Cryo-EM Experimente bestätigt werden. Detaillierte strukturelle Informationen bezüglich der Struktur und der DNA-Bindung des spezifischen Apoptin-Oligomers können allerdings nur durch eine hochauflösende Kristallstruktur von Apoptin oder MBP-Apoptin erhalten werden. Aufgrund des geringen Sekundärstrukturanteils und der damit verbundenen Flexibilität des Apoptins konnten jedoch bisher keine geeigneten Kristallisationsbedingungen identifiziert werden. Die Bestätigung des hier postulierten SAXS-Modells durch die genannten ergänzenden Methoden könnte dazu beitragen, die spezifische onkolytische Aktivität des Apoptins besser zu verstehen und neue Ansätze zur Behandlung von Tumorerkrankungen zu entwickeln.

### **4.3 Untersuchung der intrazellulären Proteinkristallisation**

In dieser Arbeit konnten Apoptin sowie die weiteren NS1 Domänen (Volllänge, Helikasedomäne, Transaktivierungsdomäne) nicht erfolgreich durch Anwendung konventioneller Methoden kristallisiert werden. Da strukturelle Information jedoch essentiell für das molekulare Verständnis der onkolytischen Aktivität sind, sollten zusätzlich innovative Ansätze angewandt werden, die eine Strukturaufklärung der

genannten Proteine dennoch ermöglicht. Eine Möglichkeit stellt die Kristallisation von Proteinen in lebenden Zellen dar. In einigen Fällen wurde bei der rekombinanten Genexpression in Sf9-Zellen die spontane Ausbildung intrazellulärer Proteinkristalle beobachtet. Dieses Phänomen konnte bereits ausgenutzt werden, um die hochauflösende Kristallstruktur von nativ inhibiertem TbCatB zu ermitteln, welches die erste neue Bioinformation, die mit einem FEL generiert wurde, darstellt<sup>155</sup>. In den folgenden Jahren wurde die intrazelluläre Kristallisation weiterer Proteine beobachtet (TbIMPDH, Luciferase aus *Photinus pyralis*, GFP- $\mu$ NS aus dem avianen Reovirus), was vermuten lässt, dass es sich um ein weiter verbreitetes Phänomen handelt. Insbesondere für die Diffraktionsdatensammlung mittels serieller röntgenkristallographischer Methoden erwiesen sich diese *in vivo*-Kristalle bereits als optimal geeignet<sup>144,155,199</sup>. In initialen Versuchen konnten die oben genannten Proteine jedoch nicht erfolgreich in SF9-Zellen kristallisiert werden. Um die Wahrscheinlichkeit der spontanen Kristallisation und der erfolgreichen Strukturaufklärung von weiteren Proteinen in lebenden Zellen zu erhöhen, wurden deshalb zunächst die beteiligten zellulären Mechanismen sowie die Stabilität der Kristalle am Beispiel von TbCatB und GFP- $\mu$ NS näher untersucht.

#### 4.3.1 Stabilität von intrazellulären Proteinkristallen

Für in lebenden Zellen kristallisiertes TbCatB wurde im Vorfeld bereits eine außerordentlich hohe Stabilität gegenüber chemischen und mechanischen Einflüssen ermittelt<sup>199</sup>. Diese konnte in dieser Arbeit mittels *Western Blot* validiert und quantifiziert werden, wobei ein neutraler pH-Wert optimale Pufferbedingungen für die TbCatB-Kristallstabilität bereitstellt. Der Western Blot stellt einen schnellen und einfachen Nachweis für die Stabilitätsuntersuchungen der Kristalle dar, setzt jedoch die Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers voraus, weshalb dieser Ansatz für eine generelle Anwendung nur bedingt geeignet ist.

Interessanterweise konnte für eine TbCatB-Variante, die mit dem peroxisomalen Lokalisationssignal SKL erweitert wurde, das Wachstum von signifikant längeren Kristallen beobachtet werden. Da eine peroxisomale Lokalisation der Kristallisation ausgeschlossen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um einen strukturellen Effekt handelt, der in einem optimierten Kristallwachstum resultiert. Matthias Hardtmann konnte im Rahmen seiner in der Arbeitsgruppe durchgeführten Bacheloararbeit durch Permutation des SKL-Lokalisationssignals zeigen, dass das Lysin an der zweiten Position für ein größeres Längenwachstum der Kristalle verantwortlich ist<sup>215</sup>. Durch eine

Interaktion dieses Lysins mit Glu-88 an der Proteinoberfläche wird eine Stabilisierung des zuvor hochgradig flexiblen TbCatB C-Terminus bewirkt, wie ein postuliertes *in silico* Modell zeigt, was letztendlich zu einem optimierten Kristallwachstum führen könnte. Initiale Diffraktionstests mit TbCatB-SKL-Kristallen an der BL32XU-Beamline am SPring-8 (Hyogo, Japan) konnten bereits ein ähnliches Diffraktionspotential wie TbCatB-WT-Kristalle demonstrieren. Die Aufklärung der hochauflösenden Kristallstruktur von TbCatB-SKL wird zeigen, ob die postulierte Stabilisierung des TbCatB C-Terminus tatsächlich zu einer Optimierung der Kristallpackung führt. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die Kristall-Optimierung durch SKL-Anfügung einen Spezialfall für TbCatB darstellt und dies keinen generellen Ansatz zur Verbesserung der Qualität und Stabilität von intrazellulär gewachsenen Kristallen im Allgemeinen darstellt.

Für GFP- $\mu$ NS konnten bei den in dieser Arbeit durchgeführten *Dot Blot*-basierten Stabilitätstests ähnliche Resultate wie für TbCatB erzielt werden, wobei eine optimale Stabilität der Kristalle bei neutralem pH-Wert und niedrigen KCl-Konzentrationen identifiziert wurde. Die Kristalle zeigten ebenfalls eine hohe Stabilität gegenüber Glycerin und PEG 400, weshalb beide Reagenzien als Kryoschutz geeignet sind. Der *Dot Blot* stellt im Vergleich zum für TbCatB verwendeten *Western Blot* eine noch schnellere Möglichkeit dar, die Stabilität von Kristallen unter verschiedenen Pufferbedingungen zu untersuchen. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass aufgrund der fehlenden Proteintrennung keine Aussagen über eventuelle unspezifische Signale des Antikörpers getroffen werden können. Als zukünftige Strategie könnte dies jedoch im Vorfeld mittels Western Blot ausgeschlossen und der Stabilitätstest anschließend mit der *Dot Blot* Technik durchgeführt werden. Insgesamt stellen die in dieser Arbeit präsentierten immunologischen Stabilitätstests eine solide Grundlage für die Charakterisierung der Kristallstabilität nach Isolierung dar und erlauben die Identifizierung geeigneter Pufferbedingungen, sofern ein spezifischer Antikörper für das jeweilige Zielprotein verfügbar ist.

In initialen Pulverdiffraktionsexperimenten konnten lediglich Beugungssignale bis zu einer maximalen Auflösung von 30 Å detektiert werden, was auch eine sehr niedrige Auflösung von Beugungssignalen bei der Durchführung serieller Diffraktionstechniken mit Synchrotron- oder FEL-Strahlung erwarten lässt. Somit erschien die Qualität der Kristalle für die Generierung von hochauflösenden Strukturinformationen nicht ausreichend. Dabei ist bisher unklar, ob die geringe Auflösung in der Schädigung der Kristalle während der Isolierung aus den lebenden Zellen oder in einer generell geringen Ordnung der Kristalle begründet ist. Allerdings erscheint es plausibel, dass das fusionierte GFP-Molekül die

intrinsische Ordnung der  $\mu$ NS-Assemblierung stört, sodass eine Diffraktion zu hohen Auflösungen verhindert wird. Da in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, dass die C-terminale  $\mu$ NS-Domäne auch in Abwesenheit von GFP innerhalb der Sf9-Zellen assembliert<sup>175</sup>, sollten diese Einschlüsse zukünftig ebenfalls auf ihren kristallinen Charakter überprüft werden.

Allerdings stellt die Isolierung unbeschädigter Kristalle weiterhin eine der größten Herausforderungen in der Strukturaufklärung von intrazellulär kristallisierten Proteinen dar. So konnte für die Luciferase aus *Photinus pyralis* gezeigt werden, dass die Lyse der Zellen in einer sofortigen Degradation der Kristalle resultiert<sup>203</sup>, weshalb keine Diffraktionsdaten isolierter Kristalle aufgenommen werden konnten. Folglich ist die Optimierung der Kristallstabilität während eines Diffraktionsexperiments von essentieller Bedeutung. Da jedoch die idealen Pufferbedingungen für jedes Protein individuell sind, müssen diese in aufwendigen Experimenten empirisch bestimmt werden, was den Vorteil der einfachen und spontanen Bildung der Kristalle in den lebenden Zellen aufwiegt. Vor kurzem konnte sowohl für bakterielle Zellen als auch für Sf9-Zellen nachgewiesen werden, dass die Aufnahme von Diffraktionsdaten intrazellulärer Proteinkristalle direkt innerhalb von lebenden Zellen möglich ist<sup>153,164</sup>. Dieser als *in cellulo-Kristallographie* bezeichnete Ansatz weist eindeutige Vorteile gegenüber der Verwendung isolierter Kristalle auf. Da sich die Kristalle bis zum Beginn des Diffraktionsexperiments in ihrer nativen Umgebung befinden, können keine Schädigungen aufgrund der Umgebungsänderung entstehen. Somit lässt sich eine maximale Kristallqualität sicherstellen, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass hochauflösende Strukturdaten generiert werden können. Für eine generelle Anwendung des *in cellulo* Ansatzes bedarf es allerdings noch essentieller Optimierung bezüglich der Applikation der Sf9-Zellen für FEL- und Synchrotronexperimente. So führten in FEL-Experimenten bereits Suspensionen isolierter TbCatB-Kristalle, die noch einen geringen Anteil an Zelltrümmern enthielten, oft zu Verstopfungen des Zerstäubers, der den *liquid jet* erzeugt (Lars Redecke, persönliche Mitteilung). Aufgrund des größeren Durchmessers von vollständigen Sf9-Zellen ( $\sim 20 \mu\text{m}$ ) müssten folglich deutlich breitere Zerstäuber zum Einsatz kommen, um dieses Problem zu vermeiden. Dies führt jedoch aufgrund des breiteren *liquid jets* zu einer erhöhten Hintergrundstreuung, was in einer reduzierten Datenqualität resultiert<sup>216</sup>. Kürzlich wurde an Beispiel der bovinen Cytochrom-C-Oxidase jedoch gezeigt, dass die FEL-basierte Generierung von Strukturdaten auch mit einzelnen großen Kristallen in konventionellen Nylonschleifen möglich ist<sup>154</sup>. Somit wäre es denkbar, dass auch für Sf9-Zellen anstelle eines *liquid jets* ein fester Träger wie z.B. ein

Röntgen-transparenter Chip zum Einsatz kommt. Dieser wäre darüber hinaus sowohl kompatibel mit FEL- als auch mit Synchrotronstrahlungsquellen und ermöglicht somit ein breites Anwendungsfeld für die Datensammlung mit intrazellulären Proteinkristallen.

#### 4.3.2 Zellbiologische Aspekte der intrazellulären Proteinkristallisation

In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von TbCatB- und GFP- $\mu$ NS-Kristallen innerhalb der Sf9-Zellen untersucht. Dabei konnte eindeutig identifiziert werden, dass TbCatB im ER der Zelle kristallisiert, wogegen die GFP- $\mu$ NS-Kristalle im Zytosol gebildet werden. In einer weiteren Studie innerhalb der Arbeitsgruppe konnte außerdem bewiesen werden, dass Kristalle der Luciferase aus *Photinus pyralis* in Peroxisomen entstehen<sup>203</sup>. Versuche, TbCatB durch Änderung seines Lokalisationssignals ebenfalls in Peroxisomen oder im Zytosol zu kristallisieren, waren, trotz Expression des Proteins, erfolglos. Diese Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Kristallisation abhängig von dem Zellkompartiment ist, in dem sich das Zielprotein befindet. Dabei ist bisher unklar, worin die Basis für das erfolgreiche Wachstum eines intrazellulären Kristalls begründet ist. Da die Ausbildung eines geordneten Kristallgitters von thermodynamischen Prozessen abhängig ist, kann davon ausgegangen werden, dass die intrazelluläre Proteinkristallisation den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie die konventionelle Proteinkristallisation *in vitro* folgt. Eine essentielle Voraussetzung ist eine hohe lokale Proteinkonzentration, da es nur so zur Ausbildung von Nukleationskeimen kommen kann. Dies kann durch den Transport des Zielproteins in ein spezifisches Kompartiment erfüllt werden: Da durch die Membran des jeweiligen Kompartiments eine diffuse Verteilung des Proteins in der Zelle verhindert wird, kommt es zur Steigerung der lokalen Proteinkonzentration, was folglich zur Entstehung von Nukleationskeimen führen kann. Für GFP- $\mu$ NS wurde bemerkenswerterweise die Kristallisation im Zytosol beobachtet, wobei keine Erhöhung der lokalen Proteinkonzentration durch weitere abgrenzende Zellmembranen erfolgt. Jedoch besitzt  $\mu$ NS eine intrinsische Tendenz zur Ausbildung von Multimeren, wodurch vermutlich eine Ausbildung von Kristallen im Zytosol ermöglicht wird<sup>175</sup>. Bei Experimenten mit einer Reihe weiterer Proteine innerhalb der Arbeitsgruppe konnte bisher in keinem weiteren Fall die zytosolische Entstehung von intrazellulären Proteinkristallen beobachtet werden. Jedoch lässt die bisherige Anzahl untersuchter Zielproteine noch keine generelle Aussage über die Kristallisierbarkeit von Proteinen im Zytosol zu.

Des Weiteren könnte auch die chemische Umgebung des Zielkompartiments von entscheidender Bedeutung sein. So ist bekannt, dass ER und Zytosol zwar einen identischen pH-Wert, jedoch unterschiedliche Konzentrationen bestimmter Ionen wie Calcium und Magnesium aufweisen<sup>217,218</sup>. Da Ionen eine zentrale Rolle für die intermolekularen Interaktionen im Kristallgitter spielen, könnte dies einen weiteren Faktor darstellen, der die Kristallisation eines bestimmten Proteins selektiv in nur einem bestimmten Kompartiment ermöglicht. Für Peroxisomen konnten bisher keine eindeutigen Pufferbedingungen nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich in unterschiedlichen Studien mit Säuger- und Hefezellen, dass das peroxisomale Lumen ein weites pH-Spektrum von 5.8-8.2 aufweist<sup>219-221</sup>. Zukünftige Untersuchungen der peroxisomalen Pufferzusammensetzung in Sf9-Zelle könnten somit dazu beitragen, intrazelluläre Kristallisationsprozesse besser zu verstehen.

Als weitere wichtige Voraussetzung für die Kristallisation von Proteinen gilt für die konventionelle Methodik *in vitro* eine monodisperse Lösung mit homogener Verteilung der Moleküle, was bei ausreichender Proteinkonzentration zur Ausbildung eines geordneten Kristallgitters führt. Insofern ist es bemerkenswert, dass in der heterogenen Zellumgebung die Ausbildung eines geordneten Kristallgitters möglich ist. Es stellt sich die Frage, ob die Zelle einen aktiven Beitrag leistet, der die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Proteinkristallisation erhöht. Im ER befinden sich Chaperone wie beispielsweise Calretikulin, die eventuell die korrekte Faltung sowie die Ausbildung eines geordneten Kristallgitters von synthetisierten Proteinen unterstützen<sup>222</sup>. Co-Expressionsstudien von TbCatB und Calretikulin würden somit Hinweise auf einen Chaperon-induzierten Effekt liefern, der die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Proteinkristallisation im ER erhöht.

Für die Luciferase aus *Photinus pyralis* wurde ein dynamischer Auf- und Abbau der Kristalle in der lebenden Insektenzelle über die Zeit beobachtet, was ebenfalls einen Hinweis auf einen aktiven Zellbeitrag darstellen könnte<sup>203</sup>. Jedoch ist bisher unklar, welche Prozesse innerhalb der Peroxisomen zu diesem Effekt beitragen könnten. Eventuell handelt es sich bei dem beobachteten Phänomen um einen destruktiven Effekt: Da Peroxisomen eine Vielzahl ATP-abhängiger Enzyme enthalten, muss die Zelle deren Versorgung mit ausreichend Energie gewährleisten. Für *A. thaliana* und *S. cerevisiae* konnten spezifische Transporter nachgewiesen werden, die den Import von ATP in das peroxisomale Lumen katalysieren und wahrscheinlich in ähnlicher Form auch in Sf9-Zellen existieren<sup>223,224</sup>. Da Luciferase zwei Bindungsstellen für ATP besitzt, das für die Umsetzung des Luciferins notwendig ist, könnte die ATP-induzierte Konformationsänderung des Proteins erfolgen,

was schließlich zum dynamischen Auf- und Abbau der Kristalle führt<sup>225,226</sup>. Die Zugabe von Luciferin zu lebenden Sf9-Zellen, die bereits Luciferase-Kristalle produziert haben, führte zu einem sofortigen Zerfall der Kristalle, was vermutlich ebenfalls durch eine aktivierende Konformationsänderung des Proteins ausgelöst wird<sup>203</sup>. Jedoch ist diese Hypothese höchst spekulativ und muss durch Aufklärung der hochauflösenden Röntgenkristallstruktur validiert werden.

Bislang war nicht endgültig geklärt, ob ein Beitrag des Baculovirus essentiell für die Ausbildung intrazellulärer Proteinkristalle ist. Dies konnte jedoch durch rekombinante Expression der Luciferase mit einem virusfreien Expressionsvektor widerlegt werden, da auch in diesem Fall die Ausbildung intrazellulärer Kristalle mit vergleichbarer Morphologie und Größe beobachtet werden konnte<sup>203</sup>. Finn Lübber konnte im Rahmen seiner Masterarbeit in der Arbeitsgruppe nachweisen, dass TbCatB in einem virusfreien Expressionssystem ebenfalls Kristalle bildet, was auf eine generelle Unabhängigkeit der Kristallisation von der Anwesenheit baculoviraler Partikel hindeutet<sup>227</sup>. Jedoch ist die baculovirale Expression deutlich effizienter, da eine höhere Anzahl an intrazellulären Proteinkristallen im Vergleich zur virusfreien Expression beobachtet werden konnte<sup>203,227</sup>. Dies kann durch die Transfektionseffizienz erklärt werden: Während die virusfreie Expression durch direkte Lipofektion des Expressionsvektors ein Endzeitexperiment darstellt, kommt es nach einmalig erfolgter Aufnahme der DNA in die Sf9-Zellen zu keinem weiteren Gentransfer auf andere Zellen. Im Gegensatz dazu führt die Replikation der baculoviralen Partikel zur Lyse und zur Infektion weiterer Zellen, wodurch die Effizienz deutlich erhöht wird. Für systematische Untersuchungen der intrazellulären Prozesse, die zur Proteinkristallisation führen, ist dennoch das virusfreie System zu bevorzugen, da der Einfluss des Virus einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Signalwege der Sf9-Zelle haben kann. Dafür muss zunächst einmal die Transfektionseffizienz der Sf9-Zellen erhöht werden, um eine höhere Aussagekraft bei der Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen.

## 5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels SAXS-Experimenten erstmals strukturelle Daten für die N-terminale Nukleasedomäne des H-1PV (NS1<sub>1-265</sub>) in Lösung generiert werden. Dabei wurde Mn<sup>2+</sup> als nativer Cofaktor für die *Nicking*-Aktivität identifiziert, der bei Bindung eine Konformationsänderung des Proteins induziert. Des Weiteren konnte ein initiales Strukturmodell mit einer maximalen Auflösung von 2.8 Å generiert werden, das eine hohe Ähnlichkeit mit der bereits vorher aufgeklärten hochauflösenden MVM-NS1<sub>1-255</sub> Kristallstruktur aufweist. Da NS11-265 jedoch in Abwesenheit von Mn<sup>2+</sup> kristallisiert wurde, können die in Lösung erhaltenen Strukturdaten nicht direkt mit der generierten Kristallstruktur verglichen werden. Deshalb sollten weitere Kristallisationsansätze mit Mn<sup>2+</sup>-gebundenem NS1<sub>1-265</sub> durchgeführt werden, um neben den bereits erhaltenen SAXS-Daten eine vergleichende hochauflösende Mn<sup>2+</sup>-gebundene Struktur zu erhalten. Dieser Strukturvergleich wird wichtige Erkenntnisse über die Funktionsweise der Nukleasedomäne während der viralen Replikation liefern und somit auch zu einem besseren Verständnis des selektiven Onkotropismus führen.

Für MBP-Apoptin konnte ebenfalls in SAXS-Experimenten ein niedrigaufgelöstes Strukturmodell erzeugt werden, das 16 ringförmig angeordnete Moleküle zeigt, wobei die MBP-Domänen nach außen und die Apoptin-Domänen nach innen orientiert sind. Dieses Modell stellt die erste Strukturinformation von MBP-Apoptin in Lösung dar und weist erstmals auf einen nicht-globulären Molekülaufbau hin. Cryo-EM-Experimente sowie weitere SAXS-Studien mit intermolekular quervernetztem MBP-Apoptin könnten Informationen darüber liefern, ob das in dieser Arbeit generierte Modell der Wirklichkeit entspricht.

Konventionelle Ansätze zur Proteinkristallisation für MBP-Apoptin sowie für die weiteren NS1-Domänen (Volllänge, Helikasedomäne, TA-Domäne) waren bisher nicht erfolgreich, was hauptsächlich auf den hohen unstrukturierten Proteinanteil (Apoptin, TA-Domäne) oder der geringen Löslichkeit (Helikasedomäne) nach Isolierung zurückzuführen ist. Daher wäre es für diese und andere konventionell schwierig zu kristallisierende Proteine von großem Interesse, die Möglichkeit der intrazellulären Proteinkristallisation in Sf9-Zellen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde am Beispiel von TbCatB und GFP-μNS das Zellkompartiment als erster wichtiger Faktor identifiziert, der den Erfolg der intrazellulären Proteinkristallisation massiv beeinflusst. Das in dieser Arbeit entwickelte *Screening*-System zur systematischen Untersuchung der intrazellulären

Proteinkristallisation wird zukünftig einen schnellen und einfachen Ansatz für diese und weitere Proteine liefern. Neben den bisher getesteten Zellkompartimenten (ER, Peroxisomen, Zytosol) kann das System einfach durch die Untersuchung zusätzlicher Kompartimente, z.B. den Zellkern oder die Mitochondrien, ergänzt werden, was die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Proteinkristallisation weiter erhöht. Um neben der Kompartimentierung weitere *Screening*-Parameter zu identifizieren, müssen außerdem die zellulären Signalwege in Zukunft näher untersucht werden, da eine aktive Beteiligung der Zelle an den Kristallisationsprozessen wahrscheinlich ist. Neben der Fluoreszenzmikroskopie sollten quantitative PCR-Experimente durchgeführt werden, um den Einfluss von Transport- und weiteren Schlüsselproteinen während der intrazellulären Proteinkristallisation zu untersuchen. Anhand dieser Informationen können weitere Optimierungen vorgenommen werden, die die Kristallisationswahrscheinlichkeit in der Zelle erhöhen.

Die baculovirale Co-Expression von Zielprotein und Kompartiment-Markern zeigt eindeutig, dass die rekombinante Herstellung von mehreren Proteinen in signifikanten Mengen im selben Zellkompartiment möglich ist. Somit würde die intrazelluläre Kristallisation von Proteinkomplexen einen großen Vorteil gegenüber konventioneller Co-Kristallisation darstellen, da es oft schwierig ist, die idealen Bedingungen für die kristalline Komplexbildung zu identifizieren. Die Etablierung der intrazellulären Co-Kristallisation sollte mit bekannten Proteinen durchgeführt werden, von denen die Ausbildung eines molekularen Komplexes bereits bekannt ist. Die vollständige Glykosylierung der nativ inhibierten TbCatB-Kristallstruktur<sup>155</sup> macht außerdem deutlich, dass mit der intrazellulären Proteinkristallisation posttranslationale Modifikationen untersucht werden können, was bei der konventionellen Kristallisation aufgrund der hohen Flexibilität von Zuckern oder Phosphatresten oft zu Problemen führt.

Zur Aufnahme hochauflösender Strukturdaten sollte zukünftig die Anwendung des bereits grundlegend nachgewiesenen *in cellulo*-Kristallographie Ansatzes<sup>153,164</sup> für Sf9-Zellen sowohl an Synchrotron- als auch an FEL-Strahlungsquellen etabliert werden, da ein Verweilen der Kristalle in der Zelle die maximale Diffraktionsqualität gewährleistet. Dafür müssen in erster Linie Festphasenträger entwickelt werden, die ein einfaches Montieren der Sf9-Zellen ermöglichen.

Die Phaseninformationen zur Lösung der TbCatB-Struktur konnten durch molekularen Ersatz gewonnen werden, jedoch setzt dies das Vorhandensein einer bereits aufgeklärten Struktur eines homologen Proteins voraus, was nicht in jedem Fall gewährleistet ist. Somit

sind neben der Optimierung der Diffraktionsqualität Methoden zur *de novo* Phasenbestimmung notwendig, um bisher unbekannte Proteine aufklären zu können. Die generelle Verwendbarkeit von anomalen Schwefel-Dispersionssignalen mit einem FEL konnte bereits an Beispiel von Lysozym-Kristallen bewiesen werden<sup>228</sup>. Auch für TbCatB-Kristalle konnten kürzlich anomale Beugungssignale detektiert werden, was eine Verwendbarkeit von intrazellulären Proteinkristallen für diese Phasierungsmethode bestätigt<sup>229</sup>. Weitere Entwicklungen wie die Schwermetallphasierung über Selenomethionin an Beispiel von TbCatB-Kristallen sind derzeit Gegenstand der Forschung innerhalb der Arbeitsgruppe und werden weitere wichtige Hinweise über die Anwendbarkeit für weitere intrazellulär kristallisierte Proteine liefern.

Sollte es gelingen, mit Hilfe der genannten Optimierungen die Wahrscheinlichkeit der intrazellulären Kristallisation zu erhöhen sowie die Generierung hochauflösender Strukturdaten sicherzustellen wird dieser Ansatz für viele Forschungsbereiche, insbesondere für die Strukturaufklärung der hier verwendeten Konstrukte onkolytischer Viren, eine wertvolle Alternative zur konventionellen Kristallographie darstellen. Die Untersuchung von Proteinen onkolytischer Viren sowie von ihren Interaktionen mit der Zielzelle stellt eine essentielle Grundlage dar, um die molekularen Prozesse besser zu verstehen, die zur selektiven Zytotoxizität in Tumorzellen führen. Die Erweiterung des Verständnisses dieser Proteine wird zukünftig entscheidend dazu beitragen, Viren mit effizienterer Replikationsfähigkeit sowie einer Selektivität für eine Vielzahl von unterschiedlichen Tumorzellen zu entwickeln, was einen innovativen, vielversprechenden Ansatz in der Behandlung von Tumorerkrankungen darstellt.

## 6 Materialien und Methoden

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Geräte

Tabelle 8: Liste verwendeter Geräte

Gerätetyp	Bezeichnung (Hersteller, Herkunftsland)
Spektrophotometer	GeneQuant 1300 (GE Healthcare, UK) Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Peqlab, Germany) GENios microplate reader (Tecan, Schweiz)
Zentrifugen	5804R/5810R/5415R/5424 (Eppendorf, Deutschland) Minispin® Plus (Eppendorf, Deutschland)
Inkubationsschüttler	IRC-1-U (Adolf Kühner AG, Switzerland) Innova® 43/43R (New Brunswick Scientific, USA) Innova® 4330 (New Brunswick Scientific, USA) GFL 3017 (GFL, Deutschland)
PCR Cycler	Mastercycler personal, gradient (Eppendorf, Hamburg) peqSTAR 96X (Peqlab) T100 Thermal Cycler (Biorad)
FPLC	ÄKTA Purifier P-901 (GE Healthcare, UK)
Thermomixer	Thermomixer comfort (Eppendorf, Germany)
CD Spektrometer	J-815 (Jasco, UK)
DLS-Gerät	SpectroSIZE 300 (Xtal-Concepts) Spectro Light 500 (Xtal-Concepts)
Agarosegelkammer	PerfectBlue Gel System Mini M (Peqlab, Deutschland) PerfectBlue Gel System Mini L (Peqlab, Deutschland)
SDS-Gelkammer	Hoefer MightySmall II
Mikroskop	Nikon Ti Eclipse
Western Blot Apparatur	Semi Dry Blotter Maxi (VWR)
MST-Gerät	Monolith™ NT.115 (MST Nanotemper, Deutschland)
Kristallisationsroboter	Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA)
Geldokumentation	VersaDoc MP5000 (Biorad)
Phosphor Imager	Molecular Imager FX (Biorad)
pH-Meter	SevenEASY (Mettler Toledo, USA)
Sonifikator	Branson Sonifier 250/450 (Emerson Electric Co, USA)
Waagen	TE3102S (Sartorius AG, Germany) LP224S-0CE (Sartorius AG, Germany)
Isotherme Titrationskalorimetrie	MicroCal iTC200 (Malvern)

#### 6.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Standardchemikalien zur Herstellung von Puffer und Lösungen wurden in analytischer Qualität von den Firmen AppliChem, Fluka, Merck, Thermo Scientific, Roth,

Serva und Sigma-Aldrich bezogen. Die Chemikalien für spezielle Anwendungen sind im Folgenden aufgeführt

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Life Technologies
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Albumin, IgG-frei (BSA)	Roth
Ammoniumpersulfat	Merck Millipore
Ampicillin-Natriumsalz	Roth
Coomassie® Brilliant Blue	Serva
Ethidiumbromid	AppliChem
Gentamicin	Sigma
Glutaraldehyd, 25% Lösung	Sigma
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Rot
Kanamycin	Roth
L-Arabinose	Roth
Lysotracker®	Invitrogen
Milchpulver	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumfluorid	Merck Millipore
Polysorbate (Tween) 20	Fluka Biochemica
Rotiphorese® Gel 30 (37.5:1) Rotiphorese® Gel 40 (19:1)	Roth

### 6.1.3 Puffer, Medien und Lösungen

Tabelle 9: Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung
50X TAE	500 mM Tris-Base 5.7% (w/v) Essigsäure 50 mM EDTA-Natriumsalz

Tabelle 10: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE und den Western Blot

Bezeichnung	Zusammensetzung
1X Elektrodenpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-HCl 0.1% (w/v) SDS

	pH 8.3
Sammelgelpuffer	1.5 M Tris-HCl pH 8.8 0.4% (w/v) SDS
Trenngelpuffer	0.5 M Tris-HCl pH 6.8 0.4% (w/v) SDS
5X Probenpuffer	50 mM Tris-HCl pH 6.8 10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerin 125 mM DTT 0.1% (w/v) Bromphenolblau
Coomassie-Lösung	0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 25% (v/v) 2-Propanol 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbe-Lösung	20% (v/v) Essigsäure
Transferpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 20% Isopropanol (v/v)
TBS-T	50 mM Tris pH 7.5 150 mM NaCl 0.1 % Tween-20 (v/v)
Blockierlösung	5 % Milchpulver (w/v) In TBS-T
ECL-Lösung A	100 mM Tris pH 8.5 2.5 mM Luminol 0.4 mM p-Cumarinsäure
ECL-Lösung B	100 mM Tris pH 8.5 0.1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Tabelle 11: Verwendete Puffer für den NS1 N-Terminus.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysispuffer	50 mM Tris pH 8.0 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
Waschpuffer Ni-NTA	50 mM Tris pH 7.5 300 mM NaCl 40 mM Imidazol
Elutionspuffer Ni-NTA	50 mM Tris pH 7.5 300 mM NaCl 400 mM Imidazol
Gelfiltrationspuffer	20 mM Tris pH 8.0 150 mM NaCl 5% (v/v) Glycerin 1 mM DTT

Kristallisationspuffer	20 mM Tris pH 8.0 150 mM NaCl 5% (v/v) Glycerin 1 mM DTT 100 mM L-Arginin
MST-Puffer	50 mM HEPES pH 7.5 200 mM NaCl
Nuklease-Puffer	50 mM Tris pH 8.0 50 mM NaCl 1 mM DTT 0.1 mg/mL BSA
EMSA-Puffer	50 mM Tris pH 8.0 10% Glycerin 100 mM NaCl 1 mM EDTA
ITC-Puffer	50 mM HEPES pH 7.5 300 mM NaCl

Tabelle 12: Verwendete Puffer für den NS1 C-Terminus

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysispuffer	50 mM Tris pH 7.5 500 mM NaCl 10 mM Imidazol 10% Glycerin (v/v)
Waschpuffer Ni-NTA	50 mM Tris pH 7.5 500 mM NaCl 20 mM Imidazol 10% Glycerin (v/v)
Elutionspuffer Ni-NTA	50 mM Tris pH 7.5 500 mM NaCl 500mM Imidazol 10% Glycerin (v/v)
Gelfiltrationspuffer	50 mM Tris pH 7.5 500 mM NaCl 10% Glycerin (v/v)

Tabelle 13: Verwendete Puffer für Apoptin-His<sub>6</sub>.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysispuffer	50 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl 10% Glycerin (v/v)
Denaturierungspuffer	50 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl

	10% Glycerin (v/v) 8 M Harnstoff
Ni-NTA Elutionspuffer	50 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl 10% Glycerin (v/v) 500 mM Imidazol
CD-Puffer	50 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaF

Tabelle 14: Verwendete Puffer für MBP-Apoptin

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysispuffer/Gelfiltrationspuffer	50 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl
Amylose-Elutionspuffer	50 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl 20 mM Maltose
Ni-NTA Elutionspuffer	50 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl 10% Glycerin (v/v) 500 mM Imidazol
CD-Puffer	50 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaF
SAXS-Puffer	50 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl 1 mM DTT

Tabelle 15: Medien und Puffer für die *E. coli* und *Sf9* Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
LB-Medium	5 g/L Hefeextrakt 10 g/L Trypton 5 g/L NaCl
ExCell 420 Medium	Sigma
1xPBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 12 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.2
Hypo-Puffer	10 mM HEPES pH 7.5 10 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Kryo-Puffer	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 12 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.2 30% Glycerin

## 6.1.4 Proteinsequenzen

### 6.1.4.1 MBP-Apoptin

MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGY  
 AQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSIIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAK  
 GKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENKDYDIKDVGVNAGAKAGLTFLVDLIKHKHMNADTDYSI  
 AEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENY  
 LLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGR  
 QTVDEALKDAQTNSSSSNNNNNNNNNLGIEGRISEFENLYFQGNALQEDTPPGPSTVFRPPTSSRPLETPH  
 CREIRIGIAGITITLSLGCANARAPTLRSATADNSESTGFKNVPDLRTDQPKPPSKKRSCDPSEYRVSELKES  
 LITTTSPSRPRTARRRIRL

### 6.1.4.2 H-1PV NS1

MAGNAYSDEVLGVTNWLDKDKSSQEVFSFVFNENNVQLNGKDIGWNSYRKELQDDELKSLQRGAETTWQDQ  
 SEDMEWESAVDDMTKKQVFIFDSLKCLFEVLSTKNIAPSNVTWVQHEWGKQDQGWCHVLIKKDFG  
 QPQGWRRQLNVYWSRWLVTACNVQLTPAERIKLREIAEDSEWVTLTYKHKHTKKDYTKCVLFGNMI  
 AYYFLSKKIKTSPPRDGGYFLSSDSGWKTNFKKEGERHLVSKLYTDEMMPETVETTVTTAQEAQRGRIQTR  
 KEVSIKTTLKVHVRVTSPEWMMMQPDSYIEMMAQPGGENLLKNTLEICTLTLARTKTAFLILEKAET  
 SKLANFSMASTRTRCIFAHEGWNYIKVCHAICCVLNRQGGKRNTVLFHGPASTGKSIIAQAIQAQAVGNVGCY  
 NAANVNFNDCTNKNLIWVEEAGNFGQVNFKAICSGQTIRIDQKGGKSKQIEPTPVIMTTNENITVVRI  
 GCEERPEHTQPIRDRMLNIHLRTRTPGDFGLVDKHEWPLICAWLVKNGYQSTMACYCAKWGKVPDWSED  
 WAEPKLDTPINSLGSMRSPSLTPRSTPLSQNYALTPLASDLADLALPWPSTPNTPVAGTAASQNTGEAGST  
 ACQGAQRSPTWSEIEADLRACFSQEQLSEDFNEELTD

### 6.1.4.3 TbCatB

MHLMRACITFCIASTAVVAVNAALVAEDAPVLSKAFVDRVNRLNRGIWKAKYDGVMQNITLREAKRLNGV  
 IKNNNNASILPKRRFTEEEARAPLSSFDSAEAWPNCPTIPQIADQSACGSCWAVAAAASAMSDRFCTMGGV  
 QDVHISAGDLLACCSDCGDCNGGDPDRAWAYFSSTGLVSDYCPYPFPHCSHHSKSKNGYPPCSQFNFDT  
 PKCNYTCDDPTIPVVNYRSWTSYALQGEDDYMRELFRRGPFVAFDVYEDFIAYNSGVYHHVSGQYLGGHA  
 VRLVGWGTSGVPPYWKIANSWNTWEGMDGYFLIRRSSECGIEDGGSAGIPLAPNTA

### 6.1.4.4 GFP- $\mu$ NS

MSRVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQ  
 CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEFGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHK  
 LEYNYNSHNVIYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDP  
 NEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKAALLSKISGLQRLNRELSLKLADVQPAREDHLLAYLNEHVCVNA  
 KAHEKDLLSRCNVSGDSIDAVITQRVKNRDRFETRLRQEANAWEPRIVALTQELAQARAEQQEMMTQSL  
 QYLTERDEMAQELDELKREVASLRAANVRLNADNHRISRATKV

### 6.1.5 E. Coli Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
BL21Star™ (DE3)	F- <i>ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen
BL21-AI™	F- <i>ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen
BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
DH5α™	F- Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)</i> U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
DH10Bac™	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu)</i> 7697 <i>galU galK λ- rpsL nupG/ pMON14272/pMON7124</i>	Invitrogen

### 6.1.6 Vektoren

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
pRSETA	T7 Promoter, Amp <sup>R</sup> , N-term. (His) <sub>6</sub> -tag, Enterokinase Schnittstelle	Invitrogen
pASK- IBA33plus	Tet-Promoter, Amp <sup>R</sup> , C-term. (His) <sub>6</sub> -tag	IBA
pFastBac1	Polyhedrin-Promoter, Tn7R, Tn7L, Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Invitrogen
pMAL c2x	Tac-Promoter, Amp <sup>R</sup> , N-Terminales MBP-Fusionsprotein, Faktor Xa- Schnittstelle	NEB

### 6.1.7 Oligonukleotide für die Klonierung

Tabelle 16: Oligonukleotide zur Klonierung der NS1-Konstrukte in pRSETA

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge
Full frw	GCAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGCTGGAAACGCTTACT CCG	49
Full rev	GCAAAGCTTTTAGTCCAAGGTCAGCTCCTC	30
1-284 rev	GCAAAGCTTTTAAATCGAGACCTCCTCTCTAGTTTG	36
285-526 frw	GCAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGAAAAACCACACTCAAAG AGTTGGTAC	55
285-526 rev	GCAAAGCTTTTACACCAAACCAAAGTCACCAG	32
258-542 rev	GCAAAGCTTTTAACCATTTTCACCAACCAAGC	33
543-672 frw	GCAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGATACCAATCTACCATGG CTTGTTACT	55
1-265 QC frw	CGGTCGAGACCACAGTGTAGACTGCACAGGAAGCTAAG	38
1-265 QC rev	CTTAGCTTCTGTGCAGTCTACACTGTGGTCTCGACCG	38

Tabelle 17: Oligonukleotide zur Klonierung der Apoptin-Konstrukte in pASK-IBA33

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge
Apo frw	ATGGTAGGTCTCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCC	40
Apo rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTCAGTCTTATACGCCTTCTTGCGG	41

Tabelle 18: Oligonukleotide zur Klonierung der Apoptin-Konstrukte in pMAL-c2x

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge
MBP frw	CGACGGAATTCGAAAACCTGTATTTTCAGGGAAACGCTCTCCAAGA AGATACTCC	55
MBP rev	CGAGGATCCTTACAGTCTTATACGCCTTCTTGC	33

Tabelle 19: Oligonukleotide zur Klonierung der Gene für das pFastBac1 Screening-Systems

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge
NS1 N frw	GCTGGAAACGCTTACTCCGATGA	23
NS1 255 rev	CTCATCAGTATACAGTTTGCTCACTAGATGGC	32
NS1 256 frw	ATGAAACCAGAAACGGTCGAGACC	24
NS1 546 rev	GGTAGATTGGTAACCATTCTTCACCAACCA	30
NS1 547 frw	ATGGCTTGTTACTGTGCTAAATGGGG	26
NS1 C rev	GTCCAAGGTCAGCTCCTCGTTGA	23
Apo frw	AACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACC	26
Apo rev	CAGTCTTATACGCCTTCTTGCGGTT	25

Tabelle 20: Oligonukleotide zur Klonierung der Kompartimentmarker für Sf9-Zellen..

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge
Fringe-GFP frw	GATCGGATCCTAAATCATGATGAGCCTGACTGTG	34
Fringe-GFP rev	GATCGAATTCTCAGCCCATGGTTCGAAG	28
PEMT-GFP frw	GATCTCTAGATCCAAAATGTATAAAACCGAGAGC	34
PEMT-GFP rev	GATCAAGCTTCTATCCGCTTTCACGACTT	30
GFP-SKL frw	GATCGGATCCATCATGGTGAGCAAGGGCGAG	31
GFP-SKL rev	GATCCTCGAGTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	33

Tabelle 21: Oligonukleotide zur Klonierung der TbCatB-Varianten.

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge
CatB-WT frw	GATCGGATCCATGCATCTCATGCGTGCCT	34
CatB-WT rev	GATCCTCGAGCTACGCCGTGTTGGGTG	28
CatB-SKL frw	GATCGGATCCATGCATCTCATGCGTGCCT	34
CatB-SKL rev	GATCCTCGAGCTACAGCTTGGACGCCGTGTTGGGTG	30

Tabelle 22: Oligonukleotide zur Herstellung der modifizierten pFastBac1-Vektoren.

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge
pFastBac-ER frw	GATCGAATTCATGCATCTCATGCGTGCCTGCATCACATTT TGTATCGCTTCGACGGCTGTAGTCGCCGTAAACGCCGGCG CCTAAAAGCTTGATC	95
pFastBac-ER rev	GATCAAGCTTTTAGGCGCCGGCGTTTACGGCGACTACAGC CGTCGAAGCGATACAAAATGTGATGCAGGCACGCATGAGA TGCATGAATTCGATC	95
pFastBac-KDEL frw	GATCGAATTCATGCATCTCATGCGTGCCTGCATCACATTT TGTATCGCTTCGACGGCTGTAGTCGCCGTAAACGCCGGCG CCAAAGATGAACTGTAAGCTTGATC	107
pFastBac-KDEL rev	GATCAAGCTTTTACAGTTCATCTTTGGCGCCGGCGTTTAC GGCGACTACAGCCGTCGAAGCGATACAAAATGTGATGCAG GCACGCATGAGATGCATGAATTCGATC	107
pFastBac-SKL frw	GATCGAATTCATCATGGGCGCCAGCAAAGCTGTAAGCTT GATC	44
pFastBac-SKL rev	GATCAAGCTTTTACAGTTTGTGGCGCCCATGATGAATTC GATC	44
pFastBac_frw	GATCGAATTCATGGGCGCCTAAAAGCTTGATC	32
pFastBac_rev	GATCAAGCTTTTAGGCGCCCATGAATTCGATC	32

### 6.1.8 Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikverbrauchswaren wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Zellkulturflaschen etc. wurden von Sarstedt (Deutschland) bezogen. Zur Konzentration von Proteinlösungen wurden *Amicon Ultra* Filtrationskonzentratoren von Merck Millipore verwendet. Für die *Western Blot* Experimente wurde *Rotilabo* Nitrocellulose-Membran sowie Whatman-Filterpapier der Firma Roth verwendet. Die Ni-NTA Affinitätsmatrix wurde von Qiagen und die Amylose-Affinitätsmatrix von New England Biolabs bezogen.

### 6.1.9 Enzyme

Enzym	Hersteller
BamHI	New England BioLabs
DpnI	New England BioLabs
FastAP	Thermo Scientific
HindIII	New England BioLabs
Pfu DNA Polymerase	Thermo Scientific
SfoI	New England BioLabs
T4 DNA Ligase	New England BioLabs
T4 Polynukleotidkinase	Thermo Scientific
Taq DNA Polymerase	New England BioLabs

TEV-Protease	Sigma Aldrich
XbaI	New England BioLabs
XhoI	New England BioLabs

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Bioinformatische Methoden

#### 6.2.1.1 Sequenz-Alignment

Alle Sequenz-Alignments wurden mit Hilfe der Webserver-basierten Software ClustalW2<sup>177</sup> unter Verwendung des langsamen Algorithmus durchgeführt und mit Hilfe von BioEdit präsentiert.

#### 6.2.1.2 Berechnung von theoretischen Molekulargewichten und Extinktionskoeffizienten

Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Zielproteine wurden unter Zuhilfenahme des Webserver-basierten *Expasy*-Tools ProtParam durchgeführt<sup>230</sup>.

#### 6.2.1.3 In silico Modelling

Die *in silico* Strukturberechnungen der NS1-Domänen wurden mit Hilfe des Intensiv-Modus des *Phyre2*-Algorithmus durchgeführt<sup>180</sup>. Als Input wurde die Aminosäure-Sequenz des NS1 aus der NCBI FASTA Datenbank verwendet (NC\_001358.1) und das berechnete Modell anschließend als PDB-Datei heruntergeladen.

### 6.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 6.2.2.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

50 µL Zellsuspension chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 15 Minuten auf Eis aufgetaut und mit 100-300 ng DNA bzw. 10 µL Ligationsprodukt versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen zwei Minuten auf Eis gekühlt und mit 500 µL LB-Medium versetzt. Es folgte eine einstündige Regenerationsphase bei 37 °C und 300 rpm im Eppendorf Thermomixer Comfort. Die Zellsuspension wurde anschließend entweder auf Antibiotika-haltigen LB- Agarplatten ausgestrichen oder direkt in flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 6.2.2.2 Plasmidisolation

Zur Plasmidisolation wurden Kolonien von einer LB-Agar Platte gepickt gepickt und in je 4 mL LB-Medium über Nacht bei 37 °C / 220 rpm inkubiert. Die Plasmidisolierung wurde am Folgetag mit Hilfe des GeneJet Miniprep Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung der Plasmidkonzentration erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm mit dem Nanodrop ND-1000 der Firma PEQLAB.

### 6.2.2.3 Rekombinante Genexpression in *E. coli* Zellen

50 µL Zellsuspension eines geeigneten *E. coli* Stammes wurden wie unter 6.2.2.1 beschrieben transformiert und über Nacht in 200 mL LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm im Orbitalschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde je 1 L LB-Medium mit je 10-50 mL Vorkultur inokuliert und bei 37 °C inkubiert, bis die gewünschte OD<sub>600</sub> erreicht war. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG (T7-Promoter und tac-Promoter Konstrukte) bzw. 214 nM Anhydrotetracyclin. Die Zellen wurden anschließend bei der gewünschten Temperatur für einen definierten Zeitraum inkubiert. Am Ende der Expression wurden die Zellen bei 4000 x g pelletiert und bei – 20 °C gelagert. Die Parameter zur Expression der einzelnen Konstrukte sind Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 23: Expressionsparameter der einzelnen Konstrukte zur rekombinanten Proteinherstellung in *E. coli* Zellen.

Konstrukt	<i>E. coli</i> Stamm	Induktion			
		OD <sub>600</sub>	Induktor	T	Zeit
pRSETA-NS1 1-284	BL21 (DE3)	0.6	1 mM IPTG	37 °C	4h
pRSETA-NS1 1-265	BL21 (DE3)	0.6	1 mM IPTG	37 °C	4h
pRSETA-NS1 285-526	BL21 AI (DE3)	0.6	1 mM IPTG	25 °C	4h
pRSETA-NS1 543-672	BL 21 (DE3)	0.6	1 mM IPTG	30 °C	5h
pASK-IBA33-Apoptin	BL21 Star (DE3)	0.6	214 nM AHT	37 °C	4h
pMAL c2x-Apoptin	BL21 (DE3)	0.6	1 mM IPTG	37 °C	4h

### 6.2.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde, wenn nicht anders erwähnt, nach Herstellerangaben mit der *Pfu* oder *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific), unter Verwendung folgender Standardparameter durchgeführt:

Komponente	Konzentration
DNA <i>Template</i> Vektor	1 – 50 ng
dNTPS	2 mM
Polymerase-Puffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM ( <i>Taq</i> )
Frw Primer	1 pmol
Rev Primer	1 pmol
Polymerase	1 U
dH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

	PCR-Zyklus	Dauer ( <i>Taq</i> / <i>Pfu</i> )	
1)	Init.Denaturierung	5 min	95 °C
2)	Denaturierung	1 min	95 °C
3)	Primer-Annealing	1 min	55 °C
4)	Elongation	1/2 min kb <sup>-1</sup>	72 °C

Die Schritte 2) bis 4) wurden insgesamt 30 mal wiederholt.

#### 6.2.2.5 DNA-Restriktion und Reinigung

Für die Klonierung wurden die amplifizierten PCR-Produkte sowie die Zielvektoren mit den vom Hersteller empfohlenen Mengen an Restriktionsenzymen (NEB oder Thermo Scientific) für 1-3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Hilfe des GeneJet DNA Extraction Kits (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photospektrometrisch am Nanodrop 2000 (Pqlab) durch Detektion der Emissionswellenlänge bei 280 nm.

#### 6.2.2.6 DNA-Ligation

Die Ligation der PCR-Produkte in die Zielvektoren erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, nach folgendem Protokoll:

Komponente	Menge
Vektor	50 ng
PCR-Produkt	3-5 – facher molarer Überschuss
T4 DNA Ligase Puffer	1x
T4 DNA Ligase	1 U
dH <sub>2</sub> O	ad 20 µL

Für die Blunt End Klonierung wurde zusätzlich eine finale PEG6000-Konzentration von 5% verwendet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen mit 10 µL des Reaktionsansatzes wie beschrieben transformiert (6.2.2.1).

#### 6.2.2.7 Zielgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese wurde ein Stopp-Codon in die codierenden Sequenz von NS11-284 nach Val-265 eingebaut, um die Expression des trunkierten NS1<sub>1-265</sub> zu ermöglichen. Dafür wurde das *Agilent Quikchange Mutagenesis Kit I* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind unter 6.1.7 in Tabelle 16 zu finden.

### 6.2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 6.2.3.1 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Zellen einer Expressionskultur wurden in einem geeigneten Puffer resuspendiert (siehe 6.1.3, Tabelle 11) und durch Sonifikation auf Eis lysiert. Nach 45-minütiger Zentrifugation bei 18000 x g und 4 °C wurde der Überstand auf eine mit Lysispuffer äquilibrierte Ni-NTA Säule (Qiagen) aufgetragen und mit einer Flussrate von ca. 3 ml/min an das Chromatographie-Material gebunden. Anschließend wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch Zugabe von 3-5 Säulenvolumen Elutionspuffer (200-400 mM Imidazol) in 5-10 mL Fraktionen, die Reinheit wurde anschließend mittels SDS-PAGE überprüft.

#### 6.2.3.2 Amylose-Affinitätschromatographie

Der Zellaufschluss für die Amylose-Affinitätschromatographie erfolgte wie in 6.2.3.1 beschrieben. Nach Bindung des Proteins an die Amylose-Matrix (NEB) erfolgte die Elution durch Zugabe von 3-5 Säulenvolumen Elutionspuffer (20 mM).

#### 6.2.3.3 Größenausschlusschromatographie

Je nach Protein und Anwendung wurde entweder eine Superdex 75 16/60 prep grade oder eine Superdex 200 16/60 prep grade Säule an ein *ÄKTA purifier* System (GE Healthcare) angeschlossen und zunächst mit 1 Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Anschließend wurden 5 mL einer konzentrierten Proteinlösung auf die Säule aufgetragen

und das Zielprotein isokratisch in 1.2 Volumen Gelfiltrationspuffer mit einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Dabei wurde die Absorption kontinuierlich bei 220 nm sowie 280 nm mit Hilfe einer UV-Detektionseinheit bestimmt. Die Reinheit der Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

#### 6.2.3.4 Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentration in Lösung wurde spektrophotometrisch bei 280 nm mit einem Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wie folgt bestimmt:

$$A_{280nm} = \epsilon d c \quad (1)$$

Dabei entspricht  $\epsilon$  dem molaren Extinktionskoeffizienten,  $d$  der Schichtdicke der Küvette in cm und  $c$  der molaren Proteinkonzentration. Der molare Extinktionskoeffizient für das entsprechende Zielprotein wurde mit Hilfe der ExPASy-Software ProtParam<sup>231</sup> berechnet und entsprechend in die Formel eingesetzt.

Tabelle 24: Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) der verwendeten Proteine.

Protein	Molekulargewicht [g mol <sup>-1</sup> ]	$\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
NS1 <sub>1-265</sub>	30922.9	84910
NS1 <sub>1-284</sub>	33077.4	84910
NS1 <sub>543-672</sub>	15966.6	42970
Apoptin	13166.9	1490
MBP-Apoptin	56959.3	69330
TbCatB	37223.7	71850
GFP- $\mu$ NS	45137.0	30370

#### 6.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine einfache analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. Durch das an die Seitenketten bindende SDS erhalten alle Proteine eine negative Ladung und wandern in einem Polyacrylamidgel ausschließlich auf Basis ihres Molekulargewichts. Bei dem von Laemmli entwickelten diskontinuierlichen SDS-PAGE-System werden die Proteine zunächst in einem niedrigprozentigen Sammelgel mit pH 6.8 fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Gel mit pH 8.8 aufgetrennt<sup>232</sup>. Für das Trenngel wurden Acrylamid-Konzentrationen von 10-15%

verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1x Probenpuffer gemischt und 10 min bei 95 °C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA pro Gel in 1x Elektrodenpuffer bei RT, bis die Bromphenol-Lauffront das Ende des Gels erreichte. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese für 1-3h in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend mit Entfärbe-Lösung bis zum Erreichen des gewünschten Kontrasts entfärbt. Alle Puffer und Lösungen sind Tabelle 10 in 6.1.3 zu entnehmen.

#### 6.2.3.6 *Tobacco Etch Virus* (TEV) Protease-Verdau

Die *TEV*-Protease ist eine Cysteinprotease und erkennt die Peptidsequenz ENLYFQG, wobei die proteolytische Spaltung zwischen Q und G erfolgt. Zur Entfernung des N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags wurde das Zielprotein in einem molaren Verhältnis von 1:20 mit *TEV*-Protease (Sigma) versetzt und unter Zugabe von 1 mM DTT über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Effizienz der Spaltung wurde anschließend mittels SDS-PAGE verifiziert.

#### 6.2.3.7 *Microscale* Thermophorese

Für die *Microscale* Thermophorese wurden zunächst 100 µg NS1 1-284 Protein mit Hilfe des *Monolith™ Protein Labeling Kit RED-NHS* nach Herstellerangaben mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff über Lysinreste markiert. Anschließend wurde das markierte Protein 45 Minuten bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert, in einer Konzentration von 47 nM mit verschiedenen Mangan- sowie Magnesiumchlorid-Konzentrationen gemischt (50 mM – 1 µM) und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte in je 16 Kapillaren des Typs *Monolith™ NT.115 Hydrophilic* an einem *Monolith™ NT.115* Gerät. Dabei wurde eine LED-Power von 50% sowie eine IR-Power von 10% verwendet. Alle Verbrauchsmittel sowie das verwendete Gerät stammen von der Firma MST Nanotemper (München, Deutschland).

#### 6.2.3.8 Thermofluor-Assay

Der Thermofluor-Assay diente der Bestimmung der Proteinstabilität in Lösung unter Verwendung unterschiedlicher Puffer und Additive. Durch Bindung des Farbstoffes SYPRO Orange (Life Technologies) an hydrophobe Regionen des Proteins kann der Denaturierungsprozess bei der Erhitzung der Proteinprobe verfolgt werden. Für NS1<sub>1-265</sub> wurden 13.6 µM Protein mit 5X SYPRO-Orange und dem zu testenden Reagenz in einem Gesamtvolumen von 20 µL vereint. Die Messungen erfolgten in 96-well PCR Platten mit optischen Deckeln (Thermo Scientific) an einem Mx3005P qPCR-Cycler (Stratagene) von

25 – 95 °C bei einer Heizrate von 1 °C/min. Die Bestimmung des Schmelzpunktes  $T_m$  erfolgte anschließend mit Hilfe der Boltzmann-Funktion der *Graphpad Prism* Software.

#### 6.2.3.9 Limitierte Proteolyse

Mit der limitierten Proteolyse können flexible Bereiche in Proteinen detektiert und entfernt werden, um eine erhöhte Proteinstabilität für die Kristallisation herbeizuführen. Für die analytischen Experimente wurde eine 4 mg/mL NS1<sub>1-284</sub> Lösung mit molaren Verhältnissen von 1:10, 1:100 und 1:1000 der Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Proteinase K für 30 min bei RT inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1X SDS-Probenpuffer gestoppt. Anschließend wurde das Ergebnis der Proteolyse per SDS-PAGE analysiert. Die zugehörige massenspektrometrische Analyse der Banden ist in 6.2.4.5 beschrieben. Für den präparativen Verdau von NS1<sub>1-284</sub> wurde das Protein im molaren Verhältnis von 1:100 mit Trypsin gemischt und die Reaktion nach 30 min Inkubationszeit bei RT durch Zugabe von 1 mM PMSF abgestoppt.

#### 6.2.3.10 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mittels EMSA kann die Interaktion zwischen Nukleinsäuren und Proteinen durch die Änderung der elektrophoretischen Eigenschaften im Polyacrylamid- oder Agarosegel analysiert werden. In Folge der Komplexbildung kommt es im Gel zu einer Verschiebung der detektierten DNA-Bande und somit zu einem größer erscheinenden Molekulargewicht. Das Ausmaß der Verschiebung ist dabei abhängig vom Molekulargewicht des Komplexes sowie vom isoelektrischen Punkt des Proteins. Zur Untersuchung der DNA-Bindungsspezifität von NS1<sub>1-265</sub> wurde zunächst eine 5 µM dsDNA Lösung aus den jeweils komplementären Einzelstrang-Oligonukleotide (siehe Tab. in) durch Erhitzen auf 95 °C und langsames Abkühlen auf RT hergestellt. Für den Assay wurden 125 nM dsDNA mit ansteigenden Proteinkonzentrationen in EMSA-Puffer (siehe Tab) 30 min bei RT inkubiert und die Proben anschließend in 1x *DNA Loading Dye* (Thermo Scientific) in einem nativen 12% TAE-Polyacrylamidgel unter Kühlung bei 130 V aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend in einer 1x SYBR Gold (Life Technologies) Lösung für 15 min bei RT gefärbt und die Banden mittels UV detektiert.

Tabelle 25: Oligonukleotide für den EMSA mit NS1<sub>1-265</sub>

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge
footprint frw	CTCCCTGAACCGCTTATCATTTCATTTTAGAACTGACCAACCATGTTTCAC	46

footprint rev	GTGAACATGGTTGGTCAGTTCTAAAAATGATAAGCGGTTTCAGGGAG	46
Random 1 frw	CTAAAAGAAAAGCTTGATTACCGAAAACCTCCAGCCGACCCCGAAC	44
Random 1 rev	GTTCGGGGTCGGCTGGGAGTTTCGGTAATCAAGCTTTCTTTTAG	44
Random 2 frw	GATTGCTTATTACTTTTTAAGCTAAAAGAAAATATGTACCAGTCCACC	48
Random 3 rev	GGTGGACTGGTACATATTTTCTTTTAGCTTAAAAAGTAATAAGCAATC	48

### 6.2.3.11 Nuklease-Aktivitätstest

Zur Herstellung des Nuklease-Substrats wurden zunächst 500 pmol des Frw-Stranges (siehe Tabelle 26: Verwendete Oligos für den Nuklease-Assay) mit T4 Polynukleotidkinase (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben mit  $\gamma$ -32P ATP (Roche) radioaktiv markiert. Anschließend wurde dieser mit 500 pmol des komplementären Rev-Stranges durch Erhitzen auf 80 °C und langsames Abkühlen zu einem partiellen Doppelstrang zusammengelagert. Zur Bestimmung der Nuklease-Aktivität wurde jeweils 1 pmol Substrat mit 5  $\mu$ M NS1 1-265 für 4h bei 37 °C unter Zugabe von 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 1 mM in Nuklease-Puffer (6.1.3 Tabelle 11) inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 1X Denat-Dye (siehe Tab.) in einem 10%igen denaturierenden 7M Urea-Polyacrylamidgel unter Verwendung von 1 X TBE Laufpuffer. Das Gel wurde 3h bei – 20°C mit einem Phosphoscreen (GE Healthcare) exponiert und anschließend mit einem *Molecular Imager FX™* unter Verwendung der *Quantity One* Software (Biorad) analysiert.

Tabelle 26: Verwendete Oligos für den Nuklease-Assay.

Bezeichnung	Sequenz	Länge
Nick frw	AAACTCCCTGAACCGCTTATCATTTTTAGAACTGACCAACCATGTTTCACGTAAGT GACGT	60
Nick rev	ACGTCACCTACGTGAACATGGTTGGTCAGTTCTAAA	36

### 6.2.3.12 Quervernetzung von MBP-Apoptin

Zur Quervernetzung wurde MBP-Apoptin auf 1 mg/mL konzentriert und mit 0.05 % Glutaraldehyd (v/v) für 3 min inkubiert, wodurch primäre Amingruppen des Proteins miteinander verknüpft wurden. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 100 mM Tris pH 7.5 gestoppt. Nicht mit MBP-Apoptin reagiertes Glutaraldehyd wurde schließlich mittels Größenausschlusschromatographie entfernt.

### 6.2.3.13 Western Blot

Der Western Blot diente zum immunologischen Nachweis der TbCatB-Expression und der Kristallstabilität. Dabei wurden die Proteine nach der SDS-PAGE mit Hilfe des *Semi-Dry Blotting* Verfahrens bei einer angelegten Stromstärke von 0.8 mA/cm<sup>2</sup> für 1h auf eine

Nitrocellulosemembran (Roth) transferiert. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran 30 min durch Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBS-T für 30 min blockiert, gefolgt von der Inkubation mit dem im Kaninchen hergestellten  $\alpha$ -TbCatB Antiserum (1:1000) für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min erfolgte eine weitere Inkubation mit einem HRP-markierten  $\alpha$ -*rabbit* IgG Antikörper (1:5000, Santa Cruz) für 45 min bei RT. Die Membran wurde anschließend erneut gewaschen und schließlich mit je 2 mL der ECL-Lösungen A und B (siehe Tabelle 10) für 1 min inkubiert. Die Proteinbanden wurden schließlich mit dem VersaDoc Imager MX4000 (Biorad) unter Zuhilfenahme einer CCD-Kamera detektiert.

#### 6.2.3.14 Dot Blot

Mit Hilfe des Dot Blots wurde die Stabilität der GFP- $\mu$ NS-Kristalle untersucht. Dabei wurden die Kristalle für 5 min bei 10000 x g pelletiert und in einem gewünschten Testpuffer resuspendiert. Nach definierten Zeitintervallen wurde die Kristalllösung erneut zentrifugiert und 1  $\mu$ L des Überstands auf eine trockene Nitrocellulosemembran pipettiert. Der Nachweis des GFP-Teils des Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erworbenen monoklonalen mouse  $\alpha$ -GFP Antikörpers (Roche) nach dem bereits für den Western Blot beschriebenen Vorgehen (6.2.3.13).

#### 6.2.3.15 TbCatB Aktivitätstest

Die Bestimmung der TbCatB Aktivität erfolgte mit Hilfe des kommerziell erwerblichen *Cathepsin B Activity Fluorimetric Assay Kit* (Biovision) nach Herstellerangaben. Dafür wurden TbCatB-Kristalle in 50 mM Na-Acetat pH 3.5 für 1 h Stunde aufgelöst und die Lösung anschließend mit einem Amicon Ultra-4 Zentrifugenröhrchen (Millipore) auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Der Assay wurde für jede Konzentration und Gruppe in Triplikaten durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde einem TECAN reader infinite m200 pro bei 400 nm angeregt und die Emission bei 505 nm detektiert.

### 6.2.4 Biophysikalische Methoden

#### 6.2.4.1 Dynamische Laserlichtstreuung (DLS)

Mittels dynamischer Laserlichtstreuung (DLS) lässt sich die Verteilung hydrodynamischer Radien von Proteinen in Abhängigkeit der Viskosität  $\eta$  sowie des Diffusionskoeffizienten  $D_0$

näherungsweise bestimmen. Die experimentelle Bestimmung des hydrodynamischen Radius  $R_h$  erfolgte unter Verwendung der Stokes-Einstein-Gleichung:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_0} \quad (2)$$

Wobei  $k$  der Boltzmann-Konstanten und  $T$  der Temperatur entspricht. Zur Untersuchung der Dispersität von Proteinlösungen wurde die Probe zur Abtrennung großer Partikel für 45 Minuten bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Messungen erfolgten wahlweise mit 15 µL Proteinlösung in einer Quartz-Küvette an einem spectroLITE 300 oder mit 2 µL Proteinlösung unter Paraffinöl in einer Terazaki-Platte an einem spectroLITE 600 (X-Tal Concepts).

#### 6.2.4.2 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXS)

Mit Hilfe von SAXS kann die grobe Struktur von Makromolekülen in Lösung bestimmt werden. Dabei wird die elastische Beugung von Röntgenstrahlen an Proteinmolekülen bei Winkeln zwischen 0.1° und 10° ausgenutzt. Die SAXS-Experimente von NS1 1-265 erfolgten in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Gerhard Grueber von der Nanyang Technological University in Singapur. Dafür wurde das Protein wie in 6.2.3.1 und 6.2.3.3 beschrieben gereinigt und auf Konzentrationen zwischen 1.8 und 4.1 mg/mL eingestellt. Die Messungen erfolgten anschließend an einem BRUKER NANOSTAR SAXS Gerät in einem Volumen von 40 µL in einer vakuumverschlossenen Quartzküvette. Für MBP-Apoptin wurden die Proben im Konzentrationsbereich von 1.7 – 10.5 mg/mL an der P12 Beamline der Synchrotronstrahlungsquelle PETRAIII (EMBL, DESY Hamburg) in Probenvolumen von jeweils 20 µL. Zusätzlich zu den Proteinproben wurde in allen Fällen der identische Puffer zur Subtraktion der Hintergrundstreuung vermessen. Die initiale Prozessierung der Streudaten erfolgte mit dem Software-Paket PRIMUS<sup>233</sup>, wobei Aggregation sowie Faltung des Proteins jeweils mittels und Guinier- und Kratky-Plot analysiert wurden<sup>192,193</sup>. Der Streumassenradius  $R_g$  wurde durch Extrapolation der Streukurven auf die konzentrationsunabhängige Vorwärtsstreuung  $I(0)$  erhalten. Die Abstandsverteilungsfunktion  $P(r)$  sowie der maximale Partikeldurchmesser  $D_{max}$  wurden mit Hilfe von GNOM bestimmt<sup>195</sup>. Die *ab initio* Modelle wurden mit Hilfe der DAMMIF Software generiert<sup>197</sup>. Zum Vergleich der experimentellen Streudaten mit der theoretischen Streukurve der hochauflösenden MVM-NS1 Nuklease Struktur (PDB: 4PP4) wurde das Software-Paket CRY SOL verwendet<sup>194</sup>.

Tabelle 27: Messparameter für die SAXS-Experimente.

Instrument/Beamline	BRUKER NANOSTAR	P12 Beamline PETRAIII (DESY, Hamburg)
Strahldurchmesser	100 $\mu\text{m}$	200 x 120 $\mu\text{m}$
Wellenlänge ( $\text{\AA}$ )	1.3414	1.24
Belichtungszeit(s)	300/Zyklus	20/Zyklus

#### 6.2.4.3 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Mittels ITC wurde die Bindungsaffinität von  $\text{MnCl}_2$  an  $\text{NS}_{1-265}$  bestimmt. Dafür wurde  $\text{NS}_{1-265}$  Proteinlösung zunächst (6.1.3) über Nacht bei 4 °C gegen ITC-Puffer im Verhältnis 1:1000 (v/v) dialysiert. Die Messungen erfolgten anschließend an einem MicroCal 200 (Malvern) bei 25 °C mit einer Proteinkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  in einem Gesamtvolumen von 280  $\mu\text{L}$ . Dabei wurde die Messzelle kontinuierlich mit einer Rührgeschwindigkeit von 750 rpm gemischt. Zu dieser Lösung wurden 19 Injektionen á 2  $\mu\text{L}$  einer 500  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ -Lösung titriert und die entstehende Bindungsenthalpie quantifiziert. Um eine ausreichende Rückkehr des Signals auf die Basislinie zu gewährleisten, wurde ein Zeitraum von 150 s zwischen den einzelnen Injektionen gewählt. Die Auswertung und die Bestimmung des  $K_D$  erfolgten durch Verwendung des beiliegenden Origin-Softwarepakets.

#### 6.2.4.4 CD-Spektroskopie

Die CD-spektroskopischen Experimente erfolgten an einem Jasco J-815 Gerät in 1 mm Quartz-Küvetten mit einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{L}$ . Für Nah-UV-Experimente wurden Proteinkonzentrationen zwischen 3 und 10  $\mu\text{M}$  verwendet und 15 Messungen im Wellenlängenbereich von 260-190 nm mit einem Intervall von 0.1 nm durchgeführt, die anschließend durch arithmetische Mittelung vereint wurden. Zur Reduktion des Hintergrundsignals wurde der identische Puffer nach dem gleichen Verfahren gemessen und von dem Proteinsignal subtrahiert. Zur Bestimmung der thermischen Stabilität von  $\text{NS}_{1-284}$  wurde eine Schmelzkurve mit einer Heizrate von 1 °C/min aufgenommen und die Änderung des CD-Signals bei 208 nm detektiert. Im Vergleich dazu wurden für die Bestimmung der Tertiärstruktur-*fingerprints* Proteinkonzentrationen von 135  $\mu\text{M}$  im Wellenlängenbereich von 320-260 nm verwendet. Die Berechnung der molaren Elliptizität erfolgte in beiden Fällen nach

$$\theta_{molar} = 100 * \frac{\theta}{c * d}$$

wobei  $\theta$  der Elliptizität in mdeg,  $c$  der molaren Konzentration und  $d$  der Schichtdicke in cm entspricht. Die Sekundärstrukturanteile wurden nach der Referenz von Raussens *et al.* berechnet<sup>181</sup>.

#### 6.2.4.5 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-MS Experimente erfolgten in Kooperation mit Dr. Maria Trusch und dem wissenschaftlichen MS-Service am Fachbereich der Chemie der Universität Hamburg. Zum Nachweis der durch die limitierten Proteolyse abgespalteten Fragmente wurden die entsprechenden Banden der SDS-PAGE ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach mehrfachem Entfärben in 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 50% ACN wurde das Gelstück mit einer 12.5 ng/μL Trypsinlösung überschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die tryptischen Peptide wurden am nächsten Tag mit Hilfe von *Bond Elut OMIX C18*-Pipettenspitzen (Agilent) zunächst entsalzt und in 50% ACN, 0.1% TFA eluiert. Zur Konzentration der Peptide wurde das Lösungsmittel anschließend in einer Speedvac-Zentrifuge (Thermo Scientific) bei Anlegen eines Vakuums reduziert. Die Proben wurden auf einem *Anchor Chip* nach Mischen mit HBBA-Matrix immobilisiert und an einem Bruker UltrafleXtreme Smartbeam II Laser (Bruker) vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der firmeneigenen Bruker-Software des Gerätes.

#### 6.2.4.6 *In vitro* Proteinkristallisation und Datensammlung

Für die Untersuchung initialer Kristallisationsbedingungen wurden mit Hilfe eines Honeybee 961 Roboters (Genomic Solutions, USA) 0.5 μL Proteinlösung mit 0.5 μL Präzipitantenlösung eines von insgesamt fünf Hochdurchsatz-Screens (JCSG, Ammoniumsulfat, Morpheus, PACT, Cryos, alle Molecular Dimensions) in einer MRC2 *sitting drop* Platte vereint und mit einer transparenten Klebefolie abgedeckt. Die Inkubation erfolgte anschließend bei 20 °C über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten. Die Platten wurden dabei regelmäßig auf die Entstehung von Kristallen untersucht. Für die Kristallisation von NS1<sub>1-265</sub> wurde zunächst ein *seed stock* aus den im *Screening* gewachsenen Nadel-Clustern mit Hilfe des *seed bead kits* (Hampton Research) nach Herstellerangaben erstellt. Anschließend wurde 1 μL NS1<sub>1-265</sub> in Kristallisationspuffer (Tabelle 11) mit einer Konzentration von 4.1 mg/mL mit 1 μL Präzipitantenlösung (100 mM Bis-Tris pH 5.5, 12% (w/v) PEG3350) in einer MRC Maxi Platte vereint und 0.5 μL des *seed stocks* hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 20 °C für 96 h oder bis

Kristalle in den Platten erkennbar waren. Für die Datensammlung wurden die gewachsenen Kristalle in einem 400  $\mu\text{m}$  Nylon-Loop montiert und als Kryoschutz 40% Glycerin zur verwendeten Präzipitantenlösung hinzugefügt. Die Aufnahme der Daten erfolgte an der P11-Beamline des PETRAIII-Speicherringes am DESY in Hamburg unter Verwendung folgender Parameter:

Strahlungsquelle	P11-Beamline PETRAIII (DESY, Hamburg)
Wellenlänge	0.99 Å
Strahlgröße	100 x 100 $\mu\text{m}$
Detektor	PILATUS 6M
Rotationswinkel	0.2 °
Belichtungszeit	0.2 s

Die Daten wurden mit der Software XDS<sup>184</sup> integriert und mit Scala aus der CCP4-Suite<sup>189</sup> skaliert. Die Verfeinerung der Struktur erfolgte mit den Programmen Phenix<sup>187</sup> und Coot<sup>188</sup> sowie den zugehörigen Unterprogrammen. Die Moleküldarstellung wurde mit dem Grafikprogramm PyMOL<sup>234</sup> generiert

#### 6.2.4.7 Pulverdiffraktion

Für den Nachweis des kristallinen Charakters von GFP- $\mu\text{NS}$  wurden Pulverdiffraktionsexperimente an der P14-Beamline des PETRAIII-Speicherringes (DESY, Hamburg) durchgeführt. Dafür wurde eine GFP- $\mu\text{NS}$  Kristallsuspension in hypotonem Puffer durch Zentrifugation für 15 min bei 1000 x g in einer Glaskapillare mit einem Durchmesser von 0.5 mm pelletiert. Die Kapillare wurde anschließend mit Kristallwachs versiegelt und die Pulverdiffraktionsexperimente mit Belichtungszeiten zwischen 0.1 und 1 s und einer Photonendichte von  $10^{12}$  ph/sec durchgeführt.

#### 6.2.4.8 Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Um die Bildung von Salzkristallen während der SEM-Messungen zu verhindern, wurden die Kristalle zunächst für 5 min bei 14000 x g pelletiert und in  $\text{dH}_2\text{O}$  resuspendiert. Anschließend wurden unverzüglich 2  $\mu\text{L}$  Kristalllösung auf einen polierten Silikonträger pipettiert und für 15 min getrocknet. Die Aufnahmen erfolgten mit einem *FEI Helios Nanolap* Mikroskop bei einem Kammerdruck von  $10^{-6}$  bar und einer Elektronenbeschleunigungsspannung von 5 kV.

#### 6.2.4.9 *Second Order Nonlinear Imaging of Chiral Crystals* (SONICC)

Mit Hilfe der SONICC-Methode lassen sich chirale von nicht chiralen Kristallen unterscheiden. Dafür werden die Kristalle mit einem 1064 nm fs-Laserimpuls bestrahlt, was im Falle eines chiralen Kristalls zu einer Frequenzverdopplung des Photons führt<sup>235</sup>. Das resultierende Signal dieses als *second harmonic generation* (SHG) bezeichneten Prozesses kann folglich bei einer Wellenlänge von 532 nm detektiert werden. Für die Experimente wurde ein SONICC-Benchtop Gerät (Formulatrix) mit einer SHG-Belichtungszeit von 30 s verwendet.

#### 6.2.5 **Insektenzellkultur und Mikroskopie**

Die Insektenzellkultur von Sf9 Zellen erfolgte weitestgehend nach Vorschriften des *Bac-to-Bac Manuals* von Invitrogen. Alle Anpassungen und Optimierungen sind im Folgenden beschrieben.

##### Auftauen von Sf9 Zellen

Ein Kryoröhrchen mit 1E7 Sf9 Zellen wurde im Wasserbad aufgetaut und umgehend in 10 mL vorgewärmtes ExCell 420 Medium verdünnt. Die Zellen wurden 2 Minuten bei RT und 300 x g zentrifugiert und ein weiteres Mal mit Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 12 mL ExCell 420 Medium resuspendiert und in eine T75 Kulturflasche für die adhärenente Kultivierung gegeben und bei 27 °C inkubiert.

##### 6.2.5.1 Subkultivierung von Sf9 Zellen

Sobald die Sf9 Zellen 80-90% Konfluenz erreichten, wurden sie vorsichtig mit einem Zellschaber vom Flaschenboden getrennt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Für adhärenente Subkultivierung wurden 1E5 Zellen pro cm<sup>2</sup> Fläche in eine neue Kulturflasche gegeben und erneut bei 27 °C inkubiert. Für Suspensionskulturen wurden 5E5 Zellen/mL in aufrecht stehenden T75 (Totalvolumen: 20 mL) oder T175 (50 mL) bei 100 rpm und 27 °C inkubiert und spätestens bei einer Dichte von 5E5 Zellen/mL erneut verdünnt oder für Experimente eingesetzt.

#### 6.2.5.2 Herstellung von Kryo-Stabilaten

Zur Langzeitlagerung wurden Sf9 Zellen mit einer Dichte von  $1E7$  Zellen/mL in ExCell 420 Medium mit 10% DMSO (v/v) resuspendiert und in einem Mr. Frosty™ Einfrierbehälter (Thermo Scientific) bei  $-80$  °C gelagert.

#### 6.2.5.3 Transfektion von Sf9 Zellen mit Bacmid-DNA

Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren wurden  $8E5$  Zellen in logarithmischer Wachstumsphase ( $2-3E6$ /mL) in je ein 6-well gegeben und 1h bei RT inkubiert. Nach Adhäsion der Zellen an den Kulturschalenboden wurde das Penicillin-Streptomycin-haltige Medium gegen unsupplementiertes Medium ausgetauscht.  $2$  µg isolierte Bacmid-DNA sowie  $4$  µL ESCORT IV Transfektionsreagenz (Sigma) wurden getrennt in jeweils  $100$  µL unsupplementiertem Medium vorgelegt und die beiden Ansätze vereint. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit wurde der Ansatz tropfenweise auf ein 6-well pipettiert und die Zellen 4h bei  $27$  °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen Pen-Strep haltiges Medium getauscht und die Inkubation bei  $27$  °C für 2-3 Tage fortgesetzt, bis erste Zeichen der viralen Infektion erkennbar waren. Schließlich wurde der Viruspartikel-enthaltene Überstand der Zellen durch Zentrifugation bei  $4500$  x g für 5 Minuten klarifiziert, in ein neues Gefäß überführt und lichtgeschützt bei  $4$  °C gelagert (P1 Stock).

#### 6.2.5.4 Amplifikation der viralen Partikel

Analog zu 6.2.5.3 wurden  $8E5$  Zellen in ein 6-well ausgesät und mit  $200$  µL des P1 Stocks infiziert. Nach einer 2-3 tägigen Inkubation wurde der Überstand wie zuvor beschrieben erneut in ein neues Gefäß überführt (P2 Stock) und anschließend ebenfalls lichtgeschützt bei  $4$  °C gelagert. Zur Herstellung eines P3 Stocks mit höherem Virustiter wurde das Procedere entsprechend wiederholt.

#### 6.2.5.5 Titerbestimmung

Zur Bestimmung des Virustiters wurden zunächst  $1.7E5$  Sf9 Zellen in einem Volumen von  $100$  µL in je eine Vertiefung einer 96-well Platte mit rundem Boden ausgesät. Anschließend wurden  $100$  µL einer Virusverdünnung hinzugefügt, sodass sich eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:10000 ergab. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und für 18h bei  $27$  °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei  $300$  x g pelletiert und zweimal mit  $200$  µL 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in  $50$  µL PBS mit anti-gp64-APC

Antikörper (1:250, eBioScience) resuspendiert und 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 150 µL PBS resuspendiert und an einem FACScalibur (BD Bioscience) mittels Durchflusszytometrie bei 650 nm analysiert. Die Titerbestimmung erfolgte nach Mulvanie *et al.* durch Verwendung der Normalisierungsmethode<sup>236</sup>.

#### 6.2.5.6 Rekombinante Genexpression zur Ausbildung von intrazellulären Kristallen

8E5 Zellen/mL wurden mit einer m.o.i von 0.1-1 bei bekanntem Titer oder mit verschiedenen Verhältnissen zum Zellkulturvolumen (1:10, 1:100, 1:1000) eines nicht titrierten P3-Virusstocks infiziert und bei 27 °C inkubiert. Über 5 Tage hinweg wurden die Zellen auf Kristallwachstum mikroskopisch untersucht.

#### 6.2.5.7 Isolation von *in vivo* Kristallen

Nach intrazellulärer Kristallbildung wurden die Zellen für 5 Minuten bei 4000 x g pelletiert und in Hypo-Puffer resuspendiert (siehe 6.1.3 Tabelle 15). Für die Lyse wurde ein Verhältnis aus Zellkultur und Hypo-Puffer von 1:3 verwendet. Nach Hinzufügen von 100 U Benzonase (Merck Millipore) wurden die Zellen für 1h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und das Pellet erneut mit dem gleichen Volumen Hypo-Puffer durch starkes Vortexen resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 200 x g wurde erneut der Überstand abgenommen und mit dem bereits vorher abgenommenen Überstand vereint. Diese Suspension wurde anschließend für 10 min bei 4000 x g zentrifugiert und die Kristalle dadurch pelletiert. Nach Entfernen des Überstands wurden die Kristalle in 0.5 – 1 mL PBS mit 1X cOmplete Protease Inhibitor (Roche) resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

#### 6.2.5.8 Mikroskopie und Lebendzell-Aufnahmen

Für die Verfolgung der intrazellulären Kristallisation wurden Sf9-Zellen auf Glasobjektträger mit einer Konfluenz von 70% ausgesät und mit dem entsprechenden Baculovirus infiziert. Die Lebendzell-Aufnahmen erfolgten an einem konfokalen *laser spinning disc* Mikroskop, das auf einem *Nikon Ti Eclipse* Mikroskop basiert. Das Mikroskop war ferner mit einer Yokogawa CSU-X1 Scanner-Einheit sowie einer Andor iXon+ EMCCD-Kamera sowie mit 40x, 1.3 NA und einem 100x, 1.49 NA Objektiven ausgestattet. Zur

Erstellung von Zeiraffer-Aufnahmen wurde das das Mikroskop mit Hilfe der *Andor Bioimaging Software IQ2.1* gesteuert. Für die mikroskopische Analyse des Kristallwachstums und der Co-Lokalisation mit spezifischen Markern wurden sowohl Differentialinterferenzkontrast- sowie Fluoreszenzbilder aufgenommen. Dabei wurde die GFP-Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 514 nm und die mCherry-Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 561 nm angeregt. Der Lyotracker-Farbstoff wurde in einer Konzentration von 100 nM verwendet und ebenfalls bei einer Wellenlänge von 561 nm angeregt.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Stewart, B. W. & Wild, C. P. *World Cancer Report 2014. World Health Organization: Geneva* (2014). doi:9283204298
2. Grossman, S. A. *et al.* Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2443–2449 (2010).
3. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* **114**, 97–109 (2007).
4. Shu, H. K. *et al.* The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14453–14458 (1998).
5. Melero, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M., Pardoll, D. M. & Chen, L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 95–106 (2007).
6. Claes, A., Idema, A. J. & Wesseling, P. Diffuse glioma growth: A guerilla war. *Acta Neuropathologica* **114**, 443–458 (2007).
7. Kostron, H. & Bauer, R. Management of recurrent malignant glioma--neurosurgical strategies. *Wien. Med. Wochenschr.* **161**, 20–21 (2011).
8. Burton, E. C. & Prados, M. D. Malignant gliomas. *Curr. Treat. Options Oncol.* **1**, 459–468 (2000).
9. Giese, A. & Westphal, M. Treatment of malignant glioma: a problem beyond the margins of resection. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**, 217–225 (2001).
10. Liu, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* **5**, 67 (2006).
11. Hatina, J. *et al.* Tumorstammzellen: Grundlagen, klinische Implikationen und Kontroversen. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **132**, 1629–32 (2007).
12. Jorissen, R. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research* **284**, 31–53 (2003).
13. Chakravarti, A. *et al.* RTOG 0211: A phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **85**, 1206–1211 (2013).
14. Gilbert, M. R. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 699–708 (2014).

15. Goldman, C. K. *et al.* Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol. Biol. Cell* **4**, 121–133 (1993).
16. Sugiyama, H. Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *Expert Rev. Vaccines* **4**, 503–512 (2005).
17. Izumoto, S. *et al.* Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery* **108**, (2008).
18. Lesniak, M. S. Immunotherapy for glioblastoma: the devil is in the details. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3105; author reply 3105–6 (2011).
19. Sampson, J. H. *et al.* Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **28**, 4722–4729 (2010).
20. Liu, T.-C., Galanis, E. & Kirn, D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **4**, 101–117 (2007).
21. Kelly, E. & Russell, S. J. History of Oncolytic Viruses : Genesis to Genetic Engineering. **15**, 651–659 (2007).
22. HOSTER, H. A., ZANES, R. P. & VON HAAM, E. Studies in Hodgkin's syndrome; the association of viral hepatitis and Hodgkin's disease; a preliminary report. *Cancer Res.* **9**, 473–80 (1949).
23. Martuza, R. L., Malick, A., Markert, J. M., Ruffner, K. L. & Coen, D. M. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* **252**, 854–856 (1991).
24. Geletneky, K. *et al.* Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. *Neuro. Oncol.* **12**, 804–814 (2010).
25. Allander, T. *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12891–12896 (2005).
26. Cotmore, S. F. & Tattersall, P. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**, 91–174 (1987).
27. Blechacz, B. & Russell, S. J. Parvovirus vectors: use and optimisation in cancer gene therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* **6**, 1–24 (2004).
28. Reguera, J., Carreira, A., Riobobos, L., Almendral, J. M. & Mateu, M. G. Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2724–2729 (2004).

29. Tullis, G. E., Burger, L. R. & Pintel, D. J. The trypsin-sensitive RVER domain in the capsid proteins of minute virus of mice is required for efficient cell binding and viral infection but not for proteolytic processing in vivo. *Virology* **191**, 846–57 (1992).
30. Paradiso, P. R. Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. *J. Virol.* **39**, 800–807 (1981).
31. Halder, S. *et al.* Structural characterization of H-1 parvovirus: comparison of infectious virions to empty capsids. *J. Virol.* **87**, 5128–40 (2013).
32. Wang, D. & Parrish, C. R. A heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B-related protein binds to single-stranded DNA near the 5' end or within the genome of feline parvovirus and can modify virus replication. *J. Virol.* **73**, 7761–7768 (1999).
33. Cotmore, S. F. & Tattersall, P. A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J. Virol.* **63**, 3902–3911 (1989).
34. Astell, C. R., Thomson, M., Chow, M. B. & Ward, D. C. Structure and replication of minute virus of mice DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **47 Pt 2**, 751–62 (1983).
35. Rhode, S. L. & Paradiso, P. R. Parvovirus Genome: Nucleotide Sequence of H-1 and Mapping of Its Genes by Hybrid-Arrested Translation. *J. Virol.* **45**, 173–184 (1983).
36. Christensen, J., Cotmore, S. F. & Tattersall, P. A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. *J. Virol.* **71**, 1405–1416 (1997).
37. Astell, C. R., Thomson, M., Merchlinsky, M. & Ward, D. C. The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res.* **11**, 999–1018 (1983).
38. Cotmore, S. F. & Tattersall, P. An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *EMBO J.* **13**, 4145–4152 (1994).
39. Cotmore, S. F. & Tattersall, P. Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **58**, 724–732 (1986).
40. Li, X. & Rhode, S. L. Mutation of lysine 405 to serine in the parvovirus H-1 NS1 abolishes its functions for viral DNA replication, late promoter trans activation, and cytotoxicity. *J. Virol.* **64**, 4654–4660 (1990).
41. Legendre, D. & Rommelaere, J. Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition. *J. Virol.* **66**, 5705–5713 (1992).
42. Cotmore, S. F. & Tattersall, P. Parvovirus DNA Replication; in Parvoviruses (J. Kerr).

43. Christensen, J., Cotmore, S. F. & Tattersall, P. Parvovirus initiation factor PIF: a novel human DNA-binding factor which coordinately recognizes two ACGT motifs. *J. Virol.* **71**, 5733–5741 (1997).
44. Cotmore, S. F., Nuesch, J. P. F. & Tattersall, P. In vitro excision and replication of 5' telomeres of minute virus of mice DNA from cloned palindromic concatemer junctions. *Virology* **190**, 365–377 (1992).
45. Nüesch, J. P. F., Christensen, J. & Rommelaere, J. Initiation of minute virus of mice DNA replication is regulated at the level of origin unwinding by atypical protein kinase C phosphorylation of NS1. *J. Virol.* **75**, 5730–9 (2001).
46. Cotmore, S. F., Nüesch, J. P. & Tattersall, P. Asymmetric resolution of a parvovirus palindrome in vitro. *J. Virol.* **67**, 1579–1589 (1993).
47. Engelsma, D. *et al.* A supraphysiological nuclear export signal is required for parvovirus nuclear export. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2544–2552 (2008).
48. Zádori, Z., Szelei, J. & Tijssen, P. SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. *J. Virol.* **79**, 13129–13138 (2005).
49. Parker, J. S. & Parrish, C. R. Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J. Virol.* **71**, 9214–9222 (1997).
50. Spalholz, B. A. & Tattersall, P. Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J. Virol.* **46**, 937–943 (1983).
51. Linser, P., Bruning, H. & Armentrout, R. W. Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J. Virol.* **24**, 211–221 (1977).
52. Suikkanen, S. *et al.* Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J. Virol.* **76**, 4401–4411 (2002).
53. Parker, J. S. & Parrish, C. R. Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J. Virol.* **74**, 1919–1930 (2000).
54. Canaan, S. *et al.* Interfacial Enzymology of Parvovirus Phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* **279**, 14502–14508 (2004).
55. Zádori, Z. *et al.* A Viral Phospholipase A2 Is Required for Parvovirus Infectivity. *Dev. Cell* **1**, 291–302 (2001).
56. Vihinen-Ranta, M., Suikkanen, S. & Parrish, C. R. Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. *J. Virol.* **78**, 6709–6714 (2004).

57. Cotmore, S. F., D'abramo, A. M., Ticknor, C. M. & Tattersall, P. Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology* **254**, 169–181 (1999).
58. Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J. & Willwand, K. Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5522–5527 (2000).
59. Wolter, S., Richards, R. & Armentrout, R. W. Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. *Biochim Biophys Acta* **607**, 420–431 (1980).
60. Kornberg, A. & Baker, T. A. *DNA Replication*. (2005). at [http://books.google.de/books/about/DNA\\_Replication.html?id=KDsubusF0YsC&pgis=1](http://books.google.de/books/about/DNA_Replication.html?id=KDsubusF0YsC&pgis=1)
61. Tattersall, P. & Ward, D. C. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* **263**, 106–109 (1976).
62. Wilson, G. M., Jindal, H. K., Yeung, D. E., Chen, W. E. I. & Astell, C. R. Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology* **185**, 90–98 (1991).
63. Nuesch, J. P. F. *et al.* Molecular Pathways: Rodent Parvoviruses--Mechanisms of Oncolysis and Prospects for Clinical Cancer Treatment. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3516–3523 (2012).
64. Grekova, S. *et al.* Activation of an antiviral response in normal but not transformed mouse cells: a new determinant of minute virus of mice oncotropism. *J. Virol.* **84**, 516–531 (2010).
65. Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S. & Rommelaere, J. Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J. Virol.* **73**, 3877–3885 (1999).
66. Harris, C. E., Boden, R. A. & Astell, C. R. A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J. Virol.* **73**, 72–80 (1999).
67. Kerr, J. R., Cotmore, S. F., Bloom, M. E., Linden, R. M. & Parrish, C. R. *Parvoviruses*. **25**, (CRC Press, 2005).
68. Nüesch, J. P. F. & Rommelaere, J. Tumor Suppressing Properties of Rodent Parvovirus NS1 Proteins and Their Derivatives. *Anticancer Genes* **818**, 99–124 (2014).
69. Legendre, D. & Rommelaere, J. Targeting of promoters for trans activation by a carboxy-terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **68**, 7974–7985 (1994).

70. Mouw, M. & Pintel, D. J. Amino acids 16-275 of minute virus of mice NS1 include a domain that specifically binds (ACCA)<sub>2-3</sub>-containing DNA. *Virology* **251**, 123–131 (1998).
71. Cotmore, S. F., Christensen, J., Nüesch, J. P. & Tattersall, P. The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]<sub>2-3</sub>. *J. Virol.* **69**, 1652–1660 (1995).
72. Nüesch, J. P. F., Cotmore, S. F. & Tattersall, P. Sequence motifs in the Replicator Protein of Parvovirus MVM.pdf. *Virology* **209**, 112–135 (1995).
73. Hickman, A. B., Ronning, D. R., Kotin, R. M. & Dyda, F. Structural Unity among Viral Origin Binding Proteins. *Mol. Cell* **10**, 327–337 (2002).
74. Nüesch, J., Cotmore, S. & Tattersall, P. Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology* (1995). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682285712366>>
75. Christensen, J., Cotmore, S. & Tattersall, P. Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *J. Virol.* **69**, 5422–5430 (1995).
76. Willwand, K. *et al.* The minute virus of mice (MVM) nonstructural protein NS1 induces nicking of MVM DNA at a unique site of the right-end telomere in both hairpin and duplex conformations in vitro. *J. Gen. Virol.* **78 ( Pt 10)**, 2647–55 (1997).
77. Smith, R. H., Spano, A. J. & Kotin, R. M. The Rep78 gene product of adeno-associated virus (AAV) self-associates to form a hexameric complex in the presence of AAV ori sequences. *J. Virol.* **71**, 4461–4471 (1997).
78. Davis, M. D., Wu, J. & Owens, R. a. Mutational analysis of adeno-associated virus type 2 Rep68 protein endonuclease activity on partially single-stranded substrates. *J. Virol.* **74**, 2936–2942 (2000).
79. Tewary, S. K. *et al.* Structures of minute virus of mice replication initiator protein N-terminal domain: Insights into DNA nicking and origin binding. *Virology* **476C**, 61–71 (2014).
80. Cotmore, S. F. & Tattersall, P. High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin. *J. Virol.* **72**, 8477–8484 (1998).
81. Pujol, A. *et al.* Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1. *J. Virol.* **71**, 7393–7403 (1997).
82. Hickman, A. B. & Dyda, F. Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 77–85 (2005).

83. Dawei Li *et al.* Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* **423**, 512–8 (2003).
84. Gai, D., Zhao, R., Li, D., Finkielstein, C. V & Chen, X. S. Mechanisms of conformational change for a replicative hexameric helicase of SV40 large tumor antigen. *Cell* **119**, 47–60 (2004).
85. Deleu, L., Pujol, A., Nüesch, J. P. F. & Rommelaere, J. Inhibition of transcription-regulating properties of nonstructural protein 1 (NS1) of parvovirus minute virus of mice by a dominant-negative mutant form of NS1. *J. Gen. Virol.* **82**, 1929–1934 (2001).
86. Niskanen, E. A. *et al.* Mutations in DNA binding and transactivation domains affect the dynamics of parvovirus NS1 protein. *J. Virol.* **87**, 11762–74 (2013).
87. Corbau, R., Duverger, V., Rommelaere, J. & Nüesch, J. P. F. Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects. *Virology* **278**, 151–67 (2000).
88. Dettwiler, S., Rommelaere, J. & Nüesch, J. P. DNA unwinding functions of minute virus of mice NS1 protein are modulated specifically by the lambda isoform of protein kinase C. *J. Virol.* **73**, 7410–7420 (1999).
89. Daeffler, L., Hörlein, R., Rommelaere, J. & Nüesch, J. P. F. Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J. Virol.* **77**, 12466–12478 (2003).
90. Nüesch, J. P. F. & Rommelaere, J. A viral adaptor protein modulating casein kinase II activity induces cytopathic effects in permissive cells. *PNAS* **104**, 12482–12487 (2007).
91. Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P. & Rommelaere, J. Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J.* **9**, 2989–2995 (1990).
92. Rommelaere, J. *et al.* Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **21**, 185–195 (2010).
93. Nüesch, J. P. F., Rommelaere, J., Nüesch, J. P. F. & Rommelaere, J. NS1 Interaction with CKIIalpha : Novel Protein Complex Mediating Parvovirus-Induced Cytotoxicity. *J. Virol.* **80**, 4729–4739 (2006).
94. Bär, S., Daeffler, L., Rommelaere, J. & Nüesch, J. P. F. Vesicular Egress of Non-Enveloped Lytic Parvoviruses Depends on Gelsolin Functioning. *PLoS Pathog.* **4**, 1–11 (2008).
95. Nüesch, J. P. F., Lachmann, S. & Rommelaere, J. Selective alterations of the host cell architecture upon infection with parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **331**, 159–174 (2005).

96. Hristov, G. *et al.* Through Its Nonstructural Protein NS1, Parvovirus H-1 Induces Apoptosis via Accumulation of Reactive Oxygen Species. *J. Virol.* **84**, 5909–5922 (2010).
97. Corbau, R., Salomé, N., Rommelaere, J. & Nüesch, J. Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVMp infection of A9 cells. *Virology* **415**, 402–415 (1999).
98. Nuesch, J. P. F. *et al.* Regulation of Minute Virus of Mice NS1 Replicative Functions by Atypical PKC In Vivo. *J. Virol.* **77**, 433–442 (2003).
99. Op De Beeck, A. *et al.* NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1). *J. Virol.* **75**, 11071–11078 (2001).
100. Op De Beeck, A., Anouja, F., Rommelaere, J. & Caillet-fauquet, P. The Nonstructural Proteins of the Autonomous Parvovirus Minute Virus of Mice Interfere with the Cell Cycle, Inducing Accumulation in G2. *Cell Growth & Differ.* **6**, 781–787 (1995).
101. Ran, Z. H., Rayet, B., Rommelaere, J. & Faisst, S. Parvovirus H-1-induced cell death: Influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res.* **65**, 161–174 (1999).
102. Rayet, B., Lopez-Guerrero, J. A., Rommelaere, J. & Dinsart, C. Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J. Virol.* **72**, 8893–8903 (1998).
103. Di Piazza, M. *et al.* Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J. Virol.* **81**, 4186–98 (2007).
104. Olijslagers, S. *et al.* Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther.* **8**, 958–965 (2001).
105. Noteborn, M. H. *et al.* Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J. Virol.* **65**, 3131–3139 (1991).
106. Noteborn, M. H. *et al.* A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J. Virol.* **68**, 346–351 (1994).
107. Poon, I. K. H., Oro, C., Dias, M. M., Zhang, J. & Jans, D. A. Apoptin nuclear accumulation is modulated by a CRM1-recognized nuclear export signal that is active in normal but not in tumor cells. *Cancer Res.* **65**, 7059–7064 (2005).
108. Heilman, D. W., Teodoro, J. G. & Green, M. R. Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies. *J. Virol.* **80**, 7535–7545 (2006).

109. Noteborn, M. H. M. Chicken anemia virus induced apoptosis: Underlying molecular mechanisms. in *Veterinary Microbiology* **98**, 89–94 (2004).
110. Maddika, S. *et al.* Cancer-selective therapy of the future: Apoptin and its mechanism of action. *Cancer Biology and Therapy* **5**, 10–19 (2006).
111. Kuusisto, H. V., Wagstaff, K. M., Alvisi, G. & Jans, D. A. The C-terminus of apoptin represents a unique tumor cell-enhanced nuclear targeting module. *Int. J. Cancer* **123**, 2965–2969 (2008).
112. Danen-Van Oorschot, A. A. A. M. *et al.* Importance of nuclear localization of apoptin for tumor-specific induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 27729–27736 (2003).
113. Backendorf, C. *et al.* Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48**, 143–169 (2008).
114. Leliveld, S. R., Zhang, Y.-H., Rohn, J. L., Noteborn, M. H. M. & Abrahams, J. P. Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer. *J. Biol. Chem.* **278**, 9042–51 (2003).
115. Rohn, J. L. *et al.* A tumor-specific kinase activity regulates the viral death protein apoptin. *J. Biol. Chem.* **277**, 50820–50827 (2002).
116. Leliveld, S. R. Apoptin protein multimers form distinct higher-order nucleoprotein complexes with DNA. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4805–4813 (2003).
117. Leliveld, S. R., Dame, R. T., Rohn, J. L., Noteborn, M. H. M. & Abrahams, J. P. Apoptin's functional N- and C-termini independently bind DNA. *FEBS Lett.* **557**, 155–158 (2004).
118. Teodoro, J. G., Heilman, D. W., Parker, A. E. & Green, M. R. The viral protein apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53. *Genes Dev.* **18**, 1952–1957 (2004).
119. Maddika, S. *et al.* Akt is transferred to the nucleus of cells treated with apoptin, and it participates in apoptin-induced cell death. *Cell Prolif.* **40**, 835–848 (2007).
120. Maddika, S. *et al.* Interaction with PI3-kinase contributes to the cytotoxic activity of apoptin. *Oncogene* **27**, 3060–3065 (2008).
121. Zhuang, S. M. *et al.* Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* **55**, 486–489 (1995).
122. Danen-van Oorschot, A. A., van Der Eb, A. J. & Noteborn, M. H. The chicken anemia virus-derived protein apoptin requires activation of caspases for induction of apoptosis in human tumor cells. *J. Virol.* **74**, 7072–7078 (2000).
123. Burek, M. *et al.* Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent. *Oncogene* **25**, 2213–2222 (2006).

124. Los, M., Wesselborg, S. & Schulze-Osthoff, K. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* **10**, 629–39 (1999).
125. Baker, E. N. New perspectives in biological crystallography. *IUCrJ* **1**, 82–3 (2014).
126. Spence, J. C. H. Lawrence Bragg, microdiffraction and X-ray lasers. *Acta Crystallogr. A* **69**, 25–33 (2013).
127. Crystallography Made Crystal Clear, Third Edition: A Guide for Users of Macromolecular Models (Complementary Science): Gale Rhodes: 9780125870733: Amazon.com: Books. at <<http://www.amazon.com/Crystallography-Crystal-Clear-Third-Edition/dp/0125870736>>
128. McPherson, A. & Gavira, J. A. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* **70**, 2–20 (2014).
129. Garman, E. F. & Schneider, T. R. Macromolecular Cryocrystallography. *Journal of Applied Crystallography* **30**, 211–237 (1997).
130. Henderson, R. Cryo-Protection of Protein Crystals against Radiation Damage in Electron and X-Ray Diffraction. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **241**, 6–8 (1990).
131. Holton, J. M. & Frankel, K. A. The minimum crystal size needed for a complete diffraction data set. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 393–408 (2010).
132. Garman, E. F. & Schneider, T. R. Macromolecular Cryocrystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 211–237 (1997).
133. Cusack, S. *et al.* Small is beautiful: protein micro-crystallography. *Nat. Struct. Biol.* **5 Suppl**, 634–637 (1998).
134. Riek, C., Burghammer, M. & Schertler, G. Protein crystallography microdiffraction. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 556–562 (2005).
135. Sanishvili, R. *et al.* A 7  $\mu\text{m}$  mini-beam improves diffraction data from small or imperfect crystals of macromolecules. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **64**, 425–435 (2008).
136. Southworth-Davies, R. J., Medina, M. A., Carmichael, I. & Garman, E. F. Observation of Decreased Radiation Damage at Higher Dose Rates in Room Temperature Protein Crystallography. *Structure* **15**, 1531–1541 (2007).
137. Nave, C. Matching X-ray source, optics and detectors to protein crystallography requirements. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **55**, 1663–1668 (1999).
138. Flot, D. *et al.* The ID23-2 structural biology microfocus beamline at the ESRF. *J. Synchrotron Radiat.* **17**, 107–118 (2010).

139. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor–Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555 (2011).
140. Warne, T. *et al.* Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486–491 (2008).
141. Cherezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258–1265 (2007).
142. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383–387 (2007).
143. Nelson, R. *et al.* Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**, 773–778 (2005).
144. Gati, C. *et al.* Serial crystallography on in vivo grown microcrystals using synchrotron radiation. *IUCrJ* **1**, 87–94 (2014).
145. Coulibaly, F. *et al.* The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature* **446**, 97–101 (2007).
146. Emma, P. *et al.* First lasing and operation of an ångstrom-wavelength free-electron laser. *Nature Photonics* **4**, 641–647 (2010).
147. Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E. & Hajdu, J. Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses. *Nature* **406**, 752–757 (2000).
148. Owen, R. L., Rudiño-Piñera, E. & Garman, E. F. Experimental determination of the radiation dose limit for cryocooled protein crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4912–4917 (2006).
149. DePonte, D. P. *et al.* Gas dynamic virtual nozzle for generation of microscopic droplet streams. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **41**, 195505 (2008).
150. Chapman, H. N. *et al.* Femtosecond time-delay X-ray holography. *Nature* **448**, 676–679 (2007).
151. Chapman, H. N. *et al.* Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature* **470**, 73–77 (2011).
152. Suga, M. *et al.* Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature* **517**, 99–103 (2014).
153. Sawaya, M. R. *et al.* Protein crystal structure obtained at 2.9 Å resolution from injecting bacterial cells into an X-ray free-electron laser beam. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1413456111– (2014). doi:10.1073/pnas.1413456111
154. Hirata, K. *et al.* Determination of damage-free crystal structure of an X-ray-sensitive protein using an XFEL. *Nat. Methods* **11**, 734–6 (2014).

155. Redecke, L. *et al.* Natively inhibited Trypanosoma brucei cathepsin B structure determined by using an X-ray laser. *Science* **339**, 227–30 (2013).
156. Doye, J. P. K. & Poon, W. C. K. Protein crystallization in vivo. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **11**, 40–46 (2006).
157. Müntz, K. Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* **38**, 77–99 (1998).
158. Dodson, G. & Steiner, D. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 189–194 (1998).
159. Veenhuis, M., Kiel, J. A. K. W. & Van der Klei, I. J. Peroxisome assembly in yeast. in *Microscopy Research and Technique* **61**, 139–150 (2003).
160. Hill-Perkins, M. S. & Possee, R. D. A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **71 (Pt 4)**, 971–976 (1990).
161. Rohrmann, G. F. Polyhedrin structure. *The Journal of general virology* **67**, (1986).
162. Smith, G. E., Summers, M. D. & Fraser, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 2156–2165 (1983).
163. Fan, G. Y. *et al.* In vivo calcineurin crystals formed using the baculovirus expression system. *Microsc. Res. Tech.* **34**, 77–86 (1996).
164. Axford, D., Ji, X., Stuart, D. I. & Sutton, G. In cellulo structure determination of a novel cypovirus polyhedrin. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **70**, 1435–1441 (2014).
165. World Health Organization. Trypanosomiasis, Human African (sleeping sickness). *World Health Organization Fact Sheet* 259 (2013).
166. Shaw, E. Peptidyl sulfonium salts. A new class of protease inhibitors. *J. Biol. Chem.* **263**, 2768–2772 (1988).
167. Scory, S., Caffrey, C. R., Stierhof, Y. D., Ruppel, A. & Steverding, D. Trypanosoma brucei: killing of bloodstream forms in vitro and in vivo by the cysteine proteinase inhibitor Z-phe-ala-CHN2. *Exp. Parasitol.* **91**, 327–333 (1999).
168. Bryant, C. *et al.* Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 6218–6221 (2009).
169. Mackey, Z. B., O'Brien, T. C., Greenbaum, D. C., Blank, R. B. & McKerrow, J. H. A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in Trypanosoma brucei. *J. Biol. Chem.* **279**, 48426–48433 (2004).

170. Blobel, G. & Dofferstein, B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* **67**, 835–851 (1975).
171. Coutinho, M. F., Prata, M. J. & Alves, S. Mannose-6-phosphate pathway: A review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Molecular Genetics and Metabolism* **105**, 542–550 (2012).
172. Quraishi, O. *et al.* The occluding loop in cathepsin B defines the pH dependence of inhibition by its propeptide. *Biochemistry* **38**, 5017–5023 (1999).
173. Jones, R. C. Avian reovirus infections. *Rev. Sci. Tech.* **19**, 614–625 (2000).
174. Brandariz-Nuñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J. & Martinez-Costas, J. A versatile molecular tagging method for targeting proteins to avian reovirus muNS inclusions. use in protein immobilization and purification. *PLoS One* **5**, (2010).
175. Brandariz-Nuñez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J. & Martinez-Costas, J. Avian reovirus microNS protein forms homo-oligomeric inclusions in a microtubule-independent fashion, which involves specific regions of its C-terminal domain. *J. Virol.* **84**, 4289–301 (2010).
176. James, J. A. A. *et al.* Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2. *Structure* **11**, 1025–1035 (2003).
177. Larkin, M. *et al.* ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007).
178. Weingart, S. Strukturelle Charakterisierung des NS1 Proteins aus H-1 Parvovirus. *Masterarbeit* (Universität Hamburg, 2014).
179. Drescher, A. Herstellung und initiale Charakterisierung der Helikasedomäne des NS1-Proteins aus dem H-1-Parvovirus Synthesis and initial characterisation of the Parvovirus H-1 NS1 protein helicase domain. (2015).
180. Kelley, L. A., Sternberg, M. J. E. & Sternberg, Michael J E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363–71 (2009).
181. Raussens, V., Ruyschaert, J. M. & Goormaghtigh, E. Protein concentration is not an absolute prerequisite for the determination of secondary structure from circular dichroism spectra: A new scaling method. *Anal. Biochem.* **319**, 114–121 (2003).
182. Tewary, S. K., Zhao, H., Shen, W., Qiu, J. & Tang, L. Structure of the NS1 Protein N-Terminal Origin Recognition/Nickase Domain from the Emerging Human Bocavirus. *J. Virol.* **87**, 11487–11493 (2013).
183. Slabinski, L. *et al.* XtalPred: A web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics* **23**, 3403–3405 (2007).
184. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).

185. Matthews, B. W. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497 (1968).
186. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25 (2010).
187. Adams, P. D. *et al.* PHENIX : building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1948–1954 (2002).
188. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
189. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **50**, 760–3 (1994).
190. Krittanai, C. & Johnson, W. C. Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains. *Anal. Biochem.* **253**, 57–64 (1997).
191. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **1751**, 119–39 (2005).
192. Guinier, A. & Fournet, G. Small angle scattering of X-rays. *J. Polym. Sci.* **1**, 268 (1955).
193. Glatter, O. & Kratky, O. Small-angle x-ray scattering. *Acad. Press. London* (1982).
194. Svergun, D., Barberato, C. & Koch, M. H. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768–773 (1995).
195. Svergun, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503 (1992).
196. Rambo, R. P. & Tainer, J. a. Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering. *Nature* **496**, 477–81 (2013).
197. Franke, D. & Svergun, D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 342–346 (2009).
198. Koopmann, R. *et al.* In vivo protein crystallization opens new routes in structural biology. *Nature Methods* **9**, 259–262 (2012).
199. Koopmann, R. *et al.* In vivo protein crystallization opens new routes in structural biology. *Nat. Methods* **9**, 259–262 (2012).
200. Brocard, C. & Hartig, A. Peroxisome targeting signal 1: Is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1763**, 1565–1573 (2006).
201. Kondylis, V., Tang, Y., Fuchs, F., Boutros, M. & Rabouille, C. Identification of ER proteins involved in the functional organisation of the early secretory pathway in *Drosophila* cells by a targeted RNAi screen. *PLoS One* **6**, (2011).

202. Duden, R. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol. Membr. Biol.* **20**, 197–207
203. Schönherr, R. *et al.* Real-time investigation of dynamic protein crystallization in living cells a ). 1–24
204. Kiprianova, I. *et al.* Regression of Glioma in Rat Models by Intranasal Application of Parvovirus H-1. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5333–5342 (2011).
205. Bär, S., Rommelaere, J., Nüesch, Jürg P. F., Weitzman, M. D. & Nüesch, J. P. F. Vesicular Transport of Progeny Parvovirus Particles through ER and Golgi Regulates Maturation and Cytolysis. *PLoS Pathog.* **9**, e1003605 (2013).
206. Parker, M. W., Lo Bello, M. & Federici, G. Crystallization of glutathione S-transferase from human placenta. *J. Mol. Biol.* **213**, 221–222 (1990).
207. Ji, X., Zhang, P., Armstrong, R. N. & Gilliland, G. L. The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* **31**, 10169–10184 (1992).
208. Hickman, A., Ronning, D., Kotin, R. & Dyda, F. Structural unity among viral origin binding proteins: crystal structure of the nuclease domain of adeno-associated virus Rep. *Mol. Cell* **10**, 327–337 (2002).
209. Yoon, M. *et al.* Amino-terminal domain exchange redirects origin-specific interactions of adeno-associated virus rep78 in vitro. *J. Virol.* **75**, 3230–3239 (2001).
210. Florianczyk, B., Kaczmarczyk, R., Osuchowski, J. & Trojanowski, T. Metallothionein and manganese concentrations in brain tumors. *Florianczyk B., Kaczmarczyk R., Osuchowski J., Trojanowski T. 2007. Met. manganese Conc. brain tumors. J. Pre-Clinical Clin. Res. 01 (1). 1*, (2007).
211. Florianczyk, B., Grzybowska, L. & Marzec, Z. Metallothionein and manganese concentrations in breast cancer and mastopathic tissues. *Florianczyk B., Grzyb. L., Marzec Z. 2011. Met. manganese Conc. breast cancer mastopathic tissues. J. Pre-Clinical Clin. Res. 05 (2). 2*, (2011).
212. Blaurock-Busch, E. *et al.* Comparing the metal concentration in the hair of cancer patients and healthy people living in the malwa region of punjab, India. *Clin. Med. Insights. Oncol.* **8**, 1–13 (2014).
213. Dhar, S. K. & St. Clair, D. K. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. *Free Radical Biology and Medicine* **52**, 2209–2222 (2012).
214. Los, M. *et al.* Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1793**, 1335–1342 (2009).

215. Hardtmann, M. Einfluss eines C-terminalen SKL-Sequenzmotivs auf die Kristallisation von Cathepsin B in baculoviral transfizierten Insektenzellen. *Bachelorarbeit im Rahmen des MLS-Studiums an der Univ. zu Lübeck* (2014).
216. Gallat, F.-X. *et al.* In vivo crystallography at X-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369**, 20130497 (2014).
217. Wu, M. M. *et al.* Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein-biotin. *Chem. Biol.* **7**, 197–209 (2000).
218. Kim, J. H. *et al.* Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2997–3002 (1998).
219. Van Roermund, C. W. T. *et al.* The peroxisomal lumen in *Saccharomyces cerevisiae* is alkaline. *J. Cell Sci.* **117**, 4231–4237 (2004).
220. Jankowski, A. *et al.* In Situ Measurements of the pH of Mammalian Peroxisomes Using the Fluorescent Protein pHluorin. *J. Biol. Chem.* **276**, 48748–48763 (2001).
221. Nicolay, K., Veenhuis, M., Douma, A. C. & Harder, W. A <sup>31</sup>P NMR study of the internal pH of yeast peroxisomes. *Arch. Microbiol.* **147**, 37–41 (1987).
222. Teng, C. Y., Chang, S. L., Van Oers, M. M. & Wu, T. Y. Enhanced protein secretion from insect cells by co-expression of the chaperone calreticulin and translation initiation factor eIF4E. *Mol. Biotechnol.* **54**, 68–78 (2013).
223. Linka, N. *et al.* Peroxisomal ATP import is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**, 3241–3257 (2008).
224. Palmieri, L. *et al.* Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J.* **20**, 5049–5059 (2001).
225. Denburg, J. L., Lee, R. T. & McElroy, W. D. Substrate-binding properties of firefly luciferase. I. Luciferin-binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* **134**, 381–394 (1969).
226. Nakatsu, T. *et al.* Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature* **440**, 372–376 (2006).
227. Lübber, F. Mechanistische Untersuchung der in vivo- Proteinkristallisation in Insektenzellen am Beispiel von Cathepsin B. *Masterarbeit im Rahmen des MLS-Studiums an der Univ. zu Lübeck* (2014).
228. Barends, T. R. M. *et al.* De novo protein crystal structure determination from X-ray free-electron laser data. *Nature* **505**, 244–7 (2014).
229. Galli, L. *et al.* Electronic damage in S atoms in a native protein crystal induced by an intense X-ray free-electron laser pulse. *Struct. Dyn.* **2**, 041703 (2015).

230. Gasteiger, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handb.* 571–607 (2005).
231. Gasteiger, E. *et al.* ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3784–3788 (2003).
232. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
233. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. & Svergun, D. I. PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1277–1282 (2003).
234. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. *Schrödinger LLC* *www.pymol.org* **Version 1.**, <http://www.pymol.org> (2002).
235. Hauptert, L. M. & Simpson, G. J. Screening of protein crystallization trials by second order nonlinear optical imaging of chiral crystals (SONICC). *Methods* **55**, 379–386 (2011).
236. Mulvania, T., Hayes, B. & Hedin, D. A Flow Cytometric Assay for Rapid, Accurate Determination of Baculovirus Titers. *BioProcess J.* **3**, 47–53 (2004).

## 8 Anhang

### 8.1 Gefahrenstoffe nach GHS

Chemikalie	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
1,4-Dithiothreitol (DTT)		302-315-319	302+352-305+351+338
Acetonitril		225-332-302-312-319	210-305+351+338-403+235
Ameisensäure		226-314	260-280-301+330+331-305+351+338-309-310
Ammoniumpersulfat		272-302-315-319-335-334-317	280-305+351+338-302+352-304+341-342+311
Nickelsulfat		350i-341-360D-372-332-302-315-334-317-410	201-280-273-308+313-342+311-302+352
Ampicillin-Natriumsalz		317-334	261-280-342-311
Ethidiumbromid		341-330-302	281-302+352-305+351+338-304+340-309-310
Manganchlorid		301-412	273-301+310
Ethanol		225	210
p-Hydroxy-Cumarinsäure		315-319-335	261-305+351+338
Essigsäure		226-314	280-301+330+331-307+310-305+351+338
EDTA		319	305+351+338
Imidazol		302-314-361d	280-301+330+331-305+351+338-309+310
Isopropanol		225-319-336	210-233-305+351+3

			38
Luminol		315-319-335	261-305+351+338
Gentamicin		317-334	261-280-342+311
Glutaraldehyd, 25% Lösung		331-301-314-334-317-400	280-305+351+338-270-260-273-308+313
Kanamycin		360	201-308+313
Bis-Tris		315-319-335	261-305+351+338
SDS		228-302+332-315-318-335-412	210-261-273-280-305+351+338
Trifluoressigsäure		20-35-52/53	(1/2)-9-26-27-28-45-61
Lysotracker®		316-320-335	261-264-304-305-351-338-304340-312-313-332
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)		225-332-302-314	210-233-280-301+330+331-305+351+338-309+310
Tris-HCl, Tris-Base		315-319-335	261-305+351+338
Natriumfluorid		301-319-315	305+351+338-302+352-309-310
Rotiphorese® Gel 30 (37.5:1) Rotiphorese® Gel 40 (19:1)		350-340-361f-301-372-332-312-319-315-317	201-280-301+310-305+351+338-308+313
Wasserstoffperoxid		271-302-314-332-335	220-261-280-305+351+338-310

### 8.1.1 Kommerzielle Kristallisations-Suites

Suite (Hersteller)	Piktogramme	R-Sätze	S-Sätze
AmSO4 (Qiagen)	 	R10, R25, R26, R45, R46, R60, R61, R48/23/25, R51/53	S45, S53, S61, S36/37.
PACT Premier (Molecular Dimensions)	 	R23/25, R52/53	S20, S36, S45, S61
JCSG+ (Qiagen)	 	R10, R21, R41, R45, R23/25, R37/38, R51/53	S13, S20, S26, S45, S53, S36/37/39
Classic (Qiagen)	 	R10, R45, R46, R60, R61, R25, R36/37/38, R48/20/22, R51/53	S20, S26, S45, S53, S61, S36/37/39
Stura Footprint (Molecular Dimensions)	 	R10, R45, R46, R60, R61, R25, R36/37/38, R48/20/22, R51/53	S20, S26, S45, S53, S61, S36/37/39
Cryos (Qiagen)	 	R10, R45, R46, R60, R61, R23/25, R36/37/38, R48/20/22, R51/53	S20, S26, S45, S53, S61, S36/37/39.
Classic (Qiagen)	 	R10, R45, R46, R60, R61, R23/25, R36/37/38, R48/20/22, R51/53	S20, S26, S45, S53, S36/37/39.

### 8.2 Hinweise für Gefahrenstoffe

P201:	Gesichtsschutz tragen.
P210:	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P261:	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden
P301:	Bei Verschlucken:
P302:	Bei Berührung mit der Haut:
P304:	Bei Einatmen:
P305:	Bei Kontakt mit den Augen:
P308:	Bei Exposition oder falls betroffen:
P311:	Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P312:	Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P313:	Mund ausspülen.
P330:	Kein Erbrechen herbeiführen.

---

P338:	Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P340:	Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert
P341:	Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P342:	Bei Symptomen der Atemwege:
P351:	Einige min lang behutsam mit Wasser ausspülen.
P352:	Mit viel Wasser und Seife waschen.
H225:	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226:	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H272:	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H290:	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H301:	Giftig bei Verschlucken.
H302:	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H311:	Giftig bei Hautkontakt.
H312:	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314:	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und
hwere	sc Augenschäden.
H315:	Verursacht Hautreizungen.
H317:	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H319:	Verursacht schwere Augenreizung.
H331:	Giftig bei Einatmen.
H332:	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334:	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder'
R10	Entzündlich
R45	Kann Krebs erzeugen.
R46	Kann vererbare Schäden verursachen.
R60	Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
R61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
R25	Giftig beim Verschlucken.
R36	Reizt die Augen.
R37	Reizt die Atmungsorgane.
R38	Reizt die Haut.
R48	Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.
R20	Gesundheitsschädlich beim Einatmen.
R22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
R51	Giftig für Wasserorganismen.
R53	Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
S13	Von Nahrungsmitteln, Getränken und

---

	Futtermitteln fernhalten.
S20	Bei der Arbeit nicht essen und trinken.
S26	Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
S45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen
S53	Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
S61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
S36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
S37	Geeignete Schutzhandschuhe tragen.
S39	Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Datum

Unterschrift

## 9 Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich gerne bei einer Reihe von Menschen bedanken, die signifikant zum Gelingen dieser Arbeit beitragen haben.

Ein großer Dank gilt Dr. Lars Redecke für die Möglichkeit, an diesem faszinierenden Thema arbeiten zu dürfen, sowie für die ständige positive Unterstützung und Wertschätzung meiner Arbeit über den gesamten Zeitraum. Neben der fachlichen Unterstützung schätze ich außerdem deinen jederzeit vorbildlichen menschlichen Umgang sowie deinen ausgeglichenen Charakter. Du warst und bist als Chef ein absolutes Vorbild.

Des Weiteren danke ich Prof. Betzel für die Möglichkeit, meine Arbeit in seinen Laboratorien durchführen zu dürfen, sowie für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit.

Ein weiterer großer Dank gilt Prof. Rainer Duden und Robert Schönherr für die großartige Kollaboration auf dem Projekt, für die vielen konstruktiven und fruchtbaren Diskussionen und vor allem für die jeder Zeit offene Tür und die Unterstützung bei allen Fragestellungen. Es ist eine große Freude, mit euch zusammenzuarbeiten.

Ich danke Dr. Jürg Nüesch und Prof. Jean Rommelaere für die Bereitstellung der Gene für H-1PV NS1 sowie für die anregenden Diskussionen und die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit. Ich bin froh, dass ich an diesem wunderbaren Thema forschen darf und hoffe auf eine lange und erfolgreiche Kollaboration mit euch.

Ein großer Dank geht an Prof. Gerhard Grüber und Sony Subramanian Manimekalai von der Nanyang Technological University in Singapur für die Durchführung der SAXS-Experimente von NS1<sub>1-265</sub> sowie für die anregenden Diskussionen rund um das Thema. Ich freue mich sehr, dass wir zusammen diese tolle Story veröffentlichen können!

Ein weiterer großer Dank gilt Gleb Bourenkov und Anja Burkhardt für die Unterstützung an der Beamline und die allnächtliche Bereitschaft bei auftretenden Problemen. Euer Einsatz hat einen signifikanten Beitrag für meine Arbeit geleistet.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Studenten bedanken, die dieses Projekt maßgeblich unterstützt und vorangebracht haben: Anna Drescher, Sebastian Weingart, Finn Lübber, Krystian Fita, Svenja Schneegans, Mia Rudolph, René Rösch, Michael Schmitz, Matthias Hardtmann, Frederice Gries, Helge Magnussen, Pongpawan Sethanant, Henrike Friedenberger (ich hoffe ich habe niemanden vergessen). Ohne euch alle wäre diese Arbeit nicht das, was sie jetzt ist. Vielen Dank!

Ich danke außerdem allen Mitgliedern der SIAS-Gruppe, die mich zur jeder Zeit fachlich oder auch emotional unterstützt haben. Dr. Dirk Rehders gilt mein Dank für das ständig offene Ohr, die vielen fachlichen sowie praktischen Ratschläge sowie die unermüdliche Hilfsbereitschaft. Ich wünsche dir für deine Zukunft alles Gute!

Dr. Sven Falke danke ich für die vielen anregenden Fachdiskussionen und die Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art. Auch dir wünsche ich für deinen weiteren Werdegang nur das Beste.

Birgitta Fried danke ich für ihr ausgeglichenes Wesen, das im Labor eine echte Erleichterung darstellte und oftmals einen noch so miesen Tag ins Umgekehrte verwandelte. Ich wünsche dir viel Spaß bei deiner neuen Aufgabe und hoffe auf ein baldiges Wiedersehen.

Jens Klingbeil möchte ich insbesondere für die Unterstützung während der Endphase meiner Arbeit danken, sowie für die zahlreichen fachlichen und musikalischen Gespräche sowohl im Labor als auch abseits der Arbeit. Ich wünsche dir für den restlichen Verlauf deiner Promotion nur das Beste!

Anne Sommer danke ich für die Hilfe bei Problemstellungen sowie die oft erheiternden Diskussionen über Gott und die Welt. Mit dir einen Arbeitsplatz zu teilen war wirklich eine Freude.

Ich bedanke mich des Weiteren bei allen Mitgliedern des Instituts für Biochemie, die ständig mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein großer Dank geht an Madeleine Künz für die Unterstützung mit der Datenprozessierung, aber vor allem für das jeder Zeit offene Ohr und das Austauschen von Sorgen und Nöten an jedem noch so harten Tag („...und täglich grüßt das Murmeltier!“).

Insbesondere gilt mein Dank auch Katharina Veith für die Unterstützung der ITC-Experimente sowie Dr. Sven Kruspe und Dr. Anna Rath für vielen praktischen Tipps und Tricks bei den Nukleaseassay-Experimenten. Besonders möchte ich auch Stephanie

Besztejan für die großartige emotionale Unterstützung danken, wenn der Tag mal wieder komplett aus dem Ruder lief (was nicht gerade eine Seltenheit darstellte). Ich bin mir sicher, dass du die letzte Phase ebenfalls erfolgreich überstehen wirst!

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich in jeder Phase der Arbeit unterstützt haben, so gut sie nur konnten. Ohne euch wäre das Ganze nicht möglich gewesen!

Mein allergrößter Dank gilt meiner wunderbaren Verlobten Steffi. Ich danke dir für die ganze Kraft, die du mir über die 3 Jahre gegeben hast sowie für deine emotionale und fachliche Unterstützung insbesondere in der Endphase der Arbeit. Ohne dich hätte ich das Ganze nicht halb so gut hinbekommen. Ich bin überaus glücklich, dich an meiner Seite zu haben. Ich liebe dich über alles!



