



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Chemie und Metabolomics der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

# Zur Bindung von Glykanen an Calicivirus P-Domänen

On the binding of glycans to calicivirus P-domains

Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Patrick König, geb. Ogrissek**

aus Lippstadt

Lübeck, 2023



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Peters

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Gutschmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. September 2023

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 15. September 2023



## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater, **Prof. Dr. Thomas Peters**, für die vielen Jahre der außerordentlich guten Betreuung in den verschiedenen Stadien meiner wissenschaftlichen Laufbahn bedanken. Das hier vorgestellte Projekt und die wöchentlichen Diskussionen der aktuellen Ergebnisse mit Ihnen haben mir immer große Freude bereitet. Ich habe sehr viel lernen dürfen und bin Ihnen sehr dankbar für diese tolle Erfahrung.

Außerdem danke ich dem Institut für Physik der Universität zu Lübeck, insbesondere **Prof. Dr. Christian Hübner** und **Dr. Verena Hirschfeld**, für die Unterstützung und Einführung im Bereich der smFRET Mikroskopie. Die Zusammenarbeit hat mir viel Spaß gemacht.

Mein Dank gilt auch meinen Kollaborationspartnern: **Dr. Matthias Stein** und **Dr. Eric Schulze** für die MD-Simulationen der humanen Norovirus P-Domäne sowie **Prof. Dr. Laura Hartmann** und **Sandra Mücke** für die Synthese der Verbindung JGII.79.

Ich möchte auch allen Mitarbeitern am Institut für Chemie und Metabolomics danken. Besonders hervorheben will ich dabei **Prof. Dr. Karsten Seeger**, **Dr. Thorsten Biet** und **Dr. Alvaro Mallagaray**, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ebenfalls danke ich **Dr. Robert Creutzmacher**, **Dr. Thorben Maass**, **Lorena Rudolph** und **Leon Torben Westermann** für die vielen wissenschaftlichen und auch nicht wissenschaftlichen Diskussionen.

Ein aufrichtiger Dank geht an **Carlotta Leonie Fiedler**, **Anna Marit Weissenburg**, **Lea Schröder** und **Marie Gravel**. Es hat mir viel Spaß gemacht mit euch zusammen an dem Projekt zu arbeiten. Ein besseres Team hätte ich mir nicht wünschen können.

Für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen und den wertvollen Momenten außerhalb der Wissenschaft möchte ich mich bei meinen Eltern **Ulrike** und **Markus** sowie meinen Geschwistern **Vanessa** und **Lukas** bedanken.

Mein größter und herzlichster Dank gebührt meiner Frau **Katja** und unserer Tochter **Lilly** für die pausenlose Bereicherung in meinem Leben.

**Tabelle 0.1 Beiträge von Studierenden an den Ergebnissen dieser Dissertation.** Im Rahmen von Bachelorarbeiten und als wissenschaftliche Hilfskräfte haben mehrere Studierende an Projekten in dieser Arbeit unter meiner Betreuung mitgewirkt. Die von den Studierenden durchgeführten Experimente, zusammen mit den Abbildungen, in denen diese Arbeiten eingeflossen sind, sind aufgelistet.

<hr/> <hr/> Carlotta Leonie Fiedler <hr/> <hr/>	
Produktion und Reinigung von $^2\text{H},^{15}\text{N}$ GII.4 Saga N373D P-Domänen	
Bindungsstudien von Verbindungen der Maybridge Library Ro5 an GII.4 Saga	Abbildung 4-3
Bindungsstudien von JGII.79 an GII.4 Saga	Abbildung 4-2
	Abbildung 4-13,
Produktion und Reinigung von fluorophormarkierten GII.4 Saga P-Domänen	Abbildung 4-14
Dissoziationsuntersuchungen von GII.4 Saga P-Dimeren mit FRET	Abbildung 4-15,
	Abbildung 4-17,
	Abbildung 4-19
<hr/> <hr/> Anna Marit Weißenburg <hr/> <hr/>	
Erzeugung der RHDVb Punktmutante S386C	
Produktion und Reinigung von unmarkierten, $^2\text{H},^{15}\text{N}$ und $^{13}\text{C}$ -methylgruppen- markierten RHDVb P-Domänen	Abbildung 4-4, Abbildung 4-5
STD-NMR-spektroskopische Untersuchungen von RHDVb	Abbildung 4-7
Dissoziationsuntersuchungen von GII.4 Saga und RHDVb P-Dimeren mit FRET	Abbildung 4-17, Abbildung 4-19
Stabilitätsmessungen von RHDVb P-Domänen mit CD-Spektroskopie	Abbildung 7-14
<hr/> <hr/> Lea Schröder <hr/> <hr/>	
Produktion und Reinigung von $^2\text{H},^{15}\text{N}$ GII.4 Saga N373D P-Domänen	
Bindungsstudien von JGII.78 an GII.4 Saga	Abbildung 4-2
	Abbildung 4-13,
Produktion und Reinigung von fluorophormarkierten GII.4 Saga P-Domänen	Abbildung 4-14
Dissoziationsuntersuchungen von GII.4 Saga P-Dimeren mit FRET	Abbildung 4-15, Abbildung 4-17, Abbildung 4-19
<hr/> <hr/> Marie Gravel <hr/> <hr/>	
Dissoziationsuntersuchungen von GII.4 Saga P-Dimeren mit FRET	Abbildung 4-16
Produktion und Reinigung von unmarkierten, $^2\text{H},^{15}\text{N}$ und $^{13}\text{C}$ -methylgruppen- markierten RHDVb P-Domänen	Abbildung 4-4, Abbildung 4-5
NMR-spektroskopische Bindungsstudien von Metallionen, Gallensäuren und Glykanen an die RHDVb P-Domäne	Abbildung 4-6, Abbildung 4-8, Abbildung 4-9, Abbildung 4-10, Abbildung 4-11, Abbildung 4-12

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>1.1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
2.1 Das humane Norovirus .....	5
2.1.1 Das Modellsystem - Rabbit Haemorrhagic Disease Virus .....	6
2.1.2 Spontane posttranslationale Modifikation des Asparagins 373.....	7
2.1.3 Liganden von Noroviren .....	8
2.1.4 Dynamik des Noroviruskapsids .....	9
2.1.5 Dimerisierung der Caliciviruskapsid P-Domänen.....	11
2.1.6 Ansätze für die Entwicklung potentieller Norovirus-Inhibitoren .....	11
2.2 Kernspinresonanzspektroskopie mit Biomolekülen.....	12
2.2.1 Isotopenmarkierung von Proteinen.....	12
2.2.2 Untersuchungen von chemischen Verschiebungsperturbationen .....	13
2.2.3 Sättigungs-Transfer-Differenz NMR-Spektroskopie.....	13
2.3 Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie .....	14
2.3.1 Grundlagen der Fluoreszenz.....	14
2.3.2 Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers.....	15
2.3.3 Fluorophormarkierung von Proteinen.....	18
2.3.4 Untersuchung von Dissoziationsraten von Proteindimeren .....	18
2.4 Ziel der Arbeit.....	20
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1 Expressionsvektor/Molekularbiologische Techniken.....	21
3.1.1 Gene und Expressionsvektor .....	21
3.1.2 Transformation in chemisch kompetente Zellen .....	21
3.1.3 Erstellung von Kryostocks.....	22
3.1.4 Ortsspezifische Mutagenese durch Polymerasekettenreaktion .....	22
3.2 Proteinproduktion.....	23
3.2.1 Unmarkierte Proteinproduktion.....	23
3.2.2 $^2\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierte Proteine.....	23
3.2.3 $^{13}\text{C}$ -Methylgruppen-isotopenmarkierte Proteine .....	24
3.3 Proteinreinigung .....	25
3.3.1 Zellyse.....	25
3.3.2 Chromatographische Reinigung.....	25
3.3.3 Denaturierende Gelelektrophorese.....	26
3.3.4 Ent- und Rückfaltung der $^2\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten GII.4 Saga P-Domäne .....	26
3.3.5 Fluorophormarkierung mit Maleimid.....	27
3.4 CD-Spektroskopie.....	29
3.5 Ionen-Austauschchromatographie zur Untersuchung der Deamidierungskinetik .....	29

3.6	Kernspinresonanzspektroskopie .....	30
3.6.1	Datenaufnahme.....	30
3.6.2	Untersuchung von chemischen Verschiebungsperturbationen .....	31
3.6.3	Analyse von Sättigungstransferdifferenz Experimenten .....	31
3.7	Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer Mikroskopie .....	32
3.7.1	Mikroskopaufbau.....	32
3.7.2	Wahl der Punktmutationen für die Fluorophormarkierung .....	33
3.7.3	Probenvorbereitung zur Dissoziationskinetik .....	34
3.7.4	Analyse der Dissoziationskinetik-Experimente .....	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
4.1	Abhängigkeit der Deamidierung von räumlich benachbarten Aminosäuren.....	37
4.2	Bindungsstudien von Fucose-tragenden niedermolekularen Verbindungen an die GII.4 Saga P-Domäne.....	38
4.3	Charakterisierung hydrophober Bindungstaschen in GII.4 Saga P-Dimeren .....	39
4.4	Erste NMR-spektroskopische Untersuchungen der RHDVb P-Domäne .....	42
4.5	Bindungsstudien mit der RHDVb P-Domäne .....	44
4.6	Einzelmolekül-FRET Untersuchungen von P-Dimeren.....	50
4.7	Spezifische Senkung der Dissoziationsraten durch Glykanbindung .....	53
4.8	pH-Wert abhängige Dissoziation von P-Dimeren .....	56
4.9	Beobachtung einer unerwarteten P-Domänen Population .....	57
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
5.1	Ungewöhnliche syn-Konformation des Proteinrückgrats als Ursache der schnellen Deamidierung von GII.4 P-Dimeren .....	59
5.2	Bewertung potentieller Norovirus Eintrittsinhibitoren .....	60
5.3	Bedeutung der RHDVb Bindungsstudien .....	62
5.4	Dissoziationsverhalten verschiedener P-Dimere im Kontext der Kapsiddynamik.....	64
5.5	Bewertung von smFRET zur Ermittlung von Homodimer-Austauschraten .....	65
5.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	66
<b>6</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>V</b>
7.1	Strukturformeln der verwendeten Verbindungen.....	V
7.2	Ionenaustausch-Chromatogramme der VA387 Deamidierungskinetik .....	VII
7.3	Bindungsuntersuchung der Verbindung JGII.79 an GII.4 Saga P-Dimere .....	VIII
7.4	Untersuchung der Verbindungen der Maybridge Library Ro5.....	IX
7.5	STD-NMR-Untersuchungen der RHDVb P-Domäne mit dem H-Disaccharid.....	X
7.6	Untersuchung der Bindung des H-Trisaccharid Typ II an RHDVb P-Dimere .....	XI
7.7	Untersuchung der Gallensäurebindung von RHDVb P-Dimeren .....	XI
7.8	Zusätzliche Informationen zu den FRET-Untersuchungen.....	XII
7.9	CD-Spektroskopische Untersuchungen der RHDVb P-Domäne .....	XV
7.10	Matlab Code für die Kurvenanpassung zur Ermittlung der Austauschraten .....	XVII
7.11	Publikationen .....	XVIII

## 1.1 Zusammenfassung

Jährlich versterben mehr als 200.000 Menschen an den Folgen einer Norovirusinfektion. Der Infektionsmechanismus des Virus ist dabei weitestgehend unerforscht. Die Infektion beginnt mit der Interaktion des Viruskapsids mit Blutgruppenantigenen (HBGA) auf der Wirtszelloberfläche. Ein Ansatz zur Bekämpfung der Infektion ist die Blockierung dieser Bindung durch einen Inhibitor. Durch Untersuchungen mit der Kernspinresonanz (NMR) Spektroskopie konnte in dieser Arbeit eine synthetische Verbindung (JGII.78) identifiziert werden, welche eine mit den natürlichen Liganden vergleichbare Affinität aufweist. Diese Verbindung bietet einen geeigneten Startpunkt für die Entwicklung eines Eintrittsinhibitors.

Die hervorstehende (protruding) Domäne (P-Domäne) des humanen Noroviruskapsidproteins VP1 interagiert mit HBGAs und liegt dabei als Homodimer vor. Eine spontane Deamidierung eines Asparagins in der P-Domäne führt zu einer Verringerung der Bindungsaffinität für HBGAs. Hier wurde die Ionenaustauschchromatographie eingesetzt, um die Deamidierungskinetik des Proteins in Abhängigkeit von räumlich benachbarten Aminosäuren zu untersuchen. Moleküldynamiksimulationen aus der Arbeitsgruppe Stein (MPI Magdeburg) legten nahe, dass eine ungewöhnliche syn-Konformation des Proteinrückgrats für die rasche Deamidierung verantwortlich gemacht werden muss. Die syn-Konformation verstärkt die Nukleophilie des als Nukleophil agierenden Rückgrat N-Atoms und beschleunigt dadurch die Reaktion. Vorhersagealgorithmen zur Deamidierungswahrscheinlichkeit sollten zukünftig diese syn-Konformation als weiteren Parameter berücksichtigen.

Die P-Domäne einer neuen Variante des Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) RHDVb, das wie das Norovirus zur Familie der *Caliciviridae* gehört, konnte von mir erstmals isotopenmarkiert hergestellt und gereinigt werden. Bindungsstudien mit Hilfe von NMR-Experimenten zeigten eine selektive Bindung des Trisaccharids der Blutgruppe H Typ II. Außerdem konnte die Bindung verschiedener Metallionen und erstmalig auch Gallensäuren nachgewiesen werden. Durch die Senkung des pH-Wertes und/oder der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  konnte eine verbesserte Affinität der RHDVb P-Domäne für L-Fucose beobachtet werden. Diese Modulierung der Glykanbindung könnte eine wichtige Rolle bei der Virusinfektion spielen und sollte weiter untersucht werden.

Das Dimerisierungsverhalten der Calicivirus P-Domänen von humanen Noroviren und RHDV ist weitgehend unerforscht. Aktuelle Studien zeigen, dass das Viruskapsid keine starre Kugel ist, sondern zwischen Konformationen wechselt. Unter Verwendung der Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer Mikroskopie konnte ein pH-Wert- und Liganden-abhängiger Austausch von GII.4 Saga und RHDVb P-Dimeren beobachtet werden. Die Senkung des pH-Wertes und die Anwesenheit von Glykanen stabilisiert die Dimere. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine partielle Dissoziation der P-Domänen, abhängig von der Umgebung, auch im gesamten Kapsid möglich sein könnten und eine neue Ebene der Dynamik darstellt.



## 1.2 Abstract

Every year, more than 200,000 people die as a result of a norovirus infection. The infection mechanism of the virus is largely unexplored. The infection is initiated by the interaction of the virus capsid with histo blood group antigens (HBGA) on the host cell. One approach to prevent the infection is to block HBGA binding by an inhibitor. Using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, a synthetic compound (JGII.78) was identified to have an affinity comparable to the natural ligands. This compound may provide a suitable starting point for the development of an entry inhibitor.

The protruding domain (P-domain) of human noroviruses interacts with HBGAs and is present as a homodimer. Spontaneous deamidation of an asparagine in the P-domain leads to a decrease in binding affinity for HBGAs. Here, ion exchange chromatography was used to investigate the deamidation kinetics of the P-domain as a function of spatially surrounding amino acids. Molecular dynamics simulations in the laboratory of Matthias Stein (MPI Magdeburg), suggest that an unusual syn-conformation of the protein backbone, leading to an enhanced nucleophilicity of the backbone nitrogen atom performing the nucleophilic attack, promotes deamidation. In the future, prediction algorithms for the probability of deamidation should take the syn-conformation into account as an additional parameter.

The P-domain of a new variant of the Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV), RHDVb, which like the norovirus belongs to the family of *Caliciviridae*, was produced and purified as stable isotope labelled protein. Binding studies using NMR experiments revealed selective binding of blood group H type II trisaccharide. In addition, the binding of various metal ions and, for the first time, of bile acids was detected. By lowering the pH and/or by the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , the affinity for glycans was improved. This modulation of glycan binding could play an important role in viral infection and should be further investigated.

The dimerisation behaviour of the P-domains of human noroviruses and of RHDV is largely unexplored. Recent studies show that the virus capsid is not a rigid sphere but switches between conformations. Using single-molecule Förster resonance energy transfer microscopy, a pH- and ligand-dependent exchange of human norovirus GII.4 Saga P-dimers and of RHDVb P-dimers was observed. Lowering the pH and the presence of glycans stabilised the dimers. These results indicate that partial dissociation of the P-domains, depending on the environment, could be possible throughout the capsid, representing a new level of dynamics.



## 2 Einleitung

Zur gezielten Entwicklung von Medikamenten gegen Virusinfektionen ist es notwendig, die Interaktionen von Virusproteinen besser zu verstehen. Einen besonderen Fokus haben dabei die Kapsidproteine, da diese außerhalb von Zellen zugänglich für potentielle Medikamente sind und erste Interaktionen mit den Wirtszellen eingehen. Mit atomarer Auflösung lassen sich Bindungsstudien mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) durchführen. Komplementär dazu kann die Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer Mikroskopie (smFRET-Mikroskopie) verwendet werden, um langsamere Prozesse auf der Ebene von einzelnen Molekülen zu charakterisieren. Dieses Kapitel befasst sich mit dem biologischen Hintergrund des humanen Norovirus und des eng verwandten Rabbit Hemorrhagic Disease Virus b (RHDVb) sowie mit ausgewählten NMR-Experimenten zur Untersuchung von Ligandenbindung. Außerdem wird eine Methode zur Untersuchung von Dissoziationsraten dimerer Proteine mit smFRET vorgestellt.

### 2.1 Das humane Norovirus

Das humane Norovirus ist weit verbreitet und verursacht jährlich 677 Millionen Infektionen (Pires et al., 2015). Norovirusinfektionen verursachen im Regelfall Erbrechen und Diarrhoe über einen Zeitraum von 2-3 Tagen (Robiloti et al., 2015). Jedoch versterben jährlich auch mehr als 200.000 Menschen an einer Norovirusinfektion (Pires et al., 2015). Besonders betroffen sind Kinder unter 5 Jahren mit mehr als 70.000 Toden weltweit pro Jahr (Lanata et al., 2013). Zusätzlich kommt es zu finanziellen Schäden durch das Norovirus. Nach Schätzungen betragen die jährlichen globalen Kosten über 4 Milliarden US Dollar für das Gesundheitssystem und mehr als 60 Milliarden US Dollar Kosten für die gesamte Gesellschaft (Bartsch et al., 2016).

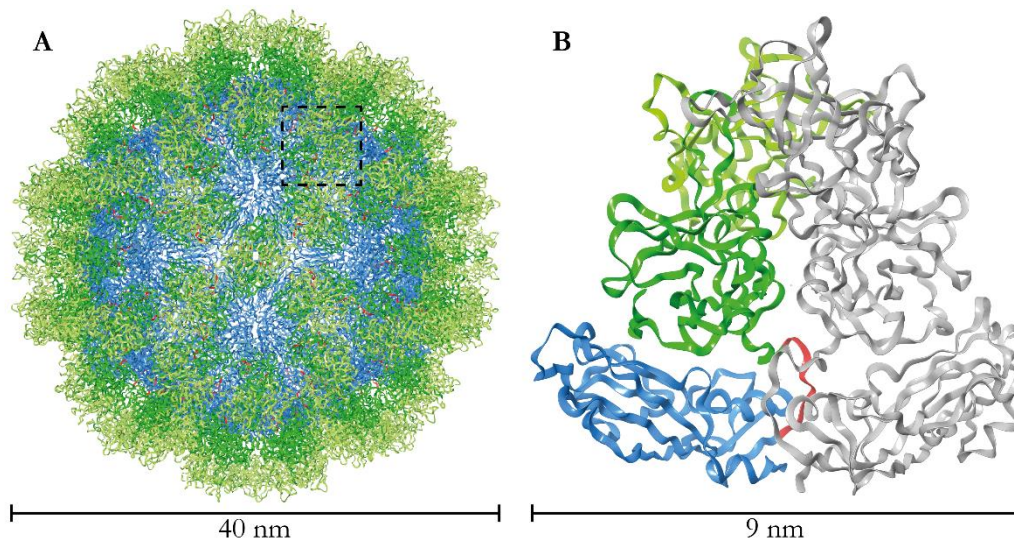
Humane Noroviren infizieren Zellen im Dünndarm, wobei unbekannt ist, welche Zellen infiziert werden. Es wird davon ausgegangen, dass Enterozyten die wahrscheinlichsten Wirtszellen sind (Atmar et al., 2018). Bis heute gibt es weder eine Impfung noch ein Medikament gegen das Norovirus (Arias et al., 2013). Die Erforschung von Noroviren ist aufgrund der herausfordernden Kultivierbarkeit erschwert. Noroviren wurden bereits erfolgreich in B-Zellen (Jones et al., 2014) und in humanen Darmenterozyten kultiviert (Ettayebi et al., 2016), jedoch sind diese Verfahren experimentell sehr aufwendig und teuer.

Noroviren gehören zu der Familie der *Caliciviridae* und sind nicht umhüllte, einzelsträngige RNA-Viren mit positiver Polarität (Vinjé et al., 2019). Das RNA Genom von Noroviren ist in drei open-reading frames (ORF) organisiert. Während das ORF1 für die 6 Nichtstrukturproteine kodiert, wird das Haupt-Kapsidprotein VP1 durch ORF2 und das kleinere Kapsidprotein VP2 durch ORF3 kodiert. Mit Hilfe einer phylogenetischen Analyse wird die Aminosäuresequenz des VP1 Proteins für eine weitere Unterteilung des Genus *Norovirus* verwendet. Dabei wurden zehn Genogruppen erstellt, die anschließend in Genotypen unterteilt wurden (Chhabra et al., 2019). Zusätzlich werden die Stämme durch den Namen der Region ergänzt, in dem ein Stamm zuerst entdeckt wurde. Zum Beispiel gehört der seit fast 20 Jahren vorherrschende Stamm GII.4 Saga (van Beek et al., 2018) zu der Genogruppe II, dem Genotyp 4 und wurde in Saga in Japan entdeckt.

Das Noroviruskapsid wird durch das Haupt-Kapsidprotein VP1 aufgebaut (Abbildung 2-1). Das VP1 Protein bildet Dimere, wobei 90 dieser Dimere das Kapsid bilden (Vinjé et al., 2019). Das VP1 Protein kann in zwei Domänen unterteilt werden, welche durch einen flexiblen Linker verbunden sind (Prasad et al., 1999). Die Domäne, die in das Innere des Kapsids gerichtet ist, bildet die

Verbindungen zu anderen VP1-Dimeren aus und wird als shell (Schale)-Domäne (S-Domäne) bezeichnet. Darauf aufsitzend befindet sich die protruding (hervorstehende)-Domäne (P-Domäne), welche in zwei Subdomänen P1 und P2 unterteilt werden kann. Die P2-Subdomäne unterliegt der größten Sequenzvariabilität zwischen Stämmen und bildet die Interaktionen mit der Umgebung, wie der Wirtszelle, aus (Prasad et al., 2016).

Die Eigenschaften der Viruskapside lassen sich mit Hilfe replikationsunfähiger Virus-ähnlicher Partikel (engl. virus-like particle, VLP) untersuchen. Dabei wird das VP1 Protein in Insektenzellen produziert und assembliert sich zu VLPs, welche anschließend gereinigt werden können. Alternativ können Interaktionsstudien des Noroviruskapsids mit der protruding-Domäne (P-Domäne) des VP1 Proteins durchgeführt werden. Diese kann rekombinant in *E. coli* produziert und anschließend chromatographisch gereinigt werden (Tan et al., 2004). Die P-Domäne alleine bildet bereits Dimere aus, welche als P-Dimere bezeichnet werden.



**Abbildung 2-1 Struktur des Noroviruskapsids (PDB 7MRY, (Hu et al., 2022)).** (A) zeigt das Noroviruskapsid in der T=3 Symmetrie, welches aus 180 Kopien des Haupt-Kapsidproteins VP1 aufgebaut ist. Die shell-Domäne ist in blau, die flexible Linker-Region in rot und die protruding-Domänen 1 und 2 in grün und gelbgrün respektive dargestellt. Markiert ist ein VP1 Dimer, welches in (B) vergrößert dargestellt wird. Ein VP1 Protein ist in der gleichen Farbcodierung wie in (A) eingefärbt.

### 2.1.1 Das Modellsystem - Rabbit Haemorrhagic Disease Virus

Aufgrund der lange fehlenden und heute immer noch schwer zugänglichen Zellkultursysteme für humane Noroviren (Ettayebi et al., 2016; Jones et al., 2015), werden häufig Modellsysteme von eng verwandten Viren verwendet, um den Replikationszyklus humaner Noroviren zu untersuchen. Dazu gehören besonders das Tulane-Virus, das Porcine Enteric Calicivirus (PEC), das Feline Calicivirus (FCV), das Murine Norovirus (MNV) und das Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) (Vashist et al., 2009).

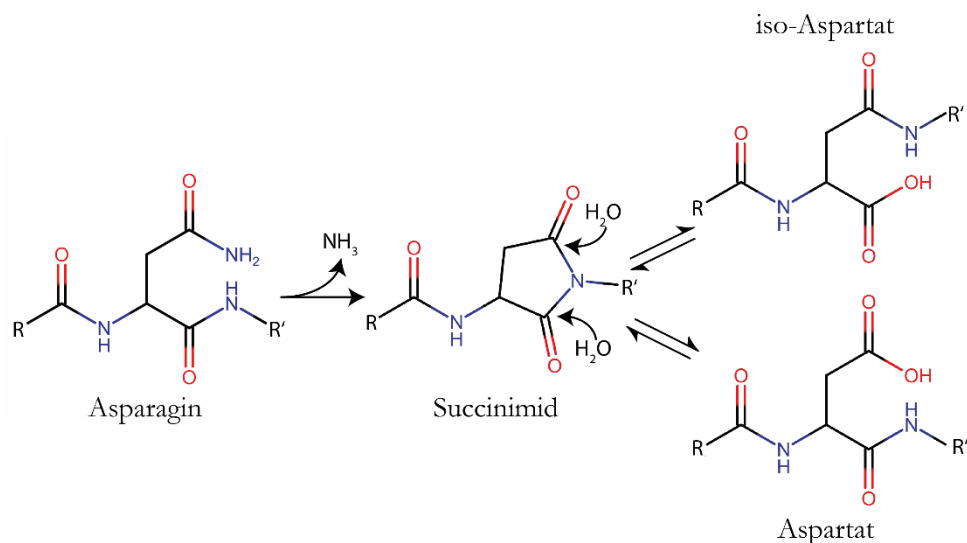
RHDV gehört zum Genus *Lagovirus* in der Familie der *Caliciviridae* und besitzt eine 39 % Sequenzidentität über das gesamte Genom zu humanen GI.4 Noroviren (Vashist et al., 2009). Anders als die humanen Noroviren, infiziert RHDV Kaninchen und verursacht eine Entzündung der Leber (Hepatitis) und Blutungen (hämorrhagisch) (Thiel and König, 1999). Das Virus wurde 1984 erstmals identifiziert (Liu et al., 1984) und innerhalb von neun Monaten sind nach einem Ausbruch in China in einer Region von 50.000 km<sup>2</sup> fast alle Kaninchen gestorben (Xu, 1991). 1986 hat sich das

Virus auch in Europa ausgebreitet und wurde endemisch in mehreren Ländern (Abrantes et al., 2012). Anschließend konnte das Virus mit Hilfe eines Impfstoffs unter Kontrolle gebracht werden (Argüello Villares, 1991; Xu, 1991). 2010 wurde in Frankreich eine neue RHDV Variante mit 80 % Sequenzidentität beobachtet und als RHDVb (auch RHDV2) bezeichnet (Le Gall-Reculé et al., 2011). Mit einer durchschnittlichen Mortalitätsrate von bis zu 30 % ist diese Variante nicht mehr so letal, jedoch infiziert sie auch geimpfte und junge Tiere (Le Gall-Reculé et al., 2011).

Aufgrund der Ähnlichkeit der Kapsidstrukturen der humanen Noroviren und RHDV bietet sich RHDV als ein interessantes Modellsystem an, um Ähnlichkeiten und Unterschiede zu studieren und dadurch die Spezifität von Viren genauer zu verstehen.

### 2.1.2 Spontane posttranslationale Modifikation des Asparagins 373

Für einige GII.4 Noroviren, darunter GII.4 Saga und GII.4 VA387, wurde eine spontane und irreversible posttranslationale Modifikation eines Asparagins beobachtet (Mallagaray et al., 2019; Ogrissek, 2020). Es handelt sich um eine Temperatur und pH-Wert abhängige Deamidierung (Abbildung 2-2). Dabei kommt es zu einem intramolekularen nucleophilen Angriff des Amidstickstoffs im Proteinrückgrat des Asp374 auf das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe in der Seitenkette des Asn373. Als Ergebnis dieser Reaktion wird Ammoniak abgespalten und ein Succinimid als Zwischenprodukt gebildet. Dieses reagiert sofort über eine Addition von Wasser zu iso-Aspartat oder Aspartat weiter. Für GII.4 Saga und GII.4 VA387 wurde ausschließlich die Bildung von iso-Aspartat beobachtet (Mallagaray et al., 2019; Ogrissek, 2020). Die Modifikation zum iso-Aspartat hat die Bildung einer Isopeptidbindung im Proteinrückgrat und abhängig vom pH-Wert eine zusätzliche negative Ladung zur Folge.



**Abbildung 2-2 Reaktionsmechanismus der Deamidierungsreaktion eines Asparagins.** Durch den intramolekularen Angriff des Amidstickstoffs an das Carbonylkohlenstoff der Asparaginseitenkette wird das Zwischenprodukt Succinimid gebildet. Dieses reagiert, abhängig von der Position der Wasseraddition, sofort zu den Produkten Aspartat oder iso-Aspartat weiter.

Die Deamidierungsreaktion ist vorwiegend als Alterungsprozess im Kontext von Antikörpern bekannt (Harris et al., 2001). Im Fall von GII.4 Saga deamidiert das Protein mit einer Halbwertszeit von 1,6 Tagen bei 37 °C (Mallagaray et al., 2019). Damit ist die Deamidierung in diesem Protein eine der schnellsten bisher beobachteten. Die P-Dimere des eng verwandten Stammes GII.4 VA387 deamidieren circa 3-mal langsamer (Ogrissek, 2020). Die Prognose von Deamidierungen über die

Aminosäureabfolge (Robinson and Robinson, 2001) sagt in beiden Stämmen für das Asparagin 373 keine besondere Deamidierungsneigung vorher. Eine Begründung für die schnelle und spezifische Deamidierung war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht verfügbar.

Der Prozess findet auf der Zeitskala der Infektion statt, jedoch ist die biologische Relevanz dieser Reaktion noch unbekannt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Deamidierung als Temperatur- und pH-Sensor agiert, um die Infektiosität zu kontrollieren (Dülfer et al., 2021). VLPs und P-Dimere sind bei niedrigen pH-Werten und Temperaturen stabil (Pogán et al., 2018) und deamidieren langsam (Mallagaray et al., 2019). Nach dem Eintritt in den Körper steigt die Temperatur und somit auch der Anteil des deamidierten Proteins. Durch die Deamidierung steigt die Flexibilität im P-Dimer, wodurch eine verbesserte Anheftung an die Wirtszelle realisiert werden könnte (Dülfer et al., 2021).

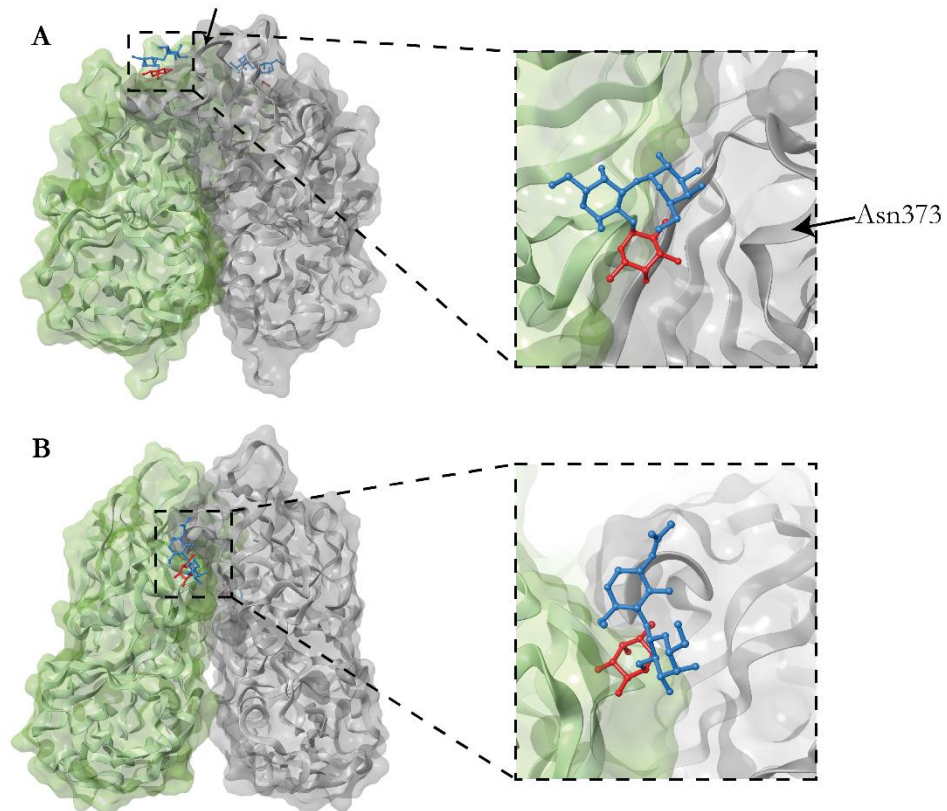
Da die fortlaufende irreversible Reaktion die Untersuchung von homogenen Proben erschwert, ist eine Punktmutation des Asparagins vorteilhaft. Dabei hat sich die N373D Mutante der GII.4 Saga P-Domäne als geeignetes Modellsystem des nicht deamidierten Proteins herausgestellt (Creutzmacher et al., 2021).

### 2.1.3 Liganden von Noroviren

Während für humane Noroviren noch keine Proteinrezeptoren gefunden wurden und somit auch nicht bekannt ist, ob sie existieren, sind Glykane als Bindungsfaktoren (eng. attachment factor) für die erste Erkennung der Wirtszellen seit einiger Zeit bekannt (Huang et al., 2003; Marionneau et al., 2002). Diese Glykane sind die Blutgruppenantigene (engl. histo blood group antigens, HBGA) und werden von Epithelzellen an der Zelloberfläche durch Glykolipide und Glykoproteine exponiert, insbesondere in der Magen-Darm-Schleimhaut. HBGAs besitzen das Disaccharid  $\alpha$ -L-Fuc-(1,2)-D-Gal (H-Antigen) und können mit N-Acetylgalaktosamin zum A-Antigen oder mit einer Galaktose zum B-Antigen erweitert werden. Die L-Fucose hat sich als minimale Bindungseinheit herausgestellt (Fiege et al., 2012). Die Affinität für die Glykane liegt im niedrigen mM Bereich. Für den Stamm GII.4 Saga liegen die Affinitäten beispielsweise bei 22 mM für das Methylglykosid der  $\alpha$ -L-Fucose (Mallagaray et al., 2019). Die beste Affinität wurde für das A-Trisaccharid mit 4,3 mM beobachtet (Creutzmacher et al., 2021).

GII.4 Saga bindet HBGAs an der P2-Domäne, wobei ein VP1-Dimer zwei Bindungsstellen besitzt (Abbildung 2-3A). Diese Bindungsstellen sind in enger Nachbarschaft zu dem Asparagin 373, welches spontan deamidiert (s. Kapitel 2.1.2). Als Folge der Deamidierungsreaktion ist die Affinität für HBGAs deutlich gesenkt und beträgt beispielsweise für das Methylglykosid der  $\alpha$ -L-Fucose nur noch circa 220 mM (Mallagaray et al., 2019). Für das klassische RHDV und RHDVb wurden ebenfalls HBGAs als Bindungsfaktoren beobachtet (Leuthold et al., 2015; Nyström et al., 2011; Rademacher et al., 2008). Dabei sollen H Typ II Oligosaccharide, aber keine vom Typ I gebunden werden. H Typ I und II Saccharide unterscheiden sich dabei nur in einer glykosidischen Bindung (Abbildung 7-1). Die Bindungsstelle befindet sich wie für das humane Norovirus GII.4 Saga in der P2-Domäne, jedoch weiter nach unten zur S-Domäne verschoben (Abbildung 2-3B). Affinitäten der Zuckerbindung von RHDV wurden noch nicht beschrieben. Sowohl bei GII.4 Saga als auch bei RHDVb befindet sich die Bindungsstelle der HBGAs an der Grenzfläche der P-Domänen, wodurch beide Proteine an der Bindung eines Zuckers beteiligt sind.

Neben den Blutgruppenantigenen wurden außerdem Gallensäuren als Liganden der humanen Noroviren beschrieben. Während Gallensäuren für GII.4 Noroviren die Reproduktion signifikant verbessern, sind sie für andere Stämme wie GI.1, GII.3 und GII.17 essentiell (Ettayebi et al., 2016). Für das murine Norovirus (MNV-1) und das Porcine Enteric Calicivirus (PEC) wurde ebenfalls die Relevanz von Gallensäuren beobachtet (Nelson et al., 2018; Shivanna et al., 2014). Interaktionen von RHDV und Gallensäuren hingegen wurden noch wenig untersucht. Ein Anstieg der Gallensäurekonzentration bei der Infektion mit RHDVb deutet jedoch ebenfalls auf eine mögliche Rolle im Infektionszyklus hin (Bonvehí et al., 2019).



**Abbildung 2-3 HBGA-Bindung an die P-Domäne vom humanen Norovirus GII.4 Saga und RHDVb.** In (A) ist die Kristallstruktur des co-kristallisierten GII.4 Saga P-Dimers mit dem Blutgruppenantigen B-Trisaccharid dargestellt (PDB 4X06, (Singh et al., 2015)). Außerdem ist das deamidierende Asparagin (s. Kapitel 2.1.2) mit einem Pfeil markiert. In (B) ist die Kristallstruktur vom RHDVb P-Dimer zusammen mit dem H-Trisaccharid Typ II abgebildet (PDB 4X1Z, (Leuthold et al., 2015)). Eine der beiden Bindungsstellen der Glykane ist jeweils vergrößert gezeigt. Die Bindung der Zucker findet jeweils an der Grenzfläche der Dimere statt, wodurch beide Proteine des Dimers an der Bindung beteiligt sind.

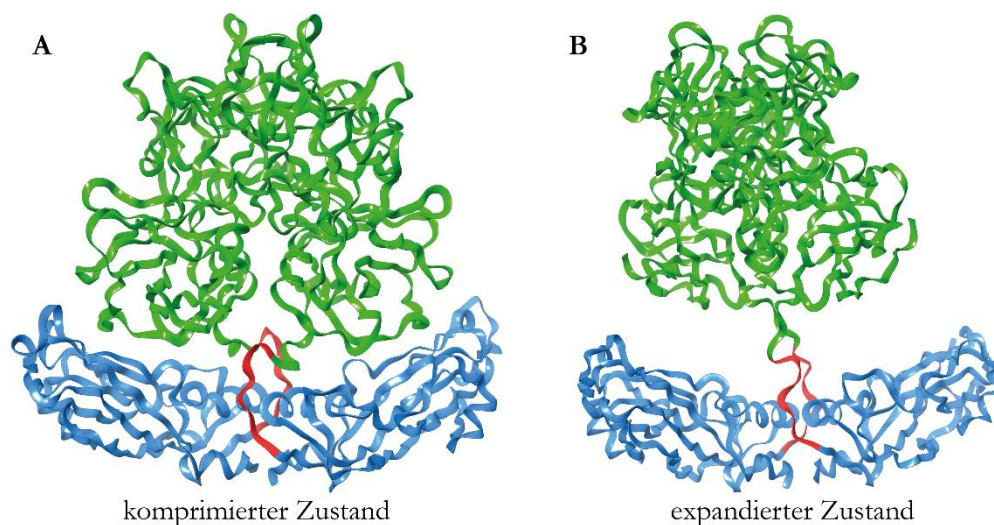
#### 2.1.4 Dynamik des Noroviruskapsids

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen zwei Konformationen, die das Kapsid von Viren der Familie *Caliciviridae* einnehmen kann. In dem komprimierten Zustand (engl. compressed state) sitzt die P-Domäne direkt auf der S-Domäne auf. Durch den flexiblen Linker kann die P-Domäne jedoch auch circa 15 Å von der durch die S-Domäne gebildete Schale hervorstehen (Hansman et al., 2012) und wird dann als expandierter Zustand oder schwebende (engl. floating) P-Domäne bezeichnet (Smith and Smith, 2019). Dabei wurden diese Zustände noch nicht gleichermaßen für alle Viren der Familie *Caliciviridae* gefunden. Für das Norwalk Virus wurde lediglich der komprimierte Zustand in der Kristallstruktur beobachtet (Prasad et al., 1999). Für die Kapside des murinen Norovirus

(MNV-1) (Katpally et al., 2008), des Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) (Katpally et al., 2010) sowie eines humanen Norovirus GII.10 Vietnam026 (Hansman et al., 2012) wurde mit Hilfe von Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) der expandierte Zustand aufgenommen. Zusätzlich zu den schwebenden P-Domänen sind die P-Domänen relativ zu der P-Domäne vom Norwalk Virus um  $40^\circ$  für GII.10 Vietnam026 und MNV-1 gedreht (Hansman et al., 2012; Katpally et al., 2008). Diese Rotation wurde für die RHDV P-Domäne nicht beobachtet (Katpally et al., 2010).

Die komprimierten und expandierten Konformationen sind am murinen Norovirus (MNV-1) am besten untersucht. Hier konnte durch die Bindung vom Rezeptor, der Gallensäure Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA) oder von Calciumionen ein Wechsel vom expandierten Zustand in den komprimierten Zustand beobachtet werden (Nelson et al., 2018). Durch diesen Konformationswechsel konnte eine Verhinderung der Antikörperbindung festgestellt werden (Creutzmacher et al., 2022; Williams et al., 2021). Das Virus kann folglich durch den Wechsel der Konformation einer Neutralisation durch den Antikörper entkommen.

Für die humanen Noroviren vom Stamm GII.4 wurden mit Hilfe von Kryo-EM Kapside in der komprimierten (Hu et al., 2022) und in der expandierten Konformation (Devant and Hansman, 2021; Jung et al., 2019) beobachtet (Abbildung 2-4). Des Weiteren konnte durch dynamische Lichtstreuungsmessungen (engl. dynamic light scattering, DLS) für GII.4 HOV ein Wechsel vom komprimierten in den expandierten Zustand durch die Komplexierung von Metallionen mit EDTA beobachtet werden (Hu et al., 2022). Es ist folglich anzunehmen, dass auch die weit verbreiteten humanen Noroviren vom Stamm GII.4 komplexe Kapsiddynamiken aufweisen.



**Abbildung 2-4 Vergleich von komprimierten und expandierten VP1 Dimeren.** (A) zeigt den komprimierten Zustand des GII.4 HOV VP1 Dimers (PDB 7MRY, (Hu et al., 2022)), in welchem die P-Domäne (grün) direkt auf der S-Domäne (blau) aufliegt. In (B) ist der expandierte Zustand vom GII.4 Minerva VP1 Dimer (PDB 6OUU, (Jung et al., 2019)) dargestellt. Die P-Domäne ist in diesem Zustand mehr als 15 Å von der S-Domäne entfernt und um circa  $40^\circ$  gedreht. Die flexible Linkerregion ist in rot dargestellt.

Es wurden bereits mehrere Antikörper gefunden, welche an Regionen der humanen P-Domäne binden, die in dem komprimierten Zustand maskiert wären (Smith and Smith, 2019). Diese Position der immunodominanten Regionen des Proteins werfen bis heute Fragen auf. Eine Hypothese für die biologische Relevanz der schwebenden P-Domänen ist die erhöhte Zugänglichkeit für Proteasen. Die P-Domänen könnten vom Kapsid getrennt werden und das Immunsystem mit sonst unzugänglichen Strukturelementen „ablenken“. Außerdem könnte eine der beiden Zustände besser an die Wirtszelle binden und damit als infektiöse Form agieren (Smith and Smith, 2019).

### 2.1.5 Dimerisierung der Caliciviruskapsid P-Domänen

Die P-Domäne von Viren der Familie *Caliciviridae* bildet bereits ohne die S-Domäne Homodimere aus. Interessanterweise ist das Dimerisierungsverhalten der P-Domänen vom Virustyp abhängig. Für das murine Norovirus (MNV-1) wurden NMR-spektroskopisch und chromatographisch P-Domänen Monomere (P-Monomere) beobachtet, welche bei Konzentrationserhöhung dimerisieren (Creutzmacher et al., 2022). Außerdem konnte eine Dimerisierung durch Bindung der Gallensäure GCDCA festgestellt werden (Creutzmacher et al., 2022). Für das humane Norovirus GII.4 Saga und GII.4 VA387 konnten bislang keine Monomere NMR-spektroskopisch oder chromatographisch beobachtet werden. Deren Konzentration liegt folglich unter der Nachweisgrenze (Creutzmacher et al., 2022; Ogrissek, 2020). Für MNV-1 und GII.4 Saga konnten Dissoziationsraten bestimmt werden, welche sich um den Faktor  $10^6$  unterscheiden. Die P-Dimere von MNV-1 dissoziieren mehr als einmal pro Sekunde, während die P-Dimere von GII.4 Saga im Durchschnitt wenige Tage benötigen (Creutzmacher et al., 2022; Ogrissek, 2020). Für GII.4 Saga konnte eine Abhängigkeit der Dissoziationsrate vom pH-Werte und der Glykanbindung beobachtet werden. Die Dissoziationsrate ist nach der Senkung des pH-Wertes von 7,9 auf 5,7 um circa den Faktor vier reduziert. Durch die Zugabe des Methylglykosids der Fucose ist ebenfalls eine Reduktion der Dissoziationsrate um den Faktor vier zu beobachten (Ogrissek, 2020).

Auch massenspektrometrisch konnten für die nicht deamidierten (s. Kapitel 2.1.2) P-Domänen von GII.4 Saga und GII.4 MI001 keine Monomere beobachtet werden (Dülfer et al., 2021). Für das deamidierte Protein wurden Monomere detektiert. Dabei betrug der monomere Anteil 32 % für GII.4 Saga (Dülfer et al., 2021). NMR-spektroskopisch wurden nach vollständiger Deamidierung jedoch keine zusätzlichen Signale beobachtet, welche bei einer Dissoziation in P-Monomere zu erwarten wären (Mallagaray et al., 2019).

Die Dissoziation der P-Dimeren deutet auf eine weitere Ebene der Komplexität des Viruskapsids hin. Bei intakten Kapsiden sind die P-Domänen über einen flexiblen Linker mit der S-Domäne verbunden und nicht frei beweglich. In der expandierten Form des Kapsids (s. Kapitel 2.1.4) könnten die P-Domänen zumindest partiell dissoziieren, ohne dass sich das ganze Kapsid öffnet. Dadurch wären sonst verborgene Regionen der P-Domäne zugänglich und könnten eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Wirtszelle spielen.

### 2.1.6 Ansätze für die Entwicklung potentieller Norovirus-Inhibitoren

Die für den Lebenszyklus von Noroviren essentielle Bindung von HBGAs (Huang et al., 2003; Marionneau et al., 2002) kann für die Entwicklung von Norovirus-Inhibitoren genutzt werden. Dabei ist ein Ansatz die Entwicklung eines multivalenten Eintrittinhibitors. Dieser soll an die HBGA-Bindungstasche binden. Über die Verknüpfung mehrerer Einheiten der Verbindung über einen Linker soll Multivalenz erreicht und die Affinität verbessert werden (Rademacher et al., 2011).

Um die Bindung des Inhibitors an die HBGA-Bindungstasche zu verbessern, ist eine Möglichkeit die Erweiterung der schon bindenden Zuckerstruktur um eine weitere Verbindung. Dafür wurden bereits 430 Verbindungen der Maybridge Library Ro5 auf eine potentielle Bindung untersucht, wobei 54 Verbindungen identifiziert wurden, welche an die HBGA-Bindungstasche binden sollen (Rademacher et al., 2011).

Für GII.10 Norovirus P-Dimere konnte in unveröffentlichten Kristallstrukturen die Bindung einer synthetisch hergestellten Verbindung an die HBGA Bindungsstelle beobachtet werden (Grant

Hansman, Mila Leuthold, Pavel Kitov und Julie Guard, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Verbindung, JGII.79, besitzt eine Fucose mit einer 2-Fluorzimtsäure und einem Sulfamethazin (Abbildung 7-2). Dabei ist ein entscheidender Vorteil der Verbindung die vergleichsweise einfache und modulare Synthese. Die Ugi-Reaktion erfolgt in einem Schritt, wobei ein Amin, eine Carbonyl-Gruppe, eine Carbonsäure und ein Isonitril zum Produkt reagieren (Ugi, 1959). Dabei sind die einzelnen Edukte austauschbar, wodurch leicht verschiedene Produkte synthetisiert werden können.

## 2.2 Kernspinresonanzspektroskopie mit Biomolekülen

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) ermöglicht die Untersuchung von Biomolekülen, wie Proteinen, unter nahezu physiologischen Bedingungen. Die Probe kann in wässriger Umgebung bei verschiedensten Pufferbedingungen gemessen werden. Die NMR-Spektroskopie liefert viele Informationen für Bindungsstudien. Im Idealfall kann die Bindungsaffinität, das Bindungsepitop des Proteins und des Liganden und die Bindungskinetik untersucht werden (Barrett et al., 2013; Mayer and Meyer, 2001; Williamson, 2013). In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Untersuchung von Proteinen und deren Interaktion mit Liganden beschrieben. Für einen generellen Hintergrund der NMR-Spektroskopie sind Textbücher, wie „Understanding NMR Spectroscopy“ von James Keeler, 2010 (Keeler, 2010), empfohlen.

### 2.2.1 Isotopenmarkierung von Proteinen

Für eine zweidimensionale NMR-spektroskopische Untersuchung ist die Einbringung von  $^{13}\text{C}$  oder  $^{15}\text{N}$  notwendig, welche wie  $^1\text{H}$  Atome eine Kernspinquantenzahl von  $\frac{1}{2}$  besitzen. Diese stabile Isotopenmarkierung kann während der rekombinanten Proteinproduktion in *E. coli* erfolgen. Dafür werden im Medium  $^{13}\text{C}$ - bzw.  $^{15}\text{N}$ -angereicherte Verbindungen angeboten, welche anschließend im Protein eingebaut werden. Im Fall der  $^{15}\text{N}$ -Markierung wird  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  verwendet, um eine uniforme Markierung aller Stickstoffatome zu erzielen. Aufgrund von schneller Dipol-Dipol Relaxation zwischen den umgebenden Protonen der angeregten Kerne, werden die Signale für Proteine  $>25$  kDa unbrauchbar (Venters et al., 1996). Um diese schnelle Relaxation zu vermeiden, kann die Anzahl an Protonen im Protein durch eine Proteinproduktion in  $\text{D}_2\text{O}$  gesenkt werden (Gardner and Kay, 1998). Für die Messung von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Kopplungen der Amidgruppen im Proteinrückgrat wird ein Austausch der amidischen Deuteronen gegen Protonen durchgeführt. Für größere Proteine kann eine Ent- und Rückfaltung des Proteins notwendig sein, um im Inneren des Proteins verborgene Deuteronen auszutauschen (Mallagaray et al., 2019).

Alternativ zur Markierung der Amidgruppen, können die Methylgruppen von Methionin, Isoleucin, Leucin, Valin und Alanin mit  $^{13}\text{C}$  markiert werden. Dafür wird standardmäßig das Protein in  $\text{D}_2\text{O}$ -haltigem Medium mit  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  methylgruppenmarkierten Vorläufern der Aminosäuren produziert. Durch die Zugabe der einzelnen Vorläufer kann selektiv eine Aminosäuresorte, beispielsweise alle Alanine, markiert werden. Auf diese Weise kann eine erste Zuordnung der Resonanzen erfolgen.

Die Messung von  $^1\text{H},^{15}\text{N}$  Experimenten hat eine bessere Verteilung von Reportergruppen über das Protein als Vorteil, jedoch ist die Ent- und Rückfaltung für große Proteine häufig problematisch. Dieser Schritt ist für die Methylgruppenmarkierung nicht notwendig. Nachteilig ist jedoch, dass mit den Methylgruppen nur ein kleinerer Teil des Proteins beobachtet wird. Ein Vorteil der Untersuchung von Methylgruppen ist das verbesserte Signal zu Rausch Verhältnis.

Zweidimensionale NMR-spektroskopische Untersuchungen von Proteinen mit  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  markierten Amidgruppen oder  $^{13}\text{C}$  markierten Methylgruppen können mit  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC und  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC-Experimenten untersucht werden. Beide Experimente ermöglichen unter der Verwendung des TROSY (transverse relaxation-optimized spectroscopy) Effekts die Detektion schmaler Signale auch für größere Proteine (Pervushin et al., 1997; Tugarinov et al., 2003).

### 2.2.2 Untersuchungen von chemischen Verschiebungsperturbationen

Die Larmorfrequenz und somit auch die chemische Verschiebung eines Kernspins im NMR-Spektrum ist von der chemischen Umgebung abhängig. Dabei kann es zu Veränderungen der chemischen Verschiebung (engl. chemical shift perturbation, CSP) kommen. Diese CSPs können beispielsweise durch eine Konformationsänderung oder durch die Bindung eines Liganden induziert werden. Abhängig von der Austauschrate und der Differenz der Larmorfrequenzen werden zwei Fälle unterschieden. Ist die Austauschrate kleiner als die Frequenzdifferenz im Spektrum, so handelt es sich um den langsamen Austausch und beide Zustände werden beobachtet. Ist der Austausch schneller als die Frequenzdifferenz wird ein populationsgemitteltes Signal detektiert (Keeler, 2010).

Für die Untersuchung der Bindungsaffinitäten von Liganden können Titrationsreihen durchgeführt werden. Findet die Bindung im schnellen Austausch statt, so können konzentrationsabhängige CSPs beobachtet werden, durch welche die Bindungsaffinität ermittelt werden kann (Williamson, 2013). Existiert eine Zuordnung der Resonanzen zu den Amidgruppen bzw. Methylgruppen kann das Bindungsepitop am Protein bestimmt werden. Dabei sind die Aminosäuren mit der größten Veränderung häufig auch am stärksten am Bindungsprozess beteiligt. Es sei hervorgehoben, dass dieser Zusammenhang nicht immer gilt und bereits kleine Veränderungen aromatischer Seitenketten große CSPs auslösen können.

### 2.2.3 Sättigungs-Transfer-Differenz NMR-Spektroskopie

Die Bindung von Liganden an Proteine kann auch über die Beobachtung der NMR-Signale des Liganden studiert werden. Eine Möglichkeit der Untersuchung bietet die Sättigungs-Transfer-Differenz NMR-Spektroskopie (STD-NMR-Spektroskopie) (Mayer and Meyer, 1999). Bei dieser Technik werden zwei eindimensionale  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des Liganden aufgenommen. Vor dem Start der Experimente wird ein Sättigungspuls appliziert. Im Fall des ON-Resonanzexperimentes wird der Sättigungspuls so gewählt, dass er selektiv das Protein, aber nicht den Liganden sättigt. Klassischerweise werden dafür Regionen angeregt, welche im niedrigen negativen ppm Bereich sind. Durch die Spindiffusion im Protein sind nach kurzer Zeit alle Kerne im Protein gesättigt. Im Fall des OFF-Resonanzexperimentes wird der Sättigungspuls weit von allen anderen Signalen entfernt gewählt, sodass weder das Protein noch der Ligand angeregt werden. Kommt es zur Bindung des Liganden an das Protein, so wird im ON-Resonanzexperiment die Magnetisierung durch den Raum vom Protein auf den Liganden übertragen. Dabei ist der Transfer größer, je dichter der Kern am Protein ist. Wenn der Ligand anschließend vom Protein dissoziiert, bleibt die Magnetisierung aufgrund der schnellen Rotation und der damit verbundenen langsamen Relaxation über eine längere Zeit gespeichert. In dieser Zeit können bereits neue Liganden binden und Magnetisierung aufnehmen und es kommt zu einer Akkumulation (Meyer and Peters, 2003). Wird anschließend ein klassisches  $^1\text{H}$  Experiment durchgeführt, so wird das gemessene Signal für gebundene Liganden durch den vorangegangenen Magnetisierungstransfer im ON-Resonanzspektrum geringer sein als im OFF-

Resonanzspektrum. Dieser Unterschied kann durch die Bildung von Differenzspektren sichtbar gemacht werden. Der STD-Effekt eines Signals kann durch die Bildung des Quotienten der Intensität im Differenzspektrum und der Intensität im OFF-Resonanzspektrum berechnet werden (Meyer and Peters, 2003). Der STD-Effekt kann verwendet werden, um das Bindungsepitop des Liganden im gebundenen Zustand zu bestimmen, da dieser unter anderem von dem Abstand zum Protein abhängt (Mayer and Meyer, 2001; Meyer and Peters, 2003). Je näher der Kern am Protein ist, desto größer ist der STD-Effekt. Ebenfalls kann die Bindungsaffinität mit Hilfe von STD-NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Dafür wird der STD-Effekt mit dem Ligandenüberschuss multipliziert, um den STD-Amplifikationsfaktor zu erhalten (Meyer and Peters, 2003). Dieser enthält Informationen über den Anteil von Proteinen, welche Liganden gebunden haben. Werden die STD-Amplifikationsfaktoren bei verschiedenen Liganden-Konzentrationen bestimmt, so können Bindungsaffinitäten über das Massenwirkungsgesetz ermittelt werden (Meyer and Peters, 2003).

STD-NMR-Experimente sind besonders für die Untersuchung von Bindungen kleiner Verbindungen an große Proteine oder Proteinkomplexe geeignet, da die Spindiffusion effektiver wird, je langsamer die Rotation des Proteins ist. Limitiert wird diese Technik jedoch durch die Dissoziationsrate des Liganden (Meyer and Peters, 2003). Bei zu starken Bindungen ist die durchschnittliche Verweildauer des Liganden zu lang und eine Akkumulation des Signals wird verhindert. Auf der anderen Seite kann kein ausreichender Magnetisierungstransfer bei zu schneller Dissoziation stattfinden.

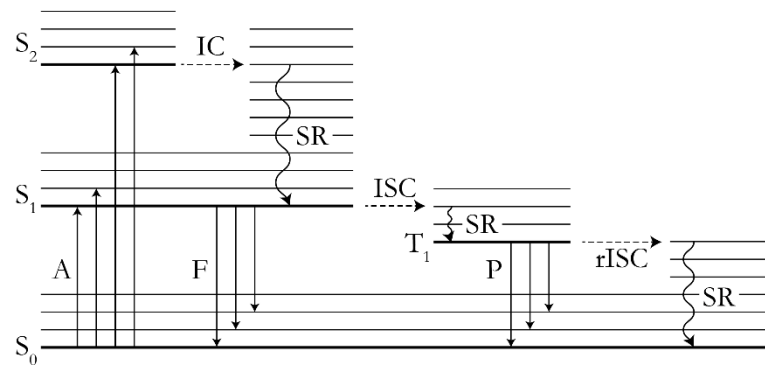
## 2.3 Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Proteinen sind ebenso wie die NMR-Spektroskopie in wässriger Lösung bei Raumtemperatur durchführbar. Das Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) (Förster, 1948) wird dabei häufig für die Untersuchung von Proteindynamiken verwendet. Mit FRET ist es möglich, Dynamiken im Bereich von mindestens 12 Größenordnungen zu untersuchen (Lerner et al., 2021). Durch die Entwicklung von Einzelmolekül-FRET (smFRET) können außerdem Messungen einzelner Proteine durchgeführt werden (Deniz et al., 1999). Anders als beispielsweise bei der NMR-Spektroskopie oder dem small angle X-ray scattering (SAXS) werden dabei nicht gemittelte Signale aller Proteine gemessen, sondern separate Signale einzelner Proteinmoleküle, wodurch Unterschiede in Subpopulationen sichtbar gemacht werden können (Deniz et al., 1999; Lerner et al., 2021).

Im Folgenden wird das Prinzip der Fluoreszenz und des smFRET beschrieben und erläutert, wie die smFRET Mikroskopie dafür genutzt werden kann, um Dissoziationskinetiken von Proteindimeren zu charakterisieren.

### 2.3.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Elektronen besitzen verschiedene energetische Zustände. Dabei wird zwischen Singulettzuständen und Triplettzuständen unterschieden, die zusätzlich Schwingungszustände besitzen. Elektronen können durch Licht der passenden Wellenlänge in höhere energetische Zustände angehoben werden. Die Relaxation zurück in den Zustand niedriger Energie kann dabei durch die Emission von Photonen (Fluoreszenz oder Phosphoreszenz) oder strahlungslos erfolgen (Internal Conversion, Intersystem Crossing). Diese Übergänge können in einem Jablonski-Diagramm veranschaulicht werden (Abbildung 2-5).



**Abbildung 2-5 Jablonski Diagramm zur Darstellung energetischer Übergänge von Elektronen.** Dargestellt sind die ersten drei Energiezustände des Singulettzustands ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ), der erste Tripletzustand ( $T_1$ ) und deren vibronische Zustände (dünne Linien). Elektronen können durch Absorption (A) von Licht passender Wellenlängen auf höhere Energieniveaus angehoben werden. Durch anschließende schnelle Schwingungsrelaxation (SR) wird der vibronische Grundzustand erreicht. Durch die Emission eines Photons kann aus dem  $S_1$  Zustand ein vibronischer Zustand von  $S_0$  erreicht werden, dabei wird von Fluoreszenz (F) gesprochen. Alternativ kann durch eine Internal Conversion (IC) der elektronisch angeregte Zustand (z. B.  $S_1$ ) in einen hoch angeregten Schwingungszustand im niedrigeren Energiezustand überführt werden. Dieser Prozess ist strahlungslos. Eine weitere Möglichkeit ist das Intersystem Crossing (ISC) durch das von dem  $S_1$  Zustand in einen vibronischen Zustand des  $T_1$  gewechselt wird. Dieser Zustand kann strahlungslos über das reverse Intersystem Crossing (rISC) oder durch Emission eines Photons, der Phosphoreszenz (P), verlassen werden.

Durch die Schwingungsrelaxation in den vibronischen Grundzustand und durch Lösungsmittelreorganisation ist das emittierte Photon energieärmer. Die Wellenlänge ist folglich länger und es wird von der Rotverschiebung der Emission oder vom Stokes-Shift gesprochen (Lakowicz, 2006).

Fluorophore besitzen häufig aromatische Systeme. Die Elektronen dieser Systeme benötigen weniger Energie zur Anregung in einen höheren Zustand, wodurch bereits sichtbares Licht ausreichen kann. Moderne Fluorophore wie die Alexa Fluorophore (Panchuk-Voloshina et al., 1999) zeichnen sich durch ihre hohe Quantenausbeute aus. Dabei ist der Anteil emittierter Photonen groß im Vergleich zu strahlungslosen Prozessen. Außerdem sind diese Fluorophore besonders photostabil (Panchuk-Voloshina et al., 1999).

### 2.3.2 Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) wird seit den 1970er Jahren verwendet, um strukturelle Heterogenität in Proteinpolygonen zu beobachten (Lerner et al., 2021). Bei diesem Energietransfer wird die Energie von einem ersten angeregten Fluorophor, Donor genannt, auf einen zweiten Fluorophor, den Akzeptor, strahlungslos übertragen (Abbildung 2-6A). Dabei relaxiert der Donor und der Akzeptor wird angeregt. Anschließend kann der Akzeptor durch Fluoreszenz relaxieren. Dieser Transfer ist von der Quantenausbeute und Lebensdauer des angeregten Zustands des Donors, dem Überlappungsintegral von Emission des Donors und der Absorption des Akzeptors sowie von der Orientierung und dem Abstand der Fluorophore zueinander abhängig (Lakowicz, 2006). Bei einem festen Fluorophorenpaar und der Annahme der Orientierungsfreiheit der Fluorophore kann die Annahme getroffen werden, dass der Transfer lediglich vom Abstand der Fluorophore abhängt. Diese Abhängigkeit wurde in der Vergangenheit viel zur Messung von Abständen und Abstandsänderungen von Biomolekülen verwendet, weshalb FRET auch als spektroskopisches Lineal bekannt ist (Stryer and Haugland, 1967). Dabei können Abstandsänderungen im Bereich von wenigen Nanometern gemessen werden. Der Energietransfer auf den Akzeptor wird über die

## Einleitung

Transfereffizienz charakterisiert. Die Transfereffizienz ist der Anteil auf den Akzeptor übertragenen Energie zur gesamt absorbierten Energie. Ein Ansatz, die Transfereffizienz zu messen, erfolgt über die getrennte Detektion von Donor- und Akzeptorphotonen und der Verwendung von Formel 2-1.

$$E = \frac{I_A}{I_A + \gamma I_D} \quad (2-1)$$

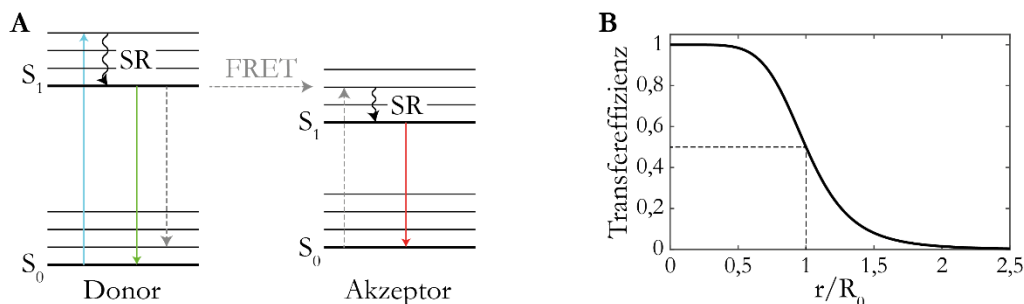
Dabei ist  $E$  die Transfereffizienz und  $I_D$  sowie  $I_A$  sind die gemessenen Intensitäten im Donor- bzw. Akzeptorkanal.  $\gamma$  ist ein Korrekturfaktor, der die unterschiedliche Quantenausbeute und die Detektionseffizienz der Fluorophore herausrechnet.

Der Abstand, für den FRET beobachtet werden kann, hängt von dem gewählten Fluorophorenpaar ab und wird über den Försterradius ( $R_0$ ) definiert. Der Försterradius ist der Abstand, bei dem die Transfereffizienz bei 0,5 liegt. Für alle weiteren Abstände kann über Formel 2-2 die Transfereffizienz berechnet werden.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2-2)$$

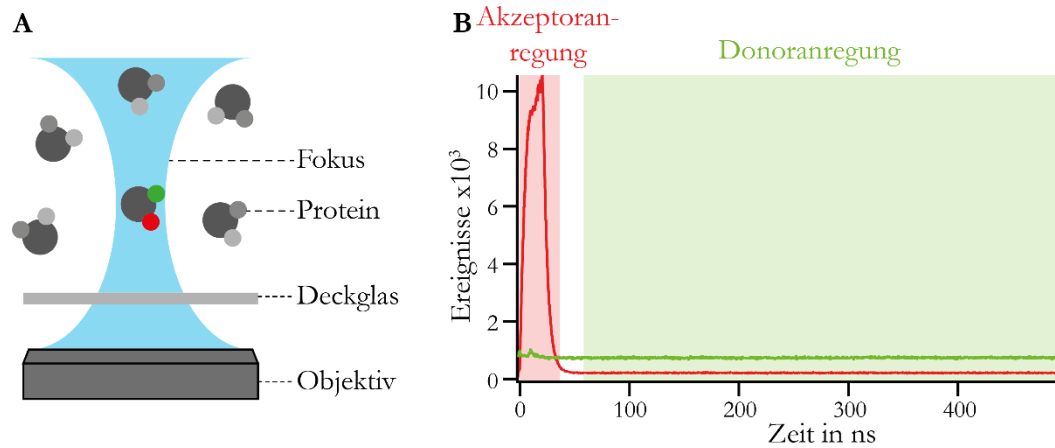
$E$  ist erneut die Transfereffizienz,  $R_0$  ist der Försterradius des Fluorophorenpaars und  $r$  der Abstand der Fluorophore.

Dabei wird die Abstandsabhängigkeit von  $r^{-6}$  deutlich. Für die Bestimmung von Abstandsänderungen können lediglich Abstände im Bereich zwischen  $0,5 R_0$  bis  $2 R_0$  verwendet werden, da sonst nur minimale bzw. keine Unterschiede in der Transfereffizienz beobachtet werden können (Abbildung 2-6B).



**Abbildung 2-6 Prinzip vom Förster-Resonanzenergietransfer und die Abstandsabhängigkeit.** In (A) ist ein Ausschnitt des Jablonski Diagramms vom Donor und Akzeptor dargestellt. Nach der Anregung des Donors vom  $S_0$  in den  $S_1$  Zustand (blauer Pfeil) und anschließender Schwingungsrelaxation (SR) können mehrere Relaxationswege erfolgen. Zwei Möglichkeiten wären die Fluoreszenz (grüner Pfeil) oder der strahlungsfreie Förster-Resonanzenergietransfer mit einem räumlich benachbarten Fluorophor (grauer Pfeil). Anschließend kann der Akzeptor durch Fluoreszenz (roter Pfeil) relaxieren. In (B) ist die Beziehung zwischen der Transfereffizienz und dem Abstand der Fluorophore ( $r$ ) relativ zum Försterradius ( $R_0$ ) dargestellt. Ist der Radius kleiner als der halbe Försterradius, so ist die Transfereffizienz nahezu 1 und es findet fast ausschließlich FRET statt. Ist der Radius doppelt so groß wie  $R_0$ , findet fast kein Energietransfer statt. Ist der Abstand der Fluorophore gleich dem Försterradius, so werden 50 % der vom Donor absorbierten Energie auf den Akzeptor übertragen.

Durch die Verwendung eines Konfokalmikroskops (s. Kapitel 3.7.1) und einer geringen Probenkonzentration können Einzelmolekülmessungen durchgeführt werden (Abbildung 2-1A). Das sehr kleine Fokusvolumen ( $\approx 1$  fL) und die geringe Konzentration ermöglichen eine durchschnittliche Anzahl von weniger als ein Protein im Beobachtungsvolumen. Statistisch werden dadurch fast nie mehrere Proteine gleichzeitig angeregt und die Beobachtung einzelner Teilchen ist möglich.

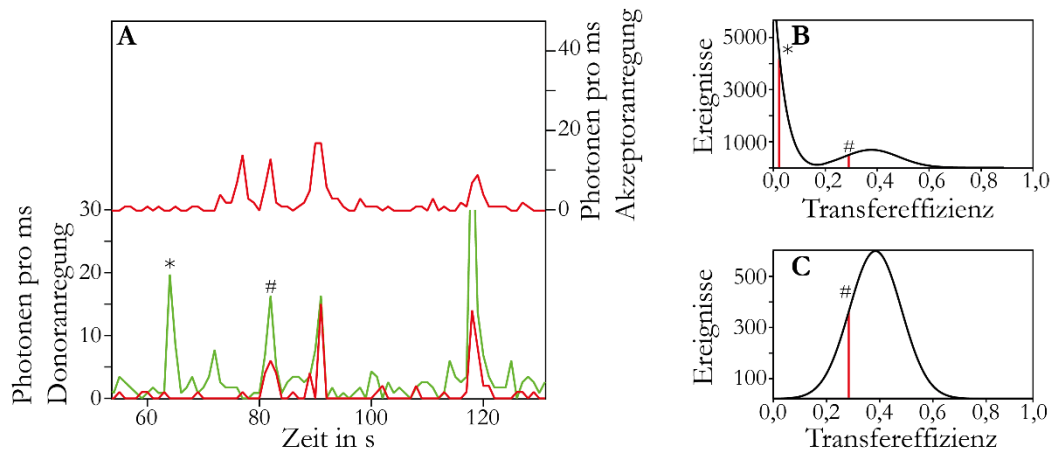


**Abbildung 2-7 Schematische Darstellung des Laserfokus für smFRET und der gepulsten Anregung.**

In (A) sind fluorophormarkierte Proteine dargestellt, die frei im Probenvolumen über dem Deckglas diffundieren. Exemplarisch befindet sich ein Protein im Laserfokus und dessen Fluorophore werden angeregt. In (B) ist das gepulste Anregungsprofil abgebildet. Während der Anregungslaser des Donors durchgehend aktiv ist, wird der Anregungslaser für den Akzeptor gepulst, hier exemplarisch mit einer Frequenz von 2 MHz. Das Zeitfenster mit dem Akzeptoranregungslaser wird als Akzeptoranregung und das Zeitfenster ohne direkte Anregung des Akzeptors als Donoranregung bezeichnet.

Für Proteine, bei denen der Donor-Akzeptor Abstand zu groß für den Energietransfer ist, wird eine Transfereffizienz von 0 beobachtet. Die gleiche Transfereffizienz würde jedoch auch ein Protein liefern, welches nur den Donor trägt. Um diese Fälle zu unterscheiden, können gepulste Messungen durchgeführt werden (Abbildung 2-7B). Die eigentliche Anregung für FRET wird dabei als Donoranregung bezeichnet. In diesem Zeitfenster wird ein Laser verwendet, der nur den Donor anregt. Dieser kann anschließend die Energie auf den Akzeptor mit Hilfe von FRET übertragen. In dieser Zeit können die Photonen von Akzeptor und Donor getrennt detektiert und ausgewertet werden, um zu überprüfen, ob FRET vorliegt. Mit einer Frequenz von einigen MHz wird außerdem ein Laser dazugeschaltet, der den Akzeptor direkt anregt. Dieses Zeitfenster wird als Akzeptoranregung bezeichnet. Über die direkte Anregung des Akzeptors kann geprüft werden, ob ein Protein den Akzeptor trägt. In Abbildung 2-8A trägt das Protein aus dem Ereignis mit der Bezeichnung \* beispielsweise kein Akzeptorfluorophor, da keine Photonen während der Akzeptoranregung detektiert werden können.

Aus jedem gemessenen Ereignis kann mit Hilfe von Formel 2-1 die Transfereffizienz berechnet werden. Diese Transfereffizienzen können anschließend in einem Histogramm veranschaulicht werden (Abbildung 2-8B,C). Dabei können zwei Analysemethoden unterschieden werden. Werden alle Ereignisse über einem Schwellenwert in der Summe von Donor- und Akzeptorkanal während der Donoranregung definiert, so werden alle Proteine, die mindestens einen Donor tragen, ausgewertet. Proteine ohne Akzeptor zeigen eine Transfereffizienz von 0 und erklären die große Population im Histogramm (Abbildung 2-8B). Wird zusätzlich eine Akzeptorschwelle für die Auswahl von Ereignissen verwendet, so werden nur Daten ausgewertet, in denen ein Mindestsignal während der Akzeptoranregung detektiert wurde. Dadurch werden nur Proteine ausgewertet, welche Akzeptor- und Donorfluorophore tragen und die Population mit niedriger Transfereffizienz verschwindet (Abbildung 2-8C).



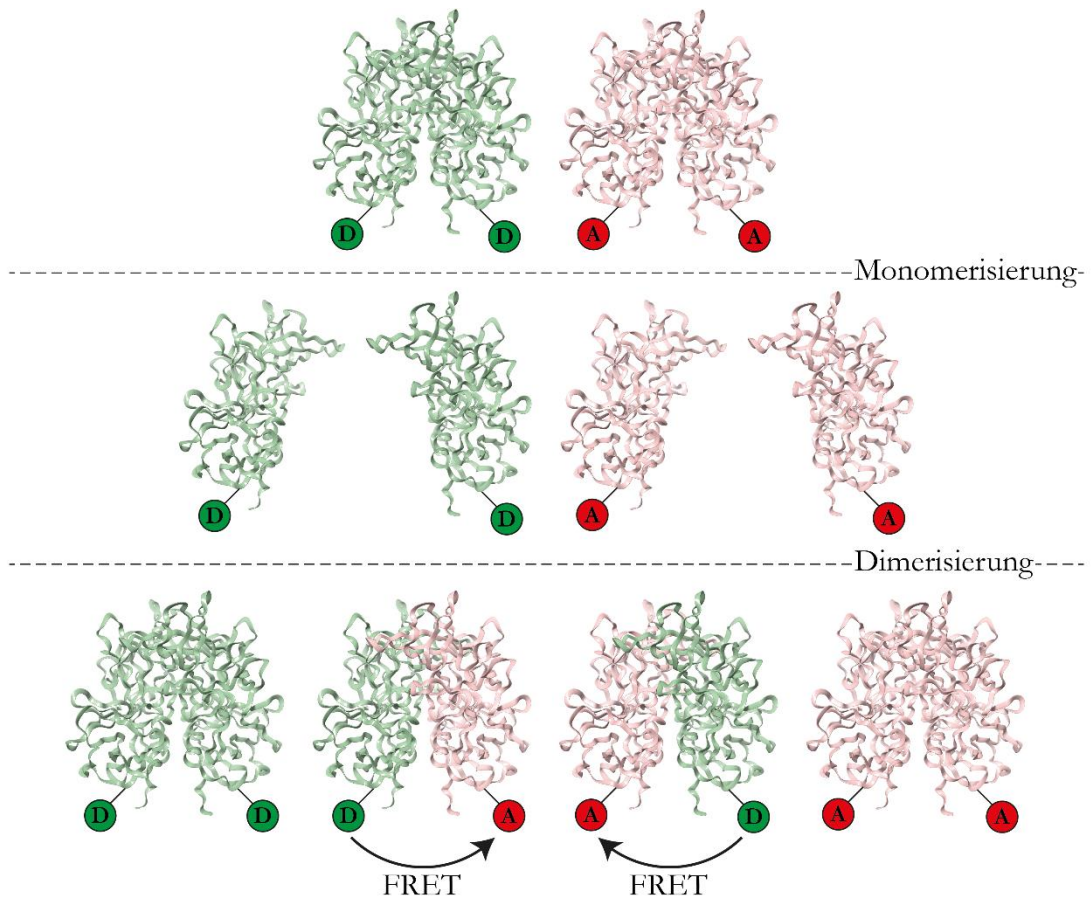
**Abbildung 2-8 Sortierung der FRET-Messergebnisse.** (A) zeigt exemplarisch einen Zeitausschnitt der gemessenen Photonen pro Millisekunde während der Akzeptoranregung (oben) und Donoranregung (unten). Dabei sind die gemessenen Photonen des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) dargestellt. Die hervorgehobenen Ereignisse zeigen einmal ein Protein mit FRET (#) und einmal ein Protein ohne Akzeptor (\*). In (B) und (C) sind schematisch Histogramme der Transfereffizienz abgebildet. In (B) werden alle Ereignisse, deren Summensignal eine bestimmte Schwelle überschreitet, aufgetragen, während in (C) eine zusätzliche Akzeptorschwelle verwendet wird. Durch die Schwelle werden Ereignisse von Proteinen ohne Akzeptor nicht gezählt und die Population bei niedriger Transfereffizienz ( $< 0,15$ ) ist im Histogramm nicht mehr vorhanden. Die hervorgehobenen Signale aus (A) sind in den Histogrammen bei ihrer Transfereffizienz aufgetragen.

### 2.3.3 Fluorophormarkierung von Proteinen

Proteine können über verschiedene Wege mit einem Fluorophor markiert werden. Im Allgemeinen sollten die Fluorophore klein, hell und stabil sein, ohne dabei die Proteineigenschaften zu beeinflussen. Häufig müssen dabei jedoch Kompromisse eingegangen werden (Toseland, 2013). Eine Möglichkeit ist die Bildung von Fusionsproteinen mit fluoreszierenden Proteinen, wie das grün fluoreszierende Protein (GFP). Dabei kann besonders die Größe des Fluorophors Probleme bereiten (Wolf et al., 2021). Alternativ können kleinere Fluorophore kovalent mit dem gereinigten Protein verbunden werden. Dabei können beispielsweise N-terminale Amine oder Cysteine markiert werden. Sollten für die Cysteinmarkierung keine Cysteinseitenketten im Protein frei zugänglich sein, können durch die Einführung einer Punktmutation gezielte Positionen im Protein markiert werden (Toseland, 2013). Fluorophore können an freie Thiolgruppen der Cysteine über Maleimide kovalent gebunden werden. Vorteile dieses Verfahrens ist die Spezifität für Thiolgruppen, die schnelle Reaktion von 10 min bis 2 h und die für Proteine häufig tolerierbaren pH- und Temperaturbereiche während der Markierung (Toseland, 2013).

### 2.3.4 Untersuchung von Dissoziationsraten von Proteindimeren

In vergangenen Studien des humanen Norovirus wurden bereits Dissoziationsuntersuchungen mit Hilfe von Kationenaustauschchromatographie durchgeführt (Creutzmacher et al., 2022; Ogrissek, 2020). Dabei war die Einbringung einer zusätzlichen Ladung in das Protein notwendig, wodurch die Eigenschaften des Proteins verändert sein könnten. Ein alternativer Ansatz ist die Verwendung von FRET zur Charakterisierung von Dissoziationsraten von Proteindimeren.



**Abbildung 2-9 Schematische Darstellung der Untersuchung der Dissoziationskinetik von Dimeren mit FRET.** Exemplarisch sind die humanen GII.4 Saga P-Dimere gezeigt (PDB 4X06). Oben beginnend sind zwei Dimere dargestellt, in welchen jedes Protein mit dem Donor (grün) oder dem Akzeptor (rot) markiert sind (Homodimere). Nach anschließender Monomerisierung der Dimere liegen vier P-Monomere vor, die anschließend zufällig dimerisieren. Durch die zufällige Dimerisierung werden auch Heterodimere gebildet, die aus einem donormarkierten Monomer und einem akzeptormarkiertem Monomer bestehen. Diese Population von Dimeren kann durch FRET sichtbar gemacht werden.

Für diese Untersuchung von Homodimeren wird das Protein in zwei Ansätze aufgeteilt. In einem Ansatz wird das Protein mit dem Donor und im Zweiten mit dem Akzeptor markiert. Anschließend werden die beiden Ansätze gemischt. Durch die Monomerisierung und anschließende zufällige Bildung von Dimeren kommt es zu einem Anstieg der Population an Dimeren, die einen Donor und einen Akzeptor tragen (Abbildung 2-9). Aufgrund der räumlichen Nähe der Fluorophore kommt es zum Energietransfer, der fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden kann. Bei der Anwendung keiner Akzeptorschwelle können neben den FRET Ereignissen auch Ereignisse von Dimeren beobachtet werden, die nur den Donor-Fluorophor (Donor-only) tragen (Abbildung 2-8B). Aus den Anteilen der Donor-only und der FRET Ereignisse kann auf den Fortschritt der Dimerbildung, welche Donor und Akzeptor tragen, geschlossen werden. Liegt wie im Fall der humanen Noroviren das Gleichgewicht der Verteilung weit auf der Seite der Dimere, kann die Annahme getroffen werden, dass der zeitlimitierende Schritt dieses Prozesses die Dissoziation in Monomere ist. Folglich entspricht die detektierte Anstiegsrate der FRET-Population der Dissoziationsrate  $k_{off}$ .

## 2.4 Ziel der Arbeit

Für die Entwicklung von Medikamenten gegen Norovirusinfektionen müssen die molekularen Prozesse der Virus-Wirt Interaktion genauer untersucht werden. Für die humanen Noroviren sind bis heute keine Proteinrezeptoren bekannt. Die Interaktion mit Histo-Blutgruppenantigenen (komplexe Glykane), die an der Zelloberfläche der Wirtszelle exponiert sind, gilt als essentieller Schritt der Virusinfektion. Eine Verringerung der Affinität für Blutgruppenantigene wurde nach der spontanen und irreversiblen Deamidierung eines Asparagins beobachtet. Ein weiterer Faktor für die Glykaninteraktion ist das Dimerisierungsverhalten der P-Domäne des Hauptkapsidproteins. Die P-Domänen des humanen Norovirus interagieren als Dimer mit den Glykanen. Eine (partielle) Dissoziation würde die Beweglichkeit der Domänen erhöhen und die Affinität für Glykane modulieren. Hilfreich für das Verständnis der humanen Noroviren ist es, auch eng verwandte Viren, wie das Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV), zu untersuchen.

Es lassen sich folgende Fragestellungen für diese Dissertation formulieren:

- Warum deamidiert das Asparagin N373 des humanen Norovirus Stamm GII.4 Saga P-Dimers dreimal schneller als das N373 in GII.4 VA387 P-Dimeren? Was ist der Grund für die ungewöhnlich schnelle und spezifische Deamidierung des N373?
- Welche Verbindungen eignen sich für die Entwicklung von Norovirus Eintrittsinhibitoren? Können Verbindungen gefunden werden, die mit hoher Affinität an die Blutgruppenantigen-Bindungstasche binden?
- Welche Zucker werden von der neuen RHDV Variante (RHDVb) gebunden und wie ist deren Affinität? Kann die Bindungsaffinität durch äußere Einflüsse moduliert werden? Werden auch Metallionen oder Gallensäuren gebunden?
- Können Unterschiede der Dissoziation der P-Domänen durch Veränderungen der Umgebung beobachtet werden?

Die Deamidierungskinetik des Asparagins N373 der P-Dimere der humanen Norovirus Stämme GII.4 Saga und GII.4 VA387 konnten in Vorarbeiten mit Hilfe von Ionenaustausch-Chromatographie ermittelt werden. In meiner Arbeit wird diese Technik zusammen mit gezielter Mutagenese verwendet, um den Einfluss der räumlich umgebenden Aminosäuren auf die Deamidierung zu untersuchen.

Für die Identifizierung von Bindungstaschen und Bindungsaffinitäten ist die Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie geeignet. So kann die Bindung von potentiellen Inhibitoren an die GII.4 Saga P-Domäne genauer charakterisiert werden. Die NMR-Spektroskopie ermöglicht ebenfalls die Identifikation neuer Liganden für die RHDVb P-Domäne. Dafür ist im ersten Schritt die Etablierung eines Protokolls für die Produktion und Reinigung der isotopenmarkierten RHDVb P-Domäne notwendig.

Die Untersuchung der Dissoziation von GII.4 Saga und RHDVb P-Dimeren ist durch Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer (smFRET) Experimenten möglich. Dabei kann der Einfluss von äußeren Faktoren wie die Zuckeranwesenheit oder der pH-Wert auf die Dissoziation untersucht werden. Für diese Technik ist die Markierung des Proteins mit Fluorophoren und damit die Einbringung von exponierten Cysteinen mit Hilfe von Mutagenese notwendig.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Expressionsvektor/Molekularbiologische Techniken

#### 3.1.1 Gene und Expressionsvektor

Als Expressionsvektor wurde das pMAL-c2X Plasmid (Walker et al., 2010) verwendet. Dieses enthält ein Fusionsprotein der jeweiligen P-Domäne (Tabelle 3.1) mit dem Maltosebindeprotein (MBP). Zwischen diesen Proteinen liegt ein doppelter His<sub>8</sub>-Tag sowie eine HRV 3C Spaltstelle (LEVLFGQP). Außerdem enthält das Plasmid noch Gene für eine Ampicillin-Resistenz sowie einen durch Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren *tac* Promotor.

**Tabelle 3.1 Sequenz der verwendeten P-Domänen sowie deren Größe und Extinktionskoeffizient.** Die GenBank (Benson et al., 2013) IDs stammen von [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). N-Terminal wurden die Aminosäuren GPGS bzw. GPG zugefügt, um eine enzymatische Spaltung während der Reinigung zu ermöglichen. Die molekulare Masse und der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm in Wasser wurde mithilfe von ProtParam ([www.web.expasy.org/protparam/](http://www.web.expasy.org/protparam/)) (Duvaud et al., 2021) berechnet.

Stamm-bezeichnung	GenBank ID	Aminosäuren	Molekulargewicht in kDa	Extinktionskoeffizient bei 280 nm in M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
GII.4 Saga 2006	AB447457	225-530 (GPGS)	34,1	35410
GII.4 VA387	AY038600	225-529 (GPGS)	34,0	36900
RHDV N11	JX133161	230-569 (GPG)	35,2	53400

#### 3.1.2 Transformation in chemisch kompetente Zellen

Die Transformation der Plasmide in die Bakterienstämme *E. coli* BL21 (DE3) (Jeong et al., 2009) bzw. DH5α erfolgte durch chemische Kompetenz. Dafür wurden die Übernachtskulturen der jeweiligen Stämme in LB-Medium (Tabelle 3.4) ohne Ampicillin bei 37 °C herangezogen. Mit 1 mL dieser Kulturen wurden anschließend 100 mL LB-Medium ohne Ampicillin inokuliert und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,4 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis inkubiert und das Medium durch Zentrifugation gegen eiskalten CM1 Puffer (Tabelle 3.2) ausgetauscht. Nach weiteren 20 min Inkubation auf Eis wurde der Puffer erneut durch Zentrifugation gegen 2 mL eiskalten CM2 Puffer (Tabelle 3.2) getauscht. Abschließend wurden 100 µL Aliquote der nun chemisch kompetenten Bakterien bei -70 °C eingefroren.

**Tabelle 3.2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer zur Erstellung chemisch kompetenter Bakterien**

CM1 Puffer		
	Natriumacetat (pH 5,6)	10 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	NaCl	5 mM
CM2 Puffer		
	Natriumacetat (pH 5,6)	10 mM
	MnCl <sub>2</sub>	5 mM
	CaCl <sub>2</sub>	70 mM
	Glycerin	5 % (v/v)

Durch die Zugabe von 15 g Agar zu 1 L LB-Medium (Tabelle 3.4) und das anschließende Autoklavieren konnten LB-Agarplatten gegossen werden. Im Fall von LB-Agarplatten mit Ampicillin wurde vor dem Gießen der Platten, aber nach dem Abkühlen des Mediums, das Ampicillin in einer finalen Konzentration von 100 µg/mL zugegeben.

Die Transformation erfolgte entweder mit 100 ng Plasmid DNA oder nach einer PCR mit 1 µL PCR Produkt. Zu dieser DNA wurden 100 µL frisch aufgetaute, chemisch kompetente Bakterien zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Inkubation von 1 min bei 42 °C wurde 1 mL LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Auf je einer LB-Agarplatte mit Ampicillin wurden anschließend 100 µL bzw. 250 µL der Kultur verteilt und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 3.1.3 Erstellung von Kryostocks

Zur Langzeitlagerung von transformierten Bakterienstämmen wurden Kryostocks angesetzt. Dazu wurden 3 mL LB-Medium mit Kolonien auf LB-Agarplatten inokuliert und bei 37 °C inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 1,5 erreicht wurde. Anschließend wurde mit einer finalen Konzentration von 15 % (v/v) steriles Glycerin zugegeben und die Kryostocks bei -70 °C eingefroren.

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden auf die Aufnahme des korrekten Plasmides durch Sequenzierung kontrolliert. Die Plasmidisolierung erfolgte durch das NucleoSpin Plasmid (NoLid) kit (Macherey-Nagel). Die Sequenzierung erfolgte durch LGC Genomics, wobei die Primer *malle* und *pTrcHis rev* (Eurofins) verwendet wurden.

### 3.1.4 Ortsspezifische Mutagenese durch Polymerasekettenreaktion

Punktmutationen wurden durch eine ortsspezifische Mutagenese eingeführt. Dafür wurde das Wildtyp-Plasmid aus DH5α isoliert (s. Kapitel 3.1.3), um methylierte Plasmid-DNA zu erhalten. 50 ng des Plasmids wurden mit 125 ng des flankierenden Primerpaars (Tabelle 3.3), 5 µL 10 Pfu Reaktionspuffer (Promega), 1 µL 10 mM dNTP Mischung (New England Biolabs), 1 µL Pfu Polymerase (Promega) versetzt und auf ein finales Volumen von 50 µL mit sterilem H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde mit 3 min bei 95 °C gestartet. Die Denaturierung bei 95 °C für 40 s, die Primerhybridisierung bei 58 °C für 30 s und die Elongation bei 72 °C für 18 min wurden 18-mal wiederholt. Abschließend wurde für weitere 9 min bei 72 °C elongiert.

Die methylierte und nicht mutierte DNA wurde anschließend durch die Zugabe von 1 µL 10 U/µL DpnI (Promega) für 1 h bei 37 °C abgebaut. Anschließend wurde das PCR Produkt in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und sequenziert (s. Kapitel 3.1.3).

**Tabelle 3.3** Verwendete Primer zur Erstellung von Punktmutationen

Punktmutation		Sequenz (5' zu 3')
RHDVb S386C	for	CAACAGGTGCACCGTGCAATCC
	rev	GGATTGCACGGTGCACCTGTTG
GII.4 Saga N373D	for	CAGTTTAGCACCGATAACCGAAGACGATTTTGAAACCCATCAG
	rev	CTGATGGGTTTCAAAATCCTGTTCGGTATCGGTGCTAAACTG

Die Cystein-Punktmutanten der GII.4 Saga P-Dimere wurden von Dr. Alvaro Mallagaray und die Punktmutanten H297R und N372E sowie dessen doppelten Punktmutante wurden von Dr. Robert Creutzmacher übernommen.

## 3.2 Proteinproduktion

### 3.2.1 Unmarkierte Proteinproduktion

Für die Proteinbiosynthese der nicht isotoopenmarkierten P-Domänen wurden 40 mL LB-Medium (Tabelle 3.4) mit dem transformierten *E. coli* BL21 (DE3) Stamm inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für eine OD<sub>600</sub> von 0,05 in dem finalen Volumen abzentrifugiert und in der finalen Menge TB-Medium (Tabelle 3.4) resuspendiert. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 1,3 - 1,6 erreicht wurde und anschließend bei 16 °C mit einer finalen Konzentration von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Ernte erfolgte bei Erreichen der stationären Phase, nach circa 36 Stunden, bei 10000 g für 5 min bei 4 °C. Die Bakterienpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

**Tabelle 3.4 Zusammensetzung des LB-Mediums und des TB-Mediums mit Zusätzen.**

LB-Medium	
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L
Ampicillin	100 mg/L
TB-Medium mit Zusätzen	
Trypton	12 g/L
Hefeextrakt	24 g/L
Glycerin	54 g/L
NaCl	0,55 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,3 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	16,63 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	1 g/L
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM
Glukose	0,2 % (w/v)
Vitamin B1	10 mg/L
Casaminosäuren	100 mg/L
Ampicillin	100 mg/L

### 3.2.2 <sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N-Isotopenmarkierte Proteine

Für die Messung von <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-TROSY-HSQC-Experimenten ist eine <sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N-Isotopenmarkierung während der Proteinproduktion notwendig. Dafür wurden 40 mL LB-Medium mit dem transformierten *E. coli* BL21 (DE3) Stamm inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Morgen wurde das M9-Medium für <sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N-Isotopenmarkierung (Tabelle 3.5) angesetzt und sterilfiltriert. Bakterien für eine OD<sub>600</sub> von 0,1 in 40 mL wurden zentrifugiert und in 40 mL M9-Medium für <sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N-Isotopenmarkierung resuspendiert und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde die Kultur abzentrifugiert und in dem finalen Volumen von 1 L Kultur resuspendiert und bei 37 °C inkubiert. Ab einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wurde die Kultur bei 16 °C inkubiert und mit 1 mM IPTG für die P-Domäne GII.4 Saga und VA387 bzw. 0,1 mM IPTG für die RHDVb P-Domäne induziert. Dabei wurde alle 24 h 100 mg/L Ampicillin in D<sub>2</sub>O nachgelegt und der pH\*-Wert mit 8 M NaOD auf 7,3 angepasst. Nach dem Eintritt in die stationäre Phase erfolgte die Ernte bei 10000 g für 5 min bei 4 °C. Bis zur Verwendung der Bakterienpellets wurden diese bei -70 °C eingefroren.

**Tabelle 3.5 Zusammensetzung des M9-Mediums für die  $^2\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierte Proteinproduktion.** Der pH-Wert wurde mit 8 M NaOD auf pH\* 7,3 eingestellt und das Medium sterilfiltriert.

M9-Medium für $^2\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung pH* 7,3	
MgSO <sub>4</sub>	4 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM
Vitamin B1	20 µg/mL
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 g/L
NaCl	1 g/L
D-Glucose-d <sub>7</sub> (Deutero)	3 g/L
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Deutero)	3 g/L
Riboflavin	0,1 mg/L
D-Biotin	1 mg/L
Cholinchlorid	1 mg/L
Folsäure	1 mg/L
Nicotinamid	1 mg/L
D-Pantothensäure x ½ Ca	1 mg/L
Pyridoxal x HCl	1 mg/L
Cobalamin	1 mg/L
Ampicillin	100 mg/L
D <sub>2</sub> O (Deutero)	

### 3.2.3 $^{13}\text{C}$ -Methylgruppen-isotopenmarkierte Proteine

Die Proteinproduktion mit selektiver  $^{13}\text{C}$ -Methylgruppen-Isotopenmarkierung erfolgte analog zur Produktion von  $^2\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkiertem Protein (Kapitel 3.2.2). Für die Produktion der methylgruppenmarkierten P-Domänen wurde kein isotopenangereichertes  $\text{NH}_4\text{Cl}$  verwendet und das finale Kulturvolumen betrug 150 mL. Außerdem wurden 15 min vor der Induktion mit 1 mM IPTG die Vorläufer (Tabelle 3.6) zur selektiven Methylgruppen-Isotopenmarkierung in 15 mL M9-Medium zu der Kultur zugegeben. Die selektive Markierung von [ $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ] V<sup>ProS</sup>-Methylgruppen erfolgte durch die Unterdrückung der Leucinmarkierung durch Zugabe von 80 mg/L L-Leucin-d<sub>10</sub> (Cambridge Isotope Laboratories).

**Tabelle 3.6 Verwendete Vorläufer zur [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] Methylgruppenmarkierung von Proteinen.**

Vorläufer	Konzentration	Markierte Methylgruppe
2- $^{13}\text{C}$ -Methyl-4-d <sub>3</sub> -Acetolacetat (synthetisiert von Dr. Mallagaray)	195 mg/L	L <sup>ProS</sup> , V <sup>ProS</sup> (L,V)
2-Oxobutansäure-4- $^{13}\text{C}$ -3, 3-d <sub>2</sub> (synthetisiert von Dr. Mallagaray)	72 mg/L	I
L-Alanin- $^{13}\text{C}$ -d <sub>2</sub> (CIP) Succinat-d <sub>4</sub> (CIP)	0,6 g/L 3,75 g/L	A
L-Methionin-(Methyl- $^{13}\text{C}$ ) (Sigma Aldrich)	130 mg/L	M

### 3.3 Proteinreinigung

Tabelle 3.7 Zusammensetzung der Puffer für die Proteinreinigung.

Lysepuffer		
Natriumphosphat		20 mM
NaCl		100 mM
Lysozym aus Hühnereiweiß (Merck)		10 mg/L
Benzoase (Novagen)		160 U/L
Leupeptin (Sigma)		0,48 mg/L
Aprotinin (Roth)		0,48 mg/L
pH 7,3		
Imidazol-Bindepuffer		
Natriumphosphat		20 mM
NaCl		100 mM
Imidazol		20 mM
pH 7,3		
Imidazol-Elutionspuffer		
Natriumphosphat		20 mM
NaCl		100 mM
Imidazol		500 mM
pH 7,3		
SEC-Puffer		
Natriumphosphat		20 mM
NaCl		100 mM
pH 7,3		

#### 3.3.1 Zellyse

Das Bakterienpellet wurde aufgetaut und mit 30 mL Lysepuffer (Tabelle 3.7) je 3 g bis 4 g Pellet resuspendiert und anschließend im French Press Cell Disrupter (Thermo) bei 1400 psi lysiert. Das Lysat wurde anschließend bei 13000 g und 4 °C für 60 min zentrifugiert und der Überstand für die nachfolgende Reinigung verwendet.

#### 3.3.2 Chromatographische Reinigung

Die chromatographische Reinigung des Proteins erfolgte an einem ÄKTA pure System (GE Healthcare) bei 4 °C. Dabei wurde der Überstand des Bakterienlysats über die Systempumpe mit 5 mL/min und einem Luftsensord auf zwei in Reihe angeschlossene 5 mL Ni-NTA Säulen (GE Healthcare) aufgetragen und mit 7 Säulenvolumen Imidazol-Bindepuffer gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrir mit 10 Säulenvolumen 10 % Imidazol-Elutionspuffer (Tabelle 3.7). Das gebundene Protein wurde mit weiteren 10 Säulenvolumen 100 % Imidazol-Elutionspuffer eluiert und in 96-Well Platten fraktioniert.

Die eluierte Proteinfraktion wurde mit 200 µL 0,4 mg/mL HRV 3C Protease (produziert und gereinigt von Dr. Creutzmacher) und 5 mM β-Mercaptoethanol versetzt und unter Verwendung eines 10 kDa Dialyseschlauches (Thermo Scientific) gegen 2 L Imidazol-Bindepuffer über Nacht bei 4 °C dialysiert.

Die dialysierte Fraktion wurde anschließend erneut über die Systempumpe auf die zwei 5 mL Ni-NTA Säulen aufgetragen und mit 5 Säulenvolumen Imidazol Bindepuffer gewaschen. Die gespaltene P-Domäne bindet nicht an die Säule und konnte gesammelt werden, während das MBP und die HRV 3C Protease an die Säule binden.

Als letzter Reinigungsschritt folgte die Größenausschlusschromatographie (engl. Size exclusion chromatography, SEC). Dafür wurde die Durchflussfraktion mit Hilfe von 10 kDa Zentrifugenfiltern (Merck) auf ein Volumen von 3,5 mL konzentriert. Das Konzentrat wurde anschließend über eine 7 mL Probenschleife auf eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule bei einer Flussrate von 1,3 mL/min mit SEC-Puffer (Tabelle 3.7) aufgetragen.

### 3.3.3 Denaturierende Gelelektrophorese

Der Erfolg der Reinigungsschritte wurde mit Hilfe einer denaturierenden Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS)-Gelelektrophorese nachgewiesen. Dafür wurden Proben der einzelnen Reinigungsschritte mit gleichen Anteilen 2x reduzierendem Probenpuffer gemischt und für 10 min bei 90 °C denaturiert. Diese Proben wurden auf ein 12 % Acrylamidgel mit 15 Taschen (Mini-Protean TGX, Bio-Rad) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 180 V mit Elektrodenpuffer (Tabelle 3.8) durchgeführt. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Brillant-Blau (Bio-Rad) gefärbt.

**Tabelle 3.8 Zusammensetzung der Puffer für die SDS-Gelelektrophorese.**

2x reduzierender Probenpuffer		
	SDS	3 % (w/v)
	Glycerol	12 % (v/v)
	TRIS/HCl pH 6.8	180 mM
	2-Mercaptoethanol	4 % (v/v)
	Bromphenolblau	1 mg/mL
	Harnstoff	300 mg/mL
Elektrodenpuffer		
	TRIS	6 g/L
	Glycerin	28,8 g/L

### 3.3.4 Ent- und Rückfaltung der $^2\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten GII.4 Saga P-Domäne

Damit Amide, die im Inneren des Proteins in Sekundärstrukturelementen liegen, im  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum detektiert werden können, ist eine Ent- und Rückfaltung des  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  isotopenmarkierten Proteins in  $^1\text{H}$ -haltigen Puffern notwendig. Dafür wurden 7 mg/mL des zu entfaltenden Proteins in SEC-Puffer (Tabelle 3.7) zu der 35-fachen Menge Entfaltungspuffer (Tabelle 3.9) und bei 4 °C inkubiert. Nach 4 h wurde dieselbe Menge Rückfaltungspuffer dazugegeben und in einen 12-14 kDa Dialyseschlauch gefüllt. Der Schlauch wurde aufgrund der Volumenzunahme durch Osmose mit dem doppelten Volumen gewählt. Zuerst wurde für je 8 h bis 12 h gegen den Dialysepuffer 1, dann gegen den Dialysepuffer 2 und anschließend 3-mal für 24 h gegen den Dialysepuffer 3 dialysiert. Abschließend wurde das Protein erneut über die Größenausschlusschromatographie gereinigt (s. Kapitel 3.3.2).

**Tabelle 3.9** Zusammensetzung der Puffer für die Ent- und Rückfaltung der GII.4 Saga P-Domäne.

Entfaltungspuffer	
Guanidinhydrochlorid	4 M
TRIS	0,5 M
NaCl	0,3 M
2-Mercaptoethanol	10 mM
pH 7,3	
Rückfaltungspuffer	
Guanidinhydrochlorid	3 M
TRIS	0,5 M
L-Prolin	1 M
D-Saccharose	0,4 M
2-Mercaptoethanol	10 mM
pH 7,3	
Dialysepuffer 1	
TRIS	0,5 M
L-Prolin	0,5 M
D-Saccharose	0,2 M
2-Mercaptoethanol	10 mM
pH 7,3	
Dialysepuffer 2	
TRIS	0,25 M
L-Prolin	0,25 M
D-Saccharose	0,1 M
2-Mercaptoethanol	5 mM
pH 7,3	
Dialysepuffer 3	
TRIS	0,05 M
NaCl	0,45 M
2-Mercaptoethanol	5 mM
pH 7,3	

### 3.3.5 Fluorophormarkierung mit Maleimid

Zu 0,5 mg des zu markierenden Proteins mit einer Konzentration von 6 mg/mL bis 9 mg/mL in SEC-Puffer wurde Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) mit zehnfachem Überschuss verglichen mit der Proteinkonzentration zugegeben. Gekoppelt wurde das Protein mit Alexa Fluor 488 C<sub>5</sub> Maleimid (Invitrogen), Alexa Fluor 647 C<sub>2</sub> Maleimid (Invitrogen) oder Atto647N Maleimid (ATTO-TEC) (Abbildung 7-10), im Weiteren abgekürzt mit AF488, AF647 und Atto647N. Dafür wurden 50 µg des Fluorophores in 5 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und zum Protein gegeben. Die Ansätze wurden anschließend für mindestens 12 h bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Bei Markierungen mit Donor und Akzeptor wurde zuerst der Akzeptor und nach einer Inkubationszeit von mindestens einer Stunde der Donor zum Reaktionsansatz gegeben.

Die Trennung der ungebundenen von den proteingekoppelten Fluorophoren erfolgte durch eine Größenausschlusschromatographie über die HiLoad 16/600 Superdex 200 pg. Die Auftragung erfolgte über eine 5 mL Probenschleife bei 0,8 mL/min. Dabei wurden die Absorptionen bei 214 nm, 496 nm und 647 nm detektiert.

Die Markierungseffizienz (engl. degree of labeling, DOL) wurde mit Hilfe eines Nano-Drop100 Spektrophotometers (PeqLab, Biotechnologie GmbH) ermittelt. Dafür wurden die Absorptionen bei 280 nm und 496 nm für die Donormarkierung bzw. 650 nm für die Akzeptormarkierung bestimmt. Der Anteil des markierten Proteins ließ sich durch die Verwendung der Formeln 3-1 bis 3-3 berechnen.

$$c_{Protein} = \frac{A_{280\text{ nm}} - CF_{280\text{ nm, Fluorophor}} \times A_{Fluorophor}}{\varepsilon_{280\text{ nm, Protein}} \times d} \quad (3-1)$$

$$c_{Fluorophor} = \frac{A_{Fluorophor}}{\varepsilon_{Fluorophor} \times d} \quad (3-2)$$

$$DOL = \frac{c_{Fluorophor}}{c_{Protein}} \times 100\% \quad (3-3)$$

$c_{Protein}$  und  $c_{Fluorophor}$  sind die berechneten Konzentrationen.  $A_{280\text{ nm}}$  und  $A_{Fluorophor}$  sind die gemessenen Absorptionen bei 280 nm bzw. am Absorptionsmaximum des Fluorophores.  $CF_{280\text{ nm, Fluorophor}}$  ist der Korrekturfaktor des Fluorophors bei 280 nm mit 0,11 für AF488, 0,03 für AF647 und 0,05 für Atto647N.  $\varepsilon_{280\text{ nm, Protein}}$  und  $\varepsilon_{Fluorophor}$  sind die molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins bei 280 nm bzw. des Fluorophors am Absorptionsmaximum. DOL ist die Markierungseffizienz des Fluorophores.

### 3.4 CD-Spektroskopie

Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie wurde am J-715 Spectropolarimeter (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH) mit dem Steuerungssystem Spectra Manager for Windows 95/NT J-700 Control Driver (Jasco Corporation) durchgeführt. Die Proben wurden mit dem PTC-348WI (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH) temperiert. Die Messungen wurden in 1 mm Quarzküvetten mit einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/mL und in einem 20 mM Natriumphosphatpuffer durchgeführt. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge und Phosphorsäure eingestellt, um die Chlorid-Ionenkonzentration gering zu halten. Es wurde in 1 nm Schritten im Bereich von 190 nm bis 250 nm, einer Geschwindigkeit von 10 nm/min mit einer Reaktionszeit von 1 s und einer Bandbreite von 2 nm gemessen. Wurden Temperaturreihen durchgeführt, so wurde die Temperatur mit 2 °C pro Minute auf die Zieltemperatur erhöht und nach Erreichen der Temperatur die Messung gestartet. Für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der mean residue ellipticity (MRE) bei einer Temperatur wurde mit einer Sensitivität von 100 mdeg einem Data-Pitch und einer Reaktionszeit von 2 s und einer Bandbreite von 1 nm gemessen. Von den gemessenen CD-Spektren wurden CD-Spektren des Puffers bei 25 °C abgezogen.

### 3.5 Ionen-Austauschchromatographie zur Untersuchung der Deamidierungskinetik

Zur Untersuchung der Deamidierungskinetik der GII.4 VA387 Punktmutanten wurde eine Kationen-Austauschchromatographie verwendet. Dabei wurde das Protein in 75 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,02 % Natriumazid bei einem pH-Wert von 7,3 mit einer Konzentration von 1,6 mg/mL bei 25 °C inkubiert. Unmittelbar vor der Chromatographie wurde die Probe 1:10 in 20 mM Natriumacetatpuffer pH 5,3 verdünnt und über eine 5 mL Probenschleife auf eine 6 mL Resource S Säule (Cytavia) geladen. Über einen Salzgradienten von 0 mM bis 195 mM NaCl über 13 Säulenvolumen wurde das Protein von der Säule eluiert. Die Integrale der Proteinspezies bei 214 nm wurde mit Hilfe von Unicorn v.7 (Cytavia) ermittelt. Die Ermittlung der Deamidierungsrate wurde von Dr. Robert Creutzmacher durchgeführt (Creutzmacher et al., 2023). Dafür wurde ein Differentialgleichungssystem numerisch gelöst. Dieses hat eine unabhängige Deamidierung des N373 einer P-Domäne von dem Deamidierungszustand der anderen P-Domäne im Dimer angenommen. Außerdem wurde eine Dissoziation und Reassoziierung der P-Dimere berücksichtigt.

### 3.6 Kernspinresonanzspektroskopie

Experimente der Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie wurden an einem 600 MHz AVANCE III HD Spektrometer (Bruker) mit Kryoprobekopf und dem Programm TopSpin 3.6.2 (Bruker) durchgeführt. Dafür wurden 3 mm NMR-Röhrchen mit einem Probenvolumen von 160  $\mu$ L verwendet. Alle Proben enthielten 10 % D<sub>2</sub>O, sowie 200  $\mu$ M deuteriertes 3-Trimethylsilyl-1-propansulfonsäure-d<sub>6</sub> (DSS-d<sub>6</sub>, Sigma-Aldrich) und 300  $\mu$ M Imidazol (Roth) zur Überprüfung des pH-Wertes (Baryshnikova et al., 2008). Die pH-Werte der Proben sowie der zu titrierenden Lösungen wurden mit einer Orion 8220BNWP pH-Elektrode (ThermoFisher) mit einem Orion Star A221 pH-Meter (ThermoFisher) nach einer Dreipunktkalibrierung mit Pufferlösungen bei pH 4, 7 und 10 (Roth) bestimmt. Die gemessenen pH-Werte von Proben mit Deuterium wurden nicht korrigiert sondern mit pH\* gekennzeichnet (Krezel and Bal, 2004).

#### 3.6.1 Datenaufnahme

Vor jedem NMR-Experiment wurde ein <sup>1</sup>H Experiment mit Wasserunterdrückung zur ersten Überprüfung der Probe durchgeführt (Bruker Pulsprogramm: *zgpg30*). Dabei wurden 32768 Inkremente mit 4 dummy scans und 32 Aufnahmen verwendet. Die Spektrale Weite wurde auf 11,7 ppm mit einem Zentrum bei 4,7 ppm und der relaxation delay auf 1,5 s gesetzt.

Zur Aufnahme von <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-TROSY-HSQC-Experimenten von <sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N markiertem Protein wurde das Pulsprogramm *trosetf3gpsi* verwendet. Dabei wurden 32 dummy scans und 4 bis 32 Aufnahmen gemessen. In der <sup>1</sup>H-Dimension wurden 2048 Inkremente mit einem spektralen Fenster von 16 ppm und einem Zentrum bei 4,7 ppm und in der <sup>15</sup>N-Dimension 256 Inkremente mit einem spektralen Fenster von 37 ppm und einem Zentrum bei 117,5 ppm aufgenommen. Der relaxation delay betrug 1,5 s. Die Proben wurden in verschiedenen Puffern gemessen, welche unter den Abbildungen beschrieben werden.

<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMQC-Experimente (Pulsprogramm *metr-hmqcph\_new.tb*) wurden mit der methylgruppenmarkierten RHDV P-Domäne durchgeführt. Dabei wurden 16 dummy scans, 180 Aufnahmen, 1,5 s relaxation delay, ein spektrales Fenster von 3,5 ppm mit einem Zentrum bei 0,8 ppm mit 512 Inkrementen für die <sup>1</sup>H-Dimension und ein spektrales Fenster von 18 ppm mit einem Zentrum bei 17 ppm mit 128 Inkrementen für die <sup>13</sup>C-Dimension verwendet.

Zur Bestimmung der Rotationskorrelationszeit wurden TRACT Experimente mit <sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N markiertem Protein durchgeführt (*15n1b-tract-alpha* und *15n1b-tract-beta*, (Lee et al., 2006)). Es wurden 4 dummy scans und 64 Aufnahmen durchgeführt mit einem spektralen Fenster von 16 ppm, einem Zentrum von 4,7 ppm und einem relaxation delay von 2 s. Die Pulssequenz wurde mit 25 verschiedenen delays durchgeführt: 0 s, 0,002 s, 0,004 s, 0,006 s, 0,008 s, 0,01 s, 0,12 s, 0,014 s, 0,016 s, 0,018 s, 0,02 s, 0,025 s, 0,03 s, 0,035 s, 0,04 s, 0,05 s, 0,06 s, 0,07 s, 0,08 s, 0,09 s, 0,1 s, 0,2 s, 0,3 s, 0,4 s und 0,5 s. Der Puffer enthielt 75 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,02 % Natriumazid bei einem pH\*-Wert von 7,3.

STD-Spektren wurden mit dem Bruker Pulsprogramm *stddiffesgp.3* mit einem relaxation delay von 5 s, 4 dummy scans und 3440 Aufnahmen mit unmarkiertem Protein durchgeführt. Dabei wurde ein spektrales Fenster von 14 ppm mit einem Zentrum bei 4,7 ppm verwendet. Die On-Resonanzfrequenz betrug -3,5 ppm und die Off-Resonanzfrequenz wurde auf 200 ppm gesetzt. Die Sättigung der Proteinsignale erfolgte durch Wiederholungen von 50 ms Gaußschen Pulsen mit einem

Abstand von 1 ms für 2 s. Für alle Messungen enthielt der Puffer 75 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,02 % Natriumazid bei einem pH\*-Wert von 7,3.

Die aufgenommenen NMR-Daten wurden mit TopSpin 3.6.2 (Bruker) prozessiert. Die chemischen Verschiebungen von Signalen in 2D-Spektren wurden mit Hilfe von CcpNmr Analysis v2.4.2 (Vranken et al., 2005) durchgeführt.

### 3.6.2 Untersuchung von chemischen Verschiebungsperturbationen

Veränderungen der chemischen Verschiebung (engl. chemical shift perturbation, CSP) von Resonanzen aus 2D-Experimenten wurden euklidisch durch Formel 3-5 bestimmt.

$$\Delta v_{euklidisch} = \sqrt{(\Delta\delta_H \omega_H)^2 + (\Delta\delta_{N/C} \omega_{N/C})^2} \quad (3-5)$$

$\Delta v_{euklidisch}$  ist die CSP in Hz,  $\Delta\delta_H$  und  $\Delta\delta_{N/C}$  sind die Differenzen in der Protonen- und der Stickstoff- bzw. Kohlenstoffdimension.  $\omega_H$  und  $\omega_{N/C}$  sind die respektiven Spektrometerfrequenzen.

Im Falle eines schnellen chemischen Austausches zwischen einem Protein und Ligand kann die Dissoziationskonstante  $K_D$  durch eine Titrationsreihe bestimmt werden. Dafür wird die populationsgewichtete Verschiebung der Signale im NMR-Spektrum ausgenutzt und der  $K_D$ -Wert aus Gleichung 3-6 bestimmt (Williamson, 2013).

$$\Delta v_{obs} = \Delta v_{max} \frac{(P_t + L_t + K_D) - \sqrt{(P_t + L_t + K_D)^2 - 4P_t L_t}}{2P_t} \quad (3-6)$$

Dabei beschreibt  $\Delta v_{obs}$  die beobachtete CSP bei einer Konzentration und  $\Delta v_{max}$  maximale CSP bei Sättigung.  $P_t$  und  $L_t$  sind die totale Protein- bzw. Ligandenkonzentration an jedem Titrationspunkt.

Die  $K_D$ - und  $\Delta v_{max}$ -Werte wurden durch einen globalen Fit der Gleichung 3-6 an die gemessenen CSPs bestimmt. Die Fehler wurden aus den Residuen berechnet. Für den globalen Fit wurden CSPs von Signalen verwendet, deren maximale CSP größer als der Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung aller CSPs ist. Das Python-Skript für den Fit wurde von Dr. Thorben Maaß übernommen und angepasst.

### 3.6.3 Analyse von Sättigungstransferdifferenz Experimenten

Aus den On- und Off-Resonanzspektren der STD-Experimente konnte mit der Gleichung 3-7 der STD-Amplifikationsfaktor bestimmt werden (Mayer and Meyer, 2001).

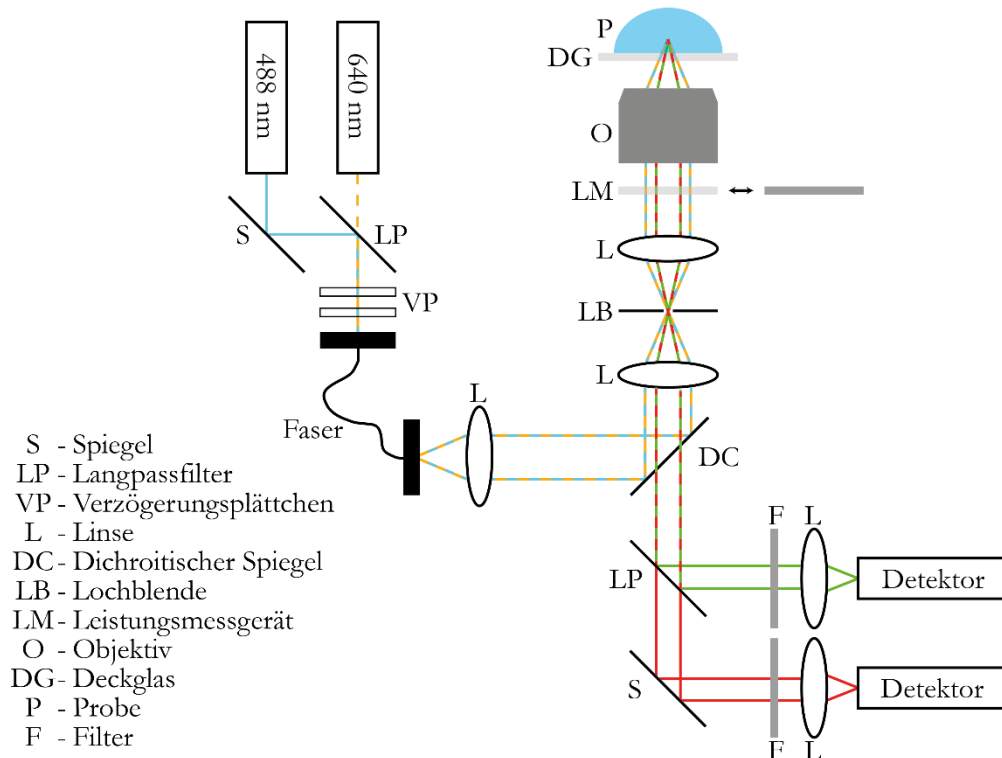
$$STD_{AF} = \frac{I_{off} - I_{on} c_L}{I_{off} c_P} \quad (3-7)$$

$STD_{AF}$  ist der zu berechnende STD-Amplifikationsfaktor des Signals,  $I_{on}$  und  $I_{off}$  sind Intensitäten des Signals im On- bzw. Off-Resonanzspektrum,  $c_L$  und  $c_P$  sind die Konzentrationen vom Ligand bzw. Protein.

### 3.7 Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer Mikroskopie

#### 3.7.1 Mikroskop Aufbau

Die Durchführung von Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer (smFRET) Experimenten erfolgte am Institut für Physik an der Universität zu Lübeck an einem vom Institut selbstgebautes Konfokalmikroskop. Ein schematischer Aufbau des konfokalen Mikroskops ist in Abbildung 3-1 dargestellt.



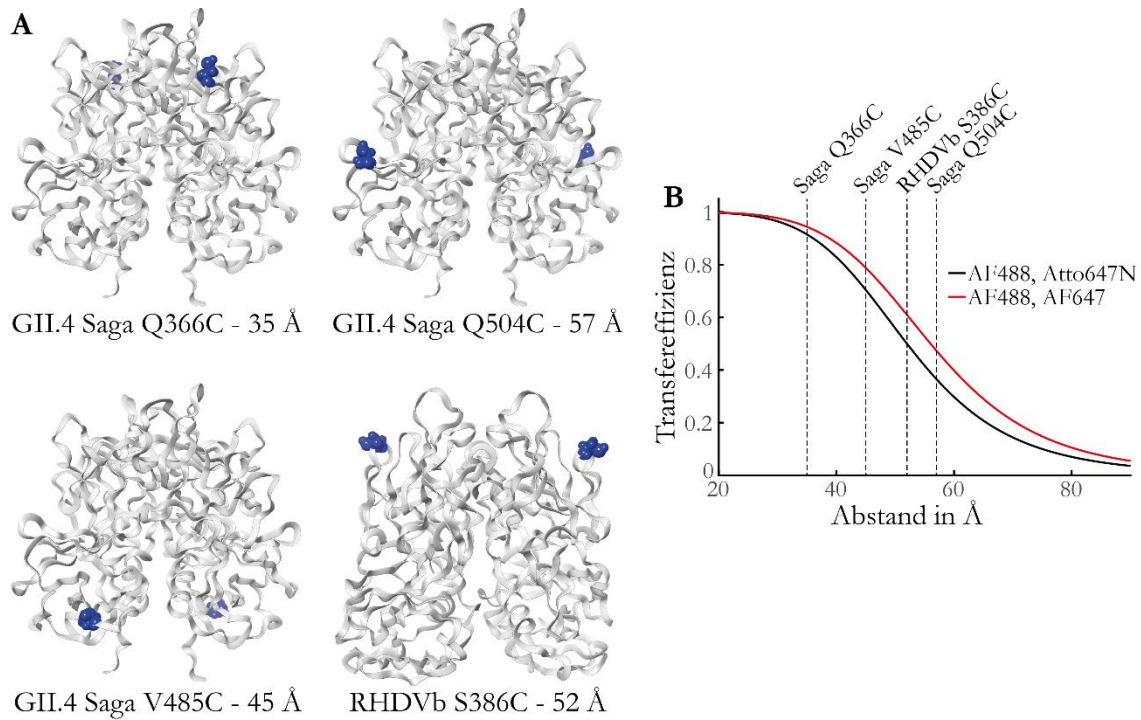
**Abbildung 3-1 Schematischer Aufbau des Konfokalmikroskops.** Das Anregungslicht der Laser wurde durch einen Spiegel (S) und einen Langpassfilter (LP) in eine Faser eingekoppelt. Dabei wurde die Polarisation durch Verzögerungsplättchen (VP) eingestellt. Das divergierende Licht aus der Faser wird durch eine Linse (L) kollimiert und mit einem dichroitischen Spiegel (DC) auf ein telezentrisches Linsensystem gelenkt. In der Mitte und damit im Brennpunkt beider telezentrischen Linsen ist eine Lochblende (LB) positioniert. Anschließend kann die Laserleistung durch ein Leistungsmessgerät geprüft werden, bevor das Licht vom Objektiv (O) durch das Deckglas (DG) auf die Probe (P) fokussiert wird. Das Fluoreszenzlicht nimmt denselben Weg zurück und passiert anschließend den dichroitischen Spiegel. Abschließend wird das Licht durch einen Langpassfilter (LP) geteilt und nach dem Passieren eines letzten Bandpassfilters (F) am Detektor gemessen.

Die Anregung der Fluorophore erfolgte durch zwei Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm (frequenzverdoppelter Diodenlaser, Spectra Physics Cyan, Newport Corp.) und 640 nm (optisch gepumpter Halbleiter-Laser, Obis 640 LX, Coherent). Dabei war der 488 nm Laser mit einer Leistung von 40  $\mu\text{W}$  durchgehend aktiv und der 640 nm Laser wurde gepulst dazugeschaltet mit einer mittleren Leistung von 10  $\mu\text{W}$ . Der Laser wurde extern durch einen Frequenzgenerator (Siglent SDG6022X, Siglent Technologies) mit einer Frequenz von 10 MHz gepulst. Mit Hilfe eines Langpassfilters (520DCXR) wurden beide Laserlinien überlagert und in eine Einzelmodenfaser (SMC-460, Schäfer und Kirchhoff) eingekoppelt. Das Anregungslicht wurde anschließend über einen dichroitischen Strahlenteiler (Z-405-470-633, AHF Analysetechnik AG) reflektiert. Im nächsten Schritt befindet sich ein telezentrisches Linsensystem (Tubulinse,  $f = 200$  mm, Nikon) mit einer konfokalen Lochblende (50  $\mu\text{m}$ , Thorlabs GmbH) im Zentrum. Anschließend konnte ein Leistungsmessgerät (818-SL, Newport Corp.) eingesetzt werden, um die Laserleistung zu überprüfen. Danach gelangte das Anregungslicht zum Wasserimmersionsobjektiv (CFI Plan Achromat 60x 1,2 WI, Nikon)

hoher numerischer Apertur ( $N. A. = 1,2$ ) und wurde auf einen beugungsbegrenzten Punkt im Probenvolumen fokussiert. Das Fokusvolumen betrug  $10^{-15}$  L (Kahra, 2012). Die Position des Fokus wurde mit einem Piezokristall (P-733.2CL, Physik-Instrumente) auf  $20 \mu\text{m}$  über das Deckglas ( $150 \mu\text{m}$ , Roth) gesetzt. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht gelangt über dasselbe Objektiv sowie die zwei Tubuslinsen wieder zum dichroitischen Spiegel. An der Lochblende wird Licht außerhalb der Fokusebene geblockt. Das Fluoreszenzlicht, welches zur Anregung rot verschoben ist, wird vom dichroitischen Spiegel durchgelassen, während das Streulicht der Anregung reflektiert wird. Das Fluoreszenzlicht wird im Weiteren mit einem Langpassfilter (BS640DCXR, Chroma Technology) in Donorfluoreszenzlicht und Akzeptorfluoreszenzlicht geteilt. Bandpassfilter (Donorkanal: HQ525/50, Chroma Technology, Akzeptorkanal: HQ685/70, Chroma Technology) filtern letztes Streulicht heraus, bevor das Fluoreszenzlicht auf die Detektoren fokussiert wurde. Dabei wurden Lawinendurchbruchdioden (engl. Avalanche Photo Diode, APD) Detektoren (APCM-AQR 14, PerkinElmer Optoelectronics) verwendet. Die Ankunftszeiten und Kanalzugehörigkeiten der detektierten Photonen wurden über ein Zeiterfassungsgerät (C200-HD15, Becker & Hickl GmbH) registriert.

### 3.7.2 Wahl der Punktmutationen für die Fluorophormarkierung

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der GII.4 Saga und RHDVb P-Dimere ist eine kovalente Verknüpfung mit Fluorophoren notwendig. Dafür wurden P-Domänen mit ausgewählten Cysteinpunktmutationen verwendet, um eine Markierung über ein Maleimid zu ermöglichen. Die Abstände der Thiolgruppen im Dimer sollten dabei ungefähr dem Försterradius (s. Kapitel 2.3.2) des gewählten Fluorophorenpaars entsprechen, um FRET zu ermöglichen (Abbildung 3-2). Die drei GII.4 Saga Punktmutanten Q366C, V485C und Q504C wurden von Dr. Alvaro Mallagaray übernommen und jeweils um die Punktmutation N373D ergänzt. Diese verhindert die Veränderung der Probe über die Zeit aufgrund von Deamidierung (s. Kapitel 2.1.2). Für die RHDVb P-Domäne wurde die Punktmutation S386C aufgrund der exponierten Lage der Seitenkette in der Kristallstruktur (PDB 4X1Z) gewählt.



**Abbildung 3-2 Positionen der Cysteinpunktmutationen und deren Abstände.** In (A) sind die Kristallstrukturen der verwendeten GII.4 Saga (PDB 4X06, (Singh et al., 2015)) und RHDVb (PDB 4X1Z, (Leuthold et al., 2015)) Punktmutanten abgebildet. Die mutierten Aminosäuren sind dabei in blau hervorgehoben. Außerdem sind die Abstände der Thiolgruppen zueinander angegeben. (B) zeigt die Transfereffizienzkurve in Abhängigkeit der Fluorophorabstände für die Fluorophorenpaare AF488, Atto647N (schwarz) und AF488, AF647 (rot). Die Abstände der Thiolgruppen sind zur Orientierung mit angegeben, wobei die Länge der Linker der Fluorophore noch nicht berücksichtigt wurde.

### 3.7.3 Probenvorbereitung zur Dissoziationskinetik

Aufgrund der langsamen Dissoziation der GII.4 Saga P-Dimere ist eine Langzeitinkubation notwendig, um die Dissoziationsrate bestimmen zu können. Es wurde die AF488 markierte GII.4 Saga P-Domäne V485C mit einer Farbstoffkonzentration von 1,29  $\mu\text{M}$  mit der AF647 markierten GII.4 Saga P-Domäne V485C mit einer Farbstoffkonzentration von 0,45  $\mu\text{M}$  gemischt. Die Gesamtproteinkonzentration, inklusive unmarkiertem Protein, betrug 3,54  $\mu\text{M}$ . Die Proben wurden mit dem Phosphat-Fluoreszenzpuffer oder Acetat-Fluoreszenzpuffer (Tabelle 3.10) auf die Zielkonzentration verdünnt und im Wasserbad bei 25 °C in 0,5 mL Reaktionsgefäßen mit wenig Proteinbindung (Sarstedt) inkubiert. Proben wurden im Abstand von 3-4 Tagen angesetzt und inkubiert. Die Messung einer Messreihe erfolgte an einem Tag, um Veränderungen in den Einstellungen des Mikroskops auszuschließen. Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben auf die, für Einzelmolekülexperimente notwendige, niedrige Konzentration verdünnt. Dafür wurden kurze Testmessungen durchgeführt und die Verdünnung angepasst, bis die Amplituden der Autokorrelationsfunktionen auf durchschnittlich 0,1 Fluorophore im Fokus schließen ließ. Der Verdünnungsfaktor lag hier bei 1:2000 bis 1:5625. Wurde der Einfluss der Zuckeranwesenheit auf die Dissoziationskinetik untersucht, so wurde der Zucker vor der Inkubation dazugegeben. Die Verdünnung vor der Messung wurde mit den Fluoreszenzpuffern ohne Zucker durchgeführt. Die Messdauer betrug 30 min pro Probe.

Für die Bestimmung der Dissoziationskinetik der RHDVb P-Dimere wurde keine Langzeitinkubation durchgeführt. Die mit AF488 markierte P-Domäne wurde auf dem Deckglas mit

der AF647 markierten P-Domäne gemischt, sodass final 32 % der Proteine mit AF488 und 46 % mit AF647 markiert waren, bei einer Konzentration von 0,5 nM bis 1,9 nM. Dabei betrug die durchschnittliche Anzahl an Fluorophoren im Fokus 0,1. Jede Messung wurde für 2 Stunden durchgeführt.

**Tabelle 3.10 Zusammensetzung des Phosphat- und Acetat-Fluoreszenzpuffer für die Inkubation und Messung der Förster-Resonanzenergietransfer Proben.** Die Puffer wurden mit MP-H<sub>2</sub>O angesetzt, um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren.

Phosphat-Fluoreszenzpuffer		
Natriumphosphat		20 mM
NaCl		0,1 M
TWEEN 20		0,001 %
BSA (Sigma)		0,1 mg/mL
pH 7,3		
Acetat-Fluoreszenzpuffer		
Natriumacetat		20 mM
NaCl		0,1 M
TWEEN 20		0,001 %
BSA (Sigma)		0,1 mg/mL
pH 5,3		

### 3.7.4 Analyse der Dissoziationskinetik-Experimente

Zur Analyse der Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer Experimente wurde Igor Pro 9 (Wavemetrics) verwendet. Dabei wurde eine Routine von Dr. Seidel mit Änderungen von Dr. Pavlita und Dr. Hirschfeld für das Einladen der Daten und das anschließende Erstellen von Energietransfereffizienz-Histogrammen verwendet.

Für die Messungen der humanen P-Domäne ist jede 30 min Messung ein Datenpunkt und wurde vollständig verwendet. Die zwei Stunden RHDVb Experimente wurden in 5 min Intervalle geteilt und anschließend eingeladen. Die folgende Analyse erfolgte für beide Proteine identisch.

Ereignisse wurden mit einer Summenschwelle (Signal in Donor- und Akzeptorkanal) von 20 detektierten Photonen pro Millisekunde definiert und sind damit vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Es wurde keine Akzeptorschwelle angewendet.

Die Energietransfereffizienzen der Ereignisse wurden berechnet (s. Kapitel 2.3.2) und in einem Histogramm dargestellt. Die Transfereffizienzen wurden mit dem Korrekturfaktor  $\gamma$  (Schuler et al., 2002) für die Fluorophorenpaare angepasst. Dabei betrug  $\gamma$  für das Fluorophorenpaar AF488-Atto647N 0,87 und für AF488-AF647 0,5. Die Korrekturfaktoren wurden aus Vorarbeiten für das Mikroskop entnommen (Seidel, 2013). Da keine Akzeptorschwelle verwendet wurde, konnte der Anteil der FRET-Ereignisse von den Gesamtereignissen berechnet werden. Dafür wurde die Summe der Ereignisse bei einer Transfereffizienz von  $> 0,2$  durch die Gesamtanzahl aller Ereignisse geteilt. Durch das Anpassen der Gleichung 3-8 an die gemessenen FRET-Anteile zu den Inkubationszeitpunkten konnte die Dissoziationsrate ermittelt werden.

$$A(t) = A_{max}(1 - e^{-k_{off} \times t}) \quad (3-8)$$

$A(t)$  ist der Anteil der FRET-Ereignisse von den insgesamt detektierten Ereignissen zum Zeitpunkt  $t$ . Der maximale erreichte Anteil wird als  $A_{max}$  beschrieben und  $k_{off}$  ist die Dissoziationsrate.

## Material und Methoden

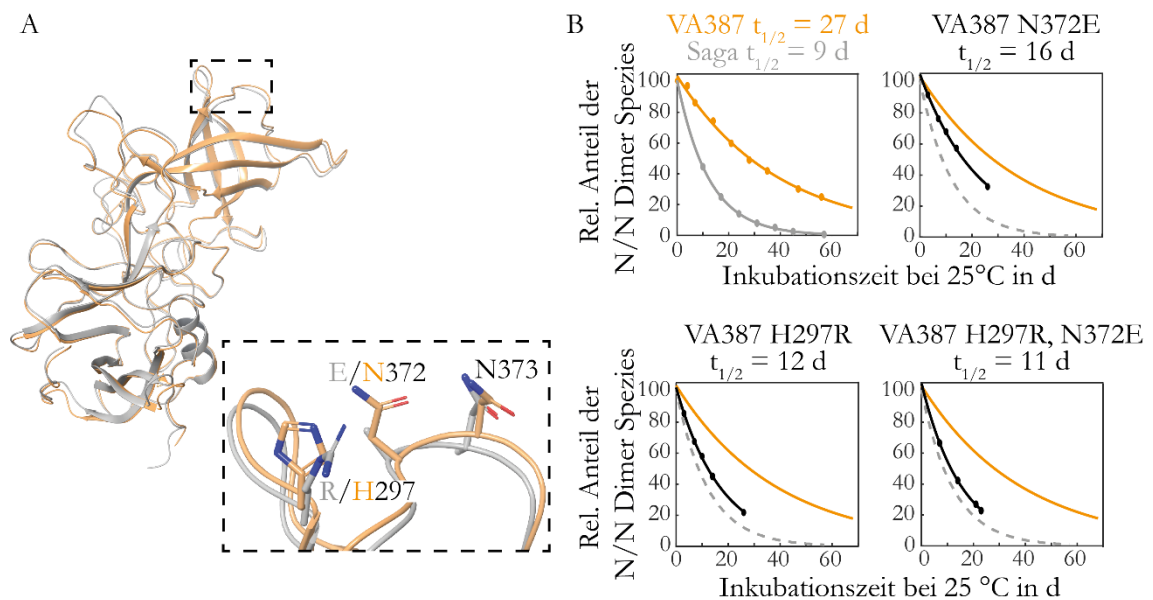
Die Bestimmung der Dissoziationsrate und des maximalen Anteils  $A_{max}$  erfolgte durch eine nichtlineare Kurvenanpassung in Matlab 2020a (MathWorks). Da der Endwert  $A_{max}$  identisch für alle Messungen einer Messreihe sein sollte, wurde dieser im Ansatz mit der schnellsten Dissoziation bestimmt und für alle weiteren Messungen als Konstante eingesetzt. Konnte noch kein Sättigungsverhalten beobachtet werden, so wurde die Kinetik durch eine Anpassung an eine einfache Geradengleichung charakterisiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Abhängigkeit der Deamidierung von räumlich benachbarten Aminosäuren

Das Asparagin 373 in den P-Dimeren der Stämme GII.4 Saga und GII.4 VA387 ist aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt für eine schnelle Deamidierung (Mallagaray et al., 2019; Ogrissek, 2020). Dabei ist die Reaktion dreimal schneller für den Stamm GII.4 Saga mit einer Halbwertszeit von 9 Tagen bei 25 °C verglichen mit einer Halbwertszeit von 27 Tagen bei 25 °C für den Stamm GII.4 VA387. Gängige Vorhersagen der Deamidierungsneigung von Asparaginen in Proteinen durch die Aminosäureabfolge (Robinson and Robinson, 2001) liefern keine Erklärung für die schnelle und spezifische Deamidierung des Asparagins 373 oder auch die beschleunigte Reaktion für den Stamm GII.4 Saga. Aus diesem Grund wird im Weiteren der Einfluss der räumlich benachbarten Aminosäuren auf die Deamidierungsrate untersucht.

Bei dem Vergleich der GII.4 Saga und GII.4 VA387 P-Domäne wird die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Proteine deutlich. Jedoch sind die Aminosäuren an Position 297 und 372 in den Stämmen verschieden und in räumlicher Nähe zum deamidierenden Asparagin 373 (Abbildung 4-1A).



**Abbildung 4-1 Die Deamidierungskinetik des Asparagins 373 ist abhängig von räumlich benachbarten Aminosäuren.** (A) zeigt die überlagerten Kristallstrukturen von GII.4 Saga in grau (PDB 4X06) und GII.4 VA387 in orange (PDB 2OBT). Die mutierten Aminosäuren an Position 297 und 372 sowie das deamidierende Asparagin 373 sind vergrößert dargestellt. In (B) sind die relativen Anteile der nicht deamidierten (N/N) Dimer Spezies gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Verläufe der Wildtyp GII.4 Saga und der GII.4 VA387 P-Dimere dienen als Referenz mit einer Halbwertszeit von 9 Tagen und 27 Tagen und stammen aus vorangegangenen Arbeiten (Ogrissek, 2020). Durch die Einführung der GII.4 VA387 Punktmutationen N372E und H297R konnten die Halbwertszeiten auf 16 Tage bzw. 12 Tage reduziert werden. Die doppelte Punktmutation H297R, N372E führt zu einer fast vollständigen Annäherung der Deamidierungskinetik an die von GII.4 Saga mit einer Halbwertszeit von 11 Tagen. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 25 °C in 75 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid bei pH 7,3.

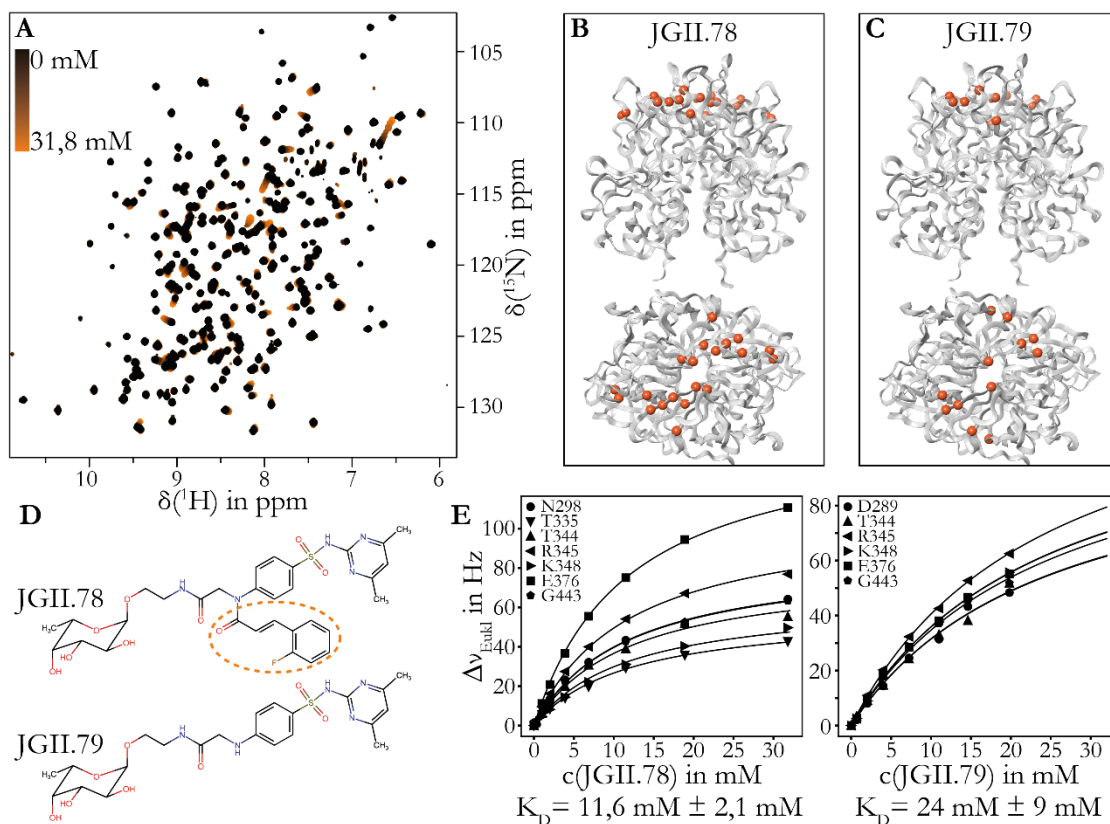
Die Angleichung der Aminosäuren H297 und N372 von GII.4 VA387 an die Aminosäuren von GII.4 Saga durch gezielte Mutagenese liefert eine Annäherung an das Deamidierungsverhalten von GII.4 Saga (Abbildung 4-1B). Durch die Einführung der Punktmutation N372E wird die Halbwertszeit von 27 Tagen auf 16 Tage gesenkt. Für die räumlich weiter von der Deamidierungsstelle entfernte Punktmutation H297R wird eine Senkung der Halbwertszeit auf 12 Tage beobachtet. Die Einführung

beider Punktmutationen H297R und N372E führt zu einer fast vollständigen Annäherung an die Deamidierungskinetik von GII.4 Saga mit einer Halbwertszeit von 11 Tagen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die beschleunigte Deamidierung von GII.4 Saga verglichen mit GII.4 VA387 durch die räumlich umgebenden Aminosäuren ermöglicht wird. Dabei spielt auch die Aminosäure R297, welche in einem anderen Proteinloop lokalisiert ist, eine entscheidende Rolle.

## 4.2 Bindungsstudien von Fucose-tragenden niedermolekularen Verbindungen an die GII.4 Saga P-Domäne

Eine unveröffentlichte Kristallstruktur von P-Dimeren des Stammes GII.10 zeigt die Bindung einer niedermolekularen Verbindung (Abbildung 4-2D). Diese trägt eine Fucose und ist das Produkt einer vergleichsweise einfach durchzuführenden Ugi-Reaktion. Diese Verbindung wird als JGII.78 bezeichnet. JGII.78 sollte auf Bindung an GII.4 Saga P-Dimere untersucht werden und der Einsatz als potentieller Virus-Inhibitor überprüft werden.



**Abbildung 4-2 Verbesserte Bindung der synthetischen Verbindung JGII.78 an die GII.4 Saga P-Domäne.** (A) zeigt  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren der GII.4 Saga P-Domäne mit steigender Konzentration der Verbindung JGII.78 von 0 mM bis 31,8 mM mit einem Farbgradienten von schwarz bis orange. Dabei sind CSPs einiger Signale von bis zu 100 Hz zu beobachten. Die Experimente mit JGII.79 sind vergleichbar und im Anhang (Abbildung 7-5) dargestellt. (B) und (C) zeigen die Aminosäuren der signifikant verschiebenden Signale (Mittelwert plus zweifache Standardabweichung) in orange in der Kristallstruktur (PDB 4X06) nach JGII.78 bzw. JGII.79 Zugabe. Gezeigt ist die Frontal- und die Aufsicht. JGII.78 und JGII.79 binden beide an die HBGA-Bindungstasche. In (D) sind die Verbindungen JGII.78 und JGII.79 dargestellt. Der Unterschied der beiden Verbindungen, die 2-Fluorzimtsäure, ist hervorgehoben. (E) zeigt die Bindungsisotherme der signifikant verschiebenden Signale für die JGII.78 und JGII.79 Titration. Dabei ist eine verbesserte Bindung der Verbindung JGII.78 mit einem  $K_D$ -Wert von  $11,6 \text{ mM} \pm 2,1 \text{ mM}$  verglichen mit  $24 \text{ mM} \pm 9 \text{ mM}$  für JGII.79 zu beobachten. Die Proteinkonzentration betrug  $200 \text{ }\mu\text{M}$  für die Messreihe mit JGII.78 und  $149 \text{ }\mu\text{M}$  mit JGII.79. Der Puffer enthielt  $75 \text{ mM}$  Natriumphosphat,  $100 \text{ mM}$  Natriumchlorid bei einem  $\text{pH}^*$ -Wert von 7,3.

Zusätzlich wurde eine alternative Verbindung JGII.79 getestet, welche einen ähnlichen Aufbau wie JGII.78 besitzt, jedoch ohne die 2-Fluorzimtsäure (Abbildung 4-2D).

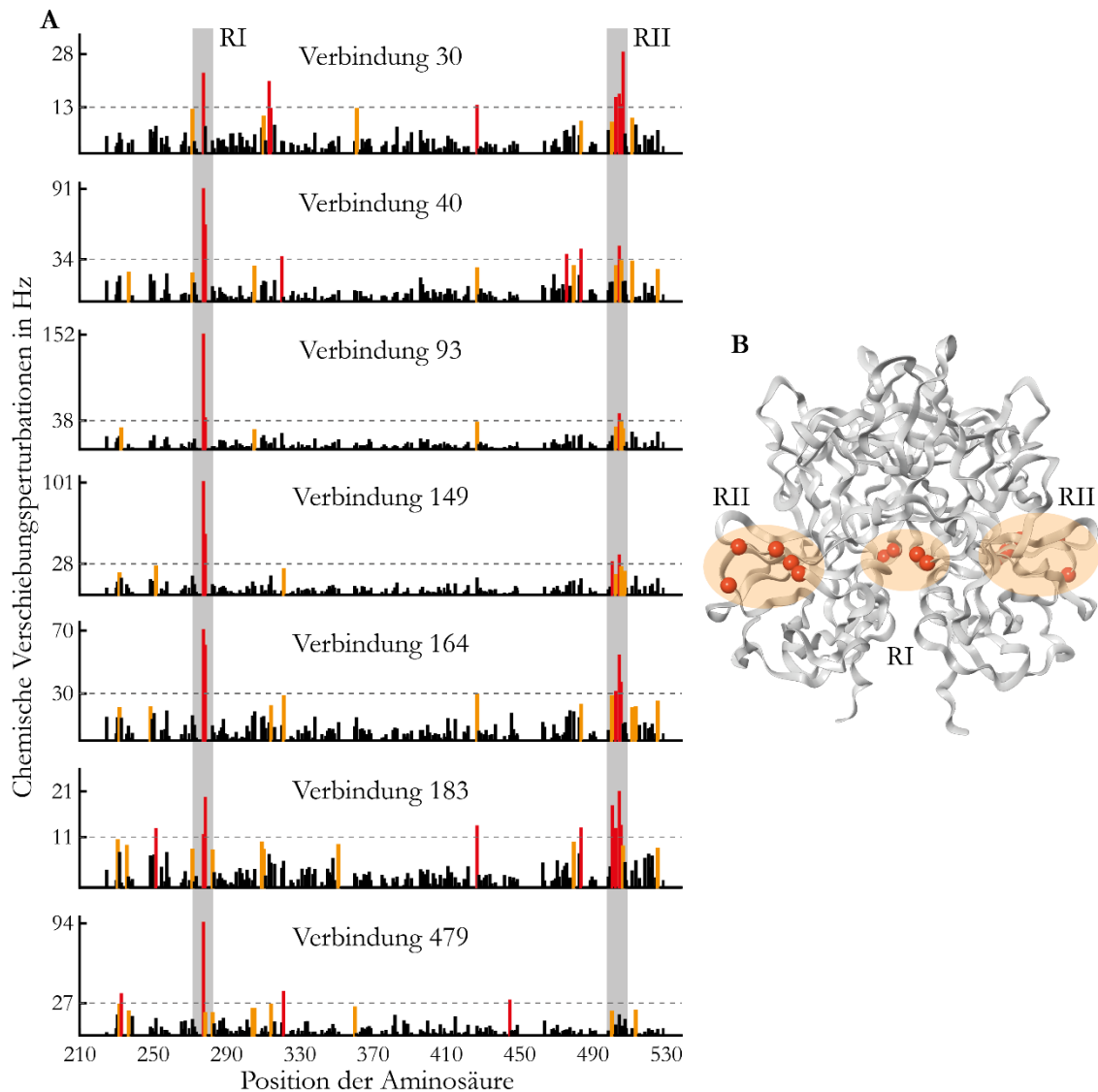
NMR-spektroskopisch konnte für JGII.78 und JGII.79 eine Bindung an die GII.4 Saga P-Dimere beobachtet werden (Abbildung 4-2). Durch die Darstellung der Aminosäuren der signifikant verschiebenden Signale in der Kristallstruktur kann das Bindungsepitop eingegrenzt werden (Abbildung 4-2B,C). Dabei wird deutlich, dass beide Verbindungen an die HBGA-Bindungstasche der P2-Subdomäne binden. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da Fucose an diese Position im Protein bindet und beide Verbindungen eine Fucose tragen. JGII.79 besitzt mit circa 24 mM eine vergleichbare Affinität wie die Fucose ( $\alpha$ -L-Fuc-OMe) alleine mit 22 mM (Mallagaray et al., 2019). Es ist davon auszugehen, dass die Bindung von JGII.79 von der Fucose ausgebildet wird und der Rest der Verbindung die Bindung nicht fördert oder verhindert.

Für JGII.78 ist eine verbesserte Bindung zu beobachten. Mit einem  $K_D$ -Wert von 11,6 mM ist die Bindungsaffinität fast so hoch wie die stärksten Bindungen natürlicher Norovirus-Liganden (Creutzmacher et al., 2021). Die zusätzliche 2-Fluorzimtsäure in der Verbindung JGII.78, verglichen mit JGII.79, scheint die Bindung an das Protein zu unterstützen.

### 4.3 Charakterisierung hydrophober Bindungstaschen in GII.4 Saga P-Dimeren

Bei dem Versuch einen Norovirus Inhibitor zu entwickeln, wurden in vorangegangenen STD-NMR und spin-lock gefilterten NMR-Experimenten 54 Verbindungen der Maybridge Library Ro5 identifiziert, welche an GII.4 Saga VLPs binden. Dabei deuten Konkurrenzexperimente mit dem H-Trisaccharid Typ I und dem B-Trisaccharid auf eine Bindung an die HBGA-Bindungstasche hin (Rademacher et al., 2011). Durch die vorliegende Zuordnung der Amidsignale im  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum (Mallagaray et al., 2019) ist eine genauere Lokalisierung der Bindungsstelle möglich. 9 von den 54 Verbindungen wurden aufgrund ihrer besonders vielversprechenden Ergebnisse in der Signalreduktion in STD- und spin-lock Experimenten ausgewählt (Abbildung 7-3), um deren Bindung genauer zu charakterisieren.

Aufgrund der geringen Löslichkeit der Verbindungen in wässrigen Lösungen wurden diese in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Um den Einfluss von DMSO auf die GII.4 Saga P-Dimere abzuschätzen, wurde eine Titrationsreihe mit DMSO durchgeführt. Dabei konnten CSPs von Signalen beobachtet werden, welche von Aminosäuren, verteilt im gesamten Protein, stammen (Abbildung 7-6). Es ist folglich von einem globalen Effekt und keiner spezifischen Bindung auszugehen. Da die NMR-Signale nach mehreren Stunden bei einer Konzentration von 13 % (v/v) DMSO unverändert blieben, wird davon ausgegangen, dass das Protein bei diesen DMSO-Konzentrationen stabil ist. Um den Einfluss von DMSO auf die P-Dimere gering zu halten, wurde jedoch in weiteren Experimenten eine Konzentration von 9,1 % gewählt.



**Abbildung 4-3 Kleine hydrophobe Verbindungen binden an die GII.4 Saga P-Domäne.** In (A) sind die chemischen Verschiebungen durch die Zugabe der Verbindung 30, 40, 93, 149, 164, 183 und 479 der Maybridge Library Ro5 (Abbildung 7-3) gegen die Position der Aminosäure im Protein aufgetragen. Dabei sind Verschiebungen, welche größer als der Mittelwert plus einfacher Standardabweichung sind, in orange und Verschiebungen, die größer als zwei Standardabweichungen plus Mittelwert sind, in rot dargestellt. Es können zwei Regionen im Protein beobachtet werden, welche durch die Bindung der Verbindungen besonders beeinflusst sind, welche mit RI und RII gekennzeichnet wurden. In (B) sind die Aminosäuren mit einem CSP größer als die zweifache Standardabweichung plus Mittelwert in der Kristallstruktur (PDB 4X06) in rot dargestellt. Außerdem sind die Regionen RI und RII markiert. RI ist an der Dimerisierungsfläche und RII an äußeren Loopregionen der P1-Subdomäne lokalisiert. Die Proteinkonzentration betrug 50  $\mu\text{M}$  und die Konzentration der Verbindungen abhängig von der Löslichkeit 12 mM bis 85 mM. Der Puffer enthielt 75 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 9,1 % DMSO bei einem pH\*-Wert von 7,3. Die CSPs wurden mit Hilfe einer Referenzprobe bei gleicher DMSO-Konzentration berechnet.

Durch die Zugabe der Maybridge Verbindungen konnten in 7 von 9 Fällen deutliche CSPs beobachtet werden (Abbildung 4-3). Es ist folglich davon auszugehen, dass diese Verbindungen an die GII.4 Saga P-Dimere binden. In der Betrachtung der CSPs über die Aminosäuresequenz können zwei Regionen im Protein identifiziert werden, welche durch die Bindung besonders beeinflusst sind. Die Region I (RI) besteht aus den Aminosäuren Leucin 278 und Serin 279 und die Region II (RII) aus den Aminosäuren 502 bis 508. RI befindet sich an der Dimerisierungsfläche der P-Domänen, während RII in äußeren Loopregionen der P1-Subdomäne lokalisiert ist. Die in RII betroffenen Aminosäuren 502 bis 508 sind dieselben, welche auch durch die Bindung von Gallensäuren

beeinflusst werden (Creutzmacher et al., 2020). Es kann angenommen werden, dass die hydrophoben Gallensäuren und die hydrophoben kleinen Verbindungen der Maybridge Library an die gleiche Stelle im Protein binden. Für die Aminosäuren in RI konnten jedoch keine signifikanten CSPs durch die Gallensäurebindung beobachtet werden (Creutzmacher et al., 2020). RI könnte eine zweite Bindungstasche für besonders kleine hydrophobe Verbindungen sein. Aufgrund der Bindung von vielen verschiedenen Verbindungen an die gleiche Bindungsstelle, scheint diese relativ unspezifisch durch hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet zu werden.

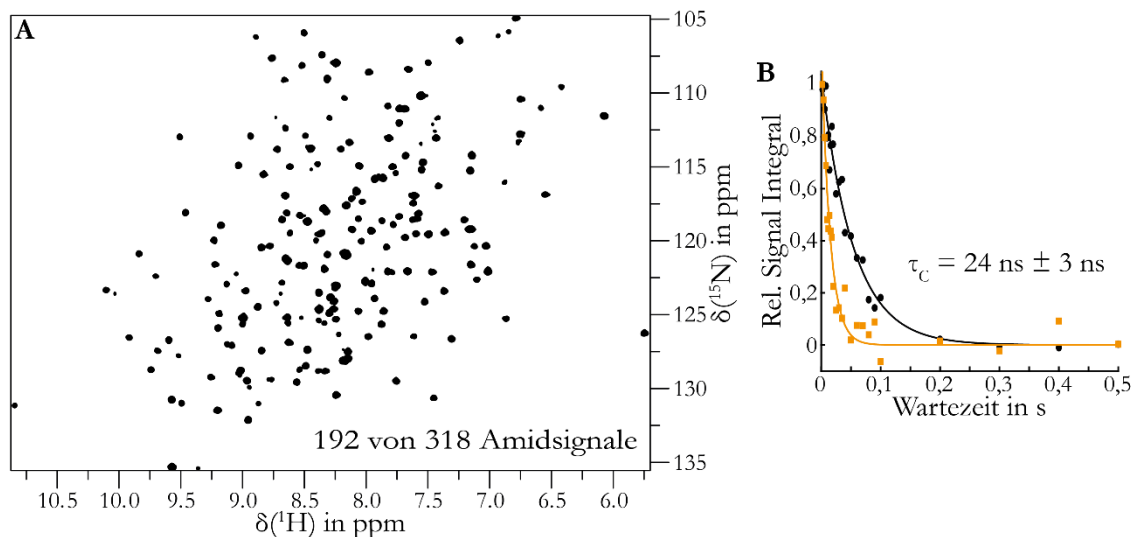
Keine der Verbindungen bindet an die HBGA-Bindungstasche. Weshalb die Kompetitionsstudien mit HBGAs in vorangegangenen Experimenten für diese Verbindungen positiv waren, ist ungeklärt. Ein allosterischer Effekt ist denkbar, jedoch sind keine signifikanten CSPs für Aminosäuren im Bereich der HBGA-Bindungstasche zu beobachten und somit ist die chemische Umgebung der Aminosäuren in dieser Region unverändert. Für die Gallensäurebindungstasche wurde bereits untersucht, dass die Bindung keinen Einfluss auf die HBGA-Bindung hat und umgekehrt (Creutzmacher, 2020).

#### 4.4 Erste NMR-spektroskopische Untersuchungen der RHDVb P-Domäne

Die 35,2 kDa große RHDVb P-Domäne (Tabelle 3.1) konnte erstmals isotopenmarkiert produziert und gereinigt werden. Dies ermöglicht die Untersuchung des Proteins mit Hilfe von NMR-Spektroskopie.

Ein erstes  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum zeigt eine feine Aufteilung von Signalen (Abbildung 4-4A). Die RHDVb P-Domäne liegt folglich gefaltet vor. Aufgrund der fehlenden Ent- und Rückfaltung des  $^2\text{H}$ -markierten Proteins ist zu erwarten, dass einige Amide ihre Deuteronen nicht gegen Protonen ausgetauscht haben und somit im Spektrum nicht sichtbar sind. Insgesamt können 192 von 318 möglichen Signalen beobachtet werden. Für die Beobachtung weiterer Signale und die Durchführung einer Zuordnung der Signale wäre die Etablierung eines Ent- und Rückfaltungsprotokolls notwendig.

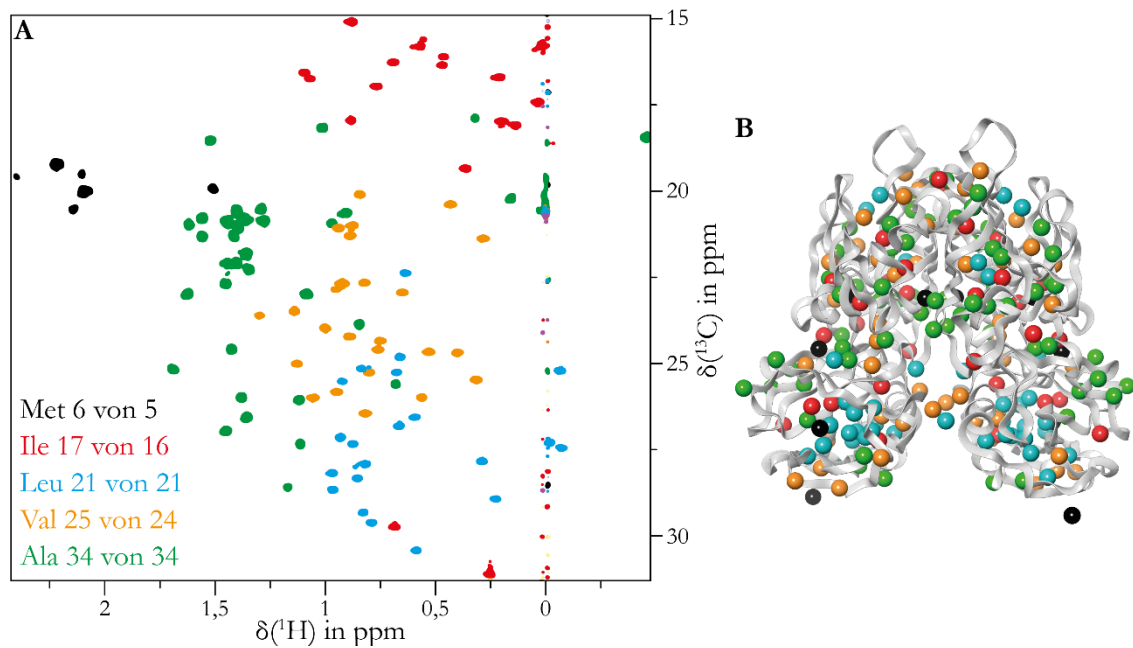
Das TRACT Experiment liefert eine Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  von 24 ns (Abbildung 4-4B). Dieser Wert ist vergleichbar mit den 25 ns für die MNV-1 P-Dimere (Creutzmacher, 2020) und auch den 28 ns für die GII.4 Saga P-Dimere (Mallagaray et al., 2019; Ogrissek, 2020). Dabei ist zu erwähnen, dass die Rotationskorrelationszeit von 24 ns für P-Dimere spricht, da für Monomere im Fall von MNV-1 ein  $\tau_c$  von 17 ns ermittelt wurde (Creutzmacher, 2020).



**Abbildung 4-4 Erste NMR-Experimente mit  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markierter RHDVb P-Domäne zeigen gefaltetes Protein.** In (A) ist ein  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum der RHDVb P-Domäne dargestellt. Das Experiment wurde mit  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem Protein in  $^1\text{H}$ -haltigem Puffer ohne Ent- und Rückfaltung durchgeführt, weshalb nur 192 von 318 Amidensignalen beobachtet werden. Die Signale sind dispers und deuten somit auf gefaltetes Protein hin. (B) zeigt die relativen Integrale von  $^1\text{H}$  Signalen gegen die Wartezeit zur Bestimmung von der  $R_{\alpha}$ - (schwarz) und  $R_{\beta}$ - (orange) Relaxation für die anschließende Ermittlung der Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$ . Für die RHDVb P-Domäne konnte ein  $\tau_c$  von  $24 \text{ ns} \pm 3 \text{ ns}$  ermittelt werden. Die Proteinkonzentration betrug  $100 \mu\text{M}$  für (A) und  $49 \mu\text{M}$  für (B). Der Puffer enthielt  $75 \text{ mM}$  Natriumphosphat,  $100 \text{ mM}$  Natriumchlorid bei einem  $\text{pH}^*$ -Wert von  $7,3$ .

Auch eine  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Isotopenmarkierung der Methylgruppen von RHDVb konnte durchgeführt werden. Durch die selektive  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Markierung von Methylgruppen einzelner Aminosäuren können die Aminosäuren im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC-Spektrum zugeordnet werden (Abbildung 4-5). Dabei können alle erwarteten Signale jeder Aminosäure beobachtet werden. Für die Aminosäuren Methionin, Isoleucin und Valin konnte jeweils ein weiteres Signal beobachtet werden. Der Ursprung dieser zusätzlichen Signale ist ungeklärt.

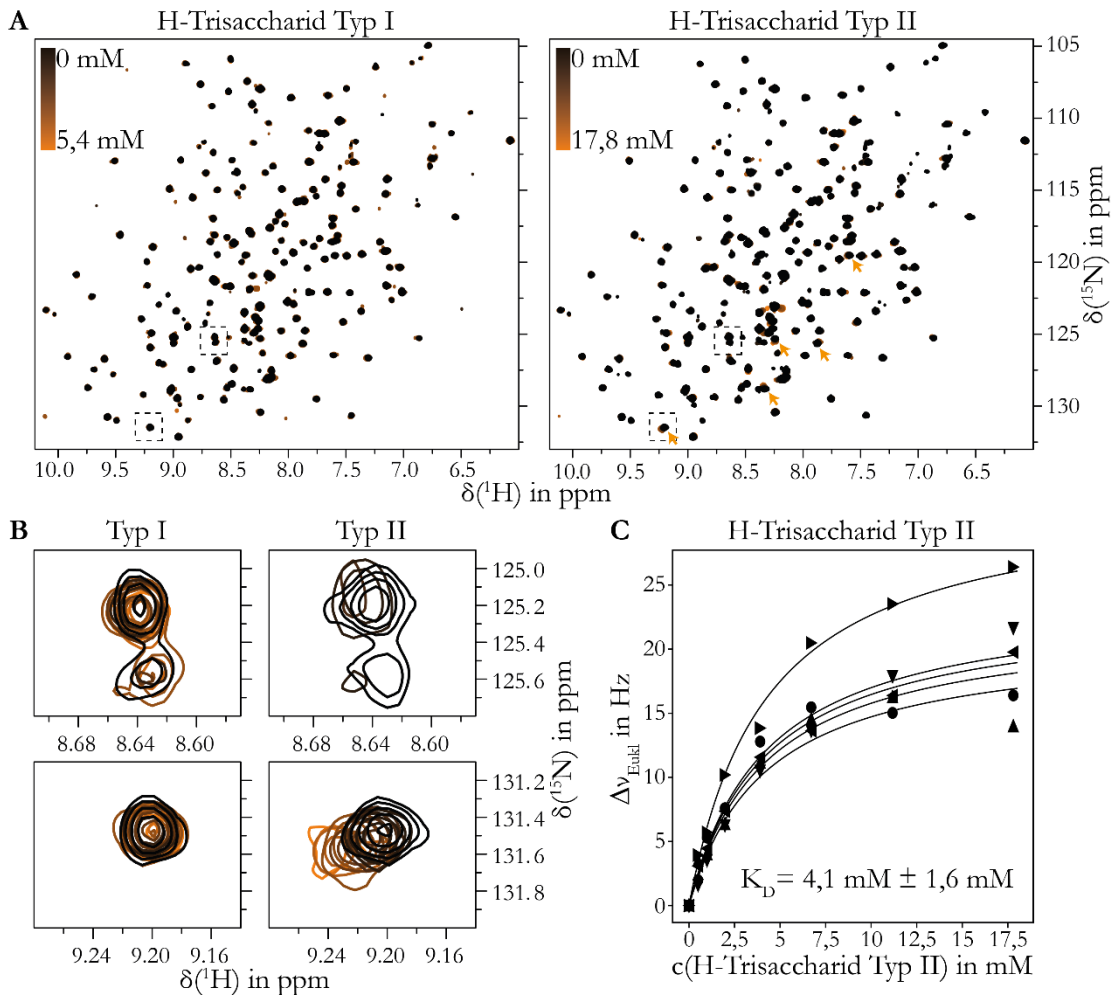
Insgesamt sind in  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimenten und in  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC-Experimenten bei Proteinkonzentrationen von  $3,2\ \mu\text{M}$  bis  $100\ \mu\text{M}$  keine Anzeichen eines veränderten Monomer-Dimer Gleichgewichts zu beobachten. In Kombination mit den Ergebnissen des TRACT Experimentes ist davon auszugehen, dass das Protein bei diesen Konzentrationen vollständig als Dimer vorliegt.



**Abbildung 4-5 Zuordnung der Aminosäuretypen der  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -methylgruppenmarkierten RHDVb P-Domäne im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC-Experiment.** (A) zeigt die Überlagerung von selektiv markierten Methylgruppen einzelner Aminosäuren der RHDVb P-Domäne. Die Signale von Methionin (schwarz), Isoleucin (rot), Leucin (blau) Valin (gelb) und Alanin (grün) sind dargestellt. Dabei sind von Leucin und Alanin die erwartete Anzahl an Signalen und für Methionin, Isoleucin und Valin jeweils ein Signal mehr zu beobachten. In (B) sind die Methylgruppen im gleichen Farbcode wie in (A) in der Kristallstruktur (PDB 4X1Z) dargestellt. Die Proteinkonzentration der  $^{13}\text{C}$ -einzelmarkierten Proteine betrug  $16,9\ \mu\text{M}$  für Methionin,  $12,1\ \mu\text{M}$  für Isoleucin,  $3,2\ \mu\text{M}$  für Alanin,  $28,4\ \mu\text{M}$  für Valin und  $19,1\ \mu\text{M}$  für die doppelmarkierte Leucin-Valin Probe. Der Puffer enthielt  $20\ \text{mM}$  Natriumphosphat mit einem  $\text{pH}^*$ -Wert von  $7,47$  und  $100\ \%$   $\text{D}_2\text{O}$ .

#### 4.5 Bindungsstudien mit der RHDVb P-Domäne

Aus der Co-Kristallisation vom RHDVb P-Dimer mit dem H-Trisaccharid Typ II (Abbildung 7-1) ist bereits bekannt, dass Histoblotgruppenantigene (HBGA) gebunden werden können (Leuthold et al., 2015). Diese Bindung soll im Weiteren genauer untersucht werden.



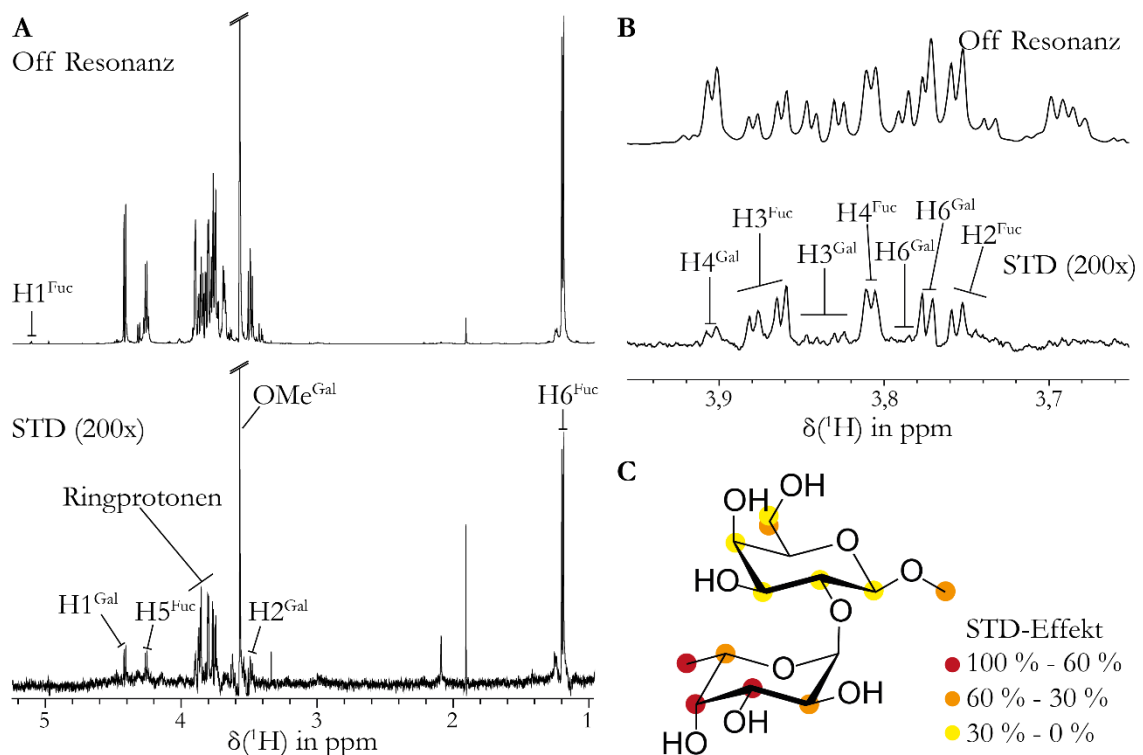
**Abbildung 4-6 RHDVb P-Domänen binden spezifisch das H-Trisaccharid Typ II.** (A) zeigt  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren einer Titrationsreihe mit dem H-Trisaccharid Typ I (links) und dem H-Trisaccharid Typ II (rechts). Das H-Trisaccharid Typ I wurde dabei bis 5,4 mM und das H-Trisaccharid Typ II bis 17,8 mM titriert. Die Spektren sind konzentrationsabhängig in einem Farbgradienten von schwarz nach orange eingefärbt. Markiert sind jeweils zwei Signale, welche in (B) vergrößert dargestellt sind. Für das H-Trisaccharid Typ I wird keine Signalverschiebung beobachtet. Das H-Trisaccharid Typ II bindet an die RHDVb P-Domäne, wobei einige Signale verschieben (B, unten) und bei anderen die Intensität sinkt (B, oben). Die 5 Signale mit den stärksten CSPs und geringer Intensitätsabnahme nach H-Trisaccharid Typ II Zugabe sind mit einem orangenen Pfeil gekennzeichnet (Abbildung 7-8) und wurden für die Bestimmung der Bindungsaffinität in C verwendet. Das H-Trisaccharid Typ II bindet mit einer Affinität von 4,1 mM  $\pm$  1,6 mM. Die Proteinkonzentration betrug 100  $\mu\text{M}$  und der Puffer enthielt 75 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid mit einem pH\*-Wert von 7,3.

Die Bindung vom H-Trisaccharid Typ II konnte NMR-spektroskopisch bestätigt werden (Abbildung 4-6). Interessanterweise befindet sich die Bindung für die meisten beeinflussten Signale im intermediären Austausch. Für diese Signale ist eine Intensitätsabnahme bei steigender Ligandenkonzentration zu beobachten (Abbildung 4-6B). Nur für wenige Signale ist die Bindung im schnellen Austausch. In diesem Fall können CSPs detektiert werden, jedoch ist auch hier eine Intensitätsabnahme zu beobachten. Fünf Signale mit CSPs (Abbildung 7-8) wurden für die Ermittlung der Bindungsaffinität verwendet. Da die Bindung für die Signale zwischen dem schnellen

und intermediären Austausch liegt, ist die ermittelte Bindungsaffinität von 4,1 mM nur mit Vorsicht zu betrachten. Die Bindungsaffinität liegt in der Größenordnung wie sie bereits für vergleichbar komplexe Zucker mit P-Dimeren humaner Noroviren ermittelt wurde (Creutzmacher et al., 2021).

Vergleichbare Experimente mit dem H-Trisaccharid Typ I zeigen keine CSPs und somit auch keine Bindung an RHDVb P-Dimere. Diese Ergebnisse zeigen folglich spezifische Bindung von Zuckern aufgrund des Verknüpfungsmusters. STD-Experimente mit VLPs des klassischen RHDV lieferten ähnliche Ergebnisse (Rademacher et al., 2008). Während für das H-Trisaccharid Typ I kein STD-Effekt beobachtet wurde, konnte ein starker STD-Effekt für das H-Trisaccharid Typ II gemessen werden. Die Abwesenheit von STD-Effekten lässt aufgrund der technischen Limitationen (s. Kapitel 2.2.3) nicht direkt darauf schließen, dass keine Bindung vorliegt. Die hier verwendete CSP-Analyse hingegen ermöglicht diese Aussage.

Auch für das Methylglykosid des H-Disaccharids konnte durch STD-Untersuchungen eine Bindung an RHDVb P-Dimere nachgewiesen werden (Abbildung 4-7). Zusätzlich konnte über die Auftragung der STD-Effekte der einzelnen Signale das Bindungsepitop des Liganden bestimmt werden. Diese zeigen, dass die Fucose den Großteil der Bindung am Protein ausmacht.

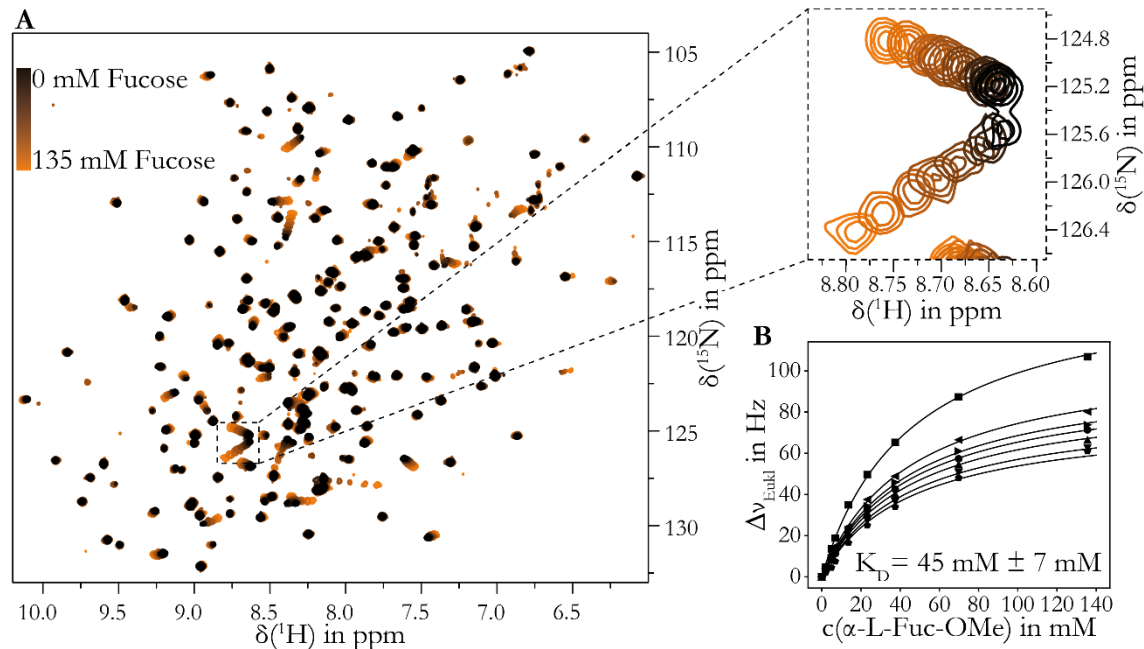


**Abbildung 4-7 RHDVb P-Domänen binden das H-Disaccharid überwiegend über die Fucose.** In (A) sind das Off-Resonanzspektrum und das STD-Spektrum vom Methylglykosid des H-Disaccharids in Anwesenheit der RHDVb P-Domäne abgebildet. Dabei kann die Bindung des Zuckers durch die Anwesenheit von Signalen im STD-Spektrum erkannt werden. (B) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Ringprotonen. Die Zuordnungen der Signale sind in (A) und (B) angegeben. In (C) ist das Methylglykosid des H-Disaccharid dargestellt. Dabei sind die Regionen abhängig von dem ermittelten STD-Effekt eingefärbt. Die großen STD-Effekte für die Protonen der Fucose zeigen, dass die Bindung des Zuckers in Großteilen über die Fucose erfolgt. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  und einer H-Disaccharidkonzentration von 5 mM in 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 100 mM Natriumchlorid bei einem pH\*-Wert von 7,3 in  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt. Die Zuordnung der Signale erfolgte nach (Rademacher et al., 2008).

Die Untersuchung, ob Fucose alleine an die RHDVb P-Domäne bindet, war ebenfalls positiv (Abbildung 4-8). So konnten CSPs nach der Zugabe von Fucose ( $\alpha\text{-L-Fuc-OMe}$ ) (Abbildung 7-1)

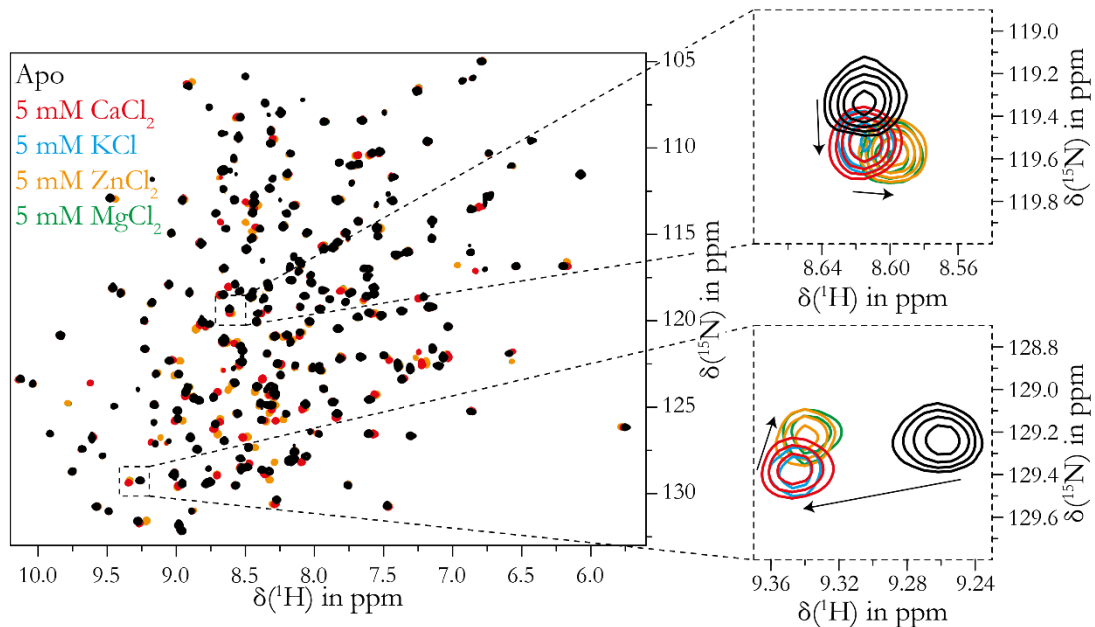
beobachtet werden und eine Bindungsaffinität von 45 mM ermittelt werden. Die Bindung ist deutlich schwächer als für das H-Trisaccharid Typ II. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Erwartungen basierend auf einer verfügbaren Kristallstruktur (Leuthold et al., 2015).

Für die Titration mit Fucose wurde kein intermediärer Austausch beobachtet. Signale, welche durch die Zugabe vom H-Trisaccharid Typ II verschwanden (Abbildung 4-6), zeigen bei der Zugabe der Fucose die größten CSPs. Aufgrund dieser Beobachtung kann die Aussage getroffen werden, dass der Austausch der Fucose schneller ist als für das H-Trisaccharid Typ II.

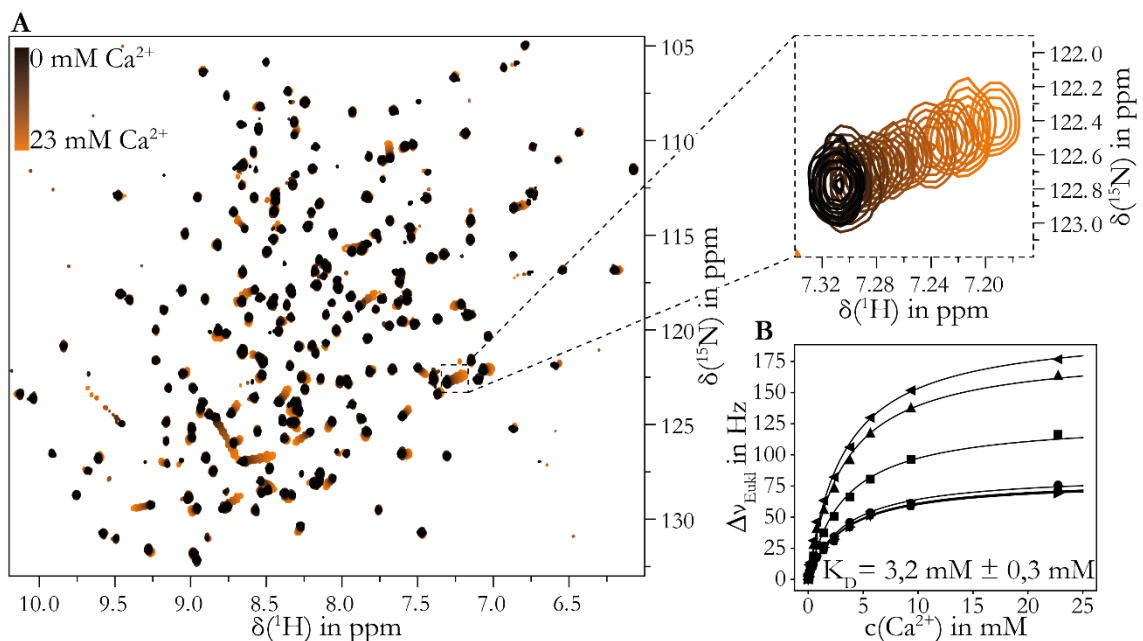


**Abbildung 4-8 Die RHDVb P-Domäne bindet bereits das Monosaccharid Fucose.** (A) zeigt  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren der RHDVb P-Domäne mit steigender Fucose- ( $\alpha\text{-L-Fuc-OMe}$ ) Konzentration von 0 mM bis 135 mM in einem Farbgradienten von schwarz bis orange. Die Signale zeigen CSPs von bis zu 100 Hz, wobei zwei verschiebende Signale vergrößert dargestellt werden. Die Verschiebungen der 7 am stärksten verschiebenden Signale wurden gegen die Zuckerkonzentration in (B) aufgetragen. Durch einen globalen Fit konnte eine Bindungsaffinität von  $45 \text{ mM} \pm 7 \text{ mM}$  ermittelt werden. Die Proteinkonzentration betrug  $100 \mu\text{M}$  und der Puffer enthielt 75 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid mit einem pH\*-Wert von 7,3.

Neben den Kohlenhydraten wurden Metallionen auf ihre Bindung an RHDVb P-Dimere untersucht. Die CSP-Analyse von Calcium-, Kalium-, Zink- und Magnesiumionen zeigte Bindung für Calcium- und Zinkionen (Abbildung 4-9). Dabei sind in beiden Fällen die gleichen Signale von der Bindung der Ionen betroffen. Es ist folglich davon auszugehen, dass beide Ionen an der gleichen Region des Proteins binden. Zink- und Calciumionen sind beides Ionen, welche bereits in der Literatur für die Bindung an andere Viren der Familie *Caliciviridae* bekannt sind. So binden Zinkionen an P-Domänen des humanen Norovirus GII.4 Saga und Calciumionen an P-Domänen des murinen Norovirus (Creutzmacher, 2020).



**Abbildung 4-9 RHDVb P-Domänen binden Calcium- und Zinkionen.** Dargestellt sind  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren der RHDVb P-Domäne, wobei nacheinander verschiedene Salze zur selben Probe zugegeben wurden. Überlagert wurden die Spektren ohne Metallionen (Apo, schwarz) mit 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (rot), mit 5 mM  $\text{KCl}$  (blau), mit 5 mM Zink (orange) und mit 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (grün). Zwei Signale sind vergrößert dargestellt. Nach der Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{ZnCl}_2$  können CSPs und damit auch Bindung beobachtet werden.  $\text{KCl}$  und  $\text{MgCl}_2$  zeigen keine Verschiebungen und binden somit nicht bei einer Konzentration von 5 mM. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 60  $\mu\text{M}$  in einem Puffer mit 20 mM Natriumacetat, 100 mM Natriumchlorid bei einem  $\text{pH}^*$ -Wert von 5,3 durchgeführt.

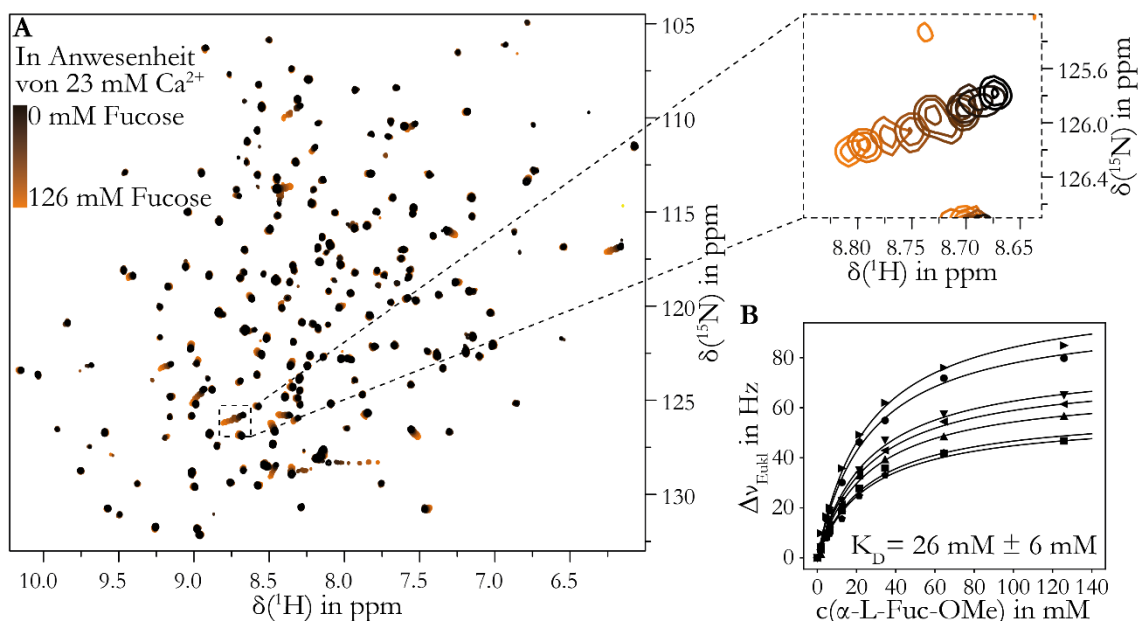


**Abbildung 4-10 RHDVb P-Domänen binden Calciumionen mit einer niedrigen millimolaren Affinität.** (A) zeigt  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren der RHDVb P-Domäne mit steigender Calciumionenkonzentration von 0 mM bis 23 mM in einem Farbgradienten von schwarz nach orange. Dabei sind CSPs von bis zu 175 Hz zu beobachten. Die CSPs von Signalen mit einem CSP größer als der Mittelwert plus doppelter Standardabweichung sind in (B) gegen die Calciumionenkonzentration aufgetragen. Ein globaler Fit liefert eine Affinität von  $3,2 \text{ mM} \pm 0,3 \text{ mM}$ . Die Experimente wurden mit einer Proteinkonzentration von 60  $\mu\text{M}$  in 20 mM Natriumacetat, 100 mM Natriumchlorid mit einem  $\text{pH}^*$ -Wert von 5,3 durchgeführt.

Die Titration von RHDVb P-Domänen mit Calciumionen liefert eine Dissoziationskonstante von 3,2 mM (Abbildung 4-10). Da bei 5 mM Calciumionen keine Sättigung der Bindungstasche vorliegt,

jedoch keine Signalverschiebung durch die Zugabe von Kaliumionen beobachtet wurde, kann die Aussage getroffen werden, dass Kalium nicht oder wenn nur sehr schwach an der RHDVb P-Domäne bindet. Da keine Bindungsaffinität von  $Zn^{2+}$ -Ionen bestimmt wurde, kann keine Aussage getroffen werden, ob zum Zeitpunkt der  $Mg^{2+}$ -Ionenzugabe die Bindungstasche bereits vollständig besetzt war und deswegen keine CSPs beobachtet werden. Die vollständige Abwesenheit von CSPs deutet jedoch auf keine Bindung von  $Mg^{2+}$ -Ionen hin.

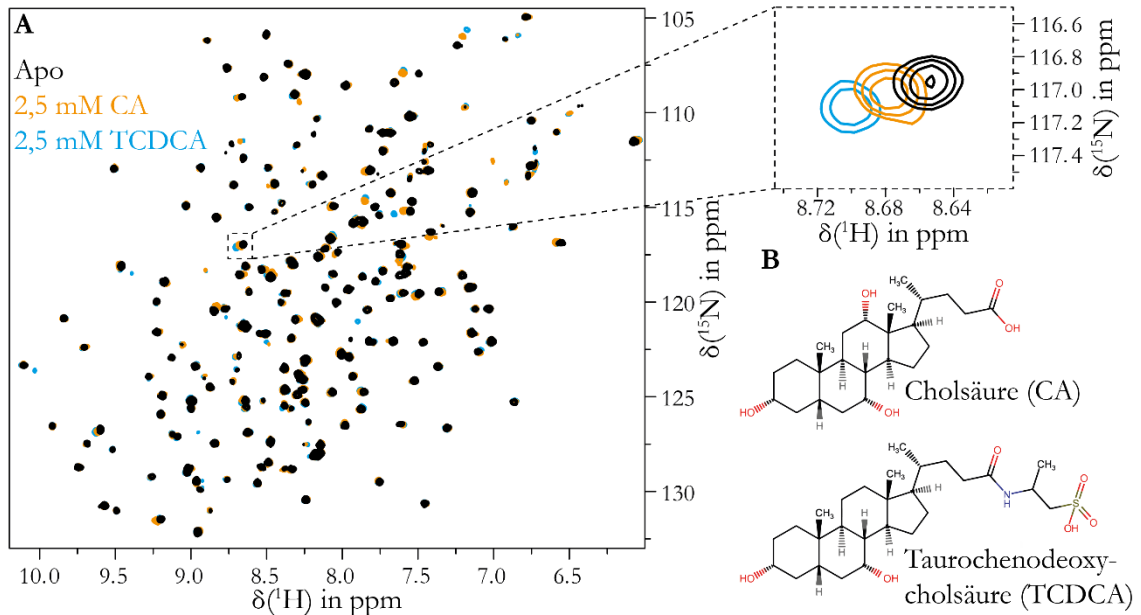
Bei Bindungsexperimenten der Fucose an RHDVb P-Dimere bei einem pH\*-Wert von 5,3 und bei gesättigter  $Ca^{2+}$ -Bindungstasche konnte eine verbesserte Bindung beobachtet werden (Abbildung 4-11). Die Bindungsaffinität betrug 26 mM. Verglichen mit der Messreihe bei einem pH\*-Wert von 7,3 (Abbildung 4-8) konnte eine Verbesserung der Affinität um fast den Faktor 2 erreicht werden. Ob die  $Ca^{2+}$ -Bindung oder der pH-Wert oder die Kombination die Verbesserung hervorruft, kann aus diesen Daten nicht geschlossen werden.



**Abbildung 4-11 Verbesserte Bindungsaffinität von Fucose bei pH 5,3 und/oder  $Ca^{2+}$ -Anwesenheit.** In (A) sind  $^1H$ ,  $^{15}N$ -TROSY-HSQC-Spektren der RHDVb P-Domäne mit steigender Fucose- ( $\alpha$ -L-Fuc-OMe) Konzentration von 0 mM bis 126 mM in einem Farbgradienten von schwarz bis orange dargestellt. Dabei wurde die Messung in 20 mM Natriumacetat, 100 mM Natriumchlorid und 23 mM  $CaCl_2$  mit einem pH\*-Wert von 5,3 durchgeführt. Die CSPs von Signalen mit einem CSP größer als der Mittelwert plus doppelter Standardabweichung sind in (B) gegen die Fucosekonzentration aufgetragen. Durch den gesenkten pH-Wert und/oder die  $Ca^{2+}$ -Bindung ist eine verbesserte Bindungsaffinität der Fucose von  $26 \text{ mM} \pm 6 \text{ mM}$ , verglichen mit den Messungen bei einem pH\*-Wert von 7,3 (Abbildung 4-8), zu beobachten. Die Proteinkonzentration betrug  $60 \mu\text{M}$ .

Nachdem Zusammenhänge zwischen Gallensäuren und verschiedenen Stämmen humaner Noroviren, aber auch mit dem murinen Norovirus (MNV-1) und dem Porcine Enteric Calicivirus (PEC) beobachtet wurden (Ettayebi et al., 2016; Nelson et al., 2018; Shivanna et al., 2014), soll im Folgenden die Interaktion von verschiedenen Gallensäuren mit den RHDVb P-Domänen untersucht werden.

Untersucht wurde die Bindung von Cholsäure (CA), Chenodeoxycholsäure (CDCA), Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA), Glycocholsäure (GCA), Taurocholsäure (TCA) und Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) (Abbildung 7-9). Dabei konnten Bindungen der Gallensäuren CA und TCDCA beobachtet werden (Abbildung 4-12), während alle anderen getesteten Gallensäuren nicht binden.



**Abbildung 4-12 RHDVb P-Domänen binden die Gallensäuren Cholsäure (CA) und Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA).** In (A) sind  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren der RHDVb P-Domäne ohne Gallensäure (schwarz), mit 2,5 mM CA (orange) und mit 2,5 mM TCDCA (blau) überlagert dargestellt. Durch die Anwesenheit der Gallensäuren kommt es zur Verschiebung von Signalen, wobei ein verschiebendes Signal exemplarisch vergrößert dargestellt ist. Für CA und TCDCA verschieben die gleichen Signale, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sie an der gleichen Bindungstasche binden. In (B) sind die Strukturen der Cholsäure (CA) und Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) abgebildet. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  in 75 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid bei einem pH\*-Wert von 7,3 durchgeführt.

#### 4.6 Einzelmolekül-FRET Untersuchungen von P-Dimeren

Die Markierung von Proteinen mit Fluorophoren ist essentiell für die Untersuchung mit Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Mikroskopie. Dabei ist die Zugänglichkeit der Markierungsstelle entscheidend. Außerdem sollten die Proteineigenschaften durch diese Veränderung nicht beeinflusst werden. Die selektive Markierung von Cysteinseitenketten über ein Maleimid bietet eine einfache Möglichkeit verschiedene Positionen und Fluorophore zu testen.

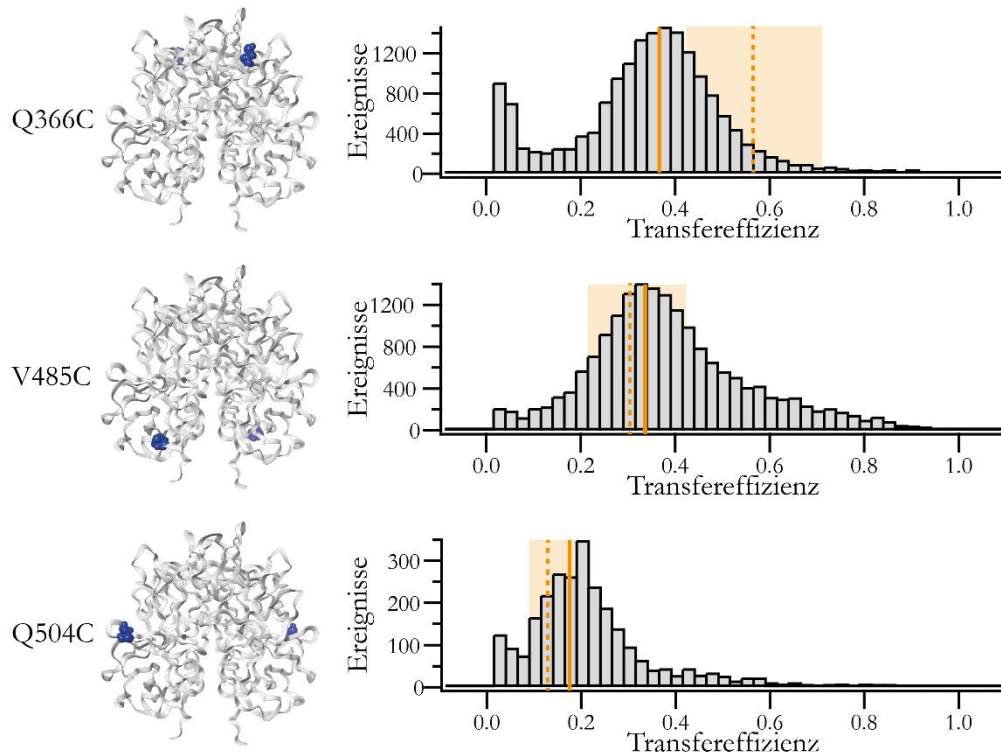
Für die selektive Markierung von Cysteinseitenketten ist eine Kontrollmarkierung mit dem nicht mutierten Protein notwendig, um zu überprüfen, ob nativ im Protein enthaltene Cysteine bereits markiert werden. Die Kontrollmarkierungen des GII.4 Saga N373D P-Dimers und des RHDVb P-Dimers zeigten nach der Durchführung des Markierungsprotokolls (s. Kapitel 3.3.5) keine messbare Fluoreszenz. Unter der Annahme, dass die Punktmutation keine Einflüsse auf die Proteinstruktur hat, ist folglich davon auszugehen, dass keine unspezifische Markierung vorliegt und im Weiteren alle Markierungen spezifisch an der Stelle der Punktmutation vorliegen.

Alle Cystein-Punktmutanten der GII.4 Saga und RHDVb P-Dimere konnten erfolgreich fluoreszenzmarkiert werden (Tabelle 4.1). Dabei konnten Markierungseffizienzen zwischen 54 % bis 96 % für AF488 und 14 % bis 70 % für die Akzeptoren erreicht werden. Die geringere Markierungseffizienz der Akzeptoren ist mit einer geringeren Löslichkeit der Fluorophore in wässrigen Lösungen zu begründen. Für die Doppelmarkierung mit Donor und Akzeptor konnten zusammengerechnet Markierungseffizienzen von >100 % erreicht werden. Diese Beobachtung lässt sich auf den Messfehler des Spektrophotometers zurückführen.

**Tabelle 4.1 Übersicht der Fluorophor-Markierungseffizienzen.** Aufgelistet sind alle in dieser Arbeit verwendeten P-Domänen Punktmutanten. AF488, AF647 und Atto647N stehen dabei für die Einzelmarkierung der Fluorophore. In den Spalten AF488&AF647 sowie AF488&Atto647N sind die Markierungseffizienzen während der Doppelmarkierung angegeben, wobei der erste Wert die Effizienz des Donors und der zweite Wert die des Akzeptors angibt. Nicht durchgeführte Markierungen sind mit „-“ gekennzeichnet. Die Markierungseffizienzen sind in % angegeben.

Protein	AF488	AF647	Atto647N	AF488&AF647	AF488&Atto647N
GII.4 Saga N373D Q366C	54	-	14	59 & 39	84 & 24
GII.4 Saga N373D V485C	55	25	37	58 & 27	83 & 26
GII.4 Saga N373D Q504C	70	-	30	50 & 63	63 & 27
RHDVb S386C	96	70	-	-	-

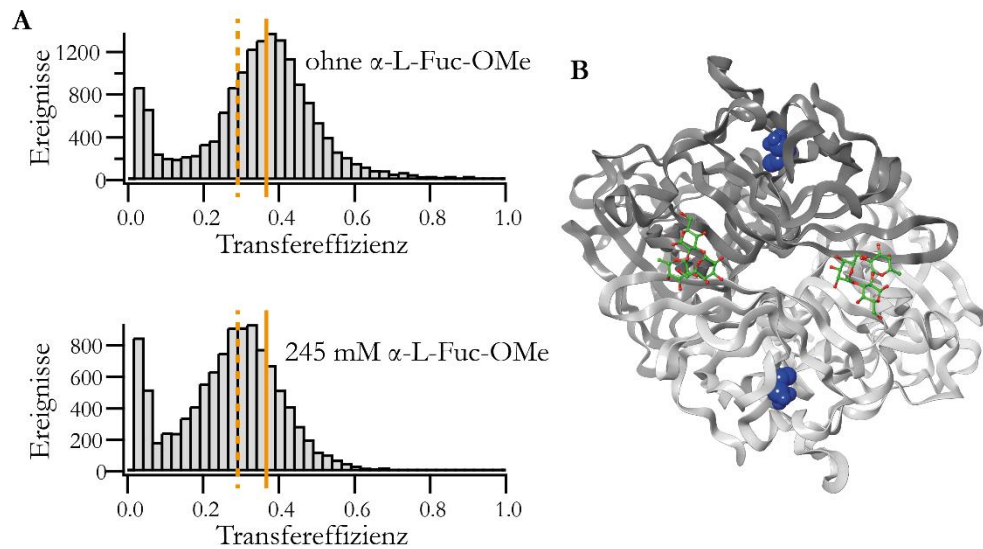
FRET-Untersuchungen der doppelmarkierten GII.4 Saga N373D Cystein-Punktmutanten zeigen, dass der Energietransfer in allen drei Mutanten stattfindet (Abbildung 4-13). Die Anpassung einer Gauß-Funktion an die Histogramme liefert eine mittlere Transfereffizienz von 0,36 für Q366C, 0,33 für V485C und 0,17 für Q504C. Die beobachteten Transfereffizienzen liegen alle niedriger als durch die Cysteinabstände alleine zu erwarteten wäre (Abbildung 3-2). Geringere Transfereffizienzen sind aufgrund des zusätzlichen Abstands durch den Linker zwischen dem Maleimid und dem Fluorophor zu erwarten. Die Fluorophorlinker haben eine Länge von circa 10 Å. Aufgrund der Flexibilität ist für beide Linker zusammen von einem zusätzlichen Abstand der Fluorophore von circa 10 Å bis 15 Å auszugehen (Hirschfeld, 2011). Für die Cystein-Punktmutante Q366C liegt die Transfereffizienz jedoch selbst unter dem erwarteten Wert, wenn ein zusätzlichen Fluorophorabstand von 20 Å angenommen wird. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Cysteine an der Position 366 weiter voneinander entfernt sind, als die Kristallstruktur (PDB 4X06) erwarten lässt. Bei einem zusätzlichen Fluorophorabstand von 15 Å durch die Linker weicht der beobachtete Fluorophorabstand circa 7 Å von der Kristallstruktur ab. Die P2 Subdomäne wird folglich eine offenere Struktur aufweisen.



**Abbildung 4-13 Transfereffizienz-Histogramme der GII.4 Saga N373D P-Domäne.** Dargestellt sind die Histogramme der Cystein-Punktmutanten Q366C (oben), V485C (Mitte) und Q504C (unten). Die Mitte der an die Daten angepasste Gaußfunktion ist als durchgezogene orangene Linie dargestellt. Zusätzlich sind die aus der Kristallstruktur (PDB 4X06) erwarteten Transfereffizienzen angegeben. Die Orientierung des Linken zwischen Protein und Fluorophor ist nicht bekannt, weshalb ein erwarteter Bereich mit einem zusätzlichen Fluorophorabstand von 10 Å bis 20 Å dargestellt ist (orangene Box). Die erwartete Transfereffizienz mit einem zusätzlichen Abstand durch die Linker von 15 Å ist als gestrichelte orangene Linie angegeben. Außerdem sind die Kristallstrukturen (PDB: 4X06) der Punktmutanten mit den mutierten Cysteinen in blau abgebildet. Die Messungen wurden mit AF488 als Donor und Atto647N als Akzeptor durchgeführt. Der Puffer enthielt 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,001 % TWEEN20 mit pH 7,3. Die Messungen wurden je eine Stunde durchgeführt. Für die Analyse wurde eine Summschwelle von 20 Photonen pro Millisekunde und eine Akzeptorschwelle von 10 Photonen pro Millisekunde verwendet.

Zusätzlich zu der eigentlichen FRET-Population zeigen besonders die Histogramme von Q366C und Q504C eine zusätzliche Spezies, die eine Transfereffizienz von 0 besitzt. Diese Population war aufgrund der verwendeten Akzeptorschwelle nicht erwartet und wird im Kapitel 4.9 weiter untersucht.

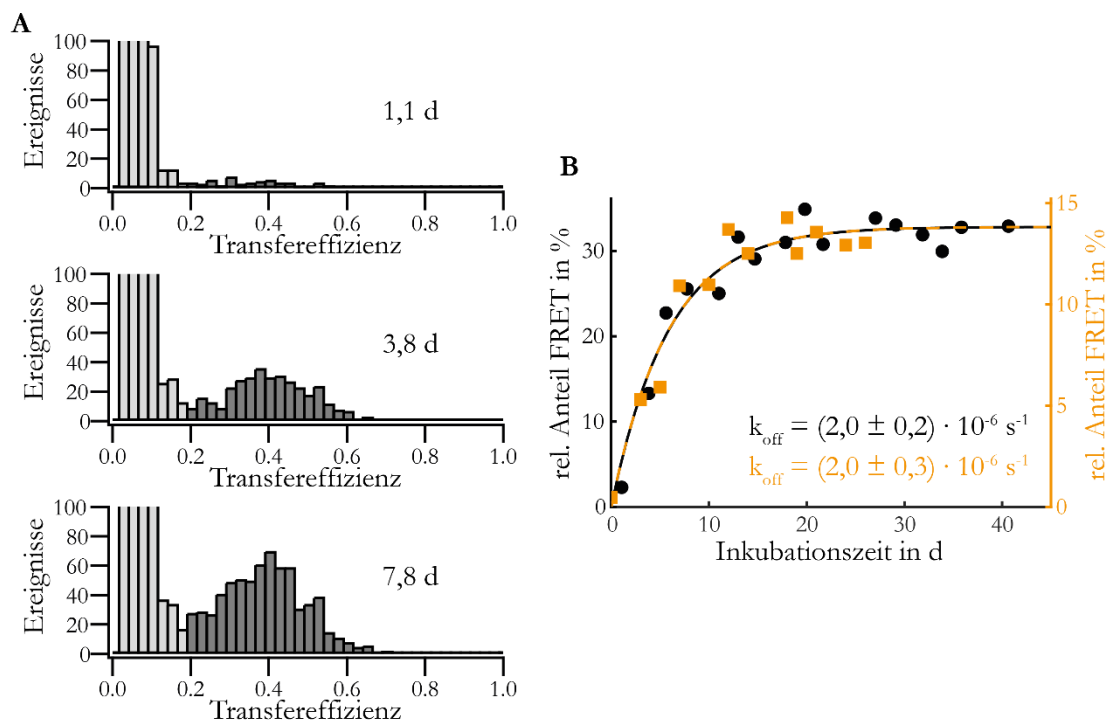
Durch die Anwesenheit von Fucose ( $\alpha$ -L-Fuc-OMe), der minimalen HBGA-Bindungseinheit, kann eine Veränderung der Transfereffizienz für die Q366C Punktmutante beobachtet werden (Abbildung 4-14). Die Histogramme der Punktmutanten V485C und Q504C weisen keine Veränderungen auf (Abbildung 7-12). Bei der Anwesenheit von Fucose sinkt die Transfereffizienz von 0,36 auf 0,29. Dieser Unterschied entspricht einer Vergrößerung der Fluorophorabstände von circa 3 Å. Die Fucosebindestelle ist circa 21 Å von der Aminosäure 366 entfernt. Die Bindung der Fucose wird also wahrscheinlich eine kleine Konformationsänderung der P2-Subdomäne auslösen, wobei sich der Abstand der Aminosäure 366 vergrößert. Der restliche Teil des Proteins scheint von der Zuckerbindung durch die fehlende Transfereffizienzänderung von V485C und Q504C unberührt zu bleiben.



**Abbildung 4-14 Verringerung der Transfereffizienz von GII.4 Saga N373D Q366C P-Dimeren durch die Fucosebindung.** (A) zeigt die Transfereffizienz-Histogramme ohne  $\alpha$ -L-Fuc-OMe und in Anwesenheit von 245 mM  $\alpha$ -L-Fuc-OMe. Gauß-Funktionen wurden an die Histogramme angepasst und deren Mitte aufgetragen, um die Transfereffizienzänderung zu verdeutlichen (durchgezogen ohne Fucose, gestrichelt mit Fucose). Die Messungen wurden mit AF488 als Donor und Atto647N als Akzeptor durchgeführt. Der Puffer enthielt 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,001 % TWEEN20 mit pH 7,3. Die Messungen wurden je eine Stunde durchgeführt. Für die Analyse wurde eine Schwellenschwelle von 20 Photonen pro Millisekunde und eine Akzeptorschwelle von 10 Photonen pro Millisekunde verwendet. (B) zeigt die Aufsicht der Kristallstruktur von GII.4 Saga P-Dimeren in der Anwesenheit vom HBGA B-Trisaccharid (grün-rot) (PDB 4X06). Die Aminosäure 366 ist in blau hervorgehoben und die einzelnen P-Domänen in Graustufen dargestellt.

#### 4.7 Spezifische Senkung der Dissoziationsraten durch Glykanbindung

Durch die Mischung von einzelmarkierten Donor P-Dimeren mit einzelmarkierten Akzeptor P-Dimeren kann aufgrund von Dissoziation und Reassoziierung die Entstehung einer FRET-Population beobachtet werden (Abbildung 4-15A). Dabei ist die Kinetik für GII.4 Saga langsam und die FRET-Population entsteht über den Zeitraum mehrerer Tage. Der Verlauf der Kinetik kann durch die Auftragung des relativen Anteils der Ereignisse der FRET-Population an den Gesamtereignissen gegen die Inkubationszeit dargestellt werden (Abbildung 4-15B). Die Anpassung der Gleichung 3-8 an die Daten liefert die zeitlimitierende Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$ . Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde die Experimentreihe zweimal durchgeführt. In beiden Messreihen konnte eine Dissoziationsrate von  $2 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ermittelt werden. Folglich sind die Messungen reproduzierbar. Aus der Dissoziationsrate lässt sich eine mittlere Lebensdauer der P-Dimere von circa vier Tagen berechnen.

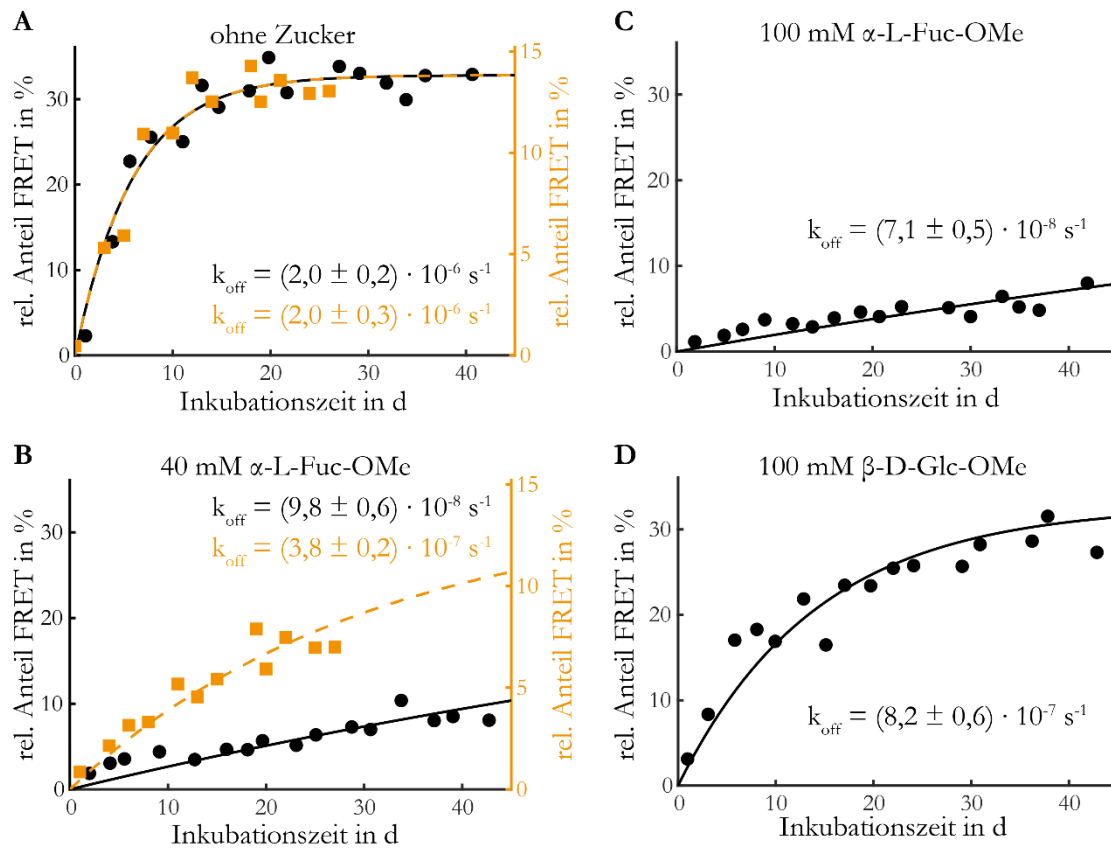


**Abbildung 4-15 Dissoziationskinetik von GII.4 Saga N373D P-Dimeren.** (A) zeigt exemplarisch die Transfereffizienz-Histogramme nach 1,1 d, 3,8 d, und 7,8 d nach der Mischung von donor- und akzeptormarkierten P-Domänen. Dabei wurde eine Schwellenschwelle von 20 Photonen pro Millisekunde und keine Akzeptorschwelle verwendet. Um die entstehende FRET-Population (dunkelgrau) hervorzuheben, wurde die Y-Achse festgesetzt. Der relative Anteil der FRET-Population an den Gesamtereignissen ist gegen die Inkubationszeit in (B) dargestellt. Die Daten in schwarz und orange sind zwei Messreihen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit. Die aus der Anpassung an Gleichung 3-8 ermittelten Dissoziationsraten sind angegeben. Die Messungen wurden mit AF488 als Donor und AF647 als Akzeptor und der Cystein-Punktmutante V485C durchgeführt. Der Puffer enthielt 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,001 % TWEEN20 und 0,1 mg/mL BSA mit pH 7,3. Die Messungen wurden je 30 min durchgeführt.

Durch die Anwesenheit von Fucose ( $\alpha$ -L-Fuc-OME) während der Inkubation ist die Dissoziation der GII.4 Saga P-Dimere verlangsamt (Abbildung 4-16). Bei 40 mM Fucose sinkt die Dissoziationsrate um den Faktor 5 bis 20 auf  $3,8 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  bis  $9,8 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$  und eine Sättigung wird nach mehr als 40 Tagen nicht erreicht. Durch die Erhöhung der Fucosekonzentration auf 100 mM ist die weitere Senkung der Dissoziationsrate gering. In dem Kontrollexperiment mit der nicht bindenden Glucose ( $\beta$ -D-Glc-OME) ist ebenfalls eine verlangsamte Kinetik um den Faktor 2,4 zu beobachten. Diese wird auf eine erhöhte Viskosität durch den Zucker in der Inkubationsprobe zurückzuführen sein. Die

erhöhte Viskosität verlangsamt die Diffusion und erschwert die Mischung. Dieser Effekt ist unspezifisch und wird auch für die Fucose zutreffen. Es ist jedoch deutlich, dass die Fucose einen zusätzlichen spezifischen Effekt aufweist.

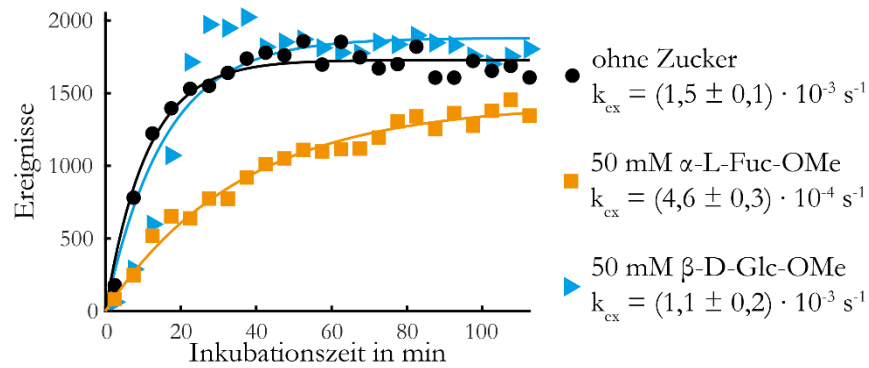
Die Veränderung der Dissoziationsrate durch die Fucose lässt sich mit dem Aufbau der Bindungstasche erklären (Abbildung 2-3A). Die Fucose wird über Wasserstoffbrückenbindungen mit beiden P-Domänen im Dimer gebunden (Hansman et al., 2011). Die Bindung des Zuckers erhöht folglich die Anzahl an Wechselwirkungen, die das Dimer zusammenhalten.



**Abbildung 4-16 Die spezifische Bindung von Fucose verlangsamt die Dissoziation von GII.4 Saga N373D P-Dimeren.** Dargestellt sind die relativen Anteile der FRET-Population in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 20 °C nach der Mischung der donor- und akzeptormarkierten P-Domänen. Dabei war in (A) kein Zucker, in (B) 40 mM  $\alpha$ -L-Fuc-OMe, in (C) 100 mM  $\alpha$ -L-Fuc-OMe und in (D) 100 mM  $\beta$ -D-Glc-OMe während der Inkubation anwesend. Die Daten in schwarz und orange sind zwei Messreihen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit. Die Dissoziation ist in Anwesenheit von  $\alpha$ -L-Fuc-OMe verlangsamt. Die Abnahme der Dissoziationsrate in der Kontrollmessung  $\beta$ -D-Glc-OMe wird auf einen unspezifischen Effekt zurückzuführen sein und fällt schwächer aus als für die  $\alpha$ -L-Fuc-OMe. In orange ist ein zweiter Datensatz zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit aufgetragen. Die Messungen wurden mit AF488 als Donor und AF647 als Akzeptor und der Cystein-Punktmutante V485C durchgeführt. Der Puffer enthielt 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,001 % TWEEN20 und 0,1 mg/mL BSA mit pH 7,3. Die Messungen wurden je 30 min durchgeführt. Für die Auswertung wurde eine Schwellenwert von 20 Photonen pro Millisekunde und keine Akzeptorschwelle verwendet.

Die Dissoziation von RHDVb P-Dimeren verläuft schneller als für GII.4 Saga P-Dimere (Abbildung 4-17). Bereits nach zwei Stunden kann ein Anstieg der FRET-Ereignisse beobachtet werden. Dadurch kann die Kinetikmessung mit nur einer Probe durchgeführt werden und die Bildung des relativen Anteils ist nicht notwendig. Für RHDVb kann die Annahme, dass die Dissoziation der zeitlimitierende Schritt für die Mischung ist, nicht getroffen werden. Aus diesem Grund werden hier Austauschraten  $k_{ex}$  ermittelt.

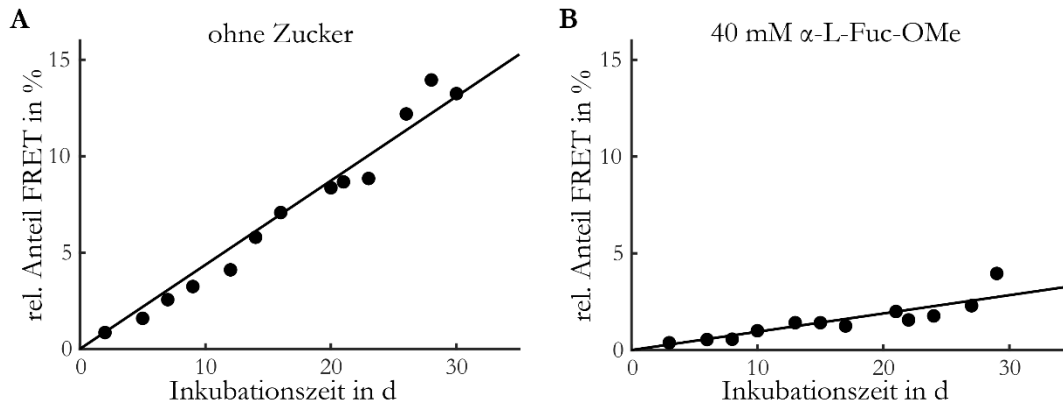
Auch für RHDVb kann eine verlangsamte Austauschrate durch die Anwesenheit von bindenden Zuckern beobachtet werden. Durch die Anwesenheit von Fucose ( $\alpha$ -L-Fuc-OMe) sinkt die Austauschrate um mehr als den Faktor 3 von  $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  auf  $4,6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Das Kontrollexperiment mit der Glucose ( $\beta$ -D-Glc-OMe) zeigt keine Senkung des Austauschs. (Abbildung 4-17).



**Abbildung 4-17 Senkung der Austauschrate von RHDVb P-Dimeren durch die Anwesenheit von Fucose.** Dargestellt sind die Ereignisse mit einer Transfereffizienz zwischen 0,2 und 1 von Messungen über 2 Stunden in 5 min Intervallen. Gegenübergestellt sind die Verläufe ohne Zucker (schwarzer Kreis), mit 50 mM  $\alpha$ -L-Fuc-OMe (orangene Quadrate) und 50 mM  $\beta$ -D-Glc-OMe (blaue Dreiecke). Die Anwesenheit von  $\alpha$ -L-Fuc-OMe führt zur Abnahme der Austauschrate um mehr als den Faktor 3. Die Messungen wurden mit AF488 als Donor und AF647 als Akzeptor und der Cystein-Punktmutante S386C durchgeführt. Der Puffer enthielt 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,001 % TWEEN20 und 0,1 mg/mL BSA mit pH 7,3. Für die Auswertung wurde eine Summschwelle von 20 Photonen pro Millisekunde und eine Akzeptorschwelle von 10 Photonen pro Millisekunde verwendet.

#### 4.8 pH-Wert abhängige Dissoziation von P-Dimeren

Für GII.4 Saga P-Dimere kann ebenfalls eine Verlangsamung der Dissoziationskinetik durch die Senkung des pH-Wertes von 7,3 auf 5,3 beobachtet werden (Abbildung 4-18). Dabei ist nach 30 Tagen noch ein linearer Anstieg zu beobachten, weshalb keine Dissoziationsraten bestimmt werden konnten. Durch die Zugabe von 40 mM Fucose ( $\alpha$ -L-Fuc-OMe) während der Inkubation kann erneut eine Abnahme der Dissoziation beobachtet werden. Dabei ist der lineare Anstieg durch die Zugabe von Fucose 4-mal langsamer.

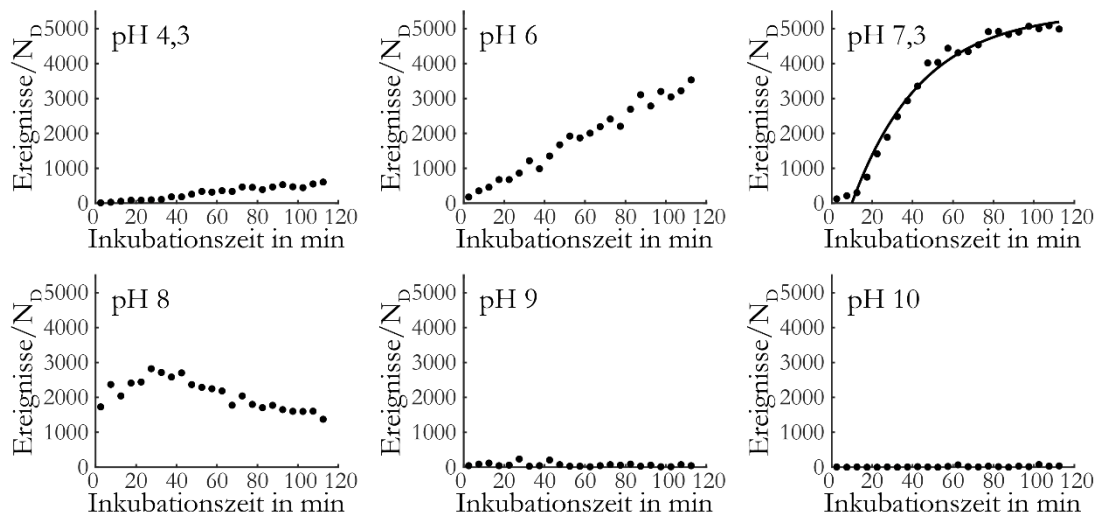


**Abbildung 4-18 Verlangsamte Dissoziation von GII.4 Saga N373D P-Dimeren bei pH 5,3.** Dargestellt sind die relativen Anteile der FRET-Population in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 20 °C nach der Mischung der donor- und akzeptormarkierten P-Domänen. Dabei war in (A) kein Zucker und in (B) 40 mM  $\alpha$ -L-Fuc-OMe während der Inkubation anwesend. In beiden Fällen ist nach 30 Tagen noch ein linearer Anstieg zu beobachten. Fucose senkt den Anstieg um den Faktor 4. Die Messungen wurden mit AF488 als Donor und AF647 als Akzeptor und der Cystein-Punktmutante V485C durchgeführt. Der Puffer während der Inkubation enthielt 20 mM Natriumacetat, 100 mM Natriumchlorid, 0,001 % TWEEN20 und 0,1 mg/mL BSA bei pH 5,3 und während der Messung 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,001 % TWEEN20 und 0,1 mg/mL BSA bei pH 7,3. Die Messungen wurden je 30 min durchgeführt und es wurde eine Summenschwelle von 20 Photonen pro Millisekunde und keine Akzeptorschwelle verwendet.

Der pH-Wert hat ebenfalls einen Einfluss auf den Austausch von RHDVb P-Dimeren (Abbildung 4-19). Für eine bessere Vergleichbarkeit der Messungen wurden die Datensätze normiert. Dafür wurde die mittlere Anzahl an Donorfluorophoren im Laserfokus verwendet, welche aus den Korrelationsfunktionen ermittelt wurden (Tabelle 7.3). Bei pH 4,3 ist nur ein langsamer Anstieg der FRET-Ereignisse zu beobachten, welcher durch die Erhöhung des pH-Wertes auf 6 um mehr als den Faktor 6 erhöht werden konnte. In beiden Fällen liegt ein linearer Anstieg vor und deutet dabei auf eine noch nicht weit fortgeschrittene Mischung der P-Dimere hin. Bei pH 7,3 ist nach 2 Stunden bereits eine Sättigung zu beobachten. Die durch eine exponentielle Anpassung ermittelte Austauschrate liegt bei  $4,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Bei pH 8 sind sofort nach dem Start der Messung FRET-Ereignisse detektierbar und bleiben über die Zeit von 2 Stunden relativ konstant. Bei pH 9 und 10 sind keine FRET-Ereignisse zu beobachten.

Die Daten zeigen einen beschleunigten Austausch der P-Dimere bei einem Anstieg von pH 4,3 bis 7,3. Die Ergebnisse bei pH 8 bis 10 lassen sich ebenfalls durch eine vermehrte Dissoziation bei höheren pH-Werten erklären. Bei pH 8 könnte die Dissoziation so schnell sein, dass bereits nach kurzer Zeit die Mischung der P-Dimere im Gleichgewicht ist. Bei pH 9 und 10 werden keine P-Dimere gebildet, die FRET zeigen. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten. Die P-Dimere könnten bei diesen pH-Werten nicht zu Monomeren dissoziieren, wodurch es nicht zur Mischung und somit zu keinem FRET-Signal kommt. Alternativ werden Monomere gebildet, die nicht wieder dimerisieren.

Dem zuvor beobachteten Trend folgend ist die Theorie der Monomere bei basischem pH-Wert wahrscheinlicher.



**Abbildung 4-19 pH-Wert abhängige Dissoziation der RHDVb P-Dimere.** Dargestellt ist die, durch die Anzahl der Donorfluorophore ( $N_D$ ) normierte, Anzahl an FRET-Ereignisse in 5 min Intervalle von 2 Stunden Messungen bei pH-Werten von 4,3 bis 10. Die Ereignisse steigen bei Erhöhung des pH-Wertes von 4,3 bis 7,3 schneller und lassen auf eine schnellere Dissoziation schließen. Bei pH 8 sind konstant Ereignisse zu detektieren ohne große Veränderungen über die Zeit. Für pH 9 und 10 sind auch nach 2 Stunden keine Ereignisse zu detektieren. Die Messungen wurden mit AF488 als Donor und AF647 als Akzeptor und der Cystein-Punktmutante S386C durchgeführt. Der Puffer enthielt 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,001 % TWEEN20 und 0,1 mg/mL BSA. Für die Auswertung wurde eine Summschwelle von 20 Photonen pro Millisekunde und eine Akzeptorschwelle von 10 Photonen pro Millisekunde verwendet.

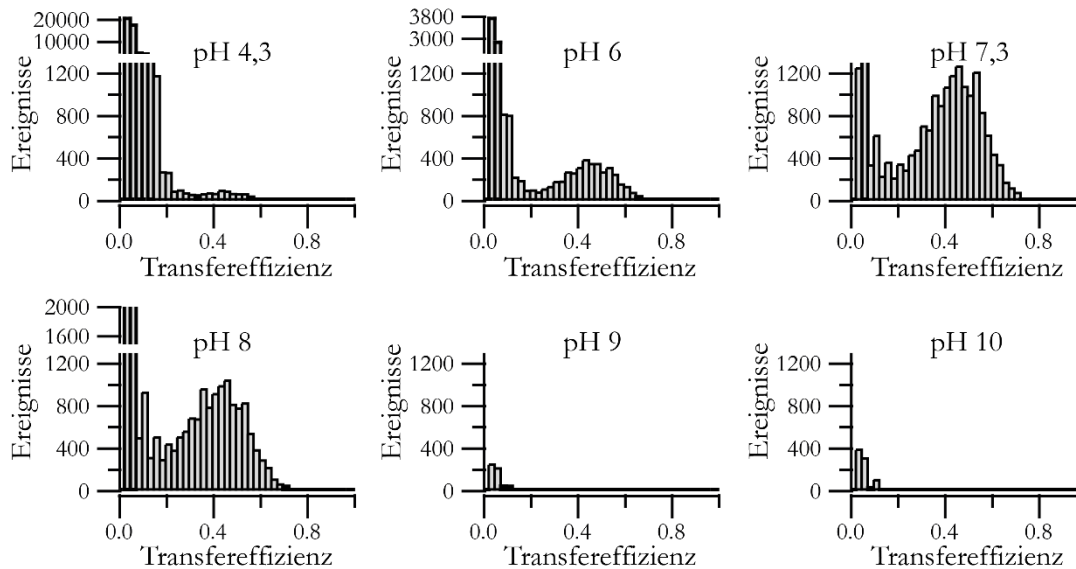
Zu erwähnen sind die unterschiedlichen Austauschraten bei pH 7,3 verglichen mit der zuvor erwähnten Messreihe (Abbildung 4-17). Trotz gleicher Messbedingungen sind die Austauschraten um den Faktor 3 verschieden. Die Messungen erfolgten in unterschiedlichen Wochen. In der Zeit dazwischen wurde das Konfokalmikroskop neu eingestellt. Eine absolute Betrachtung der Austauschraten ist folglich nur bedingt möglich. Die einzelnen Messreihen erfolgten jedoch hintereinander, wodurch die Austauschraten der Messreihen verglichen werden können.

In CD-spektroskopischen Untersuchungen der RHDVb P-Domänen konnte ein Einfluss des pH-Wertes auf die Schmelztemperatur beobachtet werden (Abbildung 7-14). Dabei sinkt die Schmelztemperatur bei steigendem pH-Wert. Folglich hat der pH-Wert einen Einfluss auf die Austauschrate der P-Dimere und auf die Proteinestabilität.

#### 4.9 Beobachtung einer unerwarteten P-Domänen Population

Für die Messungen von GII.4 Saga und RHDVb P-Dimeren mit Einzelmolekül-FRET wurden Ereignisse mit einer Transfereffizienz von 0 gemessen (Abbildung 4-13, Abbildung 4-20), die nicht auf nur Donor-markierte Proteine zurückgeführt werden können, da die Anwesenheit des Akzeptors am Dimer mit direkter Akzeptoranregung überprüft wurde. Das heißt beide Fluorophore sind am Dimer, jedoch mit einem Abstand der größer als der doppelte Försterradius ist. Aufgrund der Fluorophorabstände, die aus der Kristallstruktur ermittelt wurden (Abbildung 3-2), waren lediglich Transfereffizienzen größer als 0 erwartet.

Für RHDVb P-Dimere konnte außerdem ein Zusammenhang dieser Population mit dem pH-Wert beobachtet werden (Abbildung 4-20). Bei niedrigen pH-Werten sind viele Ereignisse mit einer Transfereffizienz von 0 zu messen. Die Anzahl sinkt dabei mit steigendem pH-Wert.



**Abbildung 4-20 FRET-Population mit einer Transfereffizienz von 0 ist pH-abhängig.** Gezeigt sind die Histogramme der 2 Stunden Dissoziationsexperimente aus Abbildung 4-19. Die Anzahl an Ereignissen mit einer Transfereffizienz von 0 ist bei pH 4,3 am größten und sinkt bei steigendem pH-Wert. Ein umgekehrter Effekt ist für die FRET-Population bei einer Transfereffizienz von 0,2 bis 1 zu beobachten. Hier steigt die Anzahl der Ereignisse bei steigendem pH bis zum pH 7,3. Zu pH 8 ist fast kein Unterschied zu erkennen und bei pH 9 und 10 sind keine Signale in diesem Bereich zu beobachten. Die Messungen wurden mit AF488 als Donor und AF647 als Akzeptor und der Cystein-Punktmutante S386C durchgeführt. Der Puffer enthielt 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,001 % TWEEN20 und 0,1 mg/mL BSA. Es wurde eine Schwellenwert von 20 Photonen pro Millisekunde und eine Akzeptorschwellenwert von 10 Photonen pro Millisekunde verwendet.

Eine unspezifische Bindung des Akzeptors Atto647N konnte NMR-spektroskopisch für GII.4 Saga ausgeschlossen werden, da keine CSPs nach Fluorophorzugabe beobachtet wurden (Abbildung 7-13). Da diese Population für mehrere Punktmutanten an verschiedenen Positionen und Proteinen beobachtet wurde, ist die Begründung durch eine Konformationsänderung unwahrscheinlich. Auch eine ungeordnete Aggregation scheint keine geeignete Erklärung für diese Beobachtung zu sein, da in diesem Fall auch Ereignisse mit höheren Transfereffizienzen beobachtet werden müssten. Ebenfalls kann eine veränderte Fluorophor-Stabilität bei verschiedenen pH-Werten ausgeschlossen werden, da die verwendeten Fluorophore in dem gewählten Bereich pH tolerant sind (Panchuk-Voloshina et al., 1999).

Mögliche Erklärungen bleiben eine andere Anordnung der P-Domänen zu P-Dimeren, in welcher die Fluorophore weit entfernt wären. Alternativ wäre eine höhere Oligomerisierung in beispielsweise Tetramere möglich. Je nach Anordnung wären in beiden Fällen mehrere Transfereffizienzen zu erwarten. Aufgrund der geordneten Anordnung wären diese Transfereffizienzen nicht zufällig sondern definiert. Möglicherweise sind die Ereignisse mit höheren Transfereffizienzen als erwartet bei V485C (zwischen 0,6 und 0,8) und bei Q504C (zwischen 0,4 und 0,6) Hinweise auf eine Oligomerisierung oder eine andere Dimer-Orientierung (Abbildung 4-13).

## 5 Diskussion

### 5.1 Ungewöhnliche syn-Konformation des Proteinerückgrats als Ursache der schnellen Deamidierung von GII.4 P-Dimeren

Für die P-Dimere der humanen Norovirus-Stämme GII.4 Saga und GII.4 VA387 konnte trotz einer Sequenzidentität von 90 % und einer strukturellen Ähnlichkeit mit einem RMSD von 0,4 Å (Creutzmacher *et al.*, 2023) eine dreimal schnellere Deamidierung des Asparagins 373 für GII.4 Saga beobachtet werden (Ogrissek, 2020). Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind das Histidin 297 und das Asparagin 372, die im GII.4 Saga P-Dimer ein Arginin und eine Glutaminsäure sind. Das Histidin 297 befindet sich in einem räumlich benachbarten Loop von dem Asparagin 373. Dennoch kommt es bei der Angleichung der Sequenzen durch eine Mutation zu einem Arginin zu einer deutlichen Beschleunigung der Deamidierung (Abbildung 4-1). Bereits diese Mutation ist ausreichend, um fast die Deamidierungskinetik von GII.4 Saga zu erreichen. Durch die Mutation des Asparagins 372 zu einer Glutaminsäure wird ebenfalls die Deamidierung beschleunigt. Im Falle der doppelten Punktmutante H297R, N372E von GII.4 VA387 ist die Deamidierungsrate fast identisch zu GII.4 Saga. Diese Daten dienen als Grundlage einer Publikation, in der die Deamidierung mit Peptiden und mit MD-Simulationen genauer untersucht wurden (Creutzmacher *et al.*, 2023).

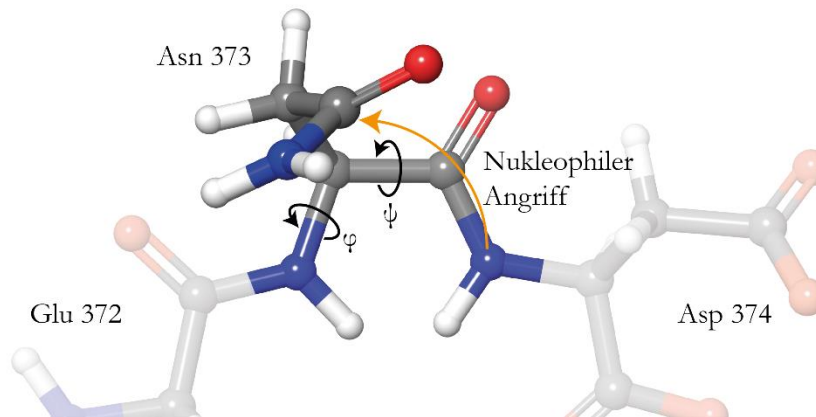
Untersuchungen von synthetisierten 13-mer Peptiden, welche die Sequenz des kompletten deamidierenden Loops enthalten, zeigten eine um einige Größenordnungen langsamere Deamidierung (Creutzmacher *et al.*, 2023). Die kombinierte Betrachtung der Ergebnisse im gesamten Protein und im Modellpeptid liefert das Ergebnis, dass die schnelle Deamidierung des Asparagins 373 durch die Proteinstruktur hervorgerufen wird. Dies ist ungewöhnlich, da in den meisten Fällen die 3D-Struktur des Proteins die Deamidierung verlangsamt und die Vorstellung vorherrscht, dass die Aminosäuresequenz bestimmend ist (Robinson and Robinson, 2001).

Zusätzlich konnte während der Inkubation der Modellpeptide die Deamidierung von mehreren Asparaginen und auch die Bildung von Aspartat in einem Verhältnis von iso-Aspartat zu Aspartat von 4:1 beobachtet werden (Creutzmacher *et al.*, 2023). Da in den Experimenten mit den P-Dimeren eine ausschließliche Bildung von iso-Aspartat zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Orientierung im Protein die Bildung von iso-Aspartat begünstigt oder die Bildung von Aspartat verhindert.

Die Betrachtung der freien Energielandschaften der Rückgrattorsionswinkel des Asparagins 373 von GII.4 Saga liefert eine Erklärung für die schnelle und selektive Deamidierung (Creutzmacher *et al.*, 2023). Das Asparagin 373 besitzt als einziges Asparagin im Protein ein häufig populierte ungewöhnliches Energieminimum. Dieses Minimum korrespondiert mit einer syn-Konformation des Proteinerückgrats (Abbildung 5-1). Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Threonin 371 und der Asparaginsäure 374 stabilisiert die syn-Konformation. Im Fall von GII.4 VA387 wird die Wasserstoffbrückenbindung seltener ausgebildet und die syn-Konformation ist weniger populiert.

Berechnungen eines Tripeptids, das die gleiche Rückgratkonformation einnimmt wie das Asparagin 373, erklärt die Reaktivität (Strieter and Andrew, 2015). Durch die syn-Konformation kommt es zu einer Pyramidalisierung des Stickstoffs und einer Rehybridisierung von  $sp^2$  zu  $sp^3$ . Als Folge besitzt das Stickstoffatom ein freies Elektronenpaar und eine erhöhte Nukleophilie, wodurch der erste Schritt der Deamidierung beschleunigt wird. Auch die selektive Bildung von iso-Aspartat lässt sich über die syn-Konformation erklären. So ist neben der Nukleophilie des Stickstoffs auch die

Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffs von Asparagin 373 erhöht und folglich anfälliger für die anschließende Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}$ .



**Abbildung 5-1 Schematische Darstellung der reaktiven syn-Konformation des Asparagins 373.** Dargestellt sind die Aminosäuren Glutaminsäure 372, Asparagin 373 und Aspartat 374 von der GII.4 Saga P-Domäne. Das Rückgrat des Asparagins liegt in der syn-Konformation ( $\varphi \approx 0^\circ$ ,  $\psi \approx -180^\circ$ ) vor. Der erste Schritt der Deamidierungsreaktion, der nukleophile Angriff des Stickstoffs vom Asp374 an das Carbonylkohlenstoff der Asn373 Seitenkette, ist mit einem orangenen Pfeil dargestellt.

Der Einfluss der Aminosäure 297 auf das Deamidierungsverhalten lässt sich durch die Interaktion mit den Aminosäuren Asparaginsäure 370 und Threonin 371 begründen (Creutzmacher et al., 2023). Wie bereits beschrieben, stabilisiert Threonin 371 über eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Asparaginsäure 374 die syn-Konformation des Asparagins 373. Die Interaktion mit dem Threonin 371 hat über eine Stabilisierung oder Destabilisierung der Wasserstoffbrückenbindung einen Einfluss auf die Deamidierung. Auch die Aminosäure 372 kann durch ihre Position im durch die Wasserstoffbrückenbindung stabilisierten Loop direkt neben dem deamidierenden Asparagin 373 einen Einfluss auf die Deamidierungskinetik haben.

Algorithmen zur Vorhersage von deamidierenden Asparaginen sollten zukünftig zusätzlich die freien Energielandschaften der Rückgrattorsionswinkel untersuchen, um Asparagine in der syn-Konformation und damit Asparagine mit einer erhöhten Deamidierungswahrscheinlichkeit zu detektieren.

## 5.2 Bewertung potentieller Norovirus Eintrittsinhibitoren

Für die Entwicklung potentieller Norovirus Eintrittsinhibitoren sollten neue Verbindungen identifiziert werden, welche mit einer verbesserten Affinität an die Bindungsstelle der Blutgruppenantigene (HBGA) binden. Durch die Blockierung der HBGA-Bindungsstelle soll der Eintritt des Norovirus in die Wirtszelle verhindert und so die Infektion bekämpft werden.

9 von 54 Verbindungen der Maybridge Library Ro5 (Abbildung 7-3), welche nach vorherigen Studien an die HBGA-Bindungsstelle binden sollen (Rademacher et al., 2011), wurden in dieser Arbeit NMR-spektroskopisch weiter untersucht. Dabei konnte für 7 Verbindungen eine Bindung beobachtet werden. Diese ist jedoch nicht an der HBGA-Bindungsstelle lokalisiert (Abbildung 4-3). Es konnten zwei Regionen im Protein bestimmt werden, die durch die Bindung der Verbindungen besonders beeinflusst sind. Diese Regionen sind die Dimerisierungsfläche der P-Domänen und die Gallensäurebindestelle (Abbildung 4-3B). Für einige Verbindungen der Maybridge Library CR2006 und TS2017 konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden (Küchler, 2019). Für die meisten dieser

Verbindungen konnten Bindungseffekte an der Dimerisierungsfläche und ggf. an der Gallensäurebindungsstelle beobachtet werden.

Gallensäuren, wie die Cholsäure, sind hydrophobe Moleküle, genauso wie die untersuchten Verbindungen. Hydrophobe Interaktionen sind verglichen mit polaren Interaktionen unspezifischer, weshalb unterschiedliche Verbindungen an dieselbe Bindungstasche binden können. Vorherige Arbeiten mit Verbindungen der Maybridge Library CR2006 und TS2017 haben einen Zusammenhang zwischen Gallensäuren und der Bindung der Verbindungen nahegelegt (Küchler, 2019).

Gallensäuren und die Maybridge Verbindungen haben nicht den gleichen Einfluss auf die P-Dimere. Während für die Gallensäuren CA, DCA, GCDCA und CDCA die größten CSPs für die Aminosäuren 503 bis 509 detektiert werden (Creutzmacher et al., 2020), sind für die Maybridge Verbindungen auch deutliche CSPs an der Dimerisierungsfläche (RI) der P-Domänen zu beobachten. Außerdem konnte für Verbindungen, wie die Verbindung 479, lediglich ein Einfluss auf die Aminosäuren in der Dimerisierungsfläche, aber nicht an der Gallensäurebindungsstelle beobachtet werden. Folglich ist davon auszugehen, dass dort eine weitere Bindungsstelle für kleine hydrophobe Moleküle lokalisiert ist.

Weshalb die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen in Konkurrenzexperimenten auf eine Bindung an die HBGA-Bindungsstelle deuteten (Rademacher et al., 2011), ist noch nicht geklärt. Für Verbindungen der Maybridge Library CR2006 und TS2017 wurden ebenfalls kompetitive Untersuchungen mit Glykanen durchgeführt. Für die meisten Verbindungen wurde in ihrer Anwesenheit keine Veränderung der Zuckerbindung festgestellt. In wenigen Fällen konnten Hinweise auf kleine Verbesserungen oder Verschlechterungen der Bindungsaffinität beobachtet werden (Küchler, 2019). Bindungsstudien von Kohlenhydraten bei besetzter Gallensäurebindungsstelle zeigten keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten (Creutzmacher et al., 2020).

Die Bindung der Fucose-tragenden Verbindungen JGII.78 und JGII.79 an die HBGA-Bindungstasche von GII.4 Saga P-Dimeren konnte nachgewiesen werden (Abbildung 4-2). Die Bindungsaffinität von JGII.79 ist dabei vergleichbar mit der von der Fucose alleine, während die Bindungsaffinität von JGII.78 um den Faktor 2 verbessert ist. Die 2-Fluorzimtsäure hat folglich einen positiven Einfluss auf die Bindung. Außerdem kann angenommen werden, dass das Sulfamethazin an der Bindung unbeteiligt ist.

Mit JGII.78 konnte eine synthetische Verbindung gefunden werden, die eine der stärksten Bindungen an die GII.4 P-Dimere aufweist (Creutzmacher et al., 2021). Aufgrund der relativ leicht modifizierbaren Synthese der Verbindung zur Erzeugung neuer Strukturen ist JGII.78 ein gut geeigneter Start eines potentiellen Norovirusinhibitors. Jedoch muss die Affinität noch deutlich verbessert werden. Dies könnte durch eine gezielte Optimierung der Struktur durch beispielsweise MD-Simulationen erfolgen (Alonso et al., 2006; Chen, 2015). Aufgrund der unveränderten Affinität von JGII.79 im Vergleich zur Fucose, sollte im ersten Schritt das Sulfamethazin ausgewechselt werden.

Für die Influenza von Vögeln konnte durch eine Verknüpfung von drei Sialinsäuren ein nanomolarer Inhibitor entwickelt werden (Waldmann et al., 2014). Dabei sind die drei Bindungstaschen des Hemagglutinin-Trimers 45 Å voneinander entfernt. Ein analoger Ansatz könnte für die hier untersuchte Verbindungen JGII.78 oder einer weiter optimierten Verbindung durchgeführt werden.

Die HBGA-Bindungstaschen im Dimer sind circa 25 Å voneinander entfernt. Falls notwendig könnten auch weitere Bindungstaschen im Kapsid bedient werden. Die HBGA-Bindungstasche benachbarter VP1-Dimere ist circa 75 Å entfernt (Rademacher et al., 2011). Die Entwicklung der Linker ist nicht trivial. Sterische Probleme sind möglich, weshalb die Länge und Eigenschaften des Linkers auf das Protein angepasst sein müssen, um Multivalenz zu ermöglichen (Bucher et al., 2018).

Auch die untersuchten Verbindungen der Maybridge Library Ro5 kommen für die Entwicklung von Inhibitoren in Betracht. Durch das unerwartete Bindungsepitop wären diese Verbindungen ungeeignet, um die Glykanbindung zu verhindern, jedoch kann auch eine Blockierung der Gallensäurebindungstasche ein Ansatz der Infektionsbekämpfung sein. In menschlichen Darm-Enteroiden aus Stammzellen konnte eine signifikante Verbesserung der Replikation von GII.4 Noroviren durch die Anwesenheit von Gallensäuren beobachtet werden (Ettayebi et al., 2016). Für eine Blockierung dieser Bindungstasche müssten diese Verbindungen weiterentwickelt werden und auch das Problem der geringen Löslichkeit in Wasser bei gleichzeitiger Beibehaltung der Bindungseigenschaften gelöst werden.

Interessant ist auch die beobachtete Bindung der Maybridge Verbindungen an die Dimerisierungsfläche (Abbildung 4-3) für die Entwicklung möglicher Inhibitoren. Diese Bindung ist noch weitestgehend unerforscht. Aufgrund der Position der Bindungstasche im Dimer kann die Hypothese entwickelt werden, dass diese Verbindungen die P-Dimere stabilisieren könnten und damit eine Infektion erschweren oder verhindern. Die Zugänglichkeit der Bindungsstelle wird im komprimierten Zustand des Kapsids (s. Kapitel 2.1.4) wahrscheinlich nur eingeschränkt möglich, weshalb die Weiterentwicklung der Verbindung erschwert werden könnte.

### 5.3 Bedeutung der RHDVb Bindungsstudien

NMR-spektroskopische Untersuchungen konnten eine Faltung der rekombinant in *E. coli* produzierten RHDVb P-Domäne nachweisen (Abbildung 4-4, Abbildung 4-5). Außerdem konnte in smFRET Untersuchungen der S386C Punktmutante eine Transfereffizienz von 0,45 beobachtet werden, die mit dem erwarteten Abstand in der Kristallstruktur (PDB 4X1Z) übereinstimmt (Abbildung 3-2, Abbildung 4-20). TRACT Experimente lieferten eine Rotationskorrelationszeit von 24 ns, welche vergleichbar mit bereits ermittelten Rotationskorrelationszeiten anderer P-Dimere ist (Creutzmacher, 2020; Mallagaray et al., 2019; Ogrissek, 2020). Die Kombination dieser Ergebnisse lässt annehmen, dass eine korrekte Faltung des Proteins vorliegt.

Mit Hilfe der hier erstmalig durchgeführten <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N-Isotopenmarkierung von RHDVb P-Dimeren konnte die Bindung von Kohlenhydraten, Metallionen und Gallensäuren nachgewiesen werden (Tabelle 5.1).

Die Bindung vom H-Trisaccharid Typ II aber nicht vom Typ I wurde bereits für das klassische RHDV und RHDVb beobachtet (Nyström et al., 2011; Rademacher et al., 2008). In dieser Arbeit wurde die Bindung vom H-Trisaccharid an die RHDVb P-Domäne weiter untersucht. Dabei konnte keine Bindung für das H-Trisaccharid Typ I beobachtet werden und eine Bindung für das H-Trisaccharid Typ II mit einer Affinität von 4,1 mM bestimmt werden. Die Spezifität für die Typ II Trisaccharide lässt sich über die Bindungstasche in der Kristallstruktur begründen. Bei gleichbleibender Position der Fucose und Galactose würde eine Änderung zum Typ I Trisaccharid die Orientierung der N-Acetylglucose so verändern, dass die N-Acetylgruppe mit den Seitenketten des Proteins kollidiert. Das H-Trisaccharid Typ I wird also aus sterischen Gründen nicht gebunden.

Außerdem konnte für einen Großteil der durch die Bindung vom H-Trisaccharid Typ II beeinflussten Signale ein intermediärer Austausch beobachtet werden. Der intermediäre Austausch liefert Informationen über die Dynamik der Bindung. Aufgrund des beobachteten intermediären Austauschs für die Bindung vom H-Trisaccharid kann eine Austauschrate  $k_{ex}$  in der Größenordnung der Differenz der Resonanzfrequenzen des ungebundenen und gebundenen Zustands angenommen werden (Mittermaier and Kay, 2009). Unter der Annahme, dass die Resonanzfrequenzdifferenz vergleichbar mit der durch die Fucose-Bindung ist (Abbildung 4-8), kann eine Austauschrate in der Größenordnung von circa  $100 \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden. Eine alternative Erklärung der verschwindenden Signale ist eine Veränderung der Proteindynamik, die durch die Bindung des Liganden ausgelöst wird.

**Tabelle 5.1 Zusammenfassung der Bindungsstudien an die RHDVb P-Domäne.** Aufgelistet sind die mit NMR-Spektroskopie auf Bindung untersuchten Kohlenhydrate, Metallionen und Gallensäuren. Dabei sind Ergebnisse mit einer beobachteten Bindung mit einem + und ohne Bindung mit einem – gekennzeichnet. Falls vorhanden, sind die ermittelten Bindungsaffinitäten aufgelistet.

Kohlenhydrate	
$\alpha$ -L-Fuc-OMe (bei pH* 7,3)	+ $K_D = 45 \text{ mM} \pm 7 \text{ mM}$
$\alpha$ -L-Fuc-OMe (bei pH* 5,3 und 23 mM $\text{Ca}^{2+}$ )	+ $K_D = 26 \text{ mM} \pm 6 \text{ mM}$
H-Disaccharid	+
H-Trisaccharid Typ I	-
H-Trisaccharid Typ II	+ $K_D = 4,1 \text{ mM} \pm 1,6 \text{ mM}$
Metallionen	
$\text{Ca}^{2+}$	+ $K_D = 3,2 \text{ mM} \pm 0,3 \text{ mM}$
$\text{K}^+$	-
$\text{Zn}^{2+}$	+
$\text{Mg}^{2+}$	-
Gallensäuren	
CA	+
CDCA	-
GCDCA	-
GCA	-
TCA	-
TCDCa	+

STD-NMR-Untersuchungen des klassischen RHDV zeigten die Bindung des H-Dissaccharids und der Fucose (Rademacher et al., 2008). Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit für das RHDVb ebenfalls beobachtet werden. Außerdem konnte das Bindungsmotiv des H-Disaccharids genauer charakterisiert werden (Abbildung 4-7C). Dabei wird die entscheidende Rolle der Fucose bei der Bindung deutlich, die bereits aus der Kristallstruktur erwartet wurde (Leuthold et al., 2015).

Interessanterweise konnte eine Modulierung der Zuckerbindung an die RHDVb P-Dimere beobachtet werden (Abbildung 4-8, Abbildung 4-11). Es konnte eine Verbesserung der Bindungsaffinität für Fucose um fast den Faktor 2 beobachtet werden. Dabei ist unklar, ob der pH-Wert oder die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung die Zuckerbindung beeinflusst. Möglicherweise haben auch beide Veränderungen einen Einfluss auf die Bindung. Diese Modulierung der Zuckerbindung könnte einen essentiellen Teil der Wirtszellerkennung darstellen und sollte in Zukunft genauer untersucht werden.

Es konnte ebenfalls die Bindung von Gallensäuren beobachtet werden (Abbildung 4-12). Diese ist spezifisch für Cholsäure (CA) und Taurochenodeoxycholsäure (TCDCa). Für humane Noroviren, dem murinen Norovirus und dem Porcine Enteric Calicivirus wurden Gallensäuren als relevanter

Faktor bei der Infektion beschrieben (Creutzmacher et al., 2020; Ettayebi et al., 2016; Nelson et al., 2018; Shivanna et al., 2014). Es wird angenommen, dass Epithelzellen, welche die HBGAs exponieren, von RHDV infiziert werden (Abrantes et al., 2012). Diese können in den Atemwegen und dem Verdauungstrakt gefunden werden. Die Infektionen laufen dabei wahrscheinlich überwiegend über den fäkal-oralen Weg ab (Abrantes et al., 2012). Die Infektion von RHDV findet also in der Gegenwart von Gallensäuren im Darm statt und könnten ein entscheidender Faktor bei der Infektion sein.

#### **5.4 Dissoziationsverhalten verschiedener P-Dimere im Kontext der Kapsiddynamik**

Durch die Bindung von Fucose konnte für GII.4 Saga und RHDVb P-Dimere mit Hilfe von smFRET ein verlangsamter Austausch der Dimere beobachtet werden (Abbildung 4-16, Abbildung 4-17). Außerdem konnte ein langsamer Austausch bei sauren pH-Werten und ein beschleunigter Austausch bei einer pH-Wert Erhöhung festgestellt werden (Abbildung 4-19).

Ein Einfluss des pH-Wertes auf das Dimerisierungsgleichgewicht wurde bereits für die P-Dimere des murinen Norovirus (MNV-1) beschrieben (Maass, 2023). Dabei wurde eine Dissoziation der Dimere bei Erhöhung des pH-Wertes beobachtet. Der Trend ist für das humane Norovirus GII.4 Saga, RHDVb und MNV-1 identisch und könnte ein Hinweis auf einen konservierten Mechanismus sein. Außerdem konnte für MNV-1 durch die Senkung des pH-Wertes ein Wechsel vom expandierten Zustand des gesamten VP1 Proteins zum komprimierten Zustand (Abbildung 2-4) beobachtet werden (Song et al., 2020). Da der Trend der Dimerisierung für die GII.4 Saga und RHDVb P-Dimere vergleichbar ist mit dem von MNV-1, ist zu vermuten, dass auch für die Kapside dieser beiden Viren ein Wechsel zwischen einem expandierten und komprimierten Zustand möglich ist und durch den pH-Wert reguliert wird. Da ebenfalls die Zuckerbindung einen Einfluss auf die Dimerisierung hat, könnte dies ein weiterer Faktor in diesem Gleichgewicht sein. Die biologische Funktion der Kapsidkonformationen ist bis heute nicht bekannt. Möglich wäre ein Schutz des Virus vor dem Immunsystem (Smith and Smith, 2019). Außerdem könnte die Dimerisierung und mögliche Kapsidkomprimierung die Kapsidstabilität erhöhen und das Virus dadurch die saure Umgebung im Magen überstehen.

Interessanterweise läuft die Dissoziation der P-Dimere für das humane Norovirus GII.4 Saga, RHDVb und MNV-1 auf drei unterschiedlichen Zeitskalen ab. Während die Dissoziation von MNV-1 Dimeren im Bereich einer Sekunde abläuft (Creutzmacher et al., 2022), werden für RHDVb mehrere Minuten bis Stunden und für GII.4 Saga Tage und Wochen benötigt. Da der Mechanismus der Virusinfektion noch nicht geklärt ist, ist auch der Einfluss der Dissoziationsrate der P-Dimere auf die Infektion unbekannt.

Da für RHDVb in dieser Arbeit die Bindung von Metallionen und Gallensäuren beobachtet wurde (Tabelle 5.1), können auch diese auf ihren Einfluss auf die Dimer-Austauschrate untersucht werden. Auch für GII.4 Saga wurde die Bindung von Metallionen und Gallensäuren beobachtet (Creutzmacher, 2020) und könnte untersucht werden. Da die Gallensäure GCDCA und das Metallion  $\text{Ca}^{2+}$  einen nachgewiesenen Einfluss auf die Dimerisierung von MNV-1 P-Dimeren und dessen Kapsidkonformation haben (Maass, 2023; Nelson et al., 2018), könnte auch für die beiden anderen Viren eine Beeinflussung vorliegen.

## 5.5 Bewertung von smFRET zur Ermittlung von Homodimer-Austauschraten

Die Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer (smFRET) Mikroskopie hat die Untersuchung von verschiedenen Austausch- bzw. Dissoziationsraten von Homodimeren ermöglicht (Abbildung 4-15 bis Abbildung 4-19). Dabei besitzt diese Technik einige Vorteile gegenüber der in vorherigen Arbeiten verwendeten Ionen-Austauschchromatographie (IEX) (Ogrissek, 2020).

Im Fall der IEX werden die Protein-Dimere nach Ladungsunterschieden aufgetrennt. Diese müssen durch eine Mutation in das Protein eingebracht werden. Mutationen, in denen Ladungen verändert werden, können dabei leichter die Eigenschaften des Proteins verändern. Für smFRET-Untersuchungen kann eine Mutation für die Fluorophormarkierung notwendig sein. Diese können aber so gewählt werden, dass die Veränderungen im Protein minimal sind. Zum Beispiel verändert die Mutation eines Serins zu einem Cystein die Eigenschaften nur gering, da lediglich die Hydroxygruppe gegen eine Thiolgruppe getauscht wird.

Ein weiterer Vorteil der smFRET-Mikroskopie ist die Möglichkeit auch schnelle Austauschprozesse zu untersuchen. IEX ist limitiert durch die Dauer der einzelnen chromatographischen Läufe von circa einer Stunde. Prozesse, die in der Größenordnung von Stunden oder noch schneller ablaufen, können folglich nur schlecht oder nicht abgebildet werden. Bei smFRET-Mikroskopie können die Prozesse im Bereich von wenigen Minuten und länger aufgrund der kontinuierlichen Detektion untersucht werden. Mit IEX wäre die Untersuchung von RHDVb P-Dimer Austauschraten nicht möglich gewesen.

Mit Hilfe der smFRET-Mikroskopie können ohne große Einschränkungen verschiedene Bedingungen für Veränderungen von Austauschraten getestet werden. Da Alexa-Fluorophore eine große pH-Wert Toleranz von pH 4 bis pH 10 besitzen (Panchuk-Voloshina et al., 1999), kann dieser für Messungen problemlos variiert werden. Es reichen bereits wenige Mikroliter vom fluorophormarkierten Protein mit geringer nanomolarer Konzentration. Aufgrund des geringen Probenvolumens werden ebenfalls nur geringe Mengen von möglichen teuren Liganden benötigt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Fluorophore sollte bei der Verwendung von hydrophoben Liganden, wie der Gallensäuren, besonders auf Kontrollexperimente geachtet werden. Der Ligand könnte mit dem Fluorophor interagieren und durch Quenching die Vergleichbarkeit erschweren.

Prinzipiell ist die Untersuchung der Austauschraten von Dimeren auch ohne eine gepulste Anregung des Akzeptors oder auch als Ensemblemessung möglich. Die Einzelmolekülexperimente ermöglichen jedoch die Untersuchung von Subpopulationen, welche durch eine gemittelte Analyse in Ensemblemessungen nicht beobachtet werden können.

## 5.6 Zusammenfassung und Ausblick

Ich konnte in meiner Arbeit zeigen, dass die beschleunigte Deamidierung des Asparagins 373 im humanen Norovirus Kapsid eine Folge der speziellen räumlichen Struktur und nicht der Aminosäuresequenz ist, wie es aus Vorarbeiten erwartbar gewesen wäre. Die Mutation einer Aminosäure in einem benachbarten Loop hat die Halbwertszeit des Asparagins mehr als halbiert. Durch die Kombination mit MD-Simulationen, welche in Kollaboration durchgeführt wurden, konnte eine ungewöhnliche syn-Konformation des Proteinrückgrats vom deamidierenden Asparagin als Ursache der schnellen Deamidierung identifiziert werden. Als Ergebnis dieser Untersuchungen sollten zukünftige Vorhersagealgorithmen zur Deamidierung ebenfalls die Anwesenheit von Asparaginen mit syn-Konformation prüfen.

Für eine synthetische, Fucose-tragende Verbindung, JGII.78, konnte eine verbesserte Bindungsaffinität an GII.4 Saga P-Dimere beobachtet werden. Dabei ist die Bindung vergleichbar mit einer der stärksten natürlichen Liganden. Diese Verbindung ist aufgrund der vergleichsweise einfachen Synthese als Startpunkt für die Entwicklung eines Norovirus-Inhibitors geeignet. Eine Optimierung der Bindungseigenschaften könnte durch eine mit MD-Simulationen gezielte Anpassung der Struktur oder durch die Erzeugung von Multivalenz erreicht werden. Letztere könnte durch die Verknüpfung von zwei Verbindungen mit einem Linker und einer gleichzeitigen Bindung an beide HBGA-Bindungstaschen eines P-Dimers erreicht werden.

Es konnten zwei Bindungstaschen für 7 kleine hydrophobe Verbindungen der Maybridge Library Ro5 an die GII.4 Saga P-Dimere lokalisiert werden. Dabei ist eine identisch mit der bereits identifizierten Gallensäurebindungstasche und die andere befindet sich an der Dimerisierungsfläche der P-Domänen. Die Bindungsaffinität der Verbindungen könnte weiter optimiert werden und durch die Blockierung dieser Bindungstaschen eine weitere Möglichkeit darstellen, einen Inhibitor für Noroviren zu entwickeln.

Die RHDVb P-Domäne konnte erstmals isopenmarkiert produziert und gereinigt werden. Durch NMR-Bindungsstudien wurde eine spezifische Bindung vom H-Trisaccharid Typ II mit einer Affinität von 4,1 mM und keine Bindung für das H-Trisaccharid Typ I beobachtet. Die Fucose interagiert am stärksten mit dem Protein und bindet bereits als Monosaccharid. Außerdem konnte die Bindung verschiedener Metallionen und, erstmalig für RHDVb, von Gallensäuren detektiert werden. Eine verbesserte Zuckeraffinität konnte nach der Senkung des pH-Wertes und gleichzeitiger Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine modulierbare Glykanbindung des RHDVb Kapsids hin, welche einen essentiellen Teil der Virusinfektion sein könnte. Es sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um den Einfluss der Bindung von Zucker, Metallionen und Gallensäuren jeweils untereinander zu bestimmen, um so ein besseres Verständnis für die Funktion im Infektionszyklus zu gewinnen.

Dissoziations- bzw. Austauschraten von GII.4 Saga und RHDVb P-Dimeren konnten mit Hilfe der smFRET Mikroskopie ermittelt werden. Dabei konnte für beide Viren eine spezifische Senkung der Raten und damit Stabilisierung der P-Dimere durch die Bindung von Zuckern beobachtet werden. Der pH-Wert hat ebenfalls einen entscheidenden Einfluss. Für P-Dimere vom humanen Norovirus GII.4 Saga und RHDVb konnte bei sauren pH-Werten ein verlangsamter Austausch beobachtet werden. Durch die Veränderungen in der Stabilität der Dimere könnten, besonders in der expandierten Kapsidform, neue Bereiche im Protein zugänglich und so die Wirtszellbindung moduliert werden. Diese Untersuchung von Austauschraten mit smFRET Mikroskopie ist geeignet,

um weitere Parameter zu untersuchen, die einen Einfluss auf die Dissoziation von P-Dimeren haben könnten, wie Metallionen- und Gallensäurebindung.



## 6 Referenzen

- Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., and Esteves, P.J. (2012). Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* *43*, 12. 10.1186/1297-9716-43-12.
- Alonso, H., Bliznyuk, A.A., and Gready, J.E. (2006). Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med Res Rev* *26*, 531-568. 10.1002/med.20067.
- Argüello Villares, J.L. (1991). Viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and immune response. *Rev Sci Tech* *10*, 459-480.
- Arias, A., Emmott, E., Vashist, S., and Goodfellow, I. (2013). Progress towards the prevention and treatment of norovirus infections. *Future Microbiol* *8*, 1475-1487. 10.2217/fmb.13.109.
- Atmar, R.L., Ramani, S., and Estes, M.K. (2018). Human noroviruses: recent advances in a 50-year history. *Curr Opin Infect Dis* *31*, 422-432. 10.1097/qco.0000000000000476.
- Barrett, P.J., Chen, J., Cho, M.K., Kim, J.H., Lu, Z., Mathew, S., Peng, D., Song, Y., Van Horn, W.D., Zhuang, T., et al. (2013). The quiet renaissance of protein nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* *52*, 1303-1320. 10.1021/bi4000436.
- Bartsch, S.M., Lopman, B.A., Ozawa, S., Hall, A.J., and Lee, B.Y. (2016). Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS One* *11*, e0151219. 10.1371/journal.pone.0151219.
- Baryshnikova, O.K., Williams, T.C., and Sykes, B.D. (2008). Internal pH indicators for biomolecular NMR. *J Biomol NMR* *41*, 5-7. 10.1007/s10858-008-9234-6.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Sayers, E.W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res* *41*, D36-42. 10.1093/nar/gks1195.
- Bonvehí, C., Ardiaca, M., Montesinos, A., Juan-Sallés, C., Gómez, A., Teso, B., Barbero, S., and Ferrera, S.E. (2019). Clinicopathologic findings of naturally occurring Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2 infection in pet rabbits. *Vet Clin Pathol* *48*, 89-95. 10.1111/vcp.12701.
- Bucher, K.S., Yan, H., Creutzmacher, R., Ruoff, K., Mallagaray, A., Grafmuller, A., Dirks, J.S., Kilic, T., Weickert, S., Rubailo, A., et al. (2018). Fucose-Functionalized Precision Glycomacromolecules Targeting Human Norovirus Capsid Protein. *Biomacromolecules* *19*, 3714-3724. 10.1021/acs.biomac.8b00829.
- Chen, Y.C. (2015). Beware of docking! *Trends Pharmacol Sci* *36*, 78-95. 10.1016/j.tips.2014.12.001.
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., Chan, M.C., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P.A., Katayama, K., Vennema, H., et al. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol* *100*, 1393-1406. 10.1099/jgv.0.001318.
- Creutzmacher, R. (2020). On the Interaction of Norovirus Capsid Proteins with Glycans and Bile Acids.
- Creutzmacher, R., Maass, T., Dülfer, J., Feldmann, C., Hartmann, V., Lane, M.S., Knickmann, J., Westermann, L.T., Thiede, L., Smith, T.J., et al. (2022). Distinct dissociation rates of murine and human norovirus P-domain dimers suggest a role of dimer stability in virus-host interactions. *Commun Biol* *5*, 563. 10.1038/s42003-022-03497-4.

## Referenzen

- Creutzmacher, R., Maass, T., Ogrissek, P., Wallmann, G., Feldmann, C., Peters, H., Lingemann, M., Taube, S., Peters, T., and Mallagaray, A. (2021). NMR Experiments Shed New Light on Glycan Recognition by Human and Murine Norovirus Capsid Proteins. *Viruses* *13*. 10.3390/v13030416.
- Creutzmacher, R., Schulze-Niemand, E., König, P., Stanojlovic, V., Mallagaray, A., Peters, T., Stein, M., and Schubert, M. (2023). Conformational Control of Fast Asparagine Deamidation in a Norovirus Capsid Protein. *Biochemistry* *62*, 1032-1043. 10.1021/acs.biochem.2c00656.
- Creutzmacher, R., Schulze, E., Wallmann, G., Peters, T., Stein, M., and Mallagaray, A. (2020). Chemical-Shift Perturbations Reflect Bile Acid Binding to Norovirus Coat Protein: Recognition Comes in Different Flavors. *Chembiochem* *21*, 1007-1021. 10.1002/cbic.201900572.
- Deniz, A.A., Dahan, M., Grunwell, J.R., Ha, T., Faulhaber, A.E., Chemla, D.S., Weiss, S., and Schultz, P.G. (1999). Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Förster distance dependence and subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 3670-3675. 10.1073/pnas.96.7.3670.
- Devant, J.M., and Hansman, G.S. (2021). Structural heterogeneity of a human norovirus vaccine candidate. *Virology* *553*, 23-34. 10.1016/j.virol.2020.10.005.
- Dülfer, J., Yan, H., Brodmerkel, M.N., Creutzmacher, R., Mallagaray, A., Peters, T., Coleman, C., Marklund, E.G., and Uetrecht, C. (2021). Glycan-Induced Protein Dynamics in Human Norovirus P Dimers Depend on Virus Strain and Deamidation Status. *Molecules* *26*. 10.3390/molecules26082125.
- Duvaud, S., Gabella, C., Lisacek, F., Stockinger, H., Ioannidis, V., and Durinx, C. (2021). Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Res* *49*, W216-w227. 10.1093/nar/gkab225.
- Ettayebi, K., Crawford, S.E., Murakami, K., Broughman, J.R., Karandikar, U., Tenge, V.R., Neill, F.H., Blutt, S.E., Zeng, X.L., Qu, L., et al. (2016). Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* *353*, 1387-1393. 10.1126/science.aaf5211.
- Fiege, B., Rademacher, C., Cartmell, J., Kitov, P.I., Parra, F., and Peters, T. (2012). Molecular details of the recognition of blood group antigens by a human norovirus as determined by STD NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* *51*, 928-932. 10.1002/anie.201105719.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* *437*, 55-75.
- Gardner, K.H., and Kay, L.E. (1998). The use of <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *27*, 357-406. 10.1146/annurev.biophys.27.1.357.
- Hansman, G.S., Biertümpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J.S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., and Kwong, P.D. (2011). Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *J Virol* *85*, 6687-6701. 10.1128/jvi.00246-11.
- Hansman, G.S., Taylor, D.W., McLellan, J.S., Smith, T.J., Georgiev, I., Tame, J.R., Park, S.Y., Yamazaki, M., Gondaira, F., Miki, M., et al. (2012). Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J Virol* *86*, 3635-3646. 10.1128/jvi.06868-11.
- Harris, R.J., Kabakoff, B., Macchi, F.D., Shen, F.J., Kwong, M., Andya, J.D., Shire, S.J., Bjork, N., Totpal, K., and Chen, A.B. (2001). Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a

- recombinant antibody. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 752, 233-245. 10.1016/s0378-4347(00)00548-x.
- Hirschfeld, V. (2011). Förster-Energietransfer an einzelnen Molekülen bei tiefen Temperaturen.
- Hu, L., Salmen, W., Chen, R., Zhou, Y., Neill, F., Crowe, J.E., Jr., Atmar, R.L., Estes, M.K., and Prasad, B.V.V. (2022). Atomic structure of the predominant GII.4 human norovirus capsid reveals novel stability and plasticity. *Nat Commun* 13, 1241. 10.1038/s41467-022-28757-z.
- Huang, P., Farkas, T., Marionneau, S., Zhong, W., Ruvoën-Clouet, N., Morrow, A.L., Altabe, M., Pickering, L.K., Newburg, D.S., LePendou, J., and Jiang, X. (2003). Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis* 188, 19-31. 10.1086/375742.
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C.H., Vallenet, D., Yu, D.S., Choi, S.H., Couloux, A., Lee, S.W., Yoon, S.H., Cattolico, L., et al. (2009). Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *J Mol Biol* 394, 644-652. 10.1016/j.jmb.2009.09.052.
- Jones, M.K., Grau, K.R., Costantini, V., Kolawole, A.O., de Graaf, M., Freiden, P., Graves, C.L., Koopmans, M., Wallet, S.M., Tibbetts, S.A., et al. (2015). Human norovirus culture in B cells. *Nat Protoc* 10, 1939-1947. 10.1038/nprot.2015.121.
- Jones, M.K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C.L., Keyes, L.R., Grau, K.R., Gonzalez-Hernandez, M.B., Iovine, N.M., Wobus, C.E., Vinjé, J., et al. (2014). Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346, 755-759. 10.1126/science.1257147.
- Jung, J., Grant, T., Thomas, D.R., Diehnelt, C.W., Grigorieff, N., and Joshua-Tor, L. (2019). High-resolution cryo-EM structures of outbreak strain human norovirus shells reveal size variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 12828-12832. 10.1073/pnas.1903562116.
- Kahra, D. (2012). Die Energielandschaft von Proteinen: Von der Faltung zur Katalyse - Einzelmolekül-FRET-Studien an einem Zwei-Domänen-Protein.
- Katpally, U., Voss, N.R., Cavazza, T., Taube, S., Rubin, J.R., Young, V.L., Stuckey, J., Ward, V.K., Virgin, H.W.t., Wobus, C.E., and Smith, T.J. (2010). High-resolution cryo-electron microscopy structures of murine norovirus 1 and rabbit hemorrhagic disease virus reveal marked flexibility in the receptor binding domains. *J Virol* 84, 5836-5841. 10.1128/jvi.00314-10.
- Katpally, U., Wobus, C.E., Dryden, K., Virgin, H.W.t., and Smith, T.J. (2008). Structure of antibody-neutralized murine norovirus and unexpected differences from viruslike particles. *J Virol* 82, 2079-2088. 10.1128/jvi.02200-07.
- Keeler, J. (2010). *Understanding NMR Spectroscopy*, 2nd Edition (John Wiley & Sons Ltd).
- Krezel, A., and Bal, W. (2004). A formula for correlating pKa values determined in D2O and H2O. *J Inorg Biochem* 98, 161-166. 10.1016/j.jinorgbio.2003.10.001.
- Küchler, R. (2019). NMR characterization of binding epitopes from small fragments on the capsid protein of a human Norovirus prevalent strain.
- Lakowicz. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer).
- Lanata, C.F., Fischer-Walker, C.L., Olascoaga, A.C., Torres, C.X., Aryee, M.J., and Black, R.E. (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One* 8, e72788. 10.1371/journal.pone.0072788.

## Referenzen

- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Boucher, S., Le Normand, B., Plassiart, G., Portejoie, Y., Decors, A., Bertagnoli, S., Guérin, J.L., and Marchandeau, S. (2011). Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec* *168*, 137-138. 10.1136/vr.d697.
- Lee, D., Hilty, C., Wider, G., and Wüthrich, K. (2006). Effective rotational correlation times of proteins from NMR relaxation interference. *J Magn Reson* *178*, 72-76. 10.1016/j.jmr.2005.08.014.
- Lerner, E., Barth, A., Hendrix, J., Ambrose, B., Birkedal, V., Blanchard, S.C., Börner, R., Sung Chung, H., Cordes, T., Craggs, T.D., et al. (2021). FRET-based dynamic structural biology: Challenges, perspectives and an appeal for open-science practices. *eLife* *10*, e60416. 10.7554/eLife.60416.
- Leuthold, M.M., Dalton, K.P., and Hansman, G.S. (2015). Structural analysis of a rabbit hemorrhagic disease virus binding to histo-blood group antigens. *J Virol* *89*, 2378-2387. 10.1128/jvi.02832-14.
- Liu, S., Xue, H., Pu, B., and Qian, N.H. (1984). A new viral disease in rabbits. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine (Xumu yu Shouyi)* *16*, 253-255.
- Maass, T. (2023). An NMR study into virus-host interactions of murine Norovirus capsid and SARS-CoV-2 spike proteins.
- Mallagaray, A., Creutzmacher, R., Dülfer, J., Mayer, P.H.O., Grimm, L.L., Orduña, J.M., Trabjerg, E., Stehle, T., Rand, K.D., Blaum, B.S., et al. (2019). A post-translational modification of human Norovirus capsid protein attenuates glycan binding. *Nat Commun* *10*, 1320. 10.1038/s41467-019-09251-5.
- Marionneau, S., Ruvoën, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., Huang, P., Jiang, X., and Le Pendu, J. (2002). Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* *122*, 1967-1977. 10.1053/gast.2002.33661.
- Mayer, M., and Meyer, B. (1999). Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* *38*, 1784-1788. 10.1002/(sici)1521-3773(19990614)38:12<1784::Aid-anie1784>3.0.Co;2-q.
- Mayer, M., and Meyer, B. (2001). Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* *123*, 6108-6117. 10.1021/ja0100120.
- Meloncelli, P.J., and Lowary, T.L. (2010). Synthesis of ABO histo-blood group type I and II antigens. *Carbohydr Res* *345*, 2305-2322. 10.1016/j.carres.2010.08.012.
- Meyer, B., and Peters, T. (2003). NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed Engl* *42*, 864-890. 10.1002/anie.200390233.
- Mittermaier, A.K., and Kay, L.E. (2009). Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR. *Trends Biochem Sci* *34*, 601-611. 10.1016/j.tibs.2009.07.004.
- Nelson, C.A., Wilen, C.B., Dai, Y.N., Orchard, R.C., Kim, A.S., Stegeman, R.A., Hsieh, L.L., Smith, T.J., Virgin, H.W., and Fremont, D.H. (2018). Structural basis for murine norovirus engagement of bile acids and the CD300lf receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *115*, E9201-e9210. 10.1073/pnas.1805797115.
- Nyström, K., Le Gall-Reculé, G., Grassi, P., Abrantes, J., Ruvoën-Clouet, N., Le Moullac-Vaidye, B., Lopes, A.M., Esteves, P.J., Strive, T., Marchandeau, S., et al. (2011). Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner. *PLoS Pathog* *7*, e1002188. 10.1371/journal.ppat.1002188.

- Ogrissek, P. (2020). Influence of pH and glycan binding on the dissociation rate of GII.4 Norovirus P-dimers. Master Thesis (Universität zu Lübeck).
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M.K., Millard, P.J., Mao, F., Leung, W.Y., and Haugland, R.P. (1999). Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem* *47*, 1179-1188. 10.1177/002215549904700910.
- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wüthrich, K. (1997). Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12366-12371. 10.1073/pnas.94.23.12366.
- Pires, S.M., Fischer-Walker, C.L., Lanata, C.F., Devleeschauwer, B., Hall, A.J., Kirk, M.D., Duarte, A.S., Black, R.E., and Angulo, F.J. (2015). Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. *PLoS One* *10*, e0142927. 10.1371/journal.pone.0142927.
- Pogan, R., Dülfer, J., and Uetrecht, C. (2018). Norovirus assembly and stability. *Curr Opin Virol* *31*, 59-65. 10.1016/j.coviro.2018.05.003.
- Prasad, B.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., and Estes, M.K. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* *286*, 287-290. 10.1126/science.286.5438.287.
- Prasad, B.V., Shanker, S., Muhaxhiri, Z., Deng, L., Choi, J.M., Estes, M.K., Song, Y., Palzkill, T., and Atmar, R.L. (2016). Antiviral targets of human noroviruses. *Curr Opin Virol* *18*, 117-125. 10.1016/j.coviro.2016.06.002.
- Rademacher, C., Guiard, J., Kitov, P.I., Fiege, B., Dalton, K.P., Parra, F., Bundle, D.R., and Peters, T. (2011). Targeting norovirus infection-multivalent entry inhibitor design based on NMR experiments. *Chemistry* *17*, 7442-7453. 10.1002/chem.201003432.
- Rademacher, C., Krishna, N.R., Palcic, M., Parra, F., and Peters, T. (2008). NMR experiments reveal the molecular basis of receptor recognition by a calicivirus. *J Am Chem Soc* *130*, 3669-3675. 10.1021/ja710854r.
- Robilotti, E., Deresinski, S., and Pinsky, B.A. (2015). Norovirus. *Clin Microbiol Rev* *28*, 134-164. 10.1128/cmr.00075-14.
- Robinson, N.E., and Robinson, A.B. (2001). Prediction of protein deamidation rates from primary and three-dimensional structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4367-4372. 10.1073/pnas.071066498.
- Schuler, B., Lipman, E.A., and Eaton, W.A. (2002). Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature* *419*, 743-747. 10.1038/nature01060.
- Seidel, H. (2013). Einzelmoleküluntersuchungen zur Proteinkomplexbildung an den Modellsystemen ESAT-6/CFP-10 des *Mycobacterium tuberculosis* und NSP7/NSP8 des Felinen Coronavirus.
- Shivanna, V., Kim, Y., and Chang, K.O. (2014). The crucial role of bile acids in the entry of porcine enteric calicivirus. *Virology* *456-457*, 268-278. 10.1016/j.virol.2014.04.002.
- Singh, B.K., Leuthold, M.M., and Hansman, G.S. (2015). Human noroviruses' fondness for histo-blood group antigens. *J Virol* *89*, 2024-2040. 10.1128/jvi.02968-14.
- Smith, H.Q., and Smith, T.J. (2019). The Dynamic Capsid Structures of the Noroviruses. *Viruses* *11*. 10.3390/v11030235.

## Referenzen

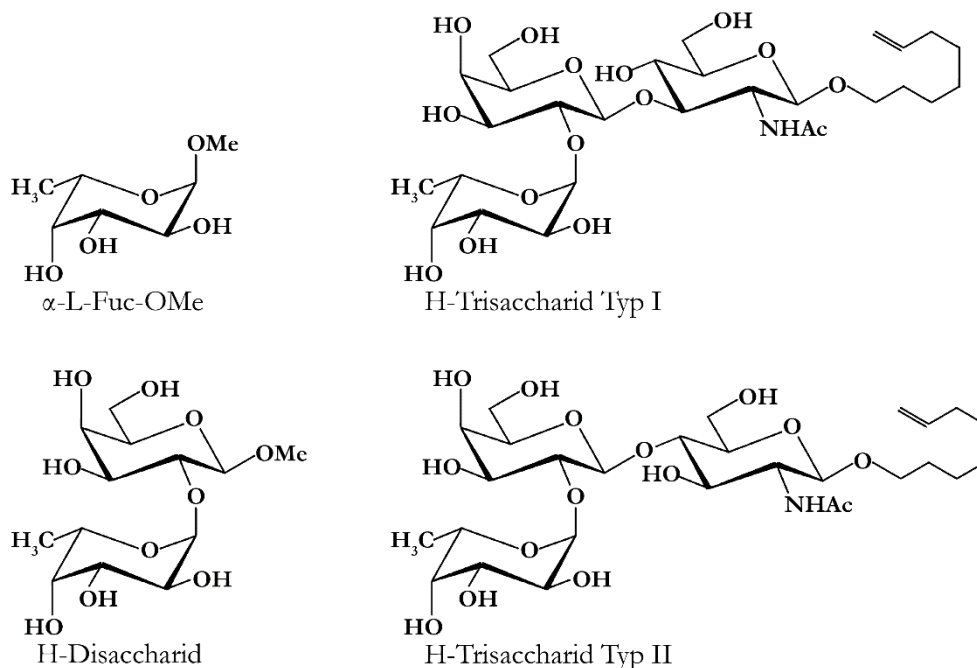
- Song, C., Takai-Todaka, R., Miki, M., Haga, K., Fujimoto, A., Ishiyama, R., Oikawa, K., Yokoyama, M., Miyazaki, N., Iwasaki, K., et al. (2020). Dynamic rotation of the protruding domain enhances the infectivity of norovirus. *PLoS Pathog* *16*, e1008619. 10.1371/journal.ppat.1008619.
- Strieter, E.R., and Andrew, T.L. (2015). Restricting the  $\psi$  Torsion Angle Has Stereoelectronic Consequences on a Scissile Bond: An Electronic Structure Analysis. *Biochemistry* *54*, 5748-5756. 10.1021/acs.biochem.5b00845.
- Stryer, L., and Haugland, R.P. (1967). Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A* *58*, 719-726. 10.1073/pnas.58.2.719.
- Tan, M., Zhong, W., Song, D., Thornton, S., and Jiang, X. (2004). E. coli-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *J Med Virol* *74*, 641-649. 10.1002/jmv.20228.
- Thiel, H.J., and König, M. (1999). Caliciviruses: an overview. *Vet Microbiol* *69*, 55-62. 10.1016/s0378-1135(99)00088-7.
- Toseland, C.P. (2013). Fluorescent labeling and modification of proteins. *J Chem Biol* *6*, 85-95. 10.1007/s12154-013-0094-5.
- Tugarinov, V., Hwang, P.M., Ollerenshaw, J.E., and Kay, L.E. (2003). Cross-correlated relaxation enhanced  $^1\text{H}$ [bond] $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *Journal of the American Chemical Society* *125*, 10420-10428. 10.1021/ja030153x.
- Ugi, I. (1959). Versuche mit isonitrilen. In 11. (WILEY-VCH VERLAG GMBH), pp. 386-386.
- van Beek, J., de Graaf, M., Al-Hello, H., Allen, D.J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Brytting, M., Buesa, J., Cabrerizo, M., Chan, M., et al. (2018). Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect Dis* *18*, 545-553. 10.1016/s1473-3099(18)30059-8.
- Vashist, S., Bailey, D., Putics, A., and Goodfellow, I. (2009). Model systems for the study of human norovirus Biology. *Future Virol* *4*, 353-367. 10.2217/fvl.09.18.
- Venters, R.A., Farmer, B.T., 2nd, Fierke, C.A., and Spicer, L.D. (1996). Characterizing the use of perdeuteration in NMR studies of large proteins:  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}$  assignments of human carbonic anhydrase II. *J Mol Biol* *264*, 1101-1116. 10.1006/jmbi.1996.0699.
- Vinjí, J., Estes, M.K., Esteves, P., Green, K.Y., Katayama, K., Knowles, N.J., L'Homme, Y., Martella, V., Vennema, H., White, P.A., and Ictv Report, C. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *J Gen Virol* *100*, 1469-1470. 10.1099/jgv.0.001332.
- Vranken, W.F., Boucher, W., Stevens, T.J., Fogh, R.H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E.L., Markley, J.L., Ionides, J., and Laue, E.D. (2005). The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* *59*, 687-696. 10.1002/prot.20449.
- Waldmann, M., Jirmann, R., Hoelscher, K., Wienke, M., Niemeyer, F.C., Rehders, D., and Meyer, B. (2014). A nanomolar multivalent ligand as entry inhibitor of the hemagglutinin of avian influenza. *J Am Chem Soc* *136*, 783-788. 10.1021/ja410918a.
- Walker, I.H., Hsieh, P.C., and Riggs, P.D. (2010). Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties. *Appl Microbiol Biotechnol* *88*, 187-197. 10.1007/s00253-010-2696-y.

- Williams, A.N., Sherman, M.B., Smith, H.Q., Taube, S., Pettitt, B.M., Wobus, C.E., and Smith, T.J. (2021). A Norovirus Uses Bile Salts To Escape Antibody Recognition While Enhancing Receptor Binding. *J Virol* 95, e0017621. 10.1128/jvi.00176-21.
- Williamson, M.P. (2013). Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 73, 1-16. 10.1016/j.pnmrs.2013.02.001.
- Wolf, P., Gavins, G., Beck-Sickinger, A.G., and Seitz, O. (2021). Strategies for Site-Specific Labeling of Receptor Proteins on the Surfaces of Living Cells by Using Genetically Encoded Peptide Tags. *Chembiochem* 22, 1717-1732. 10.1002/cbic.202000797.
- Xu, W.Y. (1991). Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation. *Rev Sci Tech* 10, 393-408.

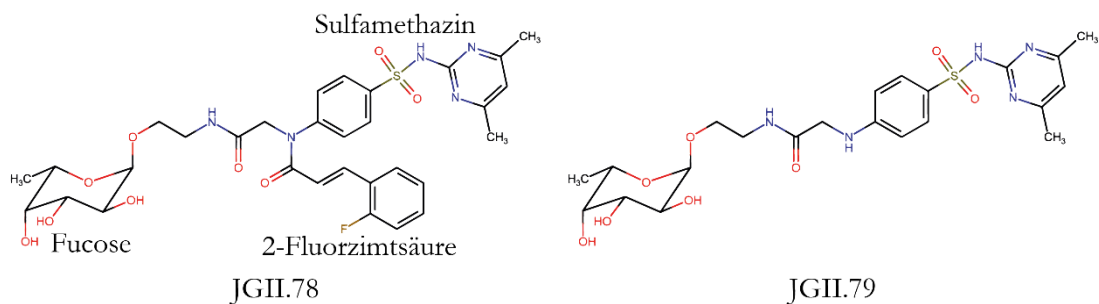


## 7 Anhang

### 7.1 Strukturformeln der verwendeten Verbindungen



**Abbildung 7-1** Strukturen der untersuchten Kohlenhydrate. Dargestellt sind die Fucose ( $\alpha$ -L-Fuc-OMe) (Carbosynth), das H-Disaccharid (hausintern synthetisiert von W. Hellebrandt) und das H-Trisaccharid Typ I und Typ II (synthetisiert von P. Meloncelli und T. Lowary, University of Alberta (Meloncelli and Lowary, 2010)). Die Trisaccharide besitzen ein 7-Okten-1-yl Aglycon, welches für weitere Verknüpfungen genutzt werden könnte.



**Abbildung 7-2** Strukturformeln der Fucose-tragenden synthetischen Verbindungen JGII.78 und JGII.79. Für JGII.78 wurden die drei Komponenten der Verbindungen Fucose, Sulfamethazin und 2-Fluorzimtsäure beschriftet. JGII.78 wurde durch J. Guiard und P. Kitov, University of Alberta, und JGII.79 von S. Mücke und L. Hartmann, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, synthetisiert.

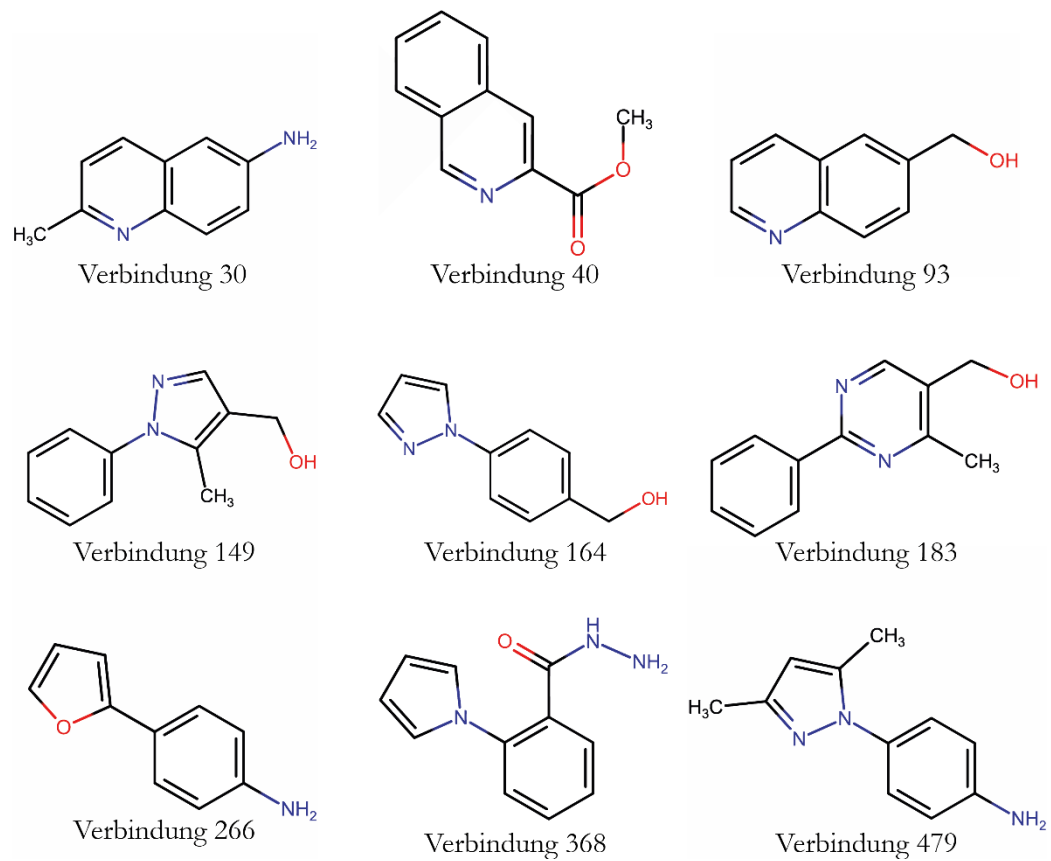
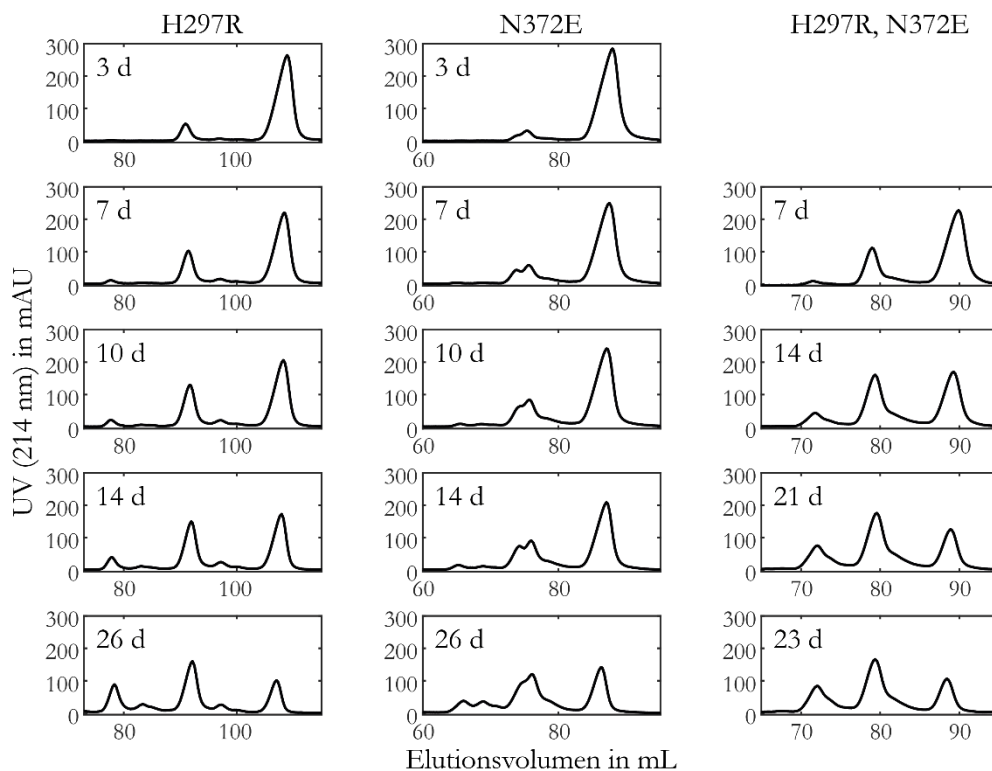


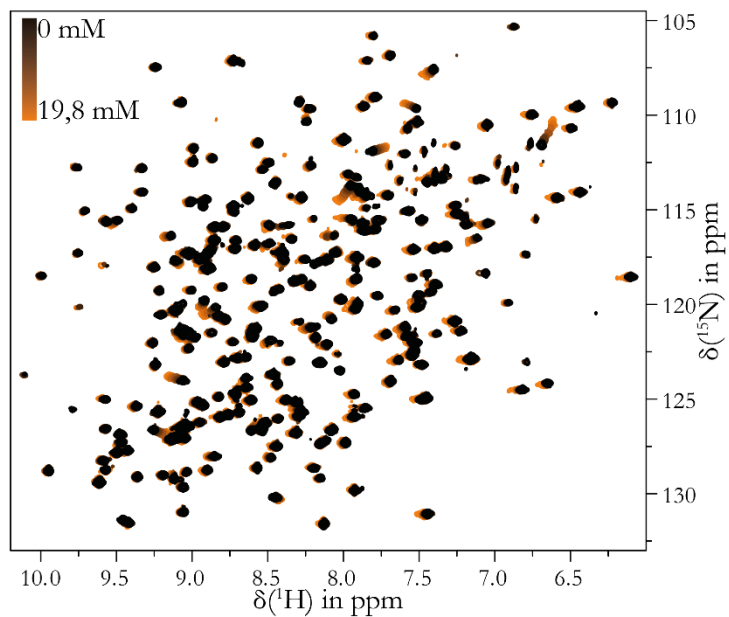
Abbildung 7-3 Strukturen der untersuchten Verbindungen der Maybridge Library Ro5.

## 7.2 Ionenaustausch-Chromatogramme der VA387 Deamidierungskinetik



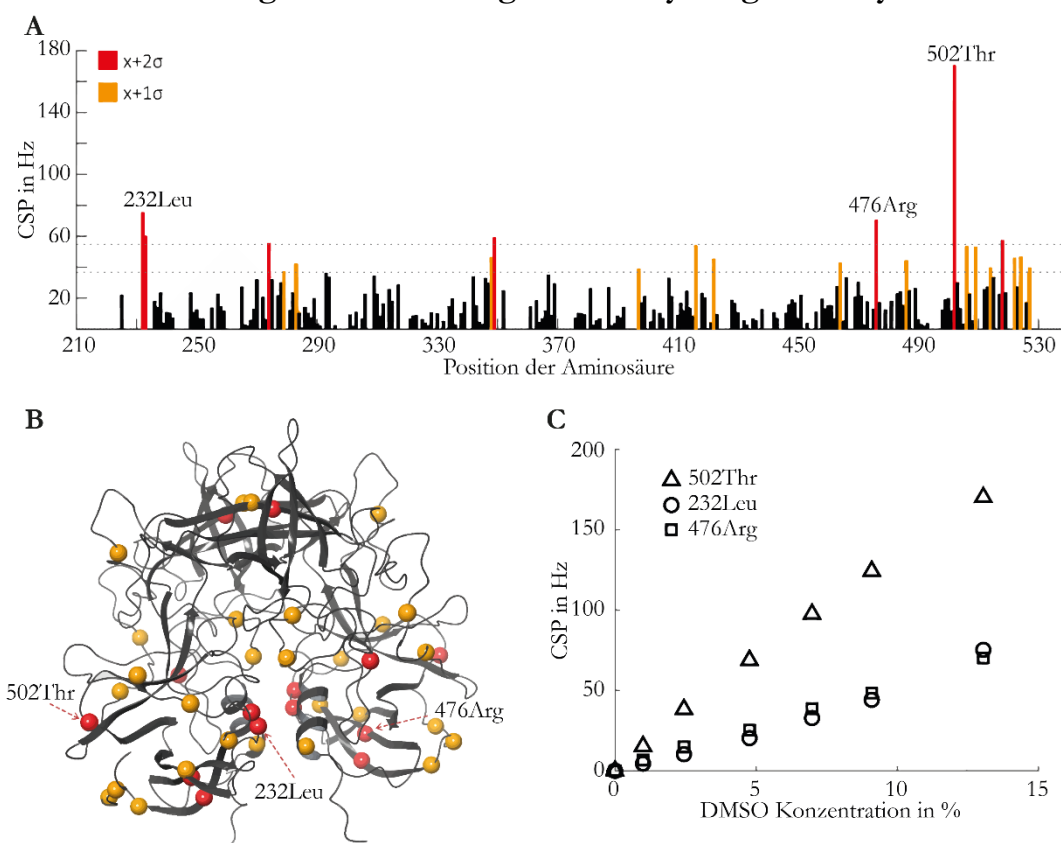
**Abbildung 7-4 Ionenaustausch-Chromatogramme für die Ermittlung der Deamidierungskinetik des N373 der Punktmutanten der P-Domäne des humanen Norovirus GII.4 VA387.** Dargestellt sind die Chromatogramme für die Punktmutanten H297R und N372E sowie der doppelten Punktmutante H297R, N372E. iD373/iD373 Dimere eluieren zuerst gefolgt von N373/iD373 Dimeren und abschließend N373/N373 Dimeren. Der relative Anteil des N373/N373 Peaks wurde für die Ermittlung der Deamidierungsrate in Abbildung 4-1 verwendet. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 25 °C in 75 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid bei pH 7,3. Für die Chromatographie wurde 20 mM Natriumacetatpuffer pH 5,3 verwendet und über einen Salzgradienten von 0 mM bis 195 mM NaCl über 13 Säulenvolumen eluiert.

### 7.3 Bindungsuntersuchung der Verbindung JGII.79 an GII.4 Saga P-Dimere



**Abbildung 7-5 Die synthetische Verbindung JGII.79 bindet an die GII.4 Saga P-Domäne.** Gezeigt sind  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren der GII.4 Saga P-Domäne mit steigender Konzentration der Verbindung JGII.79 von 0 mM bis 19,8 mM mit einem Farbgradienten von schwarz bis orange. Dabei sind CSPs einiger Signale von bis zu 60 Hz zu beobachten. Die Proteinkonzentration betrug  $149\ \mu\text{M}$ . Der Puffer enthielt 75 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid bei einem pH\*-Wert von 7,3.

## 7.4 Untersuchung der Verbindungen der Maybridge Library Ro5

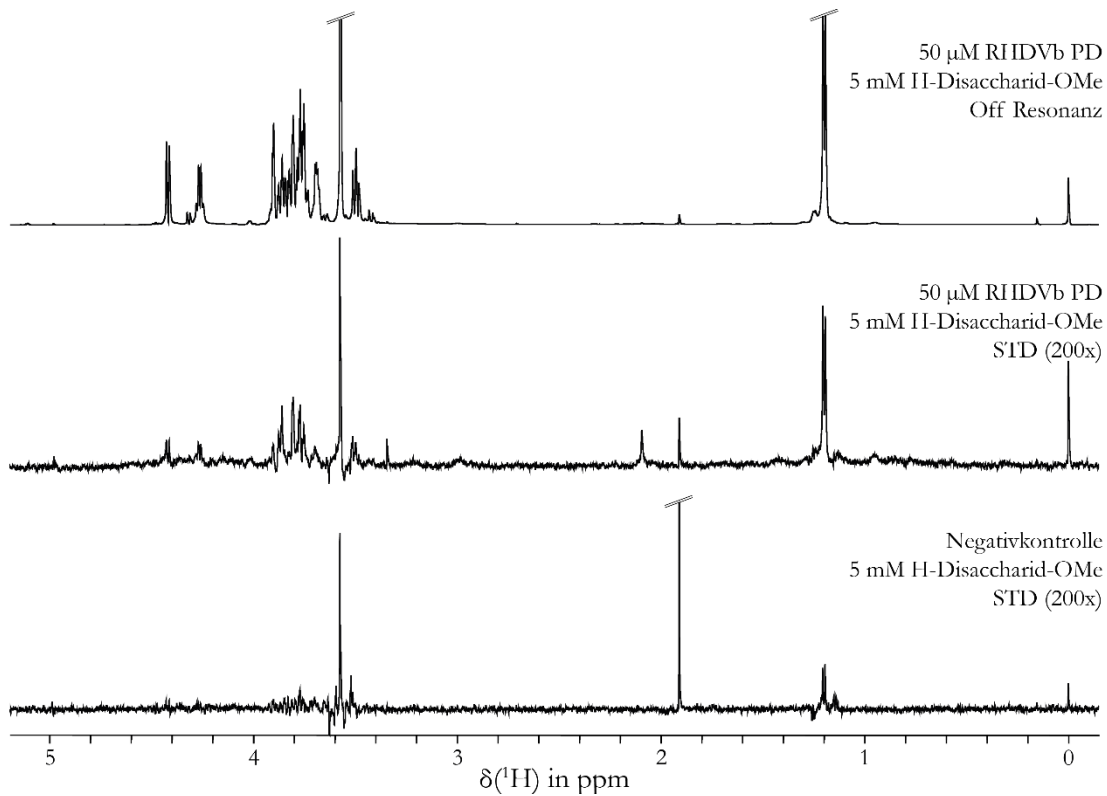


**Abbildung 7-6 Die Zugabe von DMSO zum GII.4 Saga N373D P-Dimer führt zu globalen Änderungen der chemischen Umgebung im Protein.** (A) zeigt die bei 13 % (v/v) DMSO in  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten CSPs der Signale über die Aminosäuresequenz aufgetragen. Die größten CSPs können für die Aminosäuren 232Leu, 476Arg und 502Thr beobachtet werden. CSPs größer als der Mittelwert plus einfacher Standardabweichung sind in orange und größer als der Mittelwert plus doppelten Standardabweichung sind in rot dargestellt. Im selben Farbcode sind in (B) die Aminosäuren mit den signifikanten CSPs aufgetragen. Dabei kann ein globaler Einfluss des DMSO beobachtet werden. In (C) sind die CSPs der drei am stärksten beeinflussten Signale gegen die DMSO-Konzentration aufgetragen. Es ist ein linearer Anstieg bis zur maximal verwendeten Konzentration von 13 % (v/v) zu beobachten. Die Proteinkonzentration betrug 98 mM und die Messung erfolgte in 75 mM Natriumphosphat mit 100 mM Natriumchlorid bei einem pH\*-Wert von 7,3.

**Tabelle 7.1 Verwendete Konzentrationen der Maybridge Verbindungen aus Abbildung 4-3.** Die Konzentrationen wurden aufgrund der schlechten Löslichkeit der Verbindungen über den Vergleich mit dem DSS-Referenzsignal ermittelt.

Verbindung	Konzentration in mM
30	19,7
40	85,1
93	76,1
149	77,5
164	75,0
183	38,0
479	12,4

## 7.5 STD-NMR-Untersuchungen der RHDVb P-Domäne mit dem H-Disaccharid

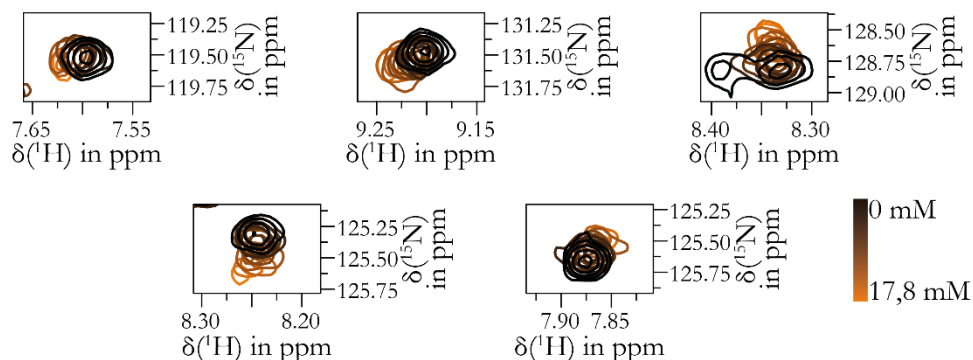


**Abbildung 7-7 STD-NMR-Spektren der RHDVb P-Dimere mit dem H-Disaccharid zusammen mit der Negativkontrolle.** Aufgrund der Abwesenheit von Differenzsignalen in der Negativkontrolle kann eine Direktanregung des Liganden ausgeschlossen werden. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  und einer H-Disaccharidkonzentration von 5 mM in 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 100 mM Natriumchlorid bei einem  $\text{pH}^*$ -Wert von 7,3 in  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt.

**Tabelle 7.2 Berechnete STD-Effekte der Protonen des H-Disaccharids durch die Bindung an die RHDVb P-Domäne.**

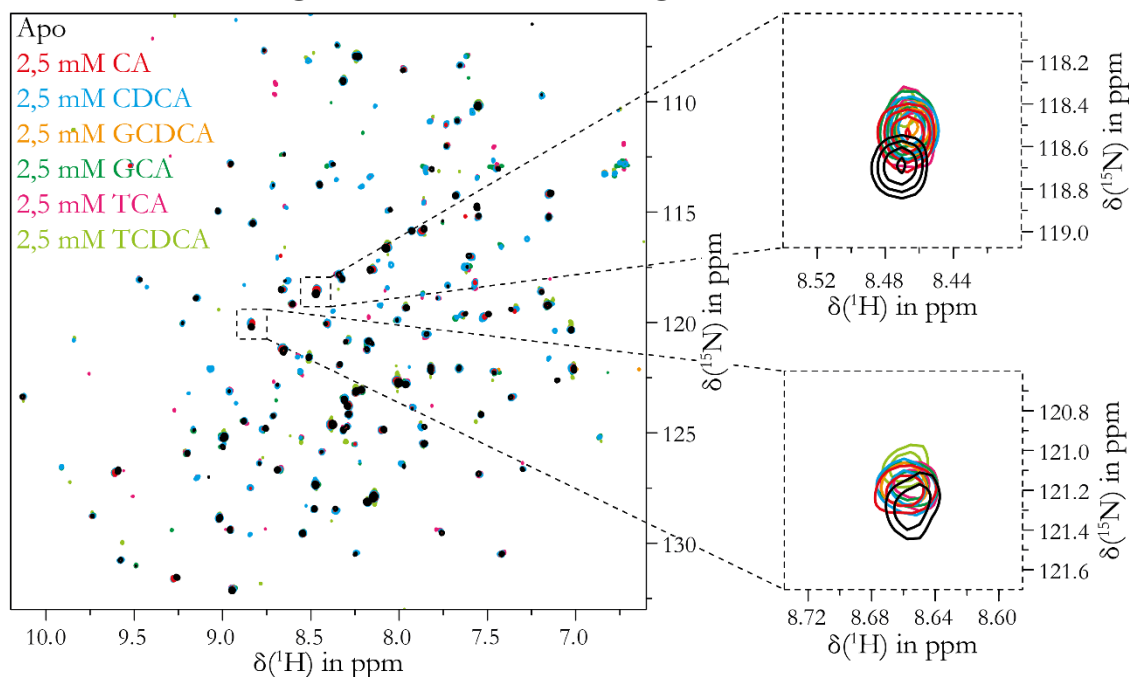
Proton	STD-Effekt	Proton	STD-Effekt
$\text{OMe}^{\text{Gal}}$	0,00225	$\text{H2}^{\text{Fuc}}$	0,00229
$\text{H1}^{\text{Gal}}$	0,00138	$\text{H3}^{\text{Fuc}}$	0,00562
$\text{H2}^{\text{Gal}}$	0,00149	$\text{H4}^{\text{Fuc}}$	0,00371
$\text{H3}^{\text{Gal}}$	0,00156	$\text{H5}^{\text{Fuc}}$	0,00208
$\text{H4}^{\text{Gal}}$	0,00122	$\text{Me}^{\text{Fuc}}$	0,00386
$\text{H6a}^{\text{Gal}}$	0,00107		
$\text{H6b}^{\text{Gal}}$	0,00289		

## 7.6 Untersuchung der Bindung des H-Trisaccharid Typ II an RHDVb P-Dimere



**Abbildung 7-8**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Signale der RHDVb P-Domäne, welche durch die Zugabe von H-Trisaccharid Typ II CSPs aufzeigen. Dargestellt sind die 5 in den  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren am stärksten verschiebenden Signale. Die Bindung ist für die meisten beeinflussten Signale im intermediären Austausch, wodurch die Signalintensität bei steigender H-Trisaccharid Typ II Konzentration abnimmt. Die dargestellten Signale befinden sich zwischen dem schnellen und intermediären Austausch. Sowohl eine Signalverschiebung als auch eine Signalabnahme kann beobachtet werden. Die Spektren sind konzentrationsabhängig in einem Farbgradienten von schwarz nach orange eingefärbt. Die Proteinkonzentration betrug  $100\ \mu\text{M}$  und der Puffer enthielt  $75\ \text{mM}$  Natriumphosphat,  $100\ \text{mM}$  Natriumchlorid mit einem  $\text{pH}^*$ -Wert von 7,3.

## 7.7 Untersuchung der Gallensäurebindung von RHDVb P-Dimeren



**Abbildung 7-9** RHDVb P-Domänen binden spezifisch die Gallensäuren Cholsäure (CA) und Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA). Dargestellt sind  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren der RHDVb P-Domäne, wobei nacheinander verschiedene Gallensäuren zur selben Probe zugegeben wurden. Überlagert wurden die Spektren ohne Gallensäuren (Apo, schwarz) mit  $2,5\ \text{mM}$  Cholsäure (CA, rot), mit  $2,5\ \text{mM}$  Chenodeoxycholsäure (CDCA, blau), mit  $2,5\ \text{mM}$  Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA, orange), mit  $2,5\ \text{mM}$  Glycocholsäure (GCA, dunkelgrün),  $2,5\ \text{mM}$  Taurocholsäure (TCA, pink) und mit  $2,5\ \text{mM}$  Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA, hellgrün). Zwei Signale sind vergrößert dargestellt. Es sind CSPs nach der Zugabe von CA und TCDCA zu beobachten. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von  $100\ \mu\text{M}$  und in einem Puffer mit  $75\ \text{mM}$  Natriumphosphat,  $100\ \text{mM}$  Natriumchlorid und  $150\ \text{mM}$   $\alpha$ -L-Fucose bei einem  $\text{pH}^*$ -Wert von 7,3 durchgeführt.

## 7.8 Zusätzliche Informationen zu den FRET-Untersuchungen

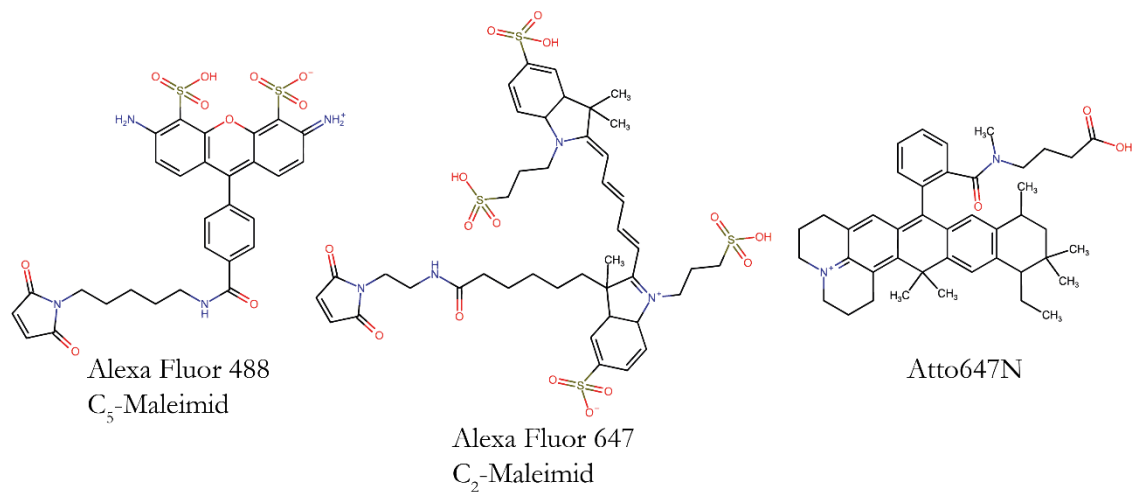


Abbildung 7-10 Strukturformeln der für die smFRET Messungen verwendeten Fluorophore.

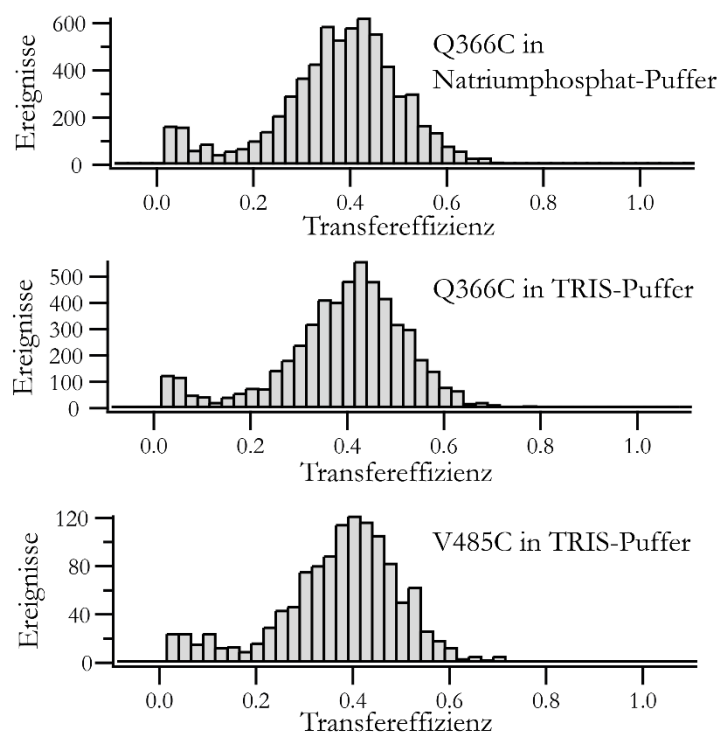
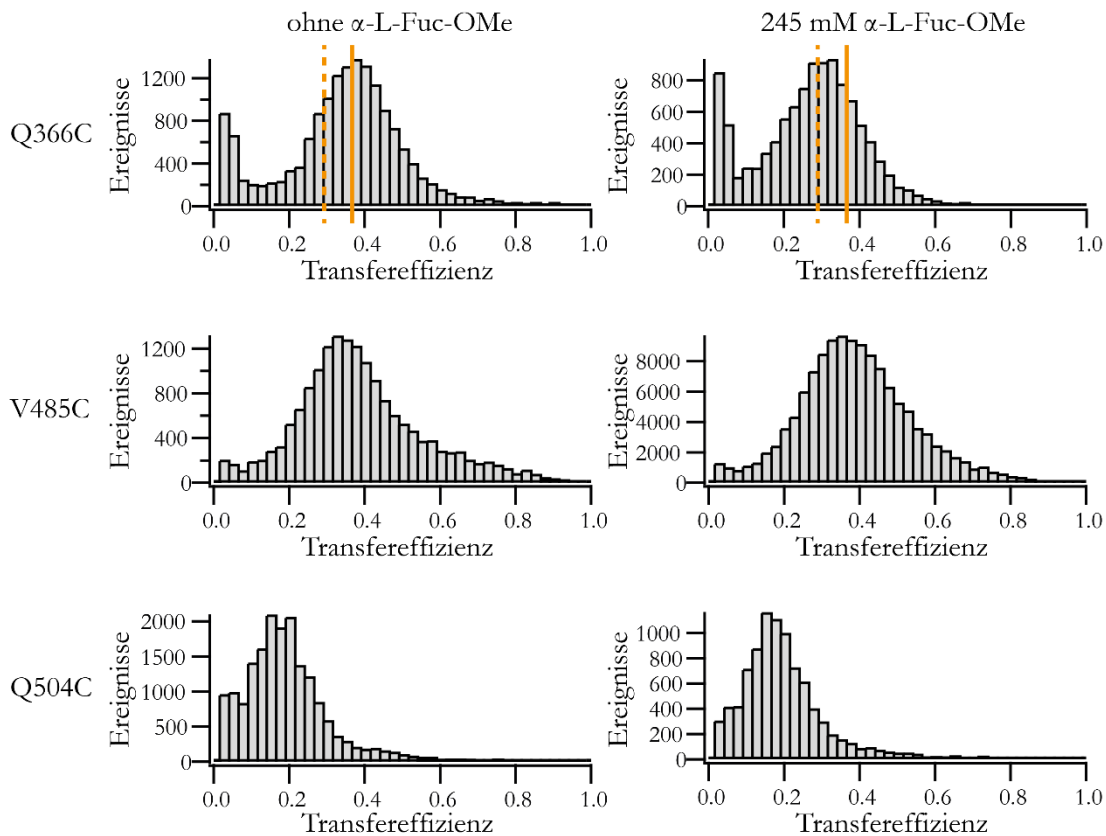
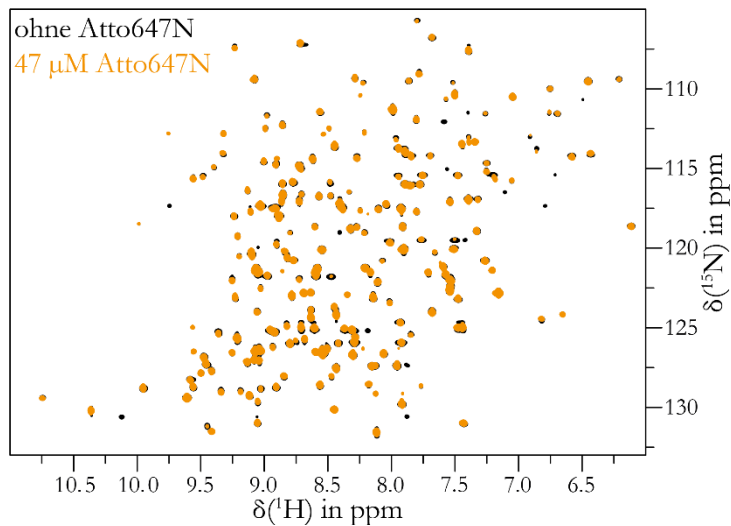


Abbildung 7-11 Das verwendete Puffersystem hat keinen Einfluss auf die FRET-Histogramme der GII.4 Saga P-Dimere. Dargestellt sind die Histogramme der Q366C Punktmutante im 20 mM Natriumphosphat- und TRIS-Puffer sowie die Punktmutante V485C in 20 mM TRIS-Puffer bei pH 7,3. Der Puffer enthielt außerdem 100 mM Natriumchlorid und 0,001 % TWEEN20. Die Messungen wurden je eine Stunde durchgeführt. Für die Analyse wurde eine Summschwelle von 20 Photonen pro Millisekunde und eine Akzeptorschwelle von 10 Photonen pro Millisekunde verwendet. Die Messungen wurden mit AF488 als Donor und AF647 als Akzeptor durchgeführt.



**Abbildung 7-12 Einfluss der Zuckerbindung auf die Transfereffizienz von GII.4 Saga N373D P-Dimeren.** Dargestellt sind die Transfereffizienz-Histogramme der drei Cystein-Punktmutanten Q366C (oben), V485C (Mitte) und Q504C (unten) ohne  $\alpha$ -L-Fuc-OMe (links) sowie in Anwesenheit von 245 mM  $\alpha$ -L-Fuc-OMe (rechts). Für das Histogramm der Cystein-Punktmutante Q366C wurde die gefittete Mitte der Gaußverteilungen dargestellt, um die Verringerung der Transfereffizienz bei Zuckeranwesenheit zu verdeutlichen. Die Messungen wurden mit AF488 als Donor und Atto647N als Akzeptor durchgeführt. Der Puffer enthielt 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0,001 % TWEEN20 mit pH 7,3. Die Messungen wurden je eine Stunde durchgeführt, außer die Messung der Punktmutante V485C mit  $\alpha$ -L-Fuc-OMe, diese wurde für 10 h gemessen. Für die Analyse wurde eine Schwelle von 20 Photonen pro Millisekunde und eine Akzeptorschwelle von 10 Photonen pro Millisekunde verwendet.



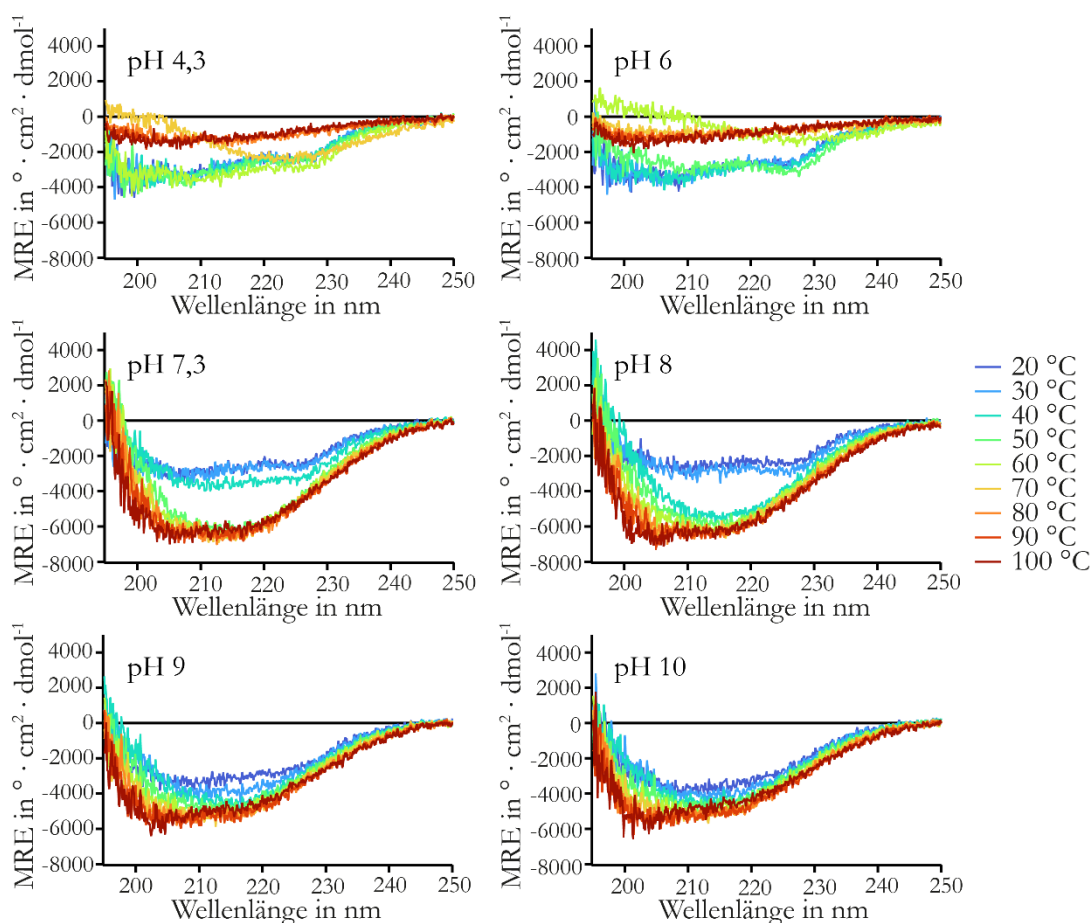
**Abbildung 7-13 Atto647N bindet nicht mit hoher Affinität an die GII.4 Saga N373D P-Domäne.** Gezeigt sind  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren der GII.4 Saga P-Domäne vor (schwarz) und nach (orange) der Zugabe von Atto647N. Da keine CSPs beobachtet werden können, ist eine Bindung bei mikromolaren Akzeptorkonzentrationen an die GII.4 Saga P-Domäne ausgeschlossen. Die Messung erfolgte mit einer Proteinkonzentration von  $194\ \mu\text{M}$  in einem Puffer mit  $75\ \text{mM}$  Natriumphosphat und  $100\ \text{mM}$  Natriumchlorid bei einem  $\text{pH}^*$ -Wert von 7,3.

**Tabelle 7.3 Mittlere Anzahl der Donor- und Akzeptorfluorophore im Anregungsvolumen aus den Experimenten von Abbildung 4-19.** Die mittlere Anzahl der Fluorophore wurde aus den jeweiligen Amplituden der Autokorrelationsfunktionen ermittelt.

$\text{pH}$ -Wert der FRET-Messung	$N_D$	$N_A$
4,3	0,19	0,32
6	0,10	0,18
7,3	0,19	0,56
8	0,27	0,72
9	0,07	0,17
10	0,13	0,38

## 7.9 CD-Spektroskopische Untersuchungen der RHDVb P-Domäne

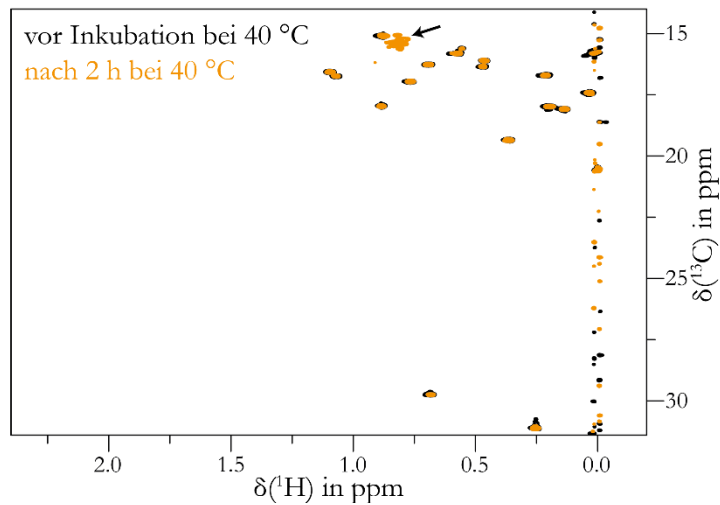
CD-spektroskopische Untersuchungen der RHDVb P-Domäne zeigen einen Einfluss des pH-Wertes auf die Proteinstabilität (Abbildung 7-14). Während bei pH 4,3 das Protein bei 70 °C denaturiert, beginnt die Denaturierung bei pH 6 bereits bei 60 °C. Ab pH 7,3 sind veränderte CD-Spektren zu beobachten. Bei einer Temperaturerhöhung ist keine Verkleinerung der negativen mean residue ellipticity (MRE), wie es für ein denaturiertes Protein zu erwarten wäre, sondern eine Verringerung der MRE zu beobachten. NMR-Experimente von bei 40 °C inkubierten Proben bei pH 7,3, welche in CD-Experimenten eine MRE von  $-6000 \text{ }^\circ\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  aufweisen (Abbildung 7-16), konnten jedoch zeigen, dass dieses Protein keine Faltung aufweist und somit auch denaturiert ist (Abbildung 7-15). Da bei 50 °C für pH 7,3 die  $-6000 \text{ }^\circ\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  erreicht werden, kann 50 °C als Schmelztemperatur angenommen werden. Bei pH 8 ist die Schmelztemperatur analog bei 40 °C. Für pH 9 und 10 ist keine Aussage über den Schmelzpunkt möglich, jedoch ist deutlich, dass das CD-Spektrum bei diesen pH-Werten eine Mischung aus denaturiertem und nativem Protein ist. Sichtbar ausgefallen ist das Protein nach der Temperaturreihe lediglich bei pH 4,3 und 6. Für alle anderen Messungen blieb die Probe klar.



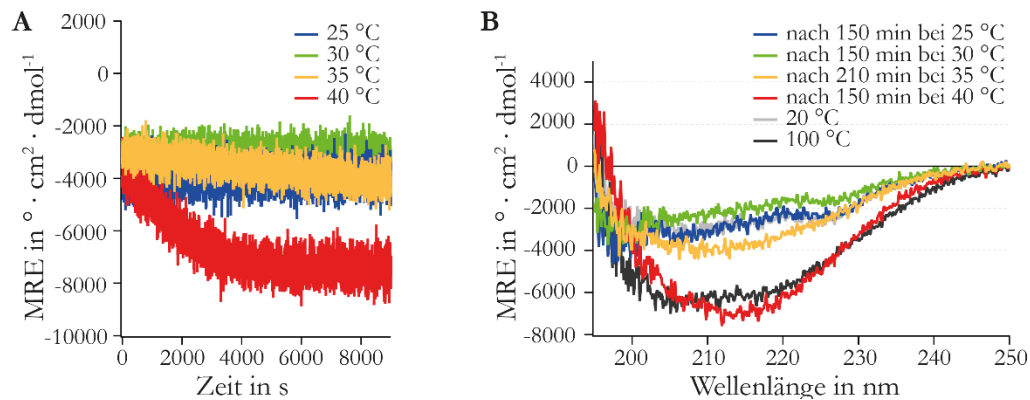
**Abbildung 7-14 pH-Wert abhängige Temperaturstabilität von RHDVb P-Dimeren.** Dargestellt sind CD-Spektren von 20 °C bis 100 °C in 10 °C Intervallen bei verschiedenen pH-Werten von 4,3 bis 10. Die RHDVb P-Dimere denaturieren dabei früher, je basischer der pH-Wert ist, bis bei pH 9 und 10 keine Aussagen mehr über den Schmelzpunkt getroffen werden können. CD-Spektren mit verkleinerter negativer MRE sowie CD-Spektren mit einer MRE von circa  $-6000 \text{ }^\circ\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  von 200 nm bis 220 nm korrespondieren dabei für denaturiertes Protein. Die Messungen erfolgten bei einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/mL in einem Puffer mit 20 mM Natriumphosphat.

Obwohl die Temperaturreihen bei verschiedenen pH-Werten von RHDVb nahelegen, dass bei basischen pH-Werten (pH 9 und 10) bereits denaturiertes Protein vorliegt, sind in den Einzelmolekül-

FRET Experimenten keine Anzeichen von Aggregaten zu beobachten. Im Fall von Aggregaten würden Ereignisse mit vielen verschiedene Transfereffizienzen gemessen werden aufgrund der verschiedenen räumlichen Anordnungen von Proteinen. Jedoch sind nahezu keine Ereignisse zu beobachten. Wahrscheinlich liegen die P-Domänen bei diesen pH-Werten teilweise denaturiert vor, jedoch nicht aggregiert.



**Abbildung 7-15 Entfaltung der RHDVb P-Domäne bei einer Inkubation für 2 Stunden bei 40 °C bei pH 7,3.** Gezeigt sind zwei  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMOC-Spektren der  $^{13}\text{C}$  Isoleucin-methylgruppenmarkierten RHDVb P-Domäne. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei 40 °C bei pH 7,3 werden die Signalintensitäten geringer und ein zusätzliches Signal (mit einem Pfeil markiert) erscheint und deutet auf eine Entfaltung des Proteins hin.



**Abbildung 7-16 Die Inkubation der RHDVb P-Domäne bei 40 °C führt zur Entfaltung des Proteins.** In (A) ist der Verlauf der MRE bei 210 nm bei einer Inkubation bei 25 °C (blau), 30 °C (grün), 35 °C (gelb) und 40 °C (rot) dargestellt. Dabei kommt es erst bei 40 °C zu einer Senkung der MRE und erreicht nach circa einer Stunde  $-8000 \text{ }^\circ\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ . (B) zeigt die CD-Spektren nach der Temperaturinkubation der Proben aus (A) mit CD-Spektren ohne vorangegangener Inkubation bei 20 °C (grau) und 100 °C (schwarz) als Referenz.

## 7.10 Matlab Code für die Kurvenanpassung zur Ermittlung der Austauschraten

Die Kurvenanpassungen für die Ermittlung der Austausch- und Dissoziationsraten aus Abbildung 4-15, Abbildung 4-16, Abbildung 4-17 und Abbildung 4-19 erfolgten unter der Verwendung von folgendem MatLab Code.

```

%%Ermittlung der Austausch- bzw. Dissoziationsraten.
clc
clear
%% Einladen der Daten
file = uigetfile({'*.xlsx'})
T = readtable(file);
[rows columns]= size(T);

xdata = T(:,1);
ydata = T(:,2);

S=0; %Kein Endwert festgelegt
% S= Alternativ festgelegter Endwert;

maxx = max(xdata);
if S==0
    fun2 = @(x,ydata) x(1)-(x(1))*exp(-x(2)*(ydata));
else
    fun2 = @(x,ydata) S-(S)*exp(-x(2)*ydata);
end

%% Kurvenanpassung

x20 = [1500,0.01];
[x2,R,J,CovB,MSE,ErrorModelInfo] = nlinfit(xdata,ydata,fun2,x20);
xx = linspace(0,maxx);

figure
hold
if S==0
    plot(xdata(:),ydata(:),'>','MarkerFaceColor','r','MarkerSize',5)
    plot(xx,x2(1)-(x2(1))*exp(-x2(2)*(xx)),'-')
else
    plot(xdata(:),ydata(:),'o','MarkerFaceColor','b','MarkerSize',5)
    plot(xx,S-(S)*exp(-x2(2)*xx),'-')
end

```

## 7.11 Publikationen

Creutzmacher R, Schulze-Niemand E, **König P**, Stanojlovic V, Mallagaray A, Peters T, Stein M, Schubert M. Conformational Control of Fast Asparagine Deamidation in a Norovirus Capsid Protein. *Biochemistry*. 2023 Mar 7;62(5):1032-1043. doi: 10.1021/acs.biochem.2c00656. Epub 2023 Feb 21. PMID: 36808948; PMCID: PMC9996831.

Peters T, Creutzmacher R, Maass T, Mallagaray A, **Ogrissek P**, Taube S, Thiede L, Uetrecht C. Norovirus-glycan interactions - how strong are they really? *Biochem Soc Trans*. 2022 Feb 28;50(1):347-359. doi: 10.1042/BST20210526. PMID: 34940787; PMCID: PMC9022987.

Liaci AM, Steigenberger B, Telles de Souza PC, Tamara S, Gröllers-Mulderij M, **Ogrissek P**, Marrink SJ, Scheltema RA, Förster F. Structure of the human signal peptidase complex reveals the determinants for signal peptide cleavage. *Mol Cell*. 2021 Oct 7;81(19):3934-3948.e11. doi: 10.1016/j.molcel.2021.07.031. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34388369.

Creutzmacher R, Maass T, **Ogrissek P**, Wallmann G, Feldmann C, Peters H, Lingemann M, Taube S, Peters T, Mallagaray A. NMR Experiments Shed New Light on Glycan Recognition by Human and Murine Norovirus Capsid Proteins. *Viruses*. 2021 Mar 5;13(3):416. doi: 10.3390/v13030416. PMID: 33807801; PMCID: PMC8001558.