

Aus dem Institut für Biochemie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Hilgenfeld



**„Charakterisierung der pH abhängigen Konformation und
Multimerisierung des Influenza-A-Virus M1-Proteins“**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Jens Klingbeil
aus Berlin

Lübeck, 29.06.2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Lars Redecke
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2016

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26. Oktober 2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Influenza-A-Virus	1
1.2. Replikation des Influenza-A-Virus	2
1.1.1. Aufnahme in die Wirtszelle	3
1.1.2. Eintritt der vRNA in den Nukleus	4
1.1.3. Transkription und Replikation des viralen Genoms	4
1.1.4. Export der vRNPs aus dem Nukleus	5
1.2.5. Entstehung neuer Virione an der Plasmamembran der Wirtszelle	5
1.2. Typisierung von Influenza-A	7
1.3. Influenza-A-Virus Matrix Protein 1 (M1-Protein)	8
1.4. Influenza-A-Virus Nukleus-Export-Protein (NEP)	11
1.5. Angewandte Strukturbiologie Methoden	13
1.5.1. Zirkular Dichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie)	14
1.5.2. Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)	15
1.5.3. Moderne Entwicklungen im Bereich der Röntgenkristallographie	17
1.5.4. <i>In vivo</i> -Kristallisation	18
2. Zielsetzung	22
3. Material und Methoden	24
3.1. Materialien	24
3.1.1. Geräte	24
3.1.2. Chemikalien	25
3.1.3. Puffer, Medien und Lösungen	25
3.1.4. Proteinsequenzen	27
3.1. Methoden	32
3.1.2. Molekularbiologische Methoden	32
3.1.3. Proteinbiochemische Methoden	35
3.1.4. Biophysikalische Methoden	36
4. Ergebnisse	44
4.1. Rekombinante Herstellung der Proteine M1 und NEP des Influenza-A-Virus	44
4.1.1. Klonierung der M1 <i>E.coli</i> -Konstrukte	45
4.1.2. Expression und Reinigung des Volllänge-M1-Proteins	46
4.1.3. Klonierung der NEP <i>E. coli</i> Konstrukte	49
4.1.4. Expression und Reinigung von NEP	50
4.1.5. M1- und NEP-Proteinbiosynthese in Sf9-Zellen	52
4.2. Strukturelle Charakterisierung des rekombinanten M1-Proteins	53
4.2.1. Dispersitäts- und Faltungsuntersuchungen des M1-Proteins in Lösung	54

4.2.2.	Konventionelle Kristallisationsversuche des Volllänge-M1-Proteins.....	56
4.2.3.	Kristallisationsversuche des M1-Proteins und NEP in Sf9-Zellen.....	58
4.2.4.	Kleinwinkelstreu-Experimente mit M1-Protein bei verschiedenen pH-Werten.....	62
4.2.5.	Innovative Methoden zur Optimierung von Kleinwinkelstreudaten	68
4.2.6.	<i>Ab initio</i> Modell-Rekonstruktion des M1-Proteins bei physiologischen und sauren pH-Werten	71
4.2.7.	Flexibilitäts- und Diskrepanz-Untersuchung der M1-Modell-Rekonstruktion	74
4.2.8.	Untersuchung der Sekundärstrukturelemente des M1-Proteins mittels CD-Spektroskopie	78
4.3.	Aggregations-Tendenz des M1-Proteins bei physiologischem pH-Wert.....	80
4.3.1.	AFM-Topographie von M1 Proteinstrukturen bei unterschiedlichen pH-Werten.....	81
5.	Diskussion	84
5.1.	Rekombinante Herstellung der Influenza-A-Virus Proteine M1 und NEP.....	84
5.2.	Strukturelle Charakterisierung des M1-Proteins	86
5.2.1.	Untersuchung zur Qualität und Stabilität der rekombinanten Herstellung	86
5.2.2.	Kristallisations-Experimente.....	87
5.2.3.	Charakterisierung des M1-Proteins mittels SAXS in Lösung	90
5.2.4.	Innovative Techniken für die SAXS-Daten-Erhebung.....	91
5.2.5.	<i>Ab initio</i> Modell-Rekonstruktion des M1-Proteins	92
5.3.	Untersuchung des Oligomerisationsverhalten des M1-Proteins	96
6.	Ausblick	100
7.	Literaturverzeichnis	103
8.	Anhang.....	114
8.1.	Gefahrstoffe nach GHS	114
8.1.1.	Kommerzielle Kristallisationslösungen.....	115
8.2.	Hinweise für Gefahrstoffe	115
9.	Danksagung	117

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
μ	mikro
Å	Ångström
3D	Dreidimensional
CD	Zirkulardichroismus
cRNA	Ribonukleinsäure Kopie
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DLS	Dynamische Laserlichtstreuung
D _{max}	maximaler Partikeldurchmesser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
f	femto
FEL	Freier Elektronenlaser
Gy	Gray
HA	Hämagglutinin
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LCLS	<i>Linac Coherent Light Source</i>
m	Meter
M	molar
M1	Matrix Protein 1
M2	Matrix Protein 2
MBP	Maltose-bindendes Protein
MGy	Megagray
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NA	Neuraminidase
NEP	Nukleus-Export-Protein
NES	Kernexportsequenz
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
NLS	Kernlokalisationssignal
nm	nano Meter

NP	Nukleoprotein
nt	Nukleotid
PA	<i>polymerase acidic protein</i>
PAA	Polyacrylamid
PB1	<i>polymerase basic protein 1</i>
PB2	<i>polymerase basic protein 2</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R_g	Gyrationsradius
R_h	hydrodynamischer Radius
RNA	Ribonukleinsäure
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9
SFX	Femtosekunden-Kristallographie
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
TDA	<i>triple detector array</i>
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
vRNA	virale Ribonukleinsäure
vRNP	virales Ribonukleoprotein

Zusammenfassung

Neben den jährlichen Influenza-A-Virus Epidemien bilden vor allem sporadisch auftretende Pandemien ein ernstzunehmendes Gesundheitsrisiko. Bei einer normalen Infektion mit Entzündung des respiratorischen Systems verläuft die Symptomatik meist harmlos innerhalb von ein bis zwei Wochen. Infektionen mit einem besonders aggressiven Viren-Stamm können hingegen letal verlaufen.

Während des Replikationszyklus übernimmt das Matrix Protein 1 (M1) verschiedene essentielle Aufgaben. Ein Netzwerk aus M1-Oligomeren bildet den Ankerpunkt für das virale Genom und stabilisiert die Integrität innerhalb des Virions. Während der frühen Phase der Infektion findet nach rezeptorvermittelter Endozytose die Ansäuerung der Endosomen statt, was zur Dissoziation des M1-Netzwerkes und der Freisetzung des viralen Genoms nach Membranfusion in das Zytosol der Wirtszelle führt. Das Fehlen von Strukturdaten trägt dazu bei, dass die Grundlagen des M1-Netzwerk-Aufbaus sowie der -Dissoziation aufgrund von pH-Wert-Änderungen noch nicht vollständig verstanden sind. Ein weiteres essentielles virales Protein für die Replikation, das Nukleus-Export-Protein (NEP), bildet durch M1-Bindung einen Nukleus-Export-Komplex, der das virale Genom aus dem Zellkern transportiert. Ohne diesen Export-Komplex können keine infektiösen Virione gebildet werden. Ähnlich wie für das Volllänge-M1-Protein sind auch nur wenige strukturelle Informationen über das NEP bekannt.

In dieser Arbeit konnte die rekombinante Herstellung des M1-Proteins erfolgreich in *E. coli*-Zellen etabliert werden, wenngleich die Ausbeute an löslichem Protein gering war. Während intensive Bemühungen, das NEP ebenfalls rekombinant in *E. coli*-Zellen zu synthetisieren, erfolglos blieben, konnte lösliches NEP alternativ in Baculovirus-infizierten Insektenzellen produziert werden. Dabei zeigte sich innerhalb der Zelle eine Assoziation des Proteins mit der Plasmamembran, was eine bislang unbekannte Eigenschaft des NEP darstellt.

Zusätzlich ermöglichte die erfolgreiche Proteinproduktion in Insektenzellen, die auch für das M1-Protein etabliert werden konnte, die Untersuchung auf spontane Kristallisation in den lebenden Zellen. Dieser innovative, alternativ zur konventionellen Proteinkristallisation in der Etablierung befindliche Ansatz nutzt verschiedene zelluläre Kompartimente: In diesem Fall das Zytosol, das ER und die Peroxisomen als *Screening*-Parameter für die Kristallbildung, in die sowohl das M1-Protein als auch NEP mittels Translokationssignalen dirigiert wurden. Allerdings konnten mit der derzeit vorhandenen lichtmikroskopischen Detektionstechnik keine Anzeichen für eine Bildung von *in vivo*-Kristallen des M1 bzw. des NEP erkannt werden. Dies kann möglicherweise mit den spezifischen Bedingungen in den Kompartimenten, mit dem enormen Stress, dem die Zellen durch die Proteinbiosynthese ausgesetzt waren, oder mit der Auflösungslimitation der Lichtmikroskopie zusammen hängen und sollte nach Etablierung optimierter Detektionstechniken wiederholt werden. Da das M1-Protein nach zytosolischer Proteinbiosynthese erfolgreich in den Sf9-Zellkern transloziert wurde, kann der Ansatz der *in vivo*-Kristallisation durch Nutzung des

Zusammenfassung

Kernlokalisationssignal (NLS) des M1-Proteins um ein zusätzliches Kompartiment als *Screening*-Parameter erweitert werden. Durch Anwendung konventioneller Kristallisationsstrategien konnte ein geordneter hexagonaler Kristall mit 25 µm x 25 µm Kantenlänge erhalten werden. Die spezifische Methylenblau-Färbung deutet auf einen Aufbau aus M1-Protein hin, was allerdings durch zukünftige Diffraktionsdatensammlung an einer hochbrillanten Synchrotronstrahlungsquelle verifiziert werden muss.

Mittels Röntgenkleinwinkelstreuungs-Experimenten konnten strukturelle Informationen über das rekombinante Volllänge-M1-Proteins in Lösung erhalten werden. Dabei wurden in Abhängigkeit des pH-Wertes Unterschiede in den SAXS-Streukurven identifiziert, die auf unterschiedliche Flexibilität der M1-Moleküle bzw. veränderte Zusammensetzung der M1-Proben hindeuten. Bei pH 5,0 der den angesäuerten Endosomen entspricht, wurden homogene *ab initio*-Strukturmodelle für das M1-Monomer generiert, die der postulierten anisotropen Struktur des nativen M1-Proteins bestehend aus globulärer NM-Domäne sowie elongiertem, flexiblen C-Terminus entspricht. Erstmals erhaltene SAXS-Strukturmodelle des monomeren M1-Proteins bei pH 7,4 implizieren hingegen eine Zusammensetzung der Probe nicht nur aus Volllänge-M1-Protein, sondern auch aus individueller NM- und C-terminaler Domäne, was durch Größenausschlusschromatographie grundlegend bestätigt wurde. Die bisher nicht bekannte Fragmentierung des M1-Proteins bei physiologischem pH beeinflusst allerdings nicht die Sekundärstruktur des Proteins, deren Unabhängigkeit vom pH-Wert und von der Proteinkonzentration die mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu zeigt das Aggregationsverhalten des M1-Proteins eine deutliche Abhängigkeit von beiden Parametern. Während die AFM-Topographie bei sauren pH-Werten keine Ausbildung von M1-Netzwerken detektierte, konnten bei pH 7,4 in Abhängigkeit der Konzentration spezifische, stäbchenförmige M1-Aggregate auf der negativ-geladenen MICA-Oberfläche visualisiert werden. Auch in Lösung war die Aggregationstendenz von M1 bei physiologischem pH nach Überschreiten der kritischen Konzentration von etwa 2 mg/ml signifikant erhöht, im Vergleich zu M1-Proben bei pH 5,0.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse gewähren nicht nur neue Einblicke in die pH-abhängige Konformation und Aggregation des M1-Proteins und somit in den Replikationszyklus des Influenza-A-Virus, sondern etablieren ebenfalls rekombinantes Volllänge-M1-Protein als valides Modellsystem für zukünftige Struktur- und Funktionsuntersuchungen. Außerdem konnte erstmals rekombinantes NEP in Insektenzellen produziert werden, was die essentielle Grundlage für weitere Charakterisierungen dieses für das Virus essentiellen Proteins sowie seiner Interaktion mit dem M1-Protein darstellt.

Summary

Next to the annually occurring epidemic spread of Influenza A virus, the constant risk of a new sporadically arising pandemic virus strain represents a major threat to health. The main symptom of an Influenza A virus infection is an inflammation of the respiratory system, which is usually cured within one or two weeks. However, infections caused by a particularly aggressive virus strain could lead to severe mortality rates.

The multifunctional Matrix Protein 1 (M1) features essential functions during the replication cycle of the influenza A virus. A network composed of M1 oligomers inside the virion anchors the viral genome and stabilizes the structural integrity of the particle. After receptor-mediated endocytosis during the early stage of infection, the M1 network dissociates due to acidification of the endosomes, which leads to the release of the viral genome into the cytosol of the host cell. Due to the lack of structural information, the molecular mechanisms of the pH-dependent M1 assembly and dissociation are not understood in detail so far. Another viral protein that is essential for replication, the Nucleus-Export-Protein (NEP), is involved in the viral genome trafficking. It interacts with M1 to form the nucleus-export-complex. Without viral-genome-export, the formation of infectious particles is inhibited. Similar to full-length M1, the structural knowledge about NEP is highly limited.

In this work, the recombinant expression of full-length M1-protein was successfully established in *E. coli* cells, although the yield of soluble protein was comparatively low. In contrast, the recombinant production of NEP in *E. coli* cells remained unsuccessful, despite numerous efforts. Thus, baculovirus-infected insect cells were employed as an alternative expression system, resulting in the production of small amounts of soluble NEP. Within the insect cells, NEP shows close contact to the plasma membrane, which represents first evidence of a so far unknown property of this protein.

In addition, the successful protein production in insect cells, which could also be established for M1 protein, allows the investigation of spontaneous protein crystallization within the living cells. This innovative approach, which is currently in establishment as an alternative strategy for conventional protein crystallization, exploits different cellular compartments, e.g. the cytosol, the ER, and peroxisomes, as screening parameters for crystal formation. Both M1 as well as NEP have been transported into these compartments using specific translocation signals. However, applying the currently available detection technique that is mainly based on light microscopy, no indications for successful *in vivo* crystal formation of M1 and NEP were observed. This could be due to the specific environmental conditions within the cellular compartments, to the significant stress that was exposed to the cells by protein biosynthesis, or to the limitations of light microscopy in terms of resolution. Thus, *in vivo* crystallization test should be repeated after establishment of optimized detection techniques for tiny crystals. Since M1 was successfully transported into the nucleus after cytosolic protein synthesis, the corresponding nucleus location signal (NLS) appears to be suitable

Summary

to extend the *in vivo* crystallization approach by an additional compartment as a new screening parameter. Furthermore, conventional crystallization trials of full-length M1 resulted in the growth of an ordered hexagonal crystal with dimensions of 25 μm x 25 μm . Specific staining with methylene blue indicates a protein- rather than a salt crystal. However, this has to be verified by diffraction data collection at a highly brilliant synchrotron source in the future.

The application of small angle X-ray scattering (SAXS) techniques resulted in structural information of the full-length M1 protein in solution. Depending on the buffer pH, differences in the SAXS scattering curves have been identified, which indicate alterations in the flexibility of the M1 molecules or a different composition of the M1 samples. At pH 5, representing acidified endosomes, homogeneous *ab initio* structural models were generated for M1 monomers, corresponding to the anisotropic structure of native M1 that consists of a globular NM domain as well as an elongated C-terminal domain. Structural SAXS models of monomeric M1 at pH 7.4, which were obtained for the first time, indicate that the sample is not only composed of full-length M1 protein, but also of individual NM and C-terminal domains, which was largely confirmed by size exclusion chromatography. However, this so far not reported fragmentation of M1 at physiologic pH does influence the secondary structure of M1, which was proven by CD spectroscopy to be independent of pH and protein concentration. In contrast, the aggregation tendency of M1 is significantly influenced by these parameters. Whereas AFM topography did not detect the formation of M1 networks at acidic pH, specific rod shaped M1 aggregates have been visualized at pH 7.4 on the surface of negatively charged MICA, also depending on the protein concentration. A similar intrinsic aggregation tendency of M1 was observed at pH 7.4 in solution after exceeding the critical concentration of approximately 2 mg/ml, in contrast to M1 samples at pH 5.

The results obtained in this study provide not only new insights into the pH-dependent conformation and aggregation of M1 and thus into the replication cycle of the Influenza A virus, but also established recombinant full-length M1 protein as a valid model system for future investigations of the protein structure and function. Moreover, recombinant NEP was produced for the first time in insect cells, representing the essential basis for the upcoming characterization of this essential protein as well as its interaction with M1.

1. Einleitung

1.1. Influenza-A-Virus

Die klinische Symptomatik einer Influenza-A-Virus Infektion zeigt vorwiegend eine Entzündung der Nase, des Rachens, der Bronchen und gelegentlich der Lunge. Normalerweise dauert eine Infektion rund eine Woche an, in der es zu hohem Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Unwohlsein, unproduktivem Auswurf und Halsschmerzen kommen kann¹.

Das Virus verbreitet sich leicht durch Tröpfcheninfektion über die Luft. Junge Menschen erholen sich meist ohne Behandlung innerhalb von 1 - 2 Wochen². Bei Risikogruppen wie Neugeborenen, Senioren oder immunsupprimierten Menschen kann es zu schwerwiegenden Komplikationen, Pneumonie oder sogar zum Tod kommen^{3,4}.

Das Influenza-A-Virus gehört zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Es ist ein membranumhülltes Virus mit einem in acht Segmente unterteilten RNA-Einzelstrang-Genom negativer Polarität ((-)ssRNA). Die Segmente kodieren für 11 bis 12 Struktur- und Nichtstruktur-Proteine, die es ermöglichen die Wirtszellmechanismen für die virale Proteinbiosynthese und Replikation zu manipulieren^{5,6}.

Die Virus umhüllende Lipiddoppelmembran (Abbildung ^{1.1}) stammt von der Wirtszelle und setzt sich hauptsächlich aus Cholesterol und Phospholipiden zusammen⁷⁻⁹. In die Membran sind die viralen Proteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und Matrix Protein 2 (M2) integriert, dabei trägt HA mit 80% den größten relativen Anteil bei, gefolgt von NA mit 17 % und M2 mit 3%¹⁰⁻¹². Auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran formt das Matrixprotein 1 (M1) ein Protein-Netzwerk, das die globuläre Struktur des Virus unterstützt und die viralen Ribonukleoproteine (vRNPs) bindet¹³. Die vRNPs bestehen aus den (-)RNA-Einzelsträngen, die von Nukleoproteinen (NP) umgeben sind, einer geringen Kopienzahl an Nukleus-Export-Protein (NEP) und drei viralen Polymerasen, dem *polymerase basic protein 1* (PB1), *polymerase basic protein 2* (PB2) und *polymerase acidic protein* (PA). PB1, PB2 und PA bilden den RNA-abhängigen viralen RNA-Polymerasekomplex¹⁴. Kürzlich wurde ein weiteres virales Protein entdeckt, das N40, dass auf dem gleichen Genom-Segment kodiert wird wie PB1¹⁵.

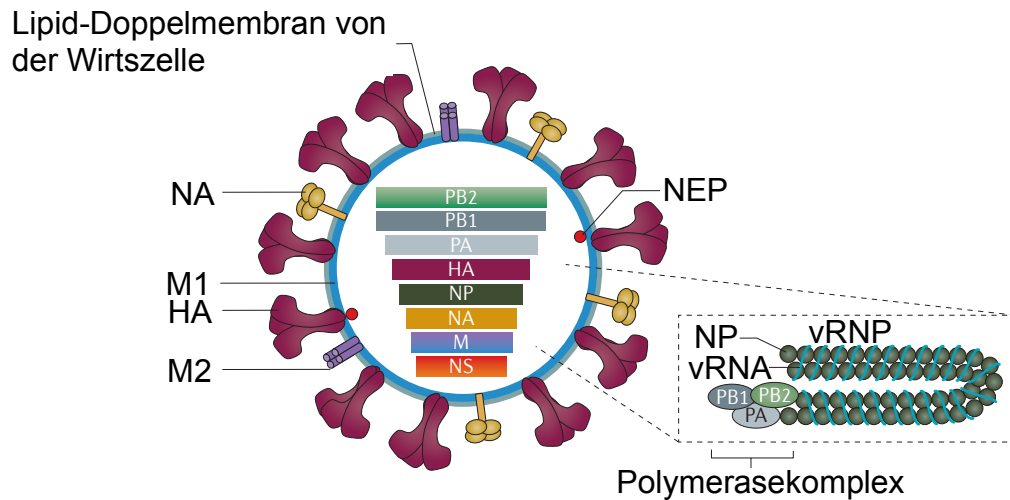


Abbildung 1.1| Aufbau eines Influenza-A-Virus-Partikels| Das Influenza-A-Virus-Genom besteht aus 8 Einzelstrang-RNA-Molekülen negative Polarität, die für bis zu 12 Struktur- und Nichtstruktur-Proteine kodieren. Das Nukleus-Export-Protein (NEP, alternativ NS2) und der antiviral Antagonist Nicht-Struktur Protein 1 (NS1) sind auf dem Segment 8 (NS-Segment) kodiert. Die Matrix Proteine M1 und der Ionenkanal M2 werden vom Segment 7 kodiert (M-Segment) und werden genauso wie die NS-Proteine durch alternatives Spleißen hergestellt. Das Rezeptorbindeprotein Hämagglutinin (HA), das Sialinsäurereste schneidende Enzym Neuraminidase (NA), das Nukleoprotein (NP) und die Polymerasekomplex-bildenden Proteine (PB1, PB2 und PA) werden alle jeweils durch ein spezifisches Genom-Segment kodiert. Jedes der 8 verschiedenen Genom-Segmente bildet mit dem RNA abhängigen Polymerase-Komplex und dem Nukleoprotein einen viralen Ribonukleoprotein-Komplex (vRNP)¹⁶.

1.2. Replikation des Influenza-A-Virus

Der Influenza-A-Virus Replikationszyklus kann in die folgenden Schritte unterteilt werden: Aufnahme in die Wirtszelle, Aufnahme der vRNA in den Nukleus, Transkription und Replikation des viralen Genoms, Zellkern-Export der vRNPs, Aufbau der Virione mit *Budding* an der Plasmamembran der Wirtszelle und Freisetzung der neuen Virione (Abbildung 1.2).

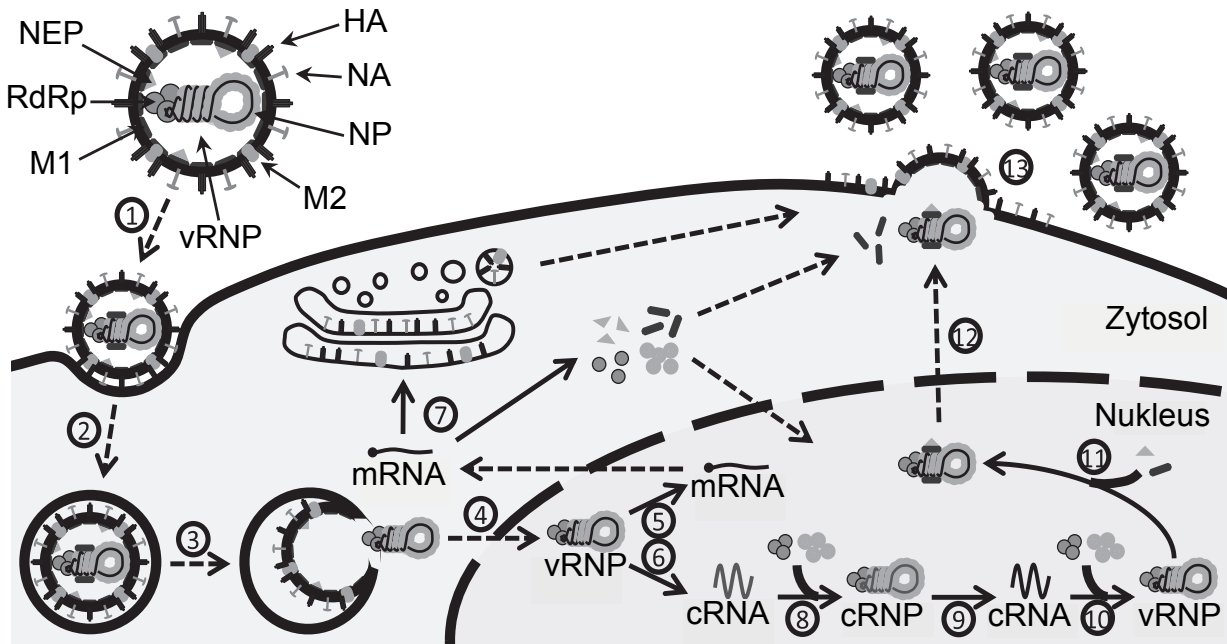


Abbildung 1.2| Replikationszyklus des Influenza-A-Virus| Das Influenza-A-Virus (1) wird durch rezeptorabhängige Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen (2). Während der Endosomen-Reifung strömen Wasserstoffprotonen in die Endosomen ein, was zu einer Ansäuerung des Virusinneren durch den M2-Ionenkanal führt. Der niedrige pH-Wert verursacht die Freisetzung der viralen RNA (3). Die vRNPs werden aktiv in den Nukleus transportiert (4), wo die Translation (5) und die Replikation über das cRNA-Zwischenprodukt (6,8,9) stattfindet. Anhand der cRNA-Vorlage werden neue vRNA-Moleküle synthetisiert (10), die mit dem RNA abhängigen RNA-Polymerasekomplex und Nukleoprotein das fertige vRNP ergeben. Durch Interaktion der vRNP mit dem M1-Protein, NEP und dem wirtszelleigenem Exportprotein Crm1 (11) wird der aktive Nukleus-Export realisiert (12). An der apikalen Seite der Plasmamembran erfolgt das *Budding* und die Freisetzung neuer Influenza-A-Virione (13)¹⁷.

1.1.1. Aufnahme in die Wirtszelle

In der Membran des Virus befinden sich Homotrimere des Proteins Hämagglutinin (HA). Ein HA Monomer wird aus den Untereinheiten HA 1 mit der Rezeptorbindungsdomäne und HA 2 mit dem Fusionspeptid aufgebaut. Die HA Trimere erkennen und binden an Sialinsäure-Moleküle auf der Wirtszelloberfläche, die vom extrazellulären Teil der membranständigen Glycoproteine präsentiert werden. Die beiden häufigsten glycosidischen Bindungen, mit der die Sialinsäure in den präsentiert wird sind $\alpha(2,3)$ bei Geflügel und $\alpha(2,6)$ beim Menschen, wobei humanpathogene Viren selektiv die $\alpha(2,6)$ Bindung und die vogelpathogenen Viren die $\alpha(2,3)$ Bindung erkennen¹⁸.

Eine Besonderheit stellen Schweine als Wirt dar, die sowohl die $\alpha(2,3)$ als auch die $\alpha(2,6)$ glycosidisch gebundene Sialinsäure auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Dieser Umstand ermöglicht es, dass ein humanpathogenes und ein geflügelpathogenes Virus eine Schweinewirtszelle infizieren können. In der Schweinewirtszelle kann es dann zu zufälligen Rekombinationen (*reassortment*) der acht Segmente beider Viren kommen, was zu einem neuen nun bedrohlichen Pathogen führen kann^{16,18,19}.

Nach Bindung des Virus an die Sialinsäure-Moleküle erfolgt die rezeptorvermittelte Endozytose (Abbildung 1.2 (1 - 3)). Die Endosomen werden in der Wirtszelle angesäuert, resultierend in einem pH-Wert zwischen 5 und 6. Der niedrige pH-Wert verursacht eine Konformationsänderung in den HA Trimeren, sodass das Fusionspeptid des HA 2 in die endosomale Membran inseriert. Die Insertion bewirkt die räumliche Annäherung der viralen und der endosomalen Membran, die für eine erfolgreiche Membranfusion notwendig ist^{18,20,21}.

Der niedrigen pH-Wert hat außerdem zur Folge, dass Protonen durch den M2 Ionenkanal in das Innere des Virus gelangen²². Folglich erniedrigt sich der pH-Wert auch im Virus, was wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung des M1-Proteins führt und dadurch erst die Freisetzung der vRNP in das Zytosol der Wirtszelle ermöglicht²³.

1.1.2. Eintritt der vRNA in den Nukleus

Die Transkription der Influenza-A Proteine sowie die Replikation des viralen Genoms finden im Zellkern der Wirtszelle statt. Daher ist es essentiell, dass die vRNPs aktiv vom Zytosol in den Zellkern transportiert werden (Abbildung 1.2 (4)). Alle viralen Proteine (NP, PA, PB 1 und PB 2), die an die virale RNA binden, besitzen ein individuelles Kernlokalisierungssignal (NLS), welches aktiven Zellkernimport ermöglicht. Bis dato ist jedoch weitgehend unklar welche der NLS verschiedenen den Zellkernimport am stärksten fördert²⁴. Die vRNPs binden an Importin- α oder - β der Wirtszelle und gelangen somit über den Crm1 abhängigen Import-Mechanismus in den Zellkern²⁵.

1.1.3. Transkription und Replikation des viralen Genoms

Bei Influenza-A handelt es sich um ein (-)ssRNA Virus, daher wird das RNA-Genom zunächst in entsprechende positiv-Strängige-RNA ((+)RNA) umgeschrieben (Abbildung 1.2 (5 - 10)). Die (+)RNA dient dann als Vorlage für die Synthese neuer viraler (-)RNA-Moleküle²⁶. Die Replikation der RNA erfolgt Oligonukleotid-unabhängig, da die virale RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RdRp) die teilweise selbstkomplementären 5' und 3' Enden für die Initiation des Prozesses verwendet^{27,28}.

Das Genom von Influenza-A kodiert lediglich für 11 bis 12 Struktur- und Nichtstruktur-Proteine. Die geringe Anzahl an viralen Nichtstrukturproteinen macht es unabdingbar für das Virus, die Wirtszellmechanismen und -Proteine beispielsweise für die Transkription viraler Gene zu verwenden. Um die virale mRNA vor dem Abbau durch die Wirtszelle zu schützen bedient sich Influenza-A dem „*cap-snatching*“ Mechanismus. Dieser wird durch die Endonukleaseaktivität der PB 2 der RdRp ausgeführt, indem PB 2 das 5' methylierte *Cap* der Wirtszell-mRNA bindet und es mit weiteren 10 - 15 Nukleotiden der mRNA abschneidet. Die so entstandenen 5' methylierten *Caps* mit 10 - 15 Nukleotiden dienen als Primer für die Transkription viraler Gene²⁹⁻³¹.

Ein Wirtszell-Mechanismus den das Virus verwendet ist die Spleiß-Maschinerie. Die Segmente 7 und 8 kodieren jeweils für zwei Proteine, das Segment 7 für das M1-Protein mit der Spleiß-Variante M2 und das Segment 8 für NS1 mit der Spleiß-Variante NEP. Beide Spleiß-Varianten (M2 und NEP) sind in deutlich geringerer Quantität in der infizierten Wirtszelle vertreten, verglichen mit den nicht gespleißten Varianten M1 und NS1^{26,32}.

Die Polyadenylierung findet bei der viralen mRNA nicht über ein spezielles Polyadenylierungssignal wie bei Eukaryonten (AAUAAA), sondern vielmehr direkt durch die RdRp statt. Am 5' Ende jedes Segments der mRNA-Vorlage befinden sich fünf bis sieben Uracil-Moleküle im viralen Genom. Die sich wiederholenden Uracile bewirken einen sogenannten „*stuttering*“-Effekt der RdRp, bei dem der Polymerase-Komplex über die Uracil-Moleküle vor und zurück „rutscht“, und somit die Polyadenylierung durchführt³³⁻³⁵.

1.1.4. Export der vRNPs aus dem Nukleus

Um neue infektiöse Partikel zu bilden muss das virale Genom nach erfolgter Replikation aus dem Zellkern transportiert werden (Abbildung 1.2 (11 - 12)). Bei dem Exportmechanismus spielen das M1-Protein und das NEP eine zentrale Rolle^{25,36-38}. Nach erfolgter Proteinbiosynthese werden M1-Protein und NEP auf Grund ihrer NLS aktiv in den Zellkern importiert. Welche Domäne des M1-Proteins für die Bindung an die vRNPs bzw. NEP verantwortlich ist wird derzeit kontrovers diskutiert³⁹⁻⁴². Allgemein akzeptiert ist, dass das M1-Protein mit dem NEP interagiert, welches wiederum an Crm1 der Wirtszelle binden kann. Der so ausgebildete Komplex ist auch als „*daisy-chain*“ bekannt und wird unter GTP-Hydrolyse aktiv aus dem Zellkern exportiert. Es konnte gezeigt werden, dass vRNPs während des Replikationszyklus in der Wirtszelle den Export durch Kernporen stärker frequentieren, die der apikalen Zellorientierung (dem Ort der Bildung neuer Virione) zugewandt sind.

1.2.5 Entstehung neuer Virione an der Plasmamembran der Wirtszelle

Im letzten Abschnitt des Replikationszyklus von Influenza-A muss unter Anderem das virale Genom in neue Virione verpackt werden (Abbildung 1.2 (13)). Influenza verwendet für den Aufbau neuer Virione die Wirtszellplasmamembran an der apikalen Seite (Abbildung 1.3). Für diesen Prozess ist es essentiell, dass die Proteine HA, NA und M2 in der apikalen Plasmamembran vorhanden sind, unabhängig davon ob alle acht verschiedenen Segmente des viralen Genoms integriert wurden oder das Genom unvollständig ist¹². Wird durch Mutation der M2 C-Terminus entfernt kommt es nicht wie üblich zu sphärischen sondern zu stark ausgedehnten eher stäbchenförmigen Viruspartikeln⁴³. Während der Virion-Bildung bildet das M1-Protein eine Proteinschicht unterhalb der sich ausstülpenden Plasmamembran und unterstützt damit die

sphärische Form^{44,45}. Zusätzlich spielt das M1-Protein eine wichtige Rolle beim Schließen und Abschnüren des neuen Virions, dem sogenannten *Budding*⁴⁶.

Damit neue infektiöse Viren entstehen können, muss im Fall des Influenza-A-Virus sichergestellt werden, dass jedes Virion mindestens eine Kopie jedes Segmentes des viralen Genoms enthält. Es existieren zwei Hypothesen, die erklären, wie das Verpacken der Virione ablaufen könnte.

Die erste Hypothese unterstützt eine zufällige Verteilung der viralen Segmente auf die sich formenden Virione. Dabei wird kein Kontrollmechanismus vorausgesetzt, sondern vielmehr der statistische Zufall zugrunde gelegt, so dass einige Virione alle und andere Virione nicht alle notwendigen Segmente enthalten^{47,48}. Aufgrund jüngster Erkenntnisse erscheint die zweite Hypothese, die eine spezifische Verpackung beschreibt, der ein Kontrollmechanismus zugrunde liegt, jedoch am plausibelsten⁴⁹⁻⁵¹. Es wird angenommen, dass Signale in den einzelnen Genom-Segmenten vorhanden sind, die es ermöglichen das Packen zu kontrollieren. Die Existenz derartiger Signale konnte in den 5' und 3' nicht kodierenden und kodierenden Bereichen einiger viraler Segmente bereits gezeigt werden, was die Hypothese des spezifischen Verpackens unterstützt⁵²⁻⁵⁵.

Im letzten Schritt, nach Abschnürung des fertigen Virions, muss das virale Enzym Neuraminidase (NA) die mit dem Virion interagierenden Sialinsäurereste von zellulären Glykoproteinen bzw. Glykolipiden abtrennen, das das Virion sonst an der Plasmamembran der Zelle, aus der es generiert wurde, gebunden bleibt⁵⁶.

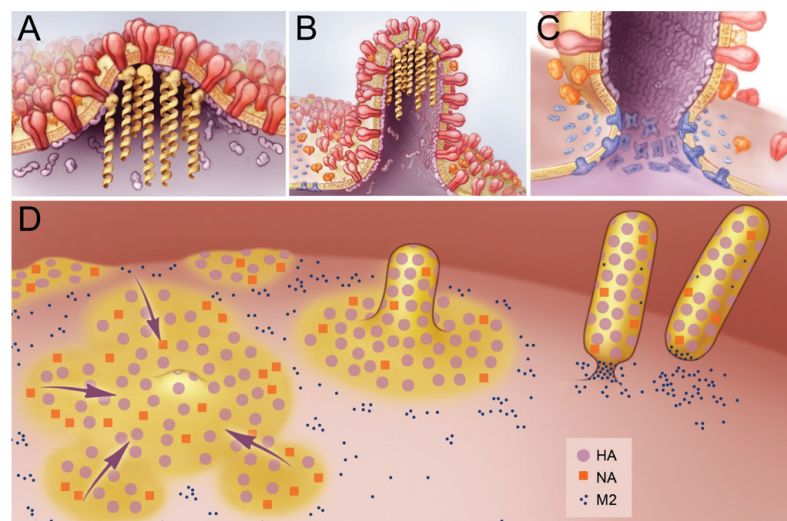


Abbildung 1.3 | Schematische Darstellung des „Buddings“ von Influenza-A Virionen | **A**. Initiation des *Buddings*-Prozess durch Anreicherung von HA (Rot) und NA (Orange) an der apikalen Seite der Plasmamembran. **B**. Wachstum neuer Virione auf Grund der Multimerisation von M1-Protein. **C**. Membranabschnürung durch M1-abhängige Membranwölbung. **D**. Überblick des *Budding*-Prozesses⁵⁷.

1.2. Typisierung von Influenza-A

Von der jährlich auftretenden Influenza-A-Virus Infektion sind Millionen Menschen betroffen⁵⁸. Die saisonale Epidemie verursacht nicht nur eine signifikante gesundheitliche sondern auch eine wirtschaftliche Bedrohung. Kommt es jedoch zu einer Pandemie mit einem besonders aggressiven Virus-Stamm so kann es auch zu schweren letalen Folgen kommen. Dabei spielt der Prozess des *reassortments* eine entscheidende Rolle.

Influenza-A-Viren können anhand der membranständigen Proteine HA und NA in unterschiedliche Subtypen eingeteilt werden. Dazu werden die Anfangsbuchstaben von HA und NA mit je einer Zahl spezifisch für deren Subtypen versehen z.B. H1N1. HA ist für den Wirts-Tropismus verantwortlich. Es erkennt entweder $\alpha 2,6$ oder $\alpha 2,3$ gebundene Sialinsäurereste der Wirtszellrezeptoren. Des Weiteren enthält HA eine Aminosäuresequenz, die von Wirtszellproteasen gespalten werden muss. Die Sequenz dieser Schnittstelle moduliert den Gewebe-Tropismus und somit die systemische Verbreitung. Dieser Zusammenhang kann einen Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung haben⁵⁹⁻⁶¹.

Derzeit zirkulieren 16 HA und 9 NA Subtypen im Geflügelreservoir. Die Subtypen H1N1 und H3N2 persistieren in der menschlichen Bevölkerung. Die HA Subtypen können auf Grund ihrer strukturellen Eigenschaften in zwei Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 1.4): Zur Gruppe 1 gehören H1a, H1b und H9 Kladen, der auch die H1 Subtypen der Pandemien von 1918 und 2009 und den saisonalen H1N1 zugehören. Zusätzlich gehört zur Gruppe 1 der als hochgradig pathogen eingestufte Geflügel-Influenza-Virus (HPAI) H5N1. Zur Gruppe 2 der HA-Subtypen gehören die Kladen H3 und H7, in die der humane Subtyp H3N2 und das HPAI H7N7 eingruppiert wird¹⁶.

Die Antigen-Evolution des saisonalen humanen Influenza-A-Virus erfolgt hauptsächlich über *Antigen-Drift*, bei dem es zu Mutationen in den HA- und NA-Genen kommt, welche in einer veränderten Aminosäuresequenz von HA und NA resultieren. Diese Aminosäureaustausche ermöglichen es dem Influenza-A-Virus, jährlich die Barriere des adaptiven Immunsystems zu überwinden. Gravierendere Veränderungen im HA-Gen werden jedoch durch einen *Antigen-Shift* verursacht und können häufig mit dem Aufkommen neuer Influenza Pandemien in Verbindung gebracht werden¹⁴.

Nicht nur die ständige Veränderung der Oberflächenantigene HA und NA machen das Virus zu einer ernstzunehmenden gesundheitlichen Bedrohung, sondern auch die Möglichkeit der zoonotischen Übertragung aus anderen Wirtsreservoirs. H5N1 ist ein letales Beispiel für eine Zoonose aus dem Geflügelreservoir¹⁴. Das Virus ist jedoch nicht fähig von Mensch zu Mensch übertragen zu werden, für eine Ansteckung ist der Kontakt mit infiziertem Geflügel erforderlich. Die erste Influenza-A-Virus-Pandemie des 21. Jahrhunderts hatte 2009 ihren Ursprung im Schweine-Influenza-Virus-Subtyps H1N1. Innerhalb eines Jahres infizierte das Virus Menschen aus 214 verschiedenen Ländern und verursachte weltweit mehr als 18000 Todesfälle⁶². Schätzungen gingen bis April 2010 sogar von 43 bis 89 Millionen infizierten Menschen allein in den

USA aus⁶³. Als es 2009 zur Verbreitung des H1N1-Subtyp kam, war es auf Grund systematischer Überwachung und dem Vorhandensein etablierter Tiermodelle möglich, den Influenza Erreger schnell zu charakterisieren und erforderliche Gegenmaßnahmen einzuleiten. Nichtsdestotrotz forderte der letale H1N1-Subtyp mehrere tausend Menschenleben, was weiterhin den Nutzen und die Notwendigkeit von zielgerichteter Grundlagenforschung unterstreicht, sowie die Optimierung der Reaktionsfähigkeit bei dem Auftreten neuer hoch pathogener Influenza-A-Virus-Subtypen unabdingbar macht¹⁶.

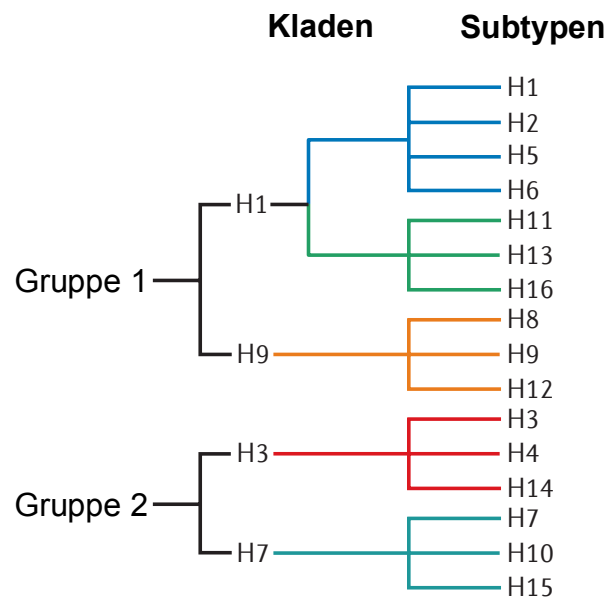


Abbildung 1.4| Klassifikation von Influenza-A Viren| Auf Grund von Antigeneigenschaften und Strukturmerkmalen von HA wird eine Klassifikation verschiedener Influenza-A-Viren vorgenommen. Dabei werden zwei Hauptgruppen unterschieden, die weiter in fünf Klade (Blau, Grün, Orange, Rot, Türkis) mit insgesamt 16 verschiedenen Subtypen unterteilt werden¹⁶.

1.3. Influenza-A-Virus Matrix Protein 1 (M1-Protein)

Das Influenza-A-Virus Matrix Protein 1 (M1-Protein) ist wie viele virale Protein multifunktional und spielt verschiedene Schlüsselrollen während des Replikationszyklus des Virus⁶⁴⁻⁶⁶. Das M1-Protein ist maßgeblich an der Formgebung und der Stabilität der Virione beteiligt, indem es eine Proteinmatrix aus Homooligomeren unterhalb der Lipiddoppelmembran ausbildet¹³. Die Proteinschicht aus M1-Proteinen konnte mittels Elektronen-Mikroskopie bildlich dargestellt werden (Abbildung 1.5 B). Dabei wurde beobachtet, dass das M1-Protein ein Gitter aus stäbchenförmigen Monomeren mit den Maßen 4,0 x 4,0 x 6,0 nm senkrecht zur Virus-Membran bildet⁶⁷. In nativen Influenza-A-Virionen werden des Weiteren helikale Strukturen des M1-Proteins in unmittelbarer Nähe zur Virushülle registriert^{68,69}. So dient die M1-Hülle unterhalb der Lipiddoppelmembran als Anker für das membranständige HA und den essentiellen Membran-Fusionsmechanismus, der zur Freisetzung des viralen Genoms in das Zytosol der Wirtszelle führt^{24,70}.

Zusätzlich bindet das M1-Protein die vRNPs innerhalb des Virions und bildet einen Proteinkomplex mit dem Nukleus-Export-Protein (NEP)^{71,72}. Eine weitere essentielle Funktion des M1-Protein wird während der späten Infektionsphase ausgeführt, indem das Protein den *Budding*-Prozess fördert (Abbildung 1.3). Wird das M1-Protein individuell, isoliert vom Influenza-A-Virus-Kontext, in einem Zellsystem synthetisiert kann die Formation von *virus like particles* beobachtet werden. Die Aminosäuresequenz des M1-Proteins und natürliche Polymorphismen im M1-Gen regulieren die Form der Virione. Da allein die Expression des M1-Gens ausreicht um Vesikelformation zu beobachten liegt es nahe, dass das M1-Protein eine Membranbindungsfähigkeit besitzt⁷³⁻⁷⁵. Eine Interaktion mit zytoplasmatischen Bereichen der membranständigen Influenza-A-Proteine (HA, NA und M2) ist während der Virion-Bildung von Bedeutung¹³.

Während des Influenza-A-Replikationszyklus ist der Transport der vRNP ein zentraler Bestandteil. Nach endosomaler Aufnahme werden die vRNPs durch eine pH-Wert abhängige Konformationsänderung des M1-Proteins in das Zytosol der Wirtszelle freigegeben⁷⁶. Im späten Abschnitt des Replikationszyklus wird auch das M1-Protein in den Zellkern transportiert wo es an die „neuen“ vRNPs binden kann⁷⁷. Durch die Bildung eines Proteinkomplexes aus NEP und M1-Protein, der als sogenannte „*daisy chain*“ bezeichnet wird und mit dem wirtszelleigenen Crm1-abhängigen Transportsystem interagiert, wird der Export der vRNPs ermöglicht^{25,36,71,72}. Dabei wird derzeit kontrovers diskutiert welche Domäne des M1-Proteins für die vRNP-Bindung und damit für den Transport zuständig ist³⁹⁻⁴². Eine Hypothese beschreibt, dass der N-Terminus des M1-Proteins die Protein-Protein-Interaktion mit dem NP bewirkt und das Sequenzmotif ¹⁰¹RKLKR¹⁰⁵ der M1-Mitteldomäne an die RNA bindet⁴². Im Gegensatz dazu wird von Baudin *et al.* (2001)⁷⁸ geschlossen, dass der C-Terminus des M1-Proteins für die Bindung an die vRNP von zentraler Bedeutung ist.

Das M1-Protein besteht aus 252 Aminosäuren mit einem anhand der Sequenz ermittelten Molekulargewicht von ~28,8 kDa und kann in vier Domänen unterteilt werden, den N-Terminus, einer Linker-Domäne L, die mittel oder M-Domäne und den C-Terminus (Abbildung 1.5 A)⁶⁵. 1998 ist es gelungen den N-terminalen Bereich und die M-Domäne des Proteins von Aminosäure 1 bis 158 (18 kDa) bei einem pH-Wert von 4,0 (PDB: 1AA7; Abbildung 1.5 C) und 2001 von Aminosäure 1 bis 164 bei neutralem pH-Wert zu kristallisieren (PDB: 1EA3) und dessen hochaufgelöste Struktur aufzuklären^{68,79,80}. Trotz intensiver Bemühungen ist es bis heute nicht gelungen, die Struktur des Volllänge-M1-Proteins mittels Röntgenstrukturanalyse mit atomarer Auflösung zu untersuchen. Die Strukturen der NM-Domäne des M1-Proteins bei saurem und neutralem pH-Wert unterscheiden sich nur gering, mit einer mittleren quadratischen Abweichung von 1.2 Å der 164 C α -Positionen. Bei beiden Strukturen wird die asymmetrische Einheitszelle aus einem Dimer aufgebaut. Mit Hilfe der thermisch aktivierten Tritium Bombardierung konnte kürzlich postuliert werden, dass es sich beim M1-Protein um ein polarisiertes Protein mit einem hochgeordneten N-Terminus mit Mitteldomäne (NM-Fragment) und einem möglicherweise eher unstrukturierten

C-Terminus handelt⁸¹. Diese Erkenntnisse könnten die Problematik bei der Kristallisation des Volllänge-M1 erklären. Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) bzw. Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS) sind Methoden, mit denen es möglich ist, Proteine, die flexible Domänen aufweisen zu untersuchen und deren Struktur bei niedriger Auflösung ($> 8 \text{ \AA}$) zu bestimmen⁸²⁻⁸⁵. SANS Experimente mit dem Volllänge-M1 zeigten einen Gyrationradius (R_g) von 2,9 nm, was für ein Protein mit einem Molekulargewicht (MW) von 28 kDa unerwartet hoch ist⁷⁹. Außerdem wurde bei diesem Experiment eine maximale Ausdehnung von 8 nm beobachtet die im Gegensatz zu den 6 nm der Elektronenmikroskopie-Experimenten stehen⁶⁷. Shtykova *et al.* (2013)⁸⁶ bestätigten mit Hilfe von SAXS-Experimenten, dass das aus nativen Virionen isolierte M1-Protein bei pH-Wert 5,0 in Lösung einen R_g von 2,9 nm und eine definierte NM-Domäne mit einem flexiblen C-Terminus aufweist.

Die Proteinkonformation bei saurem pH-Wert ist von physiologischer Relevanz, da unter sauren Bedingungen zum Beispiel die Struktur des M1-Netzwerkes während des Replikationszyklus gelockert wird und dies zur Freisetzung der vRNPs aus dem Virion führt⁸⁷. Weitere entscheidende Prozesse, an denen das M1-Protein beteiligt ist, wie der Export der replizierten vRNPs oder der Aufbau neuer Virione, finden hingegen bei neutralem pH-Wert statt^{37,64}. Daher ist es von zentraler Bedeutung die grundlegenden Mechanismen des multifunktionalen M1-Proteins besser zu verstehen und eine systematische Charakterisierung der Konformation sowie des Multimerisierungsverhaltens bei neutralem und saurem pH-Wert mit rekombinantem M1-Protein vorzunehmen.

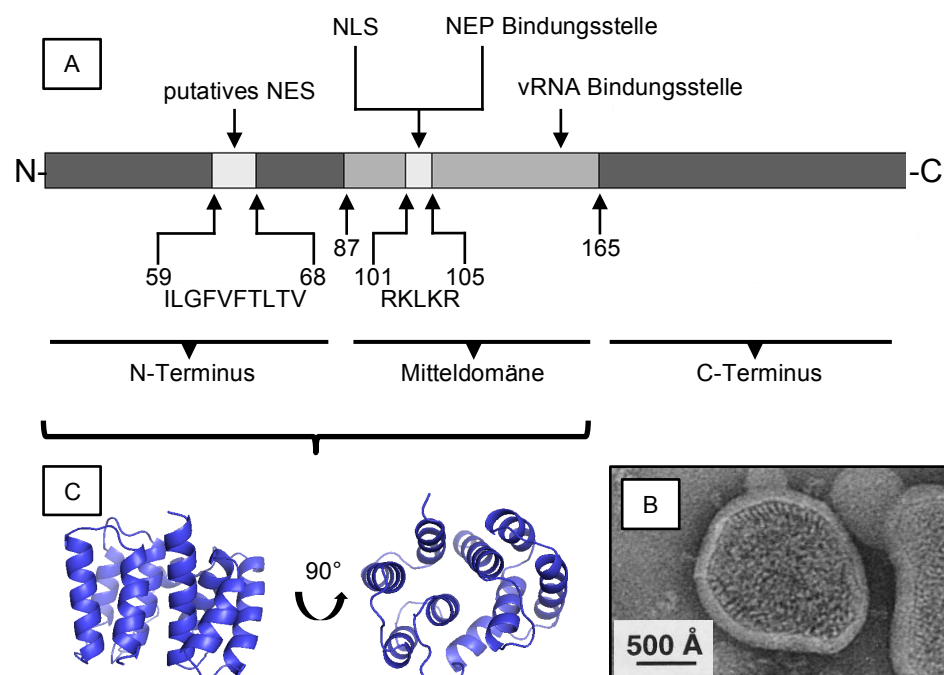


Abbildung 1.5| Domänen und Strukturmerkmale des M1-Proteins| A. Das M1-Protein kann grundlegend in drei Domänen unterteilt werden der N-Terminus, die Mitteldomäne und der C-Terminus. Das putative NES liegt im N-Terminus, am Export sind die Aminosäuren zwischen Position 59 und 68 beteiligt⁶⁴. In der Mitteldomäne liegt das

NLS, dass gleichzeitig als Bindungsstelle für NEP identifiziert wurde⁴². Welche Domäne die vRNP-Bindung ermöglicht wird kontrovers diskutiert^{42,78}. **B.** Das M1-Protein formt unterhalb der Lipiddoppelmembran ein stabilisierendes Protein-Netzwerk aus ca. 60 Å stäbchenähnlichen Strukturen (als weißen Stäbchen dargestellt)⁶⁷. **C.** Die hochauflösende Struktur des M1 Monomers zeigt überwiegend α -helikale Strukturelemente in Form von zwei Vier-Helix-Bündeln⁸⁰.

1.4. Influenza-A-Virus Nukleus-Export-Protein (NEP)

Ein mittlerweile detailliert untersuchtes Protein des Influenza-A-Virus ist das NS1, welches auf dem Gensegment 8 kodiert wird. Dieses multifunktionale Protein inhibiert zum Beispiel die Interferon Produktion sowie die Aktivität verschiedener Interferon-induzierten Gene. Zusätzlich wird von NS1 die Prozessierung und der Export von wirtszelleigener mRNA inhibiert⁸⁸.

Das Gensegment 8 kodiert nicht nur für das NS1, sondern auch für eine 121 Aminosäuren große Spleißvariante, welche als NS2-Protein bzw. synonym als Nukleus-Export-Protein (NEP) bezeichnet wird⁸⁹. Durch alternatives Spleißen oder Multifunktionalität der viralen Proteine kann die Genomkapazität des Influenza-A-Virus von ca. 15 kb optimal ausgenutzt werden⁹⁰. Ursprünglich wurde angenommen, dass das NS2-Protein nicht in infektiöse Virionen vorkommt und somit zu den Nichtstrukturproteinen gehört^{91,92}. Später konnte das NS2-Protein in geringen Konzentrationen in Virionen, wahrscheinlich an M1-Protein gebunden, nachgewiesen werden^{71,93,94}. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde vorgeschlagen, das Protein in „Nukleus-Export-Protein“ (NEP) umzubenennen⁹⁵.

Der energieabhängige Zellkernexport benötigt ein Protein mit einem spezifischen Nukleus Export Signal (NES), welches unabhängig von den umgebenden Aminosäuren des Proteins erkannt wird⁹⁶. Ein Protein mit einer NES ist in der Lage, andere Proteine oder auch Nukleinsäuren die an dieses Transportprotein binden, mit aus dem Zellkern zu transportieren. Es konnte gezeigt werden, dass NEP die Nukleus Export Funktion von der HIV-Rev ersetzen kann⁹⁵. NEP besitzt ein Leucin-reiches NES (₁₂ILMRMSKMQL₂₁), ähnlich dem zellulären Protein Crm1, das zur Importin- β -Familie gehört und ein Teil des Zellkernexport-Maschinerie darstellt^{25,96,97}. Daher ist eine der Hauptfunktionen von NEP als Adapterprotein an M1-Protein und an das Wirtszellexportprotein Crm1 zu binden um den Zellkernexport der viralen RNA zu ermöglichen (Abbildung 1.6)²⁵. Durch Infektion mit einem rekombinanten Virus ohne NEP oder mit einer durch Mutationen zerstörten Funktionalität der NES des NEPs wird der vRNP-Export aus dem Zellkern blockiert⁹⁵. Eine weiter außergewöhnliche Funktion des NEPs stellt die Interaktion mit der zellulären F₁F₀-ATPase dar, was eine Beteiligung am *Budding* neuer Virione suggeriert⁹⁸.

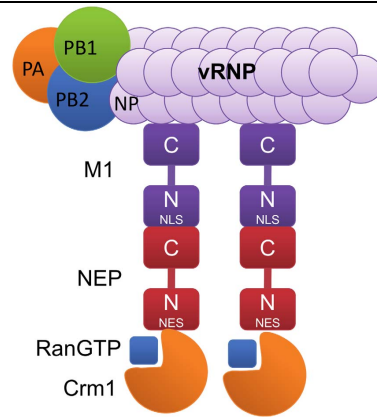


Abbildung 1.7| Das „daisy chain“ Model des Nukleus-Export-Komplexes der Influenza-A vRNPs| Das wirtszelleigene β -Importin Crm1 (Orange) ermöglicht die durch die Bindung an NEP (Rot) indirekt den Zellkernexport der vRNA. Das Adapterprotein NEP interagiert seinerseits mit M1-Protein (Lila), was an die vRNPs (Violett) gebunden ist.

Die Replikation des viralen Genoms kann in zwei Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Schritt wird zu der viralen RNA mit negativer Orientierung ein komplementärer RNA-Strang (cRNA) synthetisiert, der dann als Vorlage für die Vervielfältigung der vRNA dient. Die vRNA kann als Vorlage für virale mRNA und cRNA verwendet werden. Der Mechanismus, der den viralen Polymerasekomplex veranlasst entweder Translation oder Replikation durchzuführen bzw. zwischen beiden Prozessen zu wechseln ist weitgehend unklar. Jedoch konnte gezeigt werden, dass NEP an der Umstellung zwischen Translation und Replikation der viralen RNA beteiligt ist⁹⁹.

Akarsu *et al.* konnten 2003 mittels limitierter Proteolyse der N-terminalen Domäne die Crm1-Bindungsaffinität und der C-terminale Domäne die M1-Bindungsaffinität zuweisen. Außerdem konnten durch die Ermittlung der Kristallstruktur des C-Terminus (NEP⁵⁹⁻¹¹⁶) bei einer Auflösung von 2,6 Å die Epitope bestimmt werden, die an der M1-Protein Bindung beteiligt sind. Im M1-Protein ist zwischen den Aminosäuren 89 und 164 des N-Terminus das basische Motiv ¹⁰¹RKLKR¹⁰⁵ lokalisiert. Dieses ermöglicht einerseits die Bindung an negativ geladene Liposomen, es wird aber auch vom zellulären Kernimportsystem als Nukleus Lokalisationssignal (NLS) erkannt⁴². Eine M1-Variante mit Alanin-Mutationen (¹⁰¹AALAA¹⁰⁵) im basischen auf deren Bindungseigenschaft an NEP mit Immunpräzipitationstest untersucht, welche eine signifikant geringere Affinität zu NEP gegenüber dem Wildtyp-M1-Protein zeigte. Somit konnte die Beteiligung der NLS des M1-Proteins an der Interaktion mit NEP nachgewiesen werden. Kontrovers zur Beteiligung des N-Terminus des M1-Proteins an der NEP Bindung ist jedoch die Studie von Baudin *et al.* (2001), welche eine direkte Interaktion des C-Terminus mit NEP postuliert. Als Bindungskriterium auf Seiten des NEP konnte Trp78 identifiziert werden (Abbildung 1.7 A, B), was durch gezielte Mutation dieser Aminosäure bestätigt werden konnten¹⁰⁰.

Die Bindung von NEP an das M1-Protein ist ein Schlüsselereignis während des Zellkernexports der viralen RNP. Eine Unterbindung dieser Proteinkomplexbildung würde sowohl den Export als auch die anschließende Bildung infektiöser Virione verhindern.

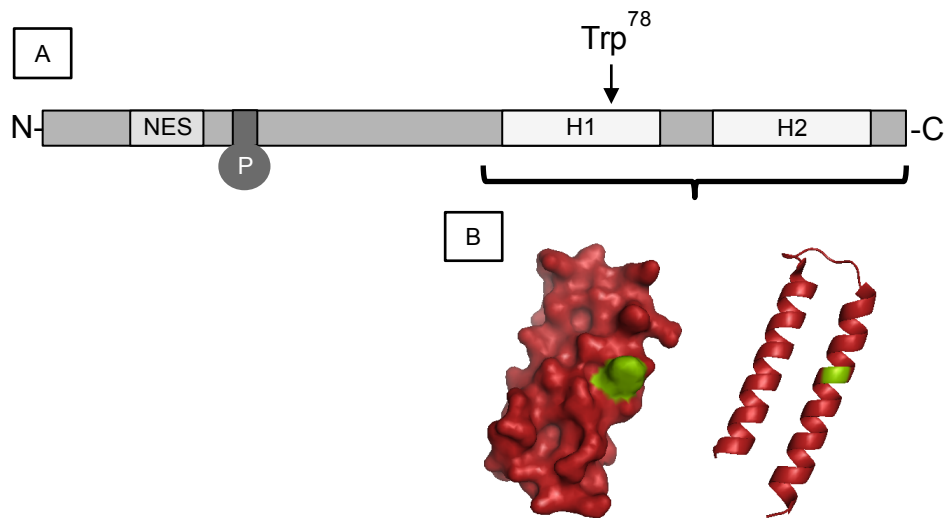


Abbildung 1.7| Schematische Repräsentation und Strukturmerkmale von NEP| A. Das N-terminale NES ermöglicht die Bindung mit dem Wirtszell β -Importin Crm1. Ein Serin-reiches Motiv kann während der Infektion phosphoryliert werden (P). Im C-terminalen Bereich befindet der Rest Trp⁷⁸ (B., Grün), welcher maßgeblich an der Bindung von M1-Protein beteiligt ist¹⁰⁰. **B.** Die hochaufgelöste Struktur des C-Terminus (PDB: 1PD3) zeigt zwei antiparallele α -Helices (Rot)¹⁰⁰.

1.5. Angewandte Strukturbioogie Methoden

Seit den späten 80er Jahren ist die Anzahl der hochaufgelösten Proteinstrukturen, die in der Protein Datenbank (PDB) veröffentlicht wurden, exponentiell angestiegen¹⁰¹. Wurden im Jahr 2000 noch ca. 3000 Proteinstrukturen pro Jahr hinterlegt, konnten im Jahr 2015 bereits 11000 Einträge registriert werden.

Dieser Entwicklung ist es zu verdanken, dass mittlerweile detaillierte Einblicke in Funktionen von komplexen Systemen ermöglicht werden^{102,103}. Die konventionelle Röntgenkristallographie ist seit Jahrzehnten eine etablierte Methode um hochaufgelöste Strukturen im Ångström (Å) Bereich von biologischen Makromolekülen zu bestimmen^{85,104,105}. Einen großen Anteil an dem stetigen Anstieg an neuen hochaufgelösten Proteinstrukturen haben die Fortschritte im Bereich der rekombinanten Proteinproduktion, die es möglich machten Proteine mit hoher Reinheit und in ausreichender Menge herzustellen¹⁰¹. Für eine hohe Qualität der hochaufgelösten Struktur ist es essentiell, einen Proteinkristall mit ausreichender Größe und guten Streuungseigenschaften herzustellen. Oftmals ist aber genau die Herstellung solcher Proteinkristalle das Problem, an dem die hochaufgelöste Strukturaufklärung scheitert. Sollen konformationelle Änderungen von Proteinen untersucht werden, wie z.B. bei der Komplexbildung oder bei pH-Wert-Änderungen befinden sich die Proteine üblicherweise in Lösung. Da in wässriger Umgebung allerdings viele verschiedene konformationelle Zustände des zu untersuchenden Proteins gleichzeitig vorliegen können, ist es von großer Bedeutung strukturaufklärende Methoden zu verwenden, die eine Charakterisierung von einem Ensemble verschiedener Zustände von biologischen Makromolekülen zulassen.

1.5.1. Zirkular Dichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Die Zirkular Dichroismus (CD) Spektroskopie bietet die Möglichkeit, aufgrund des Absorptionsverhaltens von Proteinen die Sekundäranteile zu bestimmen. Die aromatischen Aminosäuren jedes Proteins absorbieren das zirkular polarisierte Licht spezifisch, was zur Beurteilung von Tertiärstruktur-Änderungen herangezogen werden kann. Mit diesen Erkenntnissen können erste strukturelle Einblicke in eine unbekannt Probe erhalten werden¹⁰¹.

Bei der CD-Spektroskopie wird zirkular polarisiertes Licht erzeugt, das als Zusammensetzung von rechts und links rotierendem Licht gleicher Intensität beschrieben werden kann. Beim Zirkular Dichroismus absorbiert eine optisch aktive Substanz entweder den rechts oder den links rotierenden Anteil des polarisierten Lichts stärker bzw. schwächer, was als Elliptizität bestimmt werden kann. Proteine besitzen chirale Zentren wie C-Atome mit vier verschiedenen Substituenten oder Disulfid-Bindungen, die ein charakteristisches CD-Spektrum aufweisen. Einen weiteren Anteil an der Elliptizität bei einer CD-Messung trägt die asymmetrische dreidimensionale Struktur der Proteine, die es ermöglicht Aussagen über die Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente zu treffen¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.

Bei einer CD-Messung wird die Elliptizität in Abhängigkeit der Wellenlänge gemessen. Generell trägt jeder Bestandteil einer Probe, sofern er optisch aktiv ist, zu dem Absorptionsspektrum bei. Üblicherweise absorbieren dabei Chromophore und die Peptidbindung bei Wellenlängen < 240 nm, aromatische Aminosäuren zwischen 260 und 320 nm und Disulfid-Bindungen bei 260 nm¹⁰¹.

Peptidbindungen absorbieren das zirkular polarisierte Licht auf Grund der Übergänge von SP₂ zu SP₃ Hybridisierung des an der Bindung beteiligten Stickstoffatoms. Unterschiedliche Sekundärstrukturelemente wie α -Helix, β -Faltblatt und *random coil* weisen ein charakteristisches CD-Spektrum auf (Abbildung 1.8 A), die eine Zusammensetzungsbestimmung der Strukturelemente eines Proteins ermöglichen^{101,110}.

Im UV-Wellenlängenbereich zwischen 260 - 320 nm absorbieren aromatische Aminosäuren das zirkular polarisierte Licht, wobei jede aromatische Aminosäure ein spezifisches Absorptionsprofil aufweist (Abbildung 1.8 B). So zeigt Tryptophan (Trp) einen Elliptizitäts-*Peak* bei ca. 290 nm, Tyrosin (Tyr) zwischen 275 - 282 nm und Phenylalanin (Phe) zeigt schwächere, aber scharfe Elliptizität zwischen 255 und 270 nm¹⁰¹. Wie ein CD-Spektrum im nahen UV-Bereich (260 - 320 nm) für ein spezielles Protein aussieht, hängt von der Anzahl der einzelnen aromatischen Aminosäuren, ihrer Beweglichkeit und ihrer Umgebung (Wasserstoffbrückenbindungen, polare Gruppen und Polarisierungen) ab. CD-Spektren des nahen UV-Bereichs lassen sich für die Untersuchung unterschiedlicher konformationeller Zustände eines Proteins, z.B. durch Mutation bestimmter Reste oder durch pH-Wert-Änderung ausgelöst, heranziehen. Es können jedoch keine quantitativen bzw. detaillierten Aussagen über die strukturellen Änderungen getroffen werden^{101,111-113}.

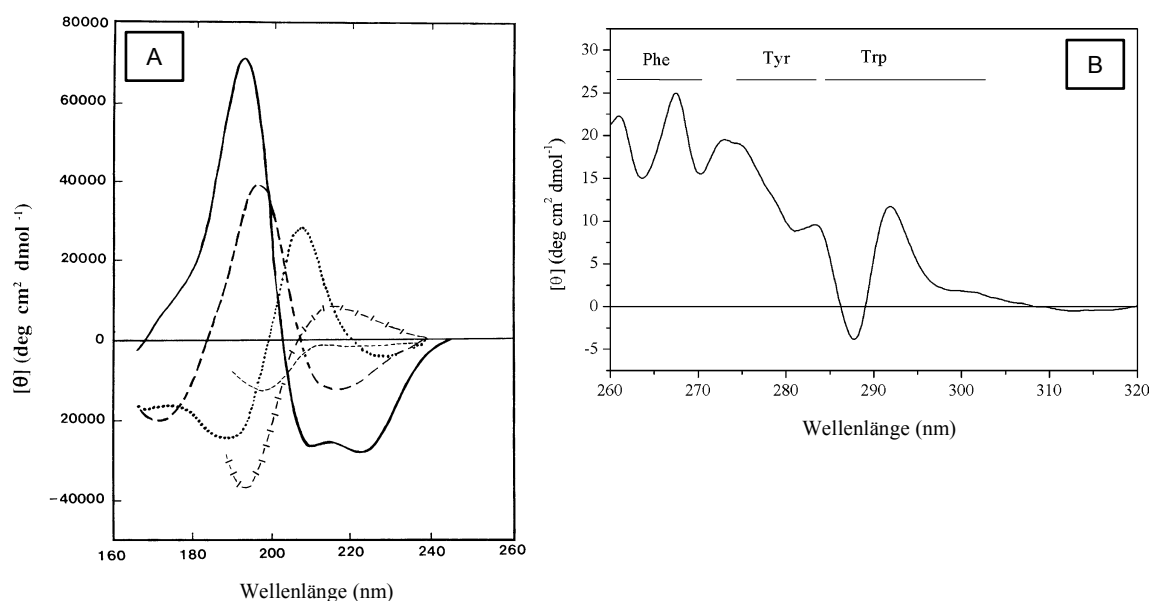


Abbildung 1.8| Elliptizitäts-Charakteristika von Protein-Sekundärstrukturelementen und dem Signalbereich aromatischen Aminosäuren] **A.** Fernes UV CD-Spektrum verschiedener Sekundärstrukturelement-Typen. Die durchgehende Linie repräsentiert die charakteristische Elliptizität einer reinen α -Helix, die lang gestrichelte Linie die des reinen antiparallelen β -Faltblatts, die gepunktete Linie die charakteristische Elliptizität des Typ I β -Turn, während die kurz-gestrichelte Linie die einer langgestreckten 3_1 -Helix oder einer Poly-Prolin II Helix und die durchgezogene Linie die eines vollständig ungefalteten Proteins zeigt¹⁰¹. **B.** Nahes UV CD-Spektrum der Typ II Dehydrogenase von *Streptomyces coelicolor* zur Illustration der charakteristischen Elliptizitätsbereiche aromatischer Aminosäuren. Die gekennzeichneten Bereiche der Aminosäuren Phe, Tyr und Trp zeigen die Wellenlängen bei denen die charakteristische Absorption verstärkt auftritt. Dabei ist zu beachten, dass die charakteristischen Bereiche durchaus überlappen können¹¹⁴.

1.5.2. Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

An Synchrotron Strahlungsquellen wie z.B. PETRA III (DESY, Hamburg) können auch Röntgenstreuungsexperimente von Proteinen in Lösung durchgeführt werden (Feigin & Svergun, 1987). Mit Hilfe der Kleinwinkelstreuung (SAS) von Röntgenstrahlung (SAXS) und Neutronen (SANS) lassen sich grundlegende strukturelle Eigenschaften von verdichteter Materie bestimmen. Die Anwendungsmöglichkeiten reichen von Untersuchung von Metalllegierungen über Emulsionen, synthetischen Polymeren und Nanopartikeln bis hin zu biologischen Makromolekülen.

In den späten 40-iger Jahren wurde von André Guinier das grundlegende Prinzip der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) entwickelt um damit metallische Legierungen zu untersuchen (Guinier, 1939). Es konnte schon früh gezeigt werden, dass von Materie gestreute Röntgenstrahlen (Abbildung 1.9) bei kleinen Streuwinkeln nahe des Primärstrahls Strukturinformationen enthalten. Die inhomogene Verteilung der Elektronendichte der untersuchten Probe ist der ausschlaggebende Faktor, der die Strukturanalyse ermöglicht und die Charakterisierung in einem weiten Größenbereich der Zielstruktur von wenigen Nanometern (nm)

bis hin zu mehreren Hundert nm zulässt. 1955 fanden Guinier und Fournet heraus, dass aus SAXS-Daten nicht nur Größe und Form eines Partikels bestimmt, sondern auch interne Struktur-Modelle von ungeordneten bzw. partiell geordneten Systemen berechnet werden können. Seit den 70-iger Jahren wird diese Methode zunehmend für Untersuchung von biologischen Makromolekülen eingesetzt, da das Experiment keinen kristallinen Zustand erfordert. Als Ergebnis werden niedrig aufgelöste Informationen über die Oberflächenform und die grobe Anordnung der Proteins-Domänen geliefert. Mit der Etablierung der ersten Synchrotronstrahlenquellen in den 80er Jahren wurde die für ein einzelnes SAXS-Experiment benötigte Messzeit signifikant verringert. Gleichzeitig wurde es bedingt durch die deutlich erhöhte Brillanz der Strahlung möglich auch intermolekulare Interaktionen oder Konformationsänderungen von Domänen zu untersuchen. Optimalerweise handelt es bei einer SAXS-Probe um eine homogene verdünnte Lösung des Makromoleküls in einer möglichst physiologischen Umgebung ohne spezielle Additive. Eine verdünnte Proteinlösung stellt eine vergleichsweise einfache Probenpräparation dar, im Gegensatz zur teilweise sehr aufwendigen Herstellung eines Proteinkristalls, welche in einigen Fällen auch nicht erfolgreich sein kann. Der bei einem SAXS-Experiment gewonnene Informationsgehalt ist aufgrund der Summation aller zufälligen Orientierung der Proteine in Lösung deutlich geringer als bei der konventionellen Röntgenkristallographie. Eine der größten Herausforderungen bei der SAXS-Datenanalyse ist die Errechnung von dreidimensionalen Struktur-Modellen anhand von eindimensionalen Primärdaten, welche aus den Intensitäten des gestreuten Röntgenstrahls in Abhängigkeit des Streuwinkels bestehen⁸². In der Vergangenheit konnten nur wenige Parameter der untersuchten Partikel, wie z.B. Volumen und Gyrationradius, direkt aus den Primärdaten gewonnen werden. Berechnungen von dreidimensionalen Modellen beschränkten sich auf einfache geometrische Körper oder wurden rudimentär nach dem Versuch und Irrtum Prinzip empirisch ermittelt^{82,117}. Oft wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Aufnahmen herangezogen um die generierte Modelle zu verwerfen bzw. zu validieren^{118,119}. In den 90er Jahren verlor die SAS-Methodik jedoch immer mehr an Bedeutung für die strukturelle Charakterisierung von biologischen Makromolekülen. Ein Grund dafür könnte die Stagnation der technischen Weiterentwicklung sein, in Kombination mit dem geringen Gehalt an Strukturinformationen, die aus SAS-Daten erhalten werden konnten. Auch die Etablierung von zeitaufgelösten SAS-Experimenten an Polymeren¹²⁰ konnte den Abwärtstrend nicht verhindern. Erst um die Jahrtausendwende konnten durch signifikante Optimierungen Datenanalysemethoden glaubwürdige *ab initio* Oberflächenformen-Rekonstruktionen, Domänenstrukturen sowie detailliertere Struktur-Modelle von Makromolekülkomplexen ermittelt werden¹²¹, was die Bedeutung der SAS-Technik nachhaltig erhöhte. Mittlerweile lassen sich durch ein SAS-Experiment verlässliche Aussagen über flexible Bereiche oder Konformationsänderungen von biologischen Makromolekülen in Abhängigkeit vom pH-Wert, Temperatur oder Ligandenbindung über einen weiten Massenbereich

(1 bis 100 nm Partikeldurchmesser) treffen^{83,85,122,123}. Durch die technischen Fortschritte im Bereich der Röntgenstrahlfokussierung und die sehr hohe Brillanz von PETRA III, einer Synchrotronstrahlenquelle der 3. Generation, sind die durch SAXS-Messungen erhaltenen Strukturdetails weiter optimiert und gleichzeitig die Messzeiten erneut signifikant reduziert worden.

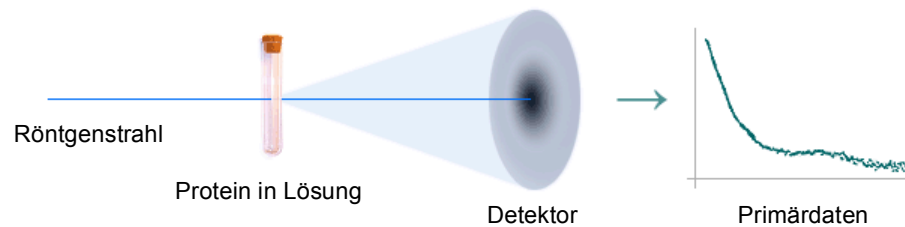


Abbildung 1.9| Schematische Darstellung eines typischen SAXS-Experiments| Der Röntgenstrahl trifft auf eine Probe, im Fall von M1-Protein, ein Protein in Lösung. Der Röntgenstrahl wird von den Partikeln in der Lösung gestreut und trifft auf einen Detektor. Die Primärdaten setzen sich aus den Intensitäten des gestreuten Röntgenstrahls in Abhängigkeit des Streuwinkels zusammen und geben Informationen über Größe und Form des untersuchten Partikels.

1.5.3. Moderne Entwicklungen im Bereich der Röntgenkristallographie

Für die Röntgenstrukturanalyse von biologischen Makromolekülen werden heutzutage hauptsächlich Synchrotron-Strahlungsquellen eingesetzt, deren erste Generation in den frühen 1980er Jahren in Betrieb genommen wurde. Synchrotronstrahlen weisen eine um den Faktor 16 gesteigerte Brillanz gegenüber herkömmlicher Röntgenstrahlung auf, wodurch das Beugspotential von Proteinkristallen besser genutzt werden konnte. In den folgenden Jahren konnten weitere Fortschritte durch verbesserte Röntgenspiegel und Monochromatoren im Bereich der Strahlfokussierung errungen werden, so dass immer kleinere Kristalle untersucht werden konnten^{124–126}. Zusätzlich wurde auf Grund eines zentrierten Röntgenstrahls die Hintergrundstreuung vermindert und somit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis enorm zu Gunsten des Signals verschoben¹²⁷. Mittlerweile existieren moderne Synchrotron-Strahlungsquellen dritter Generation, bei denen durch optische Techniken und einen gut kollimierten Photonenstrahl Photonenflussdichten von bis zu 10^{15} Photonen pro Sekunde auf einer Fläche von $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ generiert werden können (DESY, P14 EMBL MX2 *beamline*). Selbst diese hoch brillanten Strahlenquellen ermöglichen es nicht, dass ein kompletter Diffraktions-Datensatz aufgenommen werden kann bevor das maximale Dosislimit von 30 MGy pro Kristall bei 100 K erreicht wurde. Allerdings werden derzeit neue Methoden entwickelt, um einen kompletten Datensatz durch Vereinigung von Beugungsdaten vieler sehr kleiner Kristalle zu erhalten, wie z.B. die serielle Kristallographie.

Bei der seriellen Kristallographie werden meist zahlreiche Kristalle entweder in einer Nylon-Schleife oder in einem feinen Gitter bestehend aus röntgengängiger Kapton®-Folie für die Datenaufnahme vorbereitet. Zunächst wird ein Kristall solange mit dem Röntgenstrahl belichtet und helikal durchgerastert bis eine Abnahme der Streuungsqualität registriert wird. Darauf folgend

wird mit dem nächsten Kristall in gleicher Weise verfahren¹²⁸. Alternativ kann ein mit Kristallen beladener Proben-Loop oder ein Gitter-Sieb systematisch abgerastert werden, wird dabei ein Kristall in zufälliger Orientierung getroffen entsteht ein Beugungsbild. In einem nachgeschalteten softwaregestützten Prozess werden leere Bilder von den Beugungsbildern getrennt und alle indizierten Beugungsbilder zu einem kompletten Datensatz zusammengeführt¹²⁹. Nach der Vereinigung erfolgt die Prozessierung des Datensatzes analog zur konventionellen Kristallographie. Mittels serieller Kristallographie konnten in den vergangenen Jahren einige Kristallstrukturen von Protein aufgeklärt werden, bei denen es zuvor als schwierig galt, die Struktur mit konventioneller Kristallographie zu ermitteln^{130–136}.

Die jüngsten Entwicklungen im Bereich der Strukturaufklärung von biologischen Makromolekülen stellen sogenannte freie Elektronenlaser (FEL) dar. Mit Hilfe dieser Großgeräte werden kohärente Röntgenpulse im Femtosekunden-Bereich (fs) erzeugt, die eine bis zu 10 Größenordnungen höhere Brillanz im Vergleich zu Synchrotronstrahlenquellen der dritten Generation aufweisen. 2009 ging die *Linac Coherent Light Source (LCLS)*, der erste FEL der Pulse im Bereich der harten Röntgenstrahlung erzeugte, in Stanford (USA) in Betrieb und gilt bis heute als die brillianteste Röntgenstrahlenquelle weltweit¹³⁷. Bereits 2000 wurde von Neutze *et al.* das ‚*diffraction before destruction*‘-Prinzip postuliert, das besagt, dass es möglich ist, Streuungsdaten mit Hilfe eines fs-Pulses an einem Proteinkristall zu erzeugen und mittels eines ultra-schnellen Detektors zu detektieren, bevor die ersten Anzeichen von Strahlenschäden im Kristall erkennbar werden¹³⁸. Die von einem FEL-Röntgenpuls getroffenen Kristalle werden nach etwa 40 fs vollständig zerstört, so dass für die Aufnahme des nächsten Diffraktionsbildes ständig neue, identische Kristalle in den geplusten Röntgenstrahl nachgeliefert werden müssen¹³⁸. Daher ist eine große Anzahl an identischen Kristallen für die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes erforderlich. Zunächst konnte das *diffraction-before-destruction*-Prinzip mit Hilfe von niedrigenergetischen Pulsen (FLASH, DESY Hamburg) grundlegend nachgewiesen und sechs Jahre später am LCLS durch Berechnung der Struktur des Membranproteins Photosystem I aus individuellen Beugungsdaten von zehntausenden identischer Kristalle bestätigt werden. Zu dieser Zeit wurde der Begriff „serielle Femtosekunden-Kristallographie“ (SFX) geprägt^{139–141}. Seitdem konnten mit der SFX-Methode mehr als 20 weitere Proteinstrukturen aufgeklärt werden¹⁴². Unter anderem konnte die Struktur der noch unbekanntes, nativ inhibierten Cystein-Protease Cathepsin B aus dem Parasiten *Trypanosoma brucei* bestimmt werden. Die für die Analyse verwendeten Proteinkristalle bildeten sich spontan in Sf9 Insektenzellen während rekombinanter Überexpression des Zielgens¹⁴³.

1.5.4. *In vivo*-Kristallisation

Die spontane Kristallisation von Proteinen in lebenden Zellen (als *in vivo*-Kristallisation bezeichnet) ist ein seltenes natürlich vorkommendes Phänomen, das schon seit mehr als 100 Jahren bekannt

ist¹⁴⁴. Pflanzen speichern Energie, indem Proteine bei entsprechend hoher Konzentration in den Zellen kristallisieren und bei Bedarf wieder in Lösung übergehen¹⁴⁵. Ein weiteres Beispiel ist das menschliche Insulin, das in den β -Zellen des Pankreas in Form von Zink-koordinierten Kristallen gespeichert und bei ansteigendem Blutzuckerspiegel in löslicher Form freigesetzt wird¹⁴⁶. Auch in Peroxisomen von Hefezellen können Enzym-Kristalle entstehen¹⁴⁷. *In vivo* Kristalle bilden sich nicht ausschließlich in eukaryotischen, sondern auch in prokaryotischen Zellen. So ist das Bakterium *Bacillus thuringiensis* beispielsweise in der Lage, Toxine intrazellulär in Form von Kristallen zu speichern. Obwohl die beschriebenen Prozesse der spontanen Kristallisation von Proteinen in lebenden Zellen natürlichen Ursprungs sind, wurden lange Zeit als atypisch angesehen, so dass deren zelluläre Grundlagen und Mechanismen bisher weitgehend unbekannt sind.

Auf der Suche nach einer Möglichkeit, verschiedenste Proteine rekombinant in lebenden Zellen herzustellen, konnte das 28 kDa schwere Polyhedrin des Invertebraten infizierende Baculovirus identifizieren¹⁴⁸. Das Virus der Familie *Baculoviridae* exprimiert große Mengen des Polyhedringens während der späten Infektionsphase. Dadurch bilden sich extrem stabile Kristalle um das Virion herum, so dass es nach dem Austritt aus der Wirtszelle vor Umwelteinflüssen geschützt wird^{136,149}. 2006 konnte von Coulibaly *et al.* die hochaufgelöste Struktur der intrazellulär gewachsenen Polyhedrinkristalle ermittelt werden, was die erste erfolgreiche Strukturaufklärung eines Proteins unter Verwendung von *in vivo*-Kristallen darstellt¹³⁶. Bemerkenswert ist der mit 19% extrem niedrige Wasseranteil der Polyhedrin-Kristalle, ein Indiz für deren hohe Stabilität¹³⁶. Die hohe Aktivität des Polyhedrin-Promotors wird routinemäßig genutzt um Proteine rekombinant mit posttranslationalen Modifikationen in Insektenzelllinien wie Sf9, Sf21 oder TriEx Sf9 herzustellen. Prinzipiell kann jede beliebige Zielgenesequenz hinter den Polyhedrin-Promoter kloniert werden, was meist überwiegend zur Synthese von großen rekombinanten Proteinmengen führt¹⁵⁰. Dieses kommerziell erhältliche Baculovirus-Insektenzell-Expressionssystem wird mittlerweile standardmäßig eingesetzt, um ausreichende Mengen an löslichen, meist posttranslational-modifizierten Proteinen für die konventionelle Kristallographie zu produzieren. Dabei wurde in seltenen Fällen die spontane Bildung intrazelluläre Kristalle beobachtet, die aber zunächst als atypische und ungewollte Artefakte betrachtet wurden¹⁵¹. Die *in vivo*-Kristalle hatten maximal die Dimension einer lebenden Insektenzelle, also eine Länge von etwa 20 μm was zu dieser Zeit zu klein für die Aufnahme von Beugungsdaten an vorhandenen Synchrotronstrahlungsquellen war¹⁴⁴. Außerdem wurde irrtümlicherweise angenommen, dass das Kristallwachstum durch das Volumen der Zelle limitiert ist, was es überflüssig erscheinen ließ, Insektenzellen zur Herstellung von Diffraktions-tauglichen Kristallen zu verwenden¹⁵². Die Wende brachte die Entwicklung der FELs, insbesondere des 2009 in Betrieb genommenen LCLS in Stanford. Mit Hilfe dieser brillanten Röntgenstrahlenquellen war es erstmals möglich, Streuungsdaten von spontan in Sf9 Zellen gewachsenen Proteinkristallen der lysosomalen Protease Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei*

(CatB) bis zu einer Auflösung von 1,9 Å aufzunehmen. Ein Jahr später konnte die Detailstruktur des vollständig glykosylierten und nativ inhibierten Pro-Cathepsin B mit einer Auflösung von 2,1 Å gelöst werden, welche als erste mit einem FEL generierte neue biologische Information gilt¹⁴³. Zusätzlich konnten an der P14 Strahlenführung der Synchrotronstrahlungsquelle PETRA III (DESY, Hamburg) mittels serieller Kristallographie vergleichbare Beugungsdaten von *in vivo*-generierten Cathepsin B Kristallen aufgenommen werden. Damit war generell gezeigt, dass auch Synchrotron-Strahlungsquellen neuester Generation in der Lage sind, Strukturinformationen von *in vivo*-Kristallen im geringen µm-Maßstab zu erzeugen¹³⁵. Seit der ersten Beobachtung der Röntgenbeugung von *in vivo*-Kristallen sind in dieser Arbeitsgruppe weitere Proteine erfolgreich in Sf9 Zellen kristallisiert und deren Beugungseigenschaften teilweise durch SFX oder Synchrotronstrahlung bestätigt worden (Abbildung 1.10). Die zellulären Mechanismen, die der Bildung von intrazellulären Kristallen zu Grunde liegen sind aber nach wie vor weitgehend unbekannt.

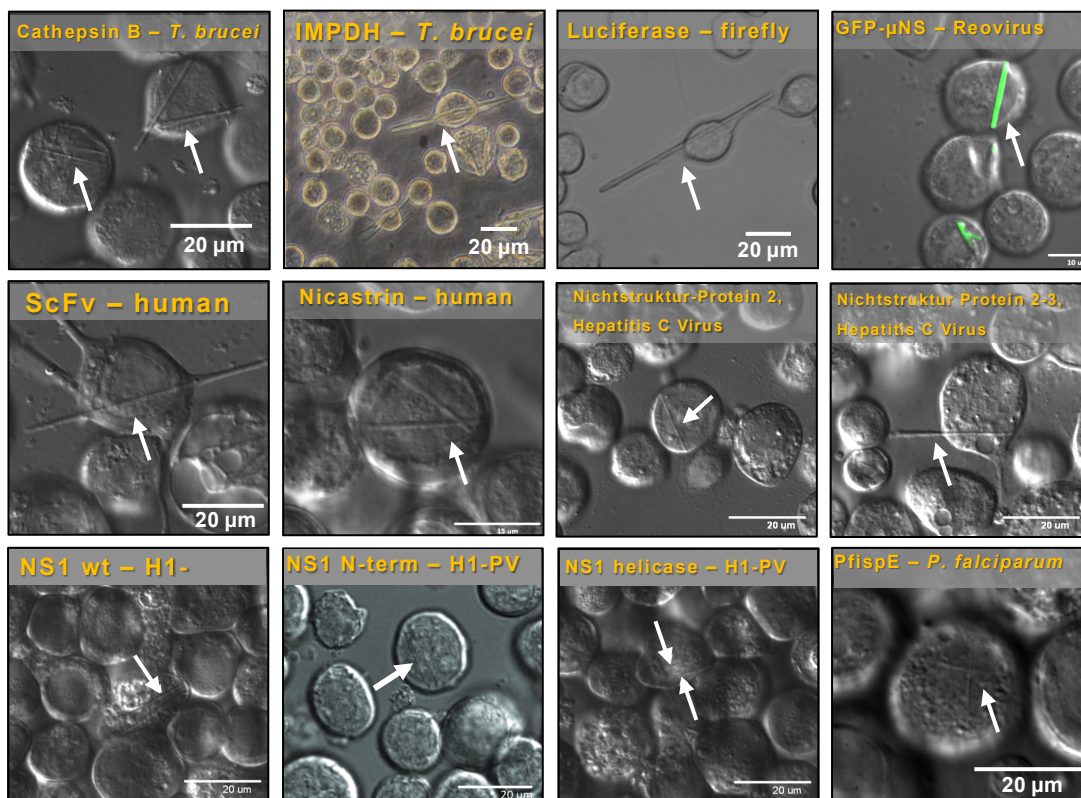


Abbildung 1.10 | *In Sf9-Zellen kristallisierte Proteine der Arbeitsgruppe* | Es konnten bereits mit Hilfe von Diffraktionstest nachgewiesen werden, dass CatB, Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), Luciferase und Nicastrin Proteinkristalle in Sf9-Zellen ausbilden. Bei allen andern aufgeführten Überexpressionen in Sf9-Zellen wurden kristalline Strukturen erkannt konnten aber noch nicht auf Diffraktionseigenschaften getestet werden.

In dieser Arbeit werden fortschrittliche Techniken der Strukturbiologie wie z.B. SAXS und *in vivo* Kristallisation mit etablierten Methoden wie z.B. Atomkraftspektroskopie und CD-Spektroskopie kombiniert um strukturelle und funktionelle Einblicke über das M1-Protein und dessen

Interaktionspartner NEP von Influenza-A zu geben und damit den Replikationszyklus des Virus besser verstehen zu lernen.

2. Zielsetzung

Die saisonal auftretende Influenza-A-Virus-Epidemie verursacht jährlich eine Erkrankung von Millionen Menschen. Neben der gesundheitlichen und wirtschaftlichen Belastung kann es durch ein *reassortment*-Ereignis zur Entstehung besonders aggressiver Viren kommen. Die Globalisierung trägt dazu bei, dass sich solch ein Virus schnell ausbreiten kann und zu einer ernstzunehmenden Pandemie führt. Wichtige Schlüsselproteine, wie das Matrix Protein 1 (M1) sowie das Nukleus-Export-Protein (NEP), übernehmen während der viralen Replikation essentielle Funktionen. So bilden homo-oligomere Strukturen des M1-Proteins im Innern der Virione ein Netzwerk, das die Virione formt und stabilisiert. Zusätzlich bildet das M1-Netzwerk den Ankerpunkt für das virale Genom. In der frühen Phase der Influenza-A-Infektion wird das Virus rezeptorvermittelt endosomal in die Wirtszelle aufgenommen. Der Innenraum des Endosoms wird durch einen Wirtszellenschutzmechanismus angesäuert^{153,22}. Damit die virale RNA in das Zytosol der Wirtszelle freigesetzt werden kann muss sie aus dem Virion freigesetzt werden. Hierzu wird durch den sauren pH-Wert die intermolekulare M1-M1- und die M1-vRNA-Interaktion geschwächt, so dass die vRNA freigesetzt wird⁸⁷. Nach wie vor ist unbekannt, ab welchem pH-Wert die Dissoziation der oligomeren M1-Strukturen initiiert wird und ob sich die Konformation der M1-Monomere pH-abhängig ändert. Die Hauptaufgabe des NEP ist, durch dessen Protein-Adapter-Funktion, den Zellkern-Export des replizierten viralen Genoms zu ermöglichen. Da das NEP mit dem M1-Protein den Zellkern-Export-Komplex bildet ist besonders die Interaktion der beiden Proteine von hohem Interesse. Ähnlich wie für das Volllänge-M1-Protein sind auch nur wenige strukturelle Informationen über das NEP bekannt.

Da die Grundlagen des Aufbaus des M1-Netzwerkes sowie die pH-Wert-abhängige Dissoziation weitestgehend unbekannt sind, was vor allem auf das Fehlen von hoch- sowie niedrigaufgelösten Strukturdaten des Volllänge-M1-Protein zurückzuführen ist, soll in dieser Arbeit die Charakterisierung des rekombinanten Volllänge-M1-Protein Proteins im Fokus stehen. Außerdem soll für das NEP in dieser Arbeit die rekombinante Protein-Herstellung etabliert werden, um eine Grundlage für zukünftige strukturelle Untersuchungen, insbesondere Interaktionsstudien des NEP mit dem M1-Proteins, zu schaffen, die Einblicke in die molekularen Zusammenhänge des Nukleus-Export-Komplexes geben.

Hierzu soll zunächst die rekombinante Proteinsynthese des M1-Proteins sowie des NEP etabliert werden. Dies soll sowohl in Bakterien- als auch in Insektenzellen erfolgen, um die Ausbeuten und Faltungszustände der Proteine anschließend vergleichen zu können. Nach säulenchromatographischer Reinigung sollen strukturelle Informationen des M1-Proteins generiert werden. Neben konventionellen Kristallisationsversuchen des Volllänge-M1-Protein soll zusätzlich die innovative Kristallisationsmethode in lebenden Insektenzellen zum Einsatz kommen, die ebenfalls mit NEP getestet werden sollen. Außerdem soll die Einführung eines HA-Tags zur Identifikation der erfolgreichen Proteinbiosynthese sowie der Lokalisation der Zielproteine in der

Insektenzelle führen. Parallel soll die strukturelle Charakterisierung in Abhängigkeit des pH-Wertes in Lösung mittels SAXS-Technik und CD-Spektroskopie erfolgen, um mögliche konformationelle Unterschiede der M1-Monomere bei physiologischem und saurem pH zu identifizieren und so initiale Einblicke in die Strukturänderungen während der endosomalen Ansäuerung zu gewähren. Basierend auf den Kleinwinkelstreuungs-Experimenten sollen Oberflächen-Rekonstruktionen des M1-Proteins berechnet und mit bestehenden Strukturdaten verglichen werden, um rekombinantes M1-Protein als valides Modellsystem des nativen M1-Proteins für zukünftige Struktur- und Funktionsuntersuchungen zu validieren. Das Aggregationsverhalten des rekombinanten M1-Proteins soll abschließend mittels AFM-Technik ebenfalls pH-abhängig untersucht werden. Die erhaltenen Erkenntnisse werden dazu beitragen, insbesondere das essentielle, pH-anhängige Aggregationsverhalten des M1-Proteins während des Influenza A-Virus-Replikationszyklus besser zu verstehen und die Grundlage für eine zukünftige strukturelle Charakterisierung des NEP zu schaffen. Dies ist nicht nur für ein detailliertes Verständnis der Influenza-A-Virus Replikation erforderlich, sondern kann zukünftig auch in der Identifikation innovativer therapeutischer Ansatzpunkte für die Eindämmung der saisonalen Epidemien bzw. sporadisch auftretenden Pandemien führen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Tabelle 3.1| Liste der verwendeten Geräte

Gerätetyp	Bezeichnung (Hersteller, Herkunftsland)
Agarosegelkammer	PerfectBlue Gel System Mini M (Peqlab, Deutschland) PerfectBlue Gel System Mini L (Peqlab, Deutschland)
Atomkraftmikroskop	MFP-3D (Asylum Research, USA)
CD Spektrometer	J-600 (Jasco, UK)
DLS-Gerät	SpectroSIZE 300 (Xtal-Concepts, Deutschland) Spectro Light 500 (Xtal-Concepts, Deutschland)
FPLC	Äkta Purifier P-901 (GE Healthcare, UK)
Geldokumentation	Transilluminator (Biostep GmbH, Deutschland)
Inkubationsschüttler	Innova 4330 (New Brunswick Scientific, USA)
Inkubator	Trocken- und Wärmeschrank (BINDER GmbH, Deutschland)
Kristallisationsroboter	Crystal Phoenix (Art Robbins Instruments, USA)
Mikroskope	Nikon Ti Eclipse (Nikon Instrumentss, USA) Nikon Ti RCP (Nikon Instrumentss, USA) Intensilight C-HGFI (Nikon Instrumentss, USA) CSU X-1 (Yokogawa Electric Corp., Japan) iXon ^{EM} + (Andor Technology, UK) Laser Combiner System, 400 series (Andor Technology, UK) Precision Control Box, 100 series (Andor Technology, UK) Leica DM (Leica, Deutschland)
PCR-Cycler	T Gradient (Biometra®, Deutschland)
pH-Meter	pH 538 (WTW Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf Research® plus (Eppendorf, Deutschland)
SDS-Gelkammer	MightySmall™ SE245 (Hoefer Scientific Instruments, USA)
Sonifikator	Branson Sonifier 250/450 (Emerson Electric Co, USA)
Spektralphotometer	Nanodrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) BioPhotometer plus (Eppendorf AG, Deutschland)
Steril Werkbank	Innova 4330 (New Brunswick Scientific, USA)
Thermomixer	Epptherm® (Gbr. Liebsch GmbH & Co. KG Labortechnik, Deutschland)
Waagen	PCB (KERN & SOHN GmbH, Deutschland)
Western Blot Apparatur	Semi Dry Blotter Maxi (VWR)
Zentrifugen	3-18K (Sigma-Aldrich Co. LLC., USA) Biofuge 15R Laboratory Benchtop Centrifuge (Heraeus Holding GmbH, Deutschland) RC-3B Refrigerated Centrifuge (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) Optima TM L-90 Ultracentrifuge (Beckmann Coulter, USA)

3.1.2. Chemikalien

Die verwendeten Standardchemikalien für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurden in analytischer Qualität von den Firmen Bacton, Gerbu, Merck, Thermo Fischer Scientific, Roth, Serva und Sigma-Aldrich bezogen. In der folgenden Liste sind die Chemikalien für spezielle Anwendungen gesondert aufgeführt.

Tabelle 3.2| Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D- galactopyranosid (X-Gal)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
BSA Type H1	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE
ESCORT Transfection Reagent	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gentamicin	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE
Kanamycin	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE
Midori green	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, DE
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA Electrophoresis HmbH, Heidelberg, DE
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
NiCl ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Tetracyclin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
TRIS X	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE
Triton X-100	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
UltraPure™ Agarose	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA (Life Technologies Corp., Invitrogen)

3.1.3. Puffer, Medien und Lösungen

Tabelle 3.3| Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung
50x TAE	500 mM Tris-Base 5,7% (w/v) Essigsäure 50 mM EDTA-Natriumsalz

Tabelle 3.4| Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE und Western Blot

Bezeichnung	Zusammensetzung
1X Elektrodenpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-HCl 0,1% (w/v) SDS pH 8,3
Sammelgelpuffer	1,5 M TRIS pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
Trenngelpuffer	0,5 M TRIS pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
5X Probenpuffer	50 mM TRIS pH 6,8 10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerin 125 mM DTT 0,1% (w/v) Bromphenolblau
Coomassie-Lösung	0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 25% (v/v) 2-Propanol 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbe-Lösung	20% (v/v) Essigsäure
Anodenpuffer 1	0,3 M TRIS 20 % (v/v) MeOH
Anodenpuffer 2	25 mM TRIS 10 % (v/v) MeOH
Blockierlösung	5 % Milchpulver (w/v) in TBS-T bzw. 5 % (g/v) BSA in 1x TBS
1x TBS	50 mM TRIS, pH 7,5 150 mM NaCl
Kathodenpuffer	25 mM TRIS 40 mM ϵ -Aminocapron 10 % (v/v) MeOH
Entwickler	100 mM Tris pH 9,5 100 mM Na Cl 5 mM MgCl ₂ 44 μ l Nitroblautetrazolimchlorid NBT (75 mg/ml) 33 μ l 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-Posphat BCIP (50 mg/ml)

Tabelle 3.5| Puffer für die Reinigung von M1

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysepuffer	20 mM Tris pH 7,9 500 mM NaCl 20 mM Imidazol 0,1 mM PMSF
Waschpuffer Ni-NTA	20 mM Tris pH 7.9 500 mM NaCl 20 mM Imidazol
Elutionspuffer Ni-NTA	20 mM Tris pH 7.9 500 mM NaCl 500 mM Imidazol
Gelfiltrationspuffer I	20 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl
Gelfiltrationspuffer II	20 mM NaAcetat pH 5,0 150 mM NaCl

Tabelle 3.6| Puffer und Medien für die *E. coli* und Sf9 Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Hersteller
LB-Medium	5 g/L Hefeextrakt 10 g/L Trypton 5 g/L NaCl
ESF 921 Medium	Expression Systems
1x PBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 12 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.2
RIPA-Puffer	Alfa Aeser
Zellfixativ	4 % Paraformaldehyd 80 mM Na Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES) pH 7,4 5 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) pH 7,4 1 mM MgCl ₂

3.1.4. Proteinsequenzen

3.1.4.1. Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) M1-Protein

MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEVLMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVP
SERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDKAVKLYRKLKREITFHGAKEISLSYSAGALASCMGLIYNR
MGAVTTEVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMVTNTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQ
AAEAMEVASQARQMVMQAMRTIGTHPSSSAGLKNLLENLQAYQKRMGVQMQRFKLEHHHHHH

3.1.4.2. Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) Nukleus-Export-Protein (NEP)

MDPNTVSSFQDILLRMSKMQLESSSGDLNGMITQFESLKLRYRDSLGEAVMRMGDLHSLQNRNEK
WREQLGQKFEEIRWLIEEVRHKLKITENSFEQITFM

3.1.5. *E. coli*-Stämme

Tabelle 3.7| Verwendete *E. coli* Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
DH5 α TM	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen
DH10Bac TM	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK λ - rpsL nupG/ pMON14272/pMON7124	Invitrogen
Rosetta TM 2 (DE3)	F- <i>ompT hsdS_B</i> (r _B - m _B -) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Novagen
BL21-Star TM (DE3)	F- <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen
BLR TM (DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (r _B - m _B -) <i>gal dcm</i> (DE3) Δ (srl-recA)306::Tn10 (TetR)	Novagen
BL21-AI TM	F- <i>ompT hsdSB</i> (r _B - m _B -) <i>gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen
BL21 (DE3)pLysS	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3), pLysS, (Cam ^R)	Promega

3.1.6. Vektoren

In der folgenden Tabelle sind unter anderem modifizierte pFastBac1 Vektoren aufgeführt, bei denen zwischen die Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI und *Hind*III der *multiple cloning site* (mcs) entweder eine ER-Signalsequenz, ein Peroxisomen-Import-Signal oder kein zusätzliches Translokations-Signal kloniert wurde. Flankiert werden die eingefügten Sequenzen von einem Startcodon (ATG) und einem Stopp-Codon (TAA). Zielensequenzen konnten in diese Vektoren durch eine neu integrierte *Sfo*I Schnittstelle zwischen Start- und Stopp-Codon kloniert werden.

Tabelle 3.8| Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
pET21a(+)	T7 Promoter, Amp ^R , C-term. (His) ₆ -Tag, <i>lacI</i>	Novagen
pASK-IBA3plus	tet Promoter, Amp ^R , C-term. <i>Strep</i> -Tag	IBA
pASK-IBA5plus	tet Promoter, Amp ^R , N-term. <i>Strep</i> -Tag	IBA
pASK-IBA33plus	tet Promoter, Amp ^R , C-term. (His) ₆ -Tag	IBA
pASK-IBA35plus	tet Promoter, Amp ^R , N-term. (His) ₆ -Tag	IBA
pASK-IBA43plus	tet Promoter, Amp ^R , C-term. <i>Strep</i> -Tag, N-term. (His) ₆ -Tag	IBA
pFastBac TM 1	Polyhedrin-Promoter, Tn7R, Tn7L, Amp ^R , Gm ^R	Invitrogen
pFastBac1-SKL	Polyhedrin-Promoter, Tn7R, Tn7L, Amp ^R , Gm ^R , C-term. SKL-Tag, <i>Sfol</i> -Schnittstelle	Modifizierter pFastBac1
pFastBac1-ER KDEL	Polyhedrin-Promoter, Tn7R, Tn7L, Amp ^R , Gm ^R , N-Term. ER-Sig.Seq., C-term. KDEL-Tag, <i>Sfol</i> -Schnittstelle	Modifizierter pFastBac1
pFastBac1-cyto	Polyhedrin-Promoter, Tn7R, Tn7L, Amp ^R , Gm ^R , <i>Sfol</i>	Modifizierter pFastBac1
pFastBac1-cyto-C-HA	Polyhedrin-Promoter, Tn7R, Tn7L, Amp ^R , Gm ^R , C-term. HA-Tag, <i>Sfol</i> -Schnittstelle	Modifizierter pFastBac1
pFastBac1-cyto-N-HA	Polyhedrin-Promoter, Tn7R, Tn7L, Amp ^R , Gm ^R , N-term. HA-Tag, <i>Sfol</i> -Schnittstelle	Modifizierter pFastBac1

3.1.7. Oligonukleotide für die Klonierung

Tabelle 3.9| Oligonukleotide für die Klonierung des M1-Konstruktes in pET21a(+)

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge in nt
M1 <i> fwd</i> pET21a	ATGTGCATATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACG	35
rev M1 ohne stop	ATTGCCTCGAGCTTGAACCGTTGCATCTGCACCC	34

Tabelle 3.10| Oligonukleotide für die Klonierung der M1-Konstrukte in pASK-IBA

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge in nt
M1 <i> Forward</i> EcoR1/TEV	CGAATTCGAGAATCTGTACTTCCAGGGCATGAGTCTTCTA ACCGAGGTCGA	51
M1 (H1N1) <i> fwd</i>	ATGACGAATTCATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGA	18
rev M1	ATTGCCTCGAGTCACTTGAACCGTTGCATCTGC	33
rev M1 ohne stop	ATTGCCTCGAGCTTGAACCGTTGCATCTGCACCC	34

Tabelle 3.11| Oligonukleotide für die Klonierung der NEP-(NS2)-Konstrukte in pASK-IBA

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge in nt
NS2 fwd 1.	GACATACTGCTGAGGATGTCA	21
NS2 fwd 2.	ATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGACATACT GCTGAGGATGTCAAAAAT	56
NEP 3. <i>Forward</i> <i>EcoR1/TEV</i>	CGAATTCGAGAATCTGTACTTCCAGGGCATGGATCCA AACACTGTGTCAAGCTTTCAG	58
NS2 (H1N1) <i>fwd</i>	ATGACGAATTCATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTT CAG	41
<i>rev</i> NS2	ATTGCCTCGAGCTAAATAAGCTGAAACGAGAAAGTTC TTATC	42
<i>rev</i> NS2 ohne stop	ATTGCCTCGAGAATAAGCTGAAACGAGAAAGTTCTTAT CTCT	42

Tabelle 3.12| Oligonukleotide für die Klonierung der Gene für das pFastBac1 *Screening*-System

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge in nt
M1 bE <i>fwd vivo</i>	AGTCTTCTAACCGAGGTCGAAAC	23
M1 bE <i>rew vivo</i>	CTTGAACCGTTGCATCTGCAC	21
NEP bE <i>fwd vivo</i>	GATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTC	25
NEP bE <i>rew vivo</i>	AATAAGCTGAAACGAGAAAGTTCTTATCTC	30

Tabelle 3.13| Oligonukleotide zur Herstellung der modifizierten pFastBac1-Vektoren

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge in nt
HA C-term <i>cyto fwd</i>	GATCGGATCCATGGGCGCCTACCCCTACGACGTGCC CGACTACGCTTAAAAGCTTGATC	59
HA C-term <i>cyto rev</i>	GATCAAGCTTTTAAAGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGG GTAGGCGCCCATGGATCCGATC	59
HA N-term <i>cyto fwd</i>	GATCGGATCCATGTACCCCTACGACGTGCCCGACTAC GCTGGCGCCTAAAAGCTTGATC	59
HA N-term <i>cyto rev</i>	GATCAAGCTTTTAAAGCGCCAGCGTAGTCGGGCACGT CGTAGGGGTACATGGATCCGATC	59

1.1.1.1 Verbrauchsmittel

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Plastikverbrauchsmittel wie z.B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Zellkulturflaschen etc. von Sarstedt (Deutschland) verwendet. Die *Amicon Ultra* Filtrationskonzentratoren wurden von Merck Millipore oder Pall bezogen und wurden für die Konzentration von Proteinen benötigt. Die *Rotilab* Nitrocellulose-Membran und Whatman-Filterpapiere, die bei Western Blot Experimenten zum Einsatz kamen, wurden beide von Roth bezogen. Die Ni-NTA Affinitätsmatrix von Qiagen und die Amylose-Affinitätsmatrix von New England BioLabs wurden für die Reinigung des Zielproteins verwendet.

1.2.2.2 Enzyme

Tabelle 3.14| Verwendete Enzyme

Name	Aktivität	Hersteller
ALLin HiFi DNA Polymerase	2 U/ μ L	highQu
<i>Bam</i> HI	10 U/ μ L	New England BioLabs
<i>Dpn</i> I	20 U/ μ L	New England BioLabs
<i>Hind</i> III	10 U/ μ L	New England BioLabs
<i>Eco</i> RI	20 U/ μ L	New England BioLabs
<i>Nde</i> I	10 U/ μ L	Thermo Fischer Scientific
RNase A	10 mg/mL	Thermo Fischer Scientific
<i>Sfo</i> I	10 U/ μ L	New England BioLabs
T4 DNA Ligase	5 U/ μ L	New England BioLabs
<i>Xho</i> I	10 U/ μ L	Thermo Fischer Scientific

1.3.3.3 Antikörper

Tabelle 3.15| Verwendete Antikörper

Antikörper	Eigenschaft	Hersteller
Maus-anti-His ₄ IgG	polyklonal	Qiagen
Maus-anti-HA IgG	polyklonal	BioLegend
Kaninchen-anti-Maus IgG	polyklonal, AP konjugiert	Sigma
Ziege-anti-Maus IgG	polyklonal, DyLight™ 549 konjugiert	Jackson ImmuniResearch

3.1. Methoden

3.1.1. Bioinformatische Methoden

3.1.1.1. Berechnung von theoretischen Molekulargewichten und Extinktionskoeffizienten

Mit Hilfe des Webserver-basierten *Expasy-Tools Protparam* (<http://web.expasy.org/protparam/>) wurden die Molekulargewichte und die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Zielproteine berechnet.

3.1.1.2. Nukleotidsequenz-Alignment

Alle Nukleotidsequenz-Alignments wurden unter Zuhilfenahme der Webserver-basierten Softwareplattform *Benchling* (<https://benchling.com>) durchgeführt.

3.1.2. Molekularbiologische Methoden

3.1.2.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Wenn nicht anders erwähnt, wurde die PCR-Ansätze mit der *ALLin™ HiFi* DNA Polymerase (highQu) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden folgende Parameter verwendet:

Tabelle 3.16| Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Komponente	Konzentration
DNA Vorlage Vektor	1 - 50 ng
Polymerase Puffer	1 x
Frw Primer	1 pmol
Rev Primer	1 pmol
Polymerase	1 U
dH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 3.17| Einstellungen des PCR-Cyclers für die Polymerase Kettenreaktion

PCR-Schritt	Dauer [s]	Temperatur [°C]
1. Init. Denaturierung	60	95
2. Denaturierung	15	95
3. Primer-Annealing	15	55
4. Elongation	30 pro kb	68
5. Finale Elongation	300	68

Die Schritte 2. bis 4. wurden 30-mal wiederholt.

3.1.2.2. DNA Restriktion und Reinigung

Die amplifizierten PCR-Produkte, sowie die Zielvektoren wurden mit den vom Hersteller empfohlenen Mengen an Restriktionsenzymen (NEB bzw. Thermo Fischer Scientific) für 1 - 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach getrennt und mit Hilfe des *GeneJet DNA Extration Kits* (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben gereinigt. Abweichend wurde zur Elution der DNA anstatt des Elutionspuffers autoklaviertes Millipore Wasser verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Probe erfolgte am NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm.

3.1.2.3. DNA-Ligation

Die Ligationsansätze wurden, wenn nicht anders erwähnt, wie folgt angesetzt:

Tabelle 3.18| Standard-Ligationsansatz

Komponente	Menge
T4 DNA Ligase Puffer	1 x
T4 DNA Ligase	1 U
Vektor	50 - 100 ng
PCR-Produkt	3 - 5 facher molarer Überschuss
dH ₂ O	ad 20 µl

Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur (RT) für 1 Stunde inkubiert und die *E. coli*-Zellen wie unter 3.2.2.1 beschrieben transformiert.

3.1.2.4. DNA Restriktion und Ligation von *Blunt End*-Konstrukten

Die Restriktion des gewünschten modifizierten pFastBac1-Vektors wurde, wie in der folgenden Tabelle gezeigt angesetzt:

Tabelle 3.19| Ansatz zur *Blunt End*-Restriktion von modifizierten pFastbac1 Vektoren

Komponente	Menge
Vektor	2 µg
Restriktionspuffer	1 x
<i>Sfo</i> I	2 U
dH ₂ O	ad 40 µl

Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte bei 37 °C für 3 - 4 Stunden. Anschließend wurden direkt aus diesem Restriktionsansatz eine Mischung aus 100 ng Vektor und 0,05 U des Restriktionsenzym *Sfo*I entnommen (2 µL des Ansatzes) und für einen Ligationsansatz verwendet, der wie unter 3.2.2.8 beschrieben erfolgte. Die Inkubation dieses Ansatzes fand bei RT

über Nacht statt. Am Folgetag wurden *E. coli*-Zellen mit diesem Ligationsansatz wie unter 3.2.2.1 beschrieben transformiert.

3.1.2.5. Plasmid-/ Bacmid-Isolation

Für eine Plasmid- bzw. Bacmid-Isolation wurden die entsprechenden Bakterienkolonien von einer LB-Agarplatte gepickt und in 4 ml antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Mit Hilfe des *GeneJet Miniprep Kits* von Thermo Scientific wurden die Plasmide nach Herstellerangaben isoliert. Die einzige Änderung zum Herstellerprotokoll bestand darin, dass, anstatt des mitgelieferten Elutionspuffers, autoklaviertes Millipore Wasser benutzt wurde. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Absorptionsmessung bei 260 nm mit dem NanoDrop 2000, ebenfalls von Thermo Scientific, durchgeführt.

3.1.2.6. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Ein Aliquot (50 µL) chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden auf Eis ca. 15 Minuten aufgetaut. Anschließend wurden 1-5 ng DNA bzw. 10-100 ng eines Ligationsansatzes zur Zellsuspension gegeben. Inkubiert wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis gefolgt von einem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis abgekühlt und nach der Ruhephase mit 500 µl LB-Medium versetzt. Für die Regeneration und Adaptation der Zellen wurde die Suspension für 1 Stunde bei 37 °C und 300 rpm im Eppendorf Thermomixer 5436 kultiviert. Die Zellsuspension wurde anschließend entweder direkt in flüssigem antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert oder auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert.

3.1.2.7. Rekombinante Genexpression in *E. coli* Zellen

Die Herstellung des rekombinanten Volllänge-M1 erfolgte nach dem von *Zhang et al. (2012)*⁶⁶ veröffentlichten Protokoll. Alle Änderungen sind nachfolgend aufgeführt.

Zunächst wurde eine Übernachtskultur angesetzt, indem eine Kolonie des Konstrukts pET21a-M1 im *E. coli* Stamm RosettaTM 2 von einer LB-Agarplatte gepickt und in 50 ml LB-Medium bei 37 °C über Nacht im Orbitalschüttler inkubiert wurde. Am Folgetag wurde jeweils 4 L antibiotikahaltiges LB-Medium mit 40 ml der über Nacht gewachsenen Bakteriensuspension inokuliert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 erreicht war. Die Induktion erfolgte dann durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Bakterien wurden anschließend für 16 - 18 Stunden bei 18 °C und 140 rpm im Orbitalschüttler inkubiert und anschließend bei 4000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in ca. 10 ml Überstand resuspendiert, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4000 x g für 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei - 20 °C gelagert.

3.1.3. Proteinbiochemische Methoden

3.1.3.1. Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Ein eingefrorenes Zellpellet einer Expressionskultur wurde aufgetaut, in Lysepuffer resuspendiert und auf Eis mittels Sonifikation für 4 - 6 Minuten bei 30% Amplitude und in 0,5 Sekunden-Zyklen lysiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand vom unlöslichen Zellbestandteil getrennt indem für 1 Stunde bei 40.000 xg und 4 °C zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand auf eine mit Lysispuffer (Tabelle 3.5) äquilibrierte Ni-NTA Säule gegeben und bei einer Flussrate von ca. 2 mL/min durch das Chromatographiematerial laufen gelassen. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen wurde die Säule mit ca. 8 Säulenvolumen Lysispuffer gewaschen. Das Zielprotein wurde durch Zugabe von 3 Säulenvolumen Elutionspuffer (500 mM Imidazol) eluiert und die Reinheit mittels SDS PAGE kontrolliert.

3.1.3.2. Größenausschulsschromatographie

Als Säule wurde eine Superdex™ 200 16/60 *prep grade* (GE Healthcare) an einem Äkta purifier System (GE Healthcare) verwendet. Zunächst wurde die Säule mit einem Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer (Tabelle 3.5) äquilibriert. Im Anschluss wurden 5 ml konzentrierte Proteinprobe auf die Säule aufgetragen um das Zielprotein mit einer Flussrate von 1 ml/min zu eluieren. Während des Größenausschlusschromatographielaufes wurden kontinuierlich die Absorption bei 280 nm sowie die Leitfähigkeit gemessen. Die Reinheit des in den Fraktionen gesammelten Proteins wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert.

3.1.3.3. Proteinquantifizierung

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (1) mit Hilfe eines NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 280 nm spektrophotometrisch bestimmt.

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

In der Formel entspricht ε dem molaren Extinktionskoeffizienten ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), d der Schichtdicker der Küvette (cm) und c der molaren Proteinkonzentration ($mol \cdot L^{-1}$). Die ExPASy-Software *Protparam* wurde verwendet, um den molaren Extinktionskoeffizienten des Influenza-A-Virus Matrix Proteins 1 (M1) zu berechnen ($13075 mol g^{-1} cm^{-1}$), der anschließend in die Formel (1) eingesetzt wurde.

3.1.3.4. **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach U.K. Laemmli (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-PAGE bindet das anionische Detergenz SDS an die hydrophoben Regionen der Proteine und führt so eine negative Nettoladung ein, die es ermöglicht, die denaturierten Proteine in einem Polyacrylamidgel ausschließlich aufgrund ihrer Molekulargewichtsunterschiede voneinander zu trennen. Durch ein 6%-iges Sammelgel (pH 6,8) wurden die Proteine zunächst fokussiert und durch ein 15%-iges Gel (pH 8,8) nachdem von Laemmli entwickelten diskontinuierlichen SDS-PAGE-System getrennt¹⁵⁴.

Die Proteinproben wurden zunächst mit 6x Probenpuffer versetzt und für etwa 10 Min bei 95 °C zur Denaturierung erhitzt. Die SDS-PAGE erfolgte bei RT und einer Stromstärke von 25 mA pro SDS-Gel in 1x Elektrodenpuffer, bis die Bromphenolblau-Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend für 20 - 40 Minuten in Coomassie-Lösung gefärbt und solange mit Entfärbelösung inkubiert, bis der gewünschte Kontrast der Proteinbanden erreicht war. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

3.1.3.5. **Western Blot**

Der Western Blot ist eine immunologische Nachweismethode um z.B. Proteine spezifisch detektieren zu können. Dafür wurden die Proteine mittels SDS-PAGE der Größe nach getrennt und mit Hilfe des *Semi-Dry Blotting* Verfahrens bei einer angelegten Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 1 Stunde auf eine Nitrozellulosemembran (Roth) transferiert. Danach wurde die Membran 60 Minuten mit einer 5 %-igen Milchpulversuspension oder einer 5 %-igen BSA-Lösung in TBS-T blockiert. Anschließend erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 3.15) bei RT. Um unspezifisch gebundene Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran 3 Mal für jeweils 5 Minuten mit TBS-T gewaschen, gefolgt von einer 45 minütigen Inkubation bei RT mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 3.15). Schließlich wurde die Membran erneut gewaschen und mit 5 - 10 ml Entwickler solange inkubiert, bis die erwarteten Proteinbanden sichtbar wurden. Abgestoppt wurde die Färbereaktion durch Waschen mit dH₂O.

3.1.4. **Biophysikalische Methoden**

3.1.4.1. **Dynamische Laserlichtstreuung (DLS)**

Mit Hilfe der dynamischen Laserlichtstreuung lassen sich der Diffusionskoeffizient D_0 und die Verteilung der hydrodynamischen Radien von Proteinen in Abhängigkeit der Viskosität des Lösungsmittels näherungsweise bestimmen. Die Stokes-Einstein-Gleichung wurde verwendet um den hydrodynamischen Radius R_h aus dem experimentell ermittelten Diffusionskoeffizienten zu berechnen:

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

In der Gleichung repräsentieren k die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur (K). Für die Probenvorbereitung der Dispersitätsuntersuchung wurden hochmolekulare Partikel abgetrennt, indem die zu untersuchende Proteinlösung für 45 Minuten bei 16000 xg und 4 °C zentrifugiert wurde. Die Laserlichtstreu-Experimente wurden entweder mit 15 µl Proteinlösung in einer Quarz-Küvette an einem spectroLITE 300 (X-tal Concepts) oder mit 2 µl Proteinlösung unter Paraffinöl in einer Terazaki-Platte (Sgima-Aldrich) an einem spectroLITE 600 (X-Tal Concepts) durchgeführt. Dafür wurden 30 Einzelmessungen in einem Messzeit von 6 Minuten bei Raumtemperatur akkumuliert.

3.1.4.2. CD-Spektroskopie

An einem Jasco J-600 wurden die CD-spektroskopischen Experimente in einer 1 mm dicken Quarz-Küvette mit einem Volumen von 100 - 200 µL durchgeführt. Dabei wurden für den nahen UV-Bereich (Wellenlängen von 320 - 250 nm) und für den fernen UV-Bereich (Wellenlängen von 260 - 190 nm) jeweils 10 Spektren mit einem Intervall von 1 nm aufgenommen. Durch eine arithmetische Mittelung wurden die Spektren einer Proteinprobe vereint. Zusätzlich wurden jeweils 5 Spektren der korrespondierenden Puffer zu den Proteinproben aufgenommen, ein arithmetisches Mittel gebildet und von den Proben-Spektren subtrahiert, um das Hintergrundsignal zu minimieren. Der Messbereich des nahen UV diente der Untersuchung der Tertiärstruktur des M1 Proteins, für die Proben mit Proteinkonzentrationen zwischen 0,25 und 1,26 mg/ml verwendet wurden. Für die Untersuchung der Sekundärstrukturelemente wurden hingegen Proteinkonzentrationen von 0,25 bis 1 mg/ml im fernen UV analysiert.

Die mittlere Aminosäure Elliptizität (MRW) konnte mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\left[\Theta_{MRW,\lambda} \right] = \frac{MRW \cdot \Theta_{\lambda}}{10 \cdot d \cdot c} \quad (3)$$

In der Gleichung entspricht MRW dem durchschnittlichen Gewicht pro Aminosäure in Da, θ der gemessenen Elliptizität (mdeg), c der Proteinkonzentration (mg/ml) und d der Schichtdicke (cm) der verwendeten Küvette. Der Sekundärstrukturanteil in den untersuchten Proteinproben wurde unter Verwendung des onlinebasierten Servers K2KD (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d3/>) bestimmt.

3.1.4.3. Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Durch Anwendung der SAXS-Technik lassen sich die Struktur Parameter Gyrationradius (R_g), maximaler Partikeldurchmesser (D_{max}), verdrängtes Volumen (*Porod*-Volumen) und das Molekulargewicht (MW) von biologischen Makromolekülen in Lösung bestimmen. Die für das Experiment notwendigen Röntgenstrahlen mit einer Wellenlänge von 0,124 nm werden von der Synchrotronstrahlungsquelle PETRA III erzeugt und weder in die Strahlenführung P12 (EMBL, DESY Hamburg) geleitet. Treffen die Röntgenstrahlen auf Partikel in Lösung, so wird dieser elastisch gestreut. Die Detektionswinkel bei einem SAXS-Experiment liegen üblicherweise zwischen $0,1^\circ$ und 10° .

Für die Streu-Experimente in Lösung musste das Influenza A-Virus M1 Protein zunächst wie in Abschnitt 3.2.2.7, 3.2.3.1 und 3.2.3.2 beschrieben hergestellt, gereinigt und auf Konzentrationen zwischen 0,3 und 4,0 mg/ml eingestellt werden. 20 μ l der unterschiedlichen Proteinprobenkonzentrationen sowie identische Puffer-Lösungen wurden nacheinander in einer Quarz-Kapillare für 1 Sekunde bei RT mit dem Röntgenstrahl belichtet (Tabelle 3.20). Die dabei entstandene Diffraktion wurden mittels eines Pilatus 2M Pixel Detektors aufgenommen. Zwischen Probe und Detektor bestand ein Abstand von 3,1 Metern. Das Software-Paket *PRIMUS*¹⁵⁵ wurde für die initiale Prozessierung der primären Diffraktionsdaten verwendet. Der Guinier- und Kratky-Plot diente jeweils zur Untersuchung des Aggregations- sowie des Faltungszustandes des Proteins. Durch die Extrapolation der Streukurven auf die konzentrationsunabhängige Vorwärtsstreuung $I(0)$ konnte der Streumassenradius R_g bestimmt werden. Das Programm *GNOM*¹⁵⁶ wurde verwendet um die Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ sowie den D_{max} zu bestimmen. Mit Hilfe der Formel (3) kann anhand eines gemessenen Protein-Standards bekannter Proteinkonzentration und dessen gemessene $I(0)$, nach messtechnischer Bestimmung der $I(0)$ der Proteinprobe, das MW der Proteinprobe berechnet werden. Als Standard bei den Kleinwinkelstreuung-Experimenten diente das Enzym Glukoseisomerase mit einem MW von 173 kDa. Gemessen wurde für die Glukoseisomerase ein $I(0)$ von $49139,20 \pm 152,17$ s.

$$\frac{MW_{\text{Probe}}}{MW_{\text{Standard}}} = \frac{I(0)_{\text{Probe}}}{I(0)_{\text{Standard}}} \quad (4)$$

*DAMMIF*¹⁵⁷ und *GASBOR*¹⁵⁸ dienten der Erzeugung der *ab initio* Modelle des Influenza-A-Virus M1-Proteins. Mit dem Programm *DAMFILT*¹⁵⁹ konnten Durchschnittsmodelle aller unabhängig berechneten Modell-Rekonstruktionen generiert werden. Die Abweichung der individuell erzeugten *DAMMIF*- und *GASBOR*-Modelle wurde mit dem Programm *DAMSEL*¹⁵⁹ berechnet.

Tabelle 3.20| Technische Daten der P12 Beamline der Synchrotronstrahlungsquelle PETRA III

Beamline	PETRA III P12 (DESY Hamburg)
Strahlendurchmesser	0,2 x 0,12 mm
Wellenlänge (Å)	1,24
Belichtungszeit (s)	1/Zyklus
Photonenfluss (s ⁻¹)	10 ¹³

3.1.4.4. **Asymmetrische-Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4)**

AF4 ist eine Einphasen-Chromatographietechnik, mit der Proteinproben nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden können. Vorgeschaltet vor einem konventionellen SAXS-Experiment, wie unter 3.2.4.3 beschrieben, kann diese Proteintrennmethode die Qualität der SAXS-Primärdaten erhöhen und so die Analyse von polydispersen Proben ermöglichen.

Durch ein parabolisches Flussprofil wird die Probe zunächst zentriert und danach der Flüssigkeitsfluss einseitig erhöht, so dass kleine Partikel schneller als große Partikel in Richtung SAXS-Probenkapillare fließen. Vorteilhaft bei dieser Methode ist, dass keine Matrix verwendet wird, dass Partikel mit hoher molekularer Masse auch getrennt werden können und dass die Methode in wenigen Minuten durchgeführt werden kann.

3.1.4.5. **MALVERN Viscotek tripple detector array system (TDA)**

Das *MALVERN* dreifach-Detektor-Einheit (vom englischen *triple detector array*, TDA) ist ein Multidetektionssystem, bestehend aus einem Refraktometer, einem Rechtswinkellichtstreu-Detektor (RALS) und einem UV-Detektor, das in Kombination mit einer analytischen Größenausschlusschromatographie-Säule die Qualität von SAXS-Experimenten verbessert. Dabei können Zusatzinformationen über Molekulargewicht, Aggregationszustand und Konzentration des zu untersuchenden Proteins gewonnen werden, sowie unterschiedliche Aggregationszustände für die nachfolgende SAXS-Messung voneinander getrennt werden.

Für dieses Experiment wurden 80 - 120 µl einer Proteinlösung mit einer Konzentration von mehr als 3 mg/ml benötigt. Das M1 Protein von Influenza A wurde wie unter 3.2.2.7, 3.2.3.1 und 3.2.3.2 hergestellt, gereinigt und konzentriert. Die Größenausschlusschromatographie am *MALVERN* TDA wurde analog wie unter 3.2.3.2 beschrieben vorbereitet und durchgeführt. Die eluierende Fraktion wurde aufgetrennt, sodass eine Hälfte der Probe direkt in die Quarzkapillare des SAXS-Probenwechslers geleitet wurde, während die andere Hälfte die Multidetektion im *MALVERN* TDA durchlief.

3.1.4.6. Zeitaufgelöste SAXS-Messung

Bei der zeitaufgelöste Variante eines SAXS-Experiments wurde eine Probenmischeinrichtung vor die SAXS-Probenkapillare geschaltet, die es ermöglicht, Veränderungen der Struktur Parameter R_g , D_{max} , Pordo-Volumen im μs Bereich zu verfolgen z.B. bei pH-Wert-Änderung. Hierzu werden kontinuierlich SAXS-Daten aufgenommen während die Probe durch die Quarzkapillare der Messvorrichtung fließt. Wird der pH-Wert des Proben-Reservoirs durch Pufferzugabe verändert, so können direkt die Auswirkungen auf das Röntgenstreuvermögen der Probe detektiert werden. Die so ermittelten SAXS-Daten geben dann Aufschluss über mögliche Konformationsänderungen.

Wird die Probenkapillare für jeweils einige μs mit Röntgenstrahlen belichtet ist es möglich z.B. Konformationsänderungen von Proteindomänen zu beobachten.

Durch Durchführung dieser Methode wurde 1 ml einer M1 Proteinprobe mit einer Konzentration von 2,0 mg/ml wie unter 3.2.2.3, 3.2.3.1 und 3.2.3.2 beschrieben hergestellt, gereinigt und konzentriert. Die Parameter für die SAXS-Messungen waren die gleichen wie für eine einzelne SAXS-Messung (3.2.4.3)

3.1.4.7. Atomkraftmikroskopie (AFM)

10 μl verschiedener Konzentrationen (0,250 mg/ml bis 250 ng/ml) der Influenza A-Virus M1 Proteinprobe wurden auf eine negativ geladene Mica Oberfläche pipettiert und bei RT eingetrocknet. Die Atomkraftmikroskopie wurde mit einem MFP-3D (Asylum Research) ausgestattet mit einem NSG10 (NT-MDT, 220 kHz Resonanzfrequenz) Cantilever im *tapping mode* bei RT am Forschungszentrum Borstel, Arbeitsgruppe Prof. Gutschmann, durchgeführt. Die geschärfte Spitze des Cantilevers mit einer Federkonstanten von 15,93 N/m und einem Spitzenradius von 1 nm wurde über die Probe bewegt, um die Oberfläche abzurastern. Die Analyse der Messdaten sowie die Erstellung der Bilder erfolgte mit der Software IGOR Pro 6 und dem Zusatzmodul WaveMetrics.

1.4.4.4 Insektenzellkultur und Mikroskopie

Die Handhabung der Sf9 Zellen im Bereich der Insektenzellkultur erfolgte größtenteils nach den Angaben des *Bac-to-Bac Manuals* der Firma Invitrogen. Alle Änderungen sind im Folgenden beschrieben.

3.1.4.8. Auftauen von Sf9 Zellen

Ein Aliquot mit 10^6 kryokonservierten Sf9 Zellen wurde im Wasserbad aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes ESF 921 Medium (Expression Systems) gegeben. Die Zellen wurden bei RT für 2 Minuten bei 300 xg zentrifugiert und mit Medium gewaschen. Schließlich wurde das Zellpellet in 12 ml ESF 921 Medium resuspendiert und in einer T75 Kulturflasche adhärent bei 27 °C kultiviert.

3.1.4.9. Subkultivieren von Sf9 Zellen

Mit dem Erreichen einer ungefähren Konfluenz von 80 - 90 % wurden die Sf9 Zellen vorsichtig durch mehrmaliges Spülen des Kulturflaschenbodens mit Medium abgelöst und mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Zur adhärennten Subkultivierung wurden 10^6 Zellen pro cm^2 in eine neue T75 Kulturflasche gegeben und ebenfalls bei 27 °C inkubiert. Die Kultivierung der Sf9 Zellen erfolgte in Suspensionsschüttelkulturen in aufrecht stehenden T75 Kulturflaschen (Gesamtvolumen: 20 ml) bei 27 °C und 100 rpm. Mit dem Erreichen einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml wurde die Zellsuspension auf 10^6 Zellen/ml verdünnt oder für Folge-Experimente verwendet.

3.1.4.10. Transfektion von Sf9 Zellen mit Bacmid-DNA

Für die Herstellung rekombinanter Baculoviren wurden 10^6 Sf9-Zellen in logarithmischer Wachstumsphase in je ein 6-Well gegeben und 10 Minuten bei RT adhärennten gelassen. Nachdem die Zellen an den Kulturschalenboden adhärennten wurde das Penicillin-Streptomycin-haltige Medium vorsichtig abgenommen und durch antibiotikafreies Medium ersetzt um die Zellen zu waschen.

In einem separaten Ansatz wurden 1 µg isolierte Bacmid-DNA sowie 4 µl Escort IV Transfektionsreagenz (Sigma) in 60 µl antibiotikafreiem ESF 921 Medium verdünnt und bei RT für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz auf ein Volumen von insgesamt 650 µl mit antibiotikafreiem ESF 921 Medium aufgefüllt und auf die zuvor gewaschenen Zellen in einen 6-Well gegeben. Die Transfektion erfolgte über einen Zeitraum von 5 Stunden bei 27 °C.

Nach erfolgter Inkubation wurde der Ansatz von den Zellen abgenommen und durch 2 ml Penicillin-Streptomycin-haltiges ESF 921 Medium je 6-Well ersetzt. Die Kultivierung wurde für 3 - 4 Tage fortgesetzt bis erste Anzeichen einer viralen Infektion erkennbar wurden. Anschließend wurde der Überstand, in dem sich die Viruspartikel befanden, abgenommen und bei 4500 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand bei -20 °C gelagert (P1 Stock).

3.1.4.11. Amplifikation der viralen Partikel

Für die Amplifikation der viralen Partikel wurden 10^6 Sf9 Zellen pro 6-Well ausgesät und mit 500 µl P1 Stock + 1500 µl ESF 921 Medium infiziert. Nach erneuter 3 - 4 tägiger Inkubation konnte wie unter 3.3.1.3 beschrieben der nun entstandene P2 Stock geerntet und gelagert werden.

Analog dazu wurde der P3 Stock hergestellt, indem 10^6 Sf9-Zellen mit 20 µl P2 Stock in 1980 µl ESF 921 Medium infiziert wurden.

3.1.4.12. Rekombinante Genexpression zur Ausbildung von intrazellulären Kristallen

Pro 6-Well wurde je ein rundes Deckgläschen (VWR) mit einem Durchmesser von 25 mm in 70% Ethanol für 2 Minuten gesäubert, unter der Steril-Werkbank getrocknet und in ein 6-Well überführt. Anschließend wurden 10^6 Sf9 Zellen in das vorbereitete 6-Well ausgesät, mit verschiedenen Verhältnissen (1:100 1:1.000 und 1:10.000 zum Zellkulturvolumen) eines nicht titrierten P3 Stocks infiziert und 3 - 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Ab dem 3. Tag wurden die Zellen täglich mikroskopisch auf Kristallwachstum untersucht.

3.1.4.13. Lyse von infizierten Sf9-Zellen

Zunächst wurde die Kristallbildung nach rekombinanter Genexpression, wie unter 3.3.1.5 und 3.3.1.7 beschrieben, kontrolliert. Das mit Sf9 Zellen bewachsene Deckgläschen wurde in die Trägerkonstruktion für die Mikroskopie eingespannt, damit den Zellen das Medium entzogen und durch 1 - 2 ml RIPA-Puffer ersetzt werden konnte. Innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten waren die Zellen lysiert. Wurden schon vor Lyse Kristalle entdeckt, konnte durch diese Methode untersucht werden, ob die Kristalle in RIPA-Puffer stabil sind. Waren vorerst keine Kristalle in den Zellen sichtbar diente die Lyse als letzte Kontrolle auf Kristalle, denn aufgrund der möglicherweise sehr ähnlichen Dichte des Kristalls zum umgebenden Kompartiment können die Kristalle erst nach der Lyse detektiert werden.

3.1.4.14. Immunhistochemische Färbungen

Die Sf9 Zellen wurden wie unter 3.3.1.5 beschrieben auf einem Deckgläschen infiziert und kultiviert. Die adhärenenten Zellen wurden nach erfolgter Inkubation von 4 Tagen mit 1-fach PBS gewaschen und mit Zellfixativ für 10 Minuten bei RT fixiert. Durch 3-maliges Waschen mit 1-fach PBS wurde das Formaldehyd vollständig entfernt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1-fach PBS mit 0,1 % Tween 100 für 10 Minuten bei RT permeabilisiert, 2 Mal mit 1-fach PBS gewaschen und mit einer 5 % Milchpulver-Lösung für 1 Stunde bei RT blockiert, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern. Nun wurde eine 1:1000 Verdünnung des Primärantikörpers (Maus-anti-HA IgG) in 5 % Milchpulver-Lösung hergestellt und für mindestens 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend wieder 3 Mal mit 1-fach PBS gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit dem 1:2000 verdünnten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus IgG) für 1 Stunde bei RT im Dunkeln, gefolgt von erneutem 3 maligen Waschen mit 1-fach PBS. Abschließend wurden die gefärbten Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert (3.3.1.8).

3.1.4.15. **Mikroskopie von infizierten Sf9 Zellen**

Zur mikroskopischen Analyse des Kristallwachstums bzw. zur Kontrolle der rekombinanten Genexpression in Sf9 Zellen wurde ein Mikroskop verwendet, das auf einem *Nikon Ti Eclipse* Gerät basiert und zusätzlich mit einer *Andor iXon+ EMCCD* Kamera sowie mit einem 40x (1.3 NA) und einem 100x (1.49 NA) Objektiv ausgestattet ist, oder alternativ ein Leica DM Mikroskop mit entsprechender Kamera. Der Differentialinterferenzkontrast (DIC) diente der Identifikation von Kristallen. Außerdem wurden Fluoreszenzbilder von rekombinant genexprimierten Proteinen aufgenommen, die keine Kristalle bildeten, um die erfolgreiche Proteinbiosynthese zu kontrollieren.

4. Ergebnisse

Während der Replikation des Influenza-A-Virus übernehmen sowohl das virale Matrix Protein 1 (M1) als auch das Nukleus-Export-Protein (NEP) essentielle Funktionen. Nach rezeptorvermittelter endosomaler Aufnahme des Virus findet in der frühen Phase der Infektion die Ansäuerung der Endosomen statt, was zur pH-Wert-Änderung im Virion führt. Diese Änderung des pH-Wertes hat zur Folge, dass die intermolekulare Interaktion der M1-Moleküle und die Interaktion mit der viralen RNA (vRNA) abgeschwächt wird, was schlussendlich zur Freisetzung der vRNA in das Wirtszell-Zytosol führt⁸⁷. Nach Transport des viralen Genoms in den Zellkern²⁵ findet dort unter anderem die Replikation der vRNA statt^{27,28}, die im weiteren Verlauf der Infektion wieder aus dem Zellkern transportiert wird. Dabei spielt das Adapter-Protein NEP eine wichtige Rolle, indem es über die Bindung an das M1-Protein, das seinerseits die vRNA-Bindung übernimmt, und an den Wirtszell-Export-Faktor Crm1 einen Protein-Export-Komplex mit aufbaut^{25,36-38}. Dieser wird dann aktiv aus dem Zellkern transportiert und ermöglicht es, dass in der späten Phase der Infektion die replizierten neuen viralen Genomsegmente in die entstehenden Virione an der Plasmamembran verpackt werden können^{46,49-55}.

Daher ist es Ziel dieser Arbeit das Influenza-A-Virus M1-Protein rekombinant herzustellen, um dessen pH-Wert-abhängiges Aggregations- und Dissoziationsverhalten sowie mögliche pH-Wert-bedingte konformationelle Änderungen charakterisieren zu können. Außerdem soll der M1-Interaktionspartner NEP rekombinant hergestellt werden, um Einblicke in den Nukleus-Export-Komplex, an dem beide Proteine beteiligt sind, zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit sind zunächst die Ergebnisse der rekombinanten Herstellung beider Proteine gezeigt, gefolgt von strukturellen Charakterisierungen die zu einem besseren Verständnis der Funktionen des M1-Proteins während des Influenza-A-Virus Replikationszyklus führen.

4.1. Rekombinante Herstellung der Proteine M1 und NEP des Influenza-A-Virus

Im ersten Teil dieser Arbeit wird zunächst die rekombinante Proteinbiosynthese der Zielproteine in *E. coli*-Zellen beschrieben. Die *E. coli*-basierte Herstellung von Proteinen bietet den Vorteil, dass das rekombinante Protein mit hoher Ausbeute in kurzer Zeit kostengünstig hergestellt werden kann. Durch die intensive biotechnologische Anwendung dieses Expressions-System sind viele optimierte *E. coli*-Stämme kommerziell erhältlich, die es auch zulassen anspruchsvolle Zielproteine, die zum Beispiel leicht aggregieren oder zytotoxisch wirken, herzustellen. Dabei spielt eine lösliche Herstellung des Zielproteins für die Anwendung strukturelle Charakterisierungs-Methoden eine zentrale Rolle. Trotz der guten Etablierung der *E. coli*-basierten Synthese kann es in Abhängigkeit des Zielproteins dazu kommen, dass die Ausbeute an löslichem Zielprotein nicht für die strukturellen Untersuchungen ausreicht. Ein Wechsel zu einem alternativen Expressions-System, wie dem Sf9-Insektenzellsystem, bietet eine zusätzliche

Möglichkeit anspruchsvolle Zielproteine rekombinant in löslicher Form herzustellen. Daher wurde außerdem im Rahmen dieser Arbeit das Sf9-Insektenzellsystem angewandt um die alternative Herstellung des M1-Proteins sowie des NEP zu untersuchen.

4.1.1. Klonierung der M1 *E.coli*-Konstrukte

Das Influenza-A-Virus-Protein M1 kann in drei Domänen unterteilt werden, die N-terminale, die Mittel- oder M-Domäne und die C-terminale Domäne³⁸. Nach wie vor ist es weitgehend unklar welche Domäne für welche der vielen verschiedenen Funktionen des M1-Proteins verantwortlich ist. Der bereits häufig untersuchte Influenza-A-Virus-Stamm A/Puerto Rico/8/34 des Subtyps H1N1 bietet zahlreiche Vergleichsmöglichkeiten, daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Proteinsequenz des Volllänge-M1-Proteins (Aminosäure 1 – 252) dieses Stammes verwendet.

Bei Proteinen kann es aufgrund der Protein-Faltung dazu kommen, dass der C-Terminus oder der N-Terminus für eine Affinitätstag-basierte Reinigung unzugänglich ist. Außerdem kann die Art des Affinitätstags eine Auswirkung auf die Löslichkeit eines Proteins haben. Daher wurden das Volllänge-M1 erfolgreich in Vektoren mit unterschiedlich lokalisierten His₆- und STREP-Affinitätstags kloniert (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 | Affinitätstags der hergestellten M1-Konstrukte

Name	His ₆ -Tag	STREP-Tag
pASK-IBA3plus-M1	-	C-terminal
pASK-IBA5plus-M1	-	N-terminal
pASK-IBA33plus-M1	C-terminal	-
pASK-IBA35plus-M1	N-terminal	-
pASK-IBA43plus-M1	N-terminal	C-terminal
pET21a(+)-M1	C-terminal	-

Aufgrund der vektorseitigen Kodierung beider Affinitätstags im pASK-IBA43plus-Vektor eignet sich dieser besonders um die Bindungs-Effizienz beider Affinitätstags an deren Matrix zu untersuchen. Außerdem kann durch Anwendung beider Affinitätschromatographien nacheinander die Reinheit des Proteins deutlich erhöht werden. Nach erfolgter Affinitätschromatographie wird der Affinitätstag in der Regel vom Zielprotein proteolytisch abgespalten. Dabei werden häufig Proteasen verwendet, bei denen die Spaltung im C-terminalen Bereich ihrer spezifischen Erkennungs-Sequenz erfolgt. Dementsprechend würde der Großteil der Protease-Erkennungs-Sequenz am C-Terminus des Zielproteins verbleiben und damit die Charakterisierung beeinflussen. Die Klonierung eines Zielgens in einen Vektor mit C-terminalen Affinitätstag hat zur Folge, dass nach Translation je nach Wahl der verwendeten Restriktionsschnittstellen eine bestimmte Anzahl an artifiziellen Aminosäuren verbleiben. Durch die Verwendung der Restriktionsschnittstellen für die Restriktionseendonukleasen *Nde*I und *Xho*I bei

der Klonierung des Volllänge-M1-Gens in den pET21a(+)-Vektor (Novagen) konnte die Anzahl der artifiziiell eingefügten Aminosäuren auf ein Leucin (L) und ein Glutaminat (E), am C-Terminus des Zielproteins vor dem 6-fachen Histidin-Affinitätstag minimiert werden.

4.1.2. Expression und Reinigung des Volllänge-M1-Proteins

Für die Anwendung von strukturebiologischen Methoden ist es wichtig am Ende des Reinigungsprozesses eine lösliche Proteinprobe mit höchstmöglicher Reinheit und Konzentration zu erhalten. Um bei einer rekombinanten *E. coli*-basierten Herstellung von Proteinen eine optimale Ausbeute an löslichem Protein zu erhalten, werden üblicherweise Proteinbiosynthese-Parameter wie zum Beispiel Temperatur, Induktor-Konzentration und Expressionszeitraum, aber auch die verwendeten *E. coli*-Stämme variiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die in Tabelle 4.2 aufgeführten *E. coli*-Stämme auf erfolgreiche M1-Proteinsynthese unter den Standardbedingungen (37°C über 4 Stunden induziert) untersucht. Dabei wurde eine Induktor-Konzentration von 1mM IPTG für den T7-Promotor kontrollierten pET21a(+)-Vektor und von 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin für die Tetracyclin-Promotor kontrollierten pASK-IBA-Vektoren im Rahmen der initialen Testexpressionen in kleinem Maßstab verwendet. Die SDS-PAGE-Analyse der entsprechenden Zellysate zeigte, dass augenscheinlich die höchsten Proteinausbeuten mit den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3)pLysS sowie Rosetta™ 2 (DE3) erzielt werden konnten. (Tabelle 4.2)

Nach den ersten Expressionstests im kleinen Maßstab wurde eine Test-Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie für His₆-markiertes M1-Protein und mit STREP-Tactin-Sepharose-Matrix für STREP-markiertes M1-Protein durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass rekombinant hergestelltes M1-Protein sowohl mit N-terminalem STREP- als auch mit N-terminalem His₆-Affinitätstag nicht an die Affinitätsmatrix binden konnte, was auf einen nicht freizugänglichen N-Terminus hindeutet. Hingegen konnten alle C-terminalen Affinitätstags an die entsprechende Matrix binden um eine Reinigung des Zielproteins vorzunehmen. Bereits in anderen Arbeiten wurde ein C-terminal His₆-markiertes M1-Protein (-LEHHHHHH) für Untersuchungen verwendet und bietet damit gute Vergleichsmöglichkeiten⁶⁶. Aus diesem Grund wurde das pET21a(+)-M1-Konstrukt für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Für die weitere Optimierung der Proteinbiosynthese des Volllänge-M1-Proteins wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta™ 2 bei Temperaturen von 37°C, 30°C und 25°C über vier Stunden und bei 18°C über Nacht mit IPTG-Konzentrationen zwischen 0,2 und 1 mM IPTG induziert. Nach SDS-PAGE-Analyse konnten unter Voraussetzung der erreichten OD₆₀₀ der Zellsuspension von 0,8 die optimale Proteinbiosynthese-Bedingung bei 18°C mit einer 0,5 mM IPTG-Induktion identifiziert werden. Der Großteil des synthetisierten Proteins konnte nach Lyse im Zellpellet detektiert werden, was auf Faltungsprobleme während der Genexpression hindeutet. Allerdings

verblieb auch ein geringer Anteil von etwa 0,5 mg pro Liter Zellsuspension löslich im Überstand (Abbildung 4.1 A), der anschließend säulenchromatographisch gereinigt wurde.

Tabelle 4.2| Abschätzung der Proteinbiosynthese der M1-Konstrukte in verschiedenen *E. coli*-Stämmen unter Standardbedingungen (37°C, 4 Stunden Induktion, 1M IPTG bzw. 0,2 µg/ml AHT) (- = keine; + = gering; ++ = gute; +++ = hohe Proteinbiosynthese)

Name	BLR TM (DE3)	BI21-Star TM (DE3)	BL21-AI TM	BL21 (DE3)pLysS	Rosetta TM 2 (DE3)
pASK-IBA3plus-M1	-	+	+	++	++
pASK-IBA5plus-M1	-	+	+	+++	+++
pASK-IBA33plus-M1	-	+	+	++	++
pASK-IBA35plus-M1	-	+	+	++	++
pASK-IBA43plus-M1	-	+	+	++	++
pET21a(+)-M1	-	++	++	++	+++

Die Reinigung des M1-Proteins basierte grundlegend auf dem Protokoll von Zhang *et al.*, (2012)⁶⁶, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit optimiert. Da die Proteinprobe nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie noch signifikante Verunreinigungen aufwies, die eine aussagekräftige Charakterisierung behindern können, erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie (GF) mit einer kalibrierten *SuperdexTM 200 16/60 prep grade* (16 mm / 600 mm) Säule (Abbildung 4.1 B,C und D). Je nach weiterer Untersuchung der Proteinprobe wurde entweder Gelfiltrationspuffer I (pH-Wert 7,4) oder Gelfiltrationspuffer II (pH-Wert 5,0) verwendet. Das Absorptionsspektrum des GF-Laufes bei pH 7,4 wies vier Absorptionsmaxima auf (Abbildung 4.1. B). Besonders große Proteine bzw. Protein-Aggregate eluieren im Ausschlussvolumen der GF-Säule. Das Absorptionsmaximum I (Peak I) bei einem Retentionsvolumen von ca. 50 ml liegt damit im Bereich des Ausschlussvolumens. Selbst wenn die zugehörigen Elutionsfraktionen M1-Protein enthielten, würde es in Form von aggregiertem Protein vorliegen und für weiterführende strukturelle Charakterisierungen ungeeignet sein. Mittels SDS-PAGE-Analyse wurden die Elutionsfraktionen der Absorptionsmaxima II – IV (Peak II – IV) näher untersucht und festgestellt, dass das M1-Protein ausschließlich in den Fraktionen des Absorptionsmaximums II mit einem Retentionsvolumen von ca. 87 ml bei pH 7,4 eluierte, was einem errechneten Molekulargewicht (MW) von etwa 33,5 kDa entspricht. Das Absorptionsspektrum der Gelfiltration bei pH 5,0 zeigte im Gegensatz zum Spektrum bei pH 7,4 nur ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum (Abbildung 4.1 C Peak I) bei einem Retentionsvolumen von ca. 103 ml, was einem Molekulargewicht von etwa 24,3 kDa entspricht, und ein kleineres Absorptionsmaximum bei einem höheren Retentionsvolumen. Das anhand der Aminosäuresequenz mit dem Online-Server-basierten Programm *Protparam* berechnete Molekulargewicht des Volllänge-M1-Proteins inklusive Affinitätstag beträgt 28,8 kDa. Beide anhand der Retentionsvolumina bei pH 5,0 und 7,4 errechneten Molekulargewichte der M1-Proteineliegen

in der gleichen Größenordnung wie das anhand der Aminosäuresequenz errechnete, so dass die zugehörigen Fraktionen der M1-Monomere entsprechen. Da das M1-Protein bei physiologischem pH-Wert dazu tendiert Protein-Aggregate auszubilden⁶⁶, werden diese vermutlich im Ausschlussvolumen der GF-Säule eluieren. Nicht auszuschließen sind auch unterschiedliche Retentionsvolumina aufgrund von fehlgefaltetem M1-Protein, was zur unspezifischen Protein-Aggregation führt. Die unterschiedlichen pH-Werte tragen außerdem dazu bei, dass die Proteine aufgrund möglicher pH-Wert-bedingter Ladungsänderung andere Konformationen einnehmen, deshalb kommt es vermutlich zu den Retentionsvolumina-Unterschieden zwischen den beiden M1- Absorptionsmaxima (Peak III bei pH-Wert 7,4 und Peak I bei pH-Wert 5,0). SDS-PAGE-Analysen der Elutionsfraktionen nach der Affinitätschromatographie und der Größenausschlusschromatographie bei pH 7,4 sowie bei pH 5,0 konnten bestätigen, dass es sich bei den Elutionsfraktionen um ein Protein mit gleichem Molekulargewicht handelte und die Reinheit der finalen Proteinprobe mit >95% abgeschätzt werden konnte (Abbildung 4.1 D). Eine abschließende Western Blot-Analyse konnte nachweisen, dass es sich bei dem rekombinant hergestellten und gereinigten Protein um das Volllänge-M1 handelte. Das erfolgreich rekombinant hergestellte Volllänge-M1-Protein konnte nun für die strukturelle Charakterisierung verwendet werden.

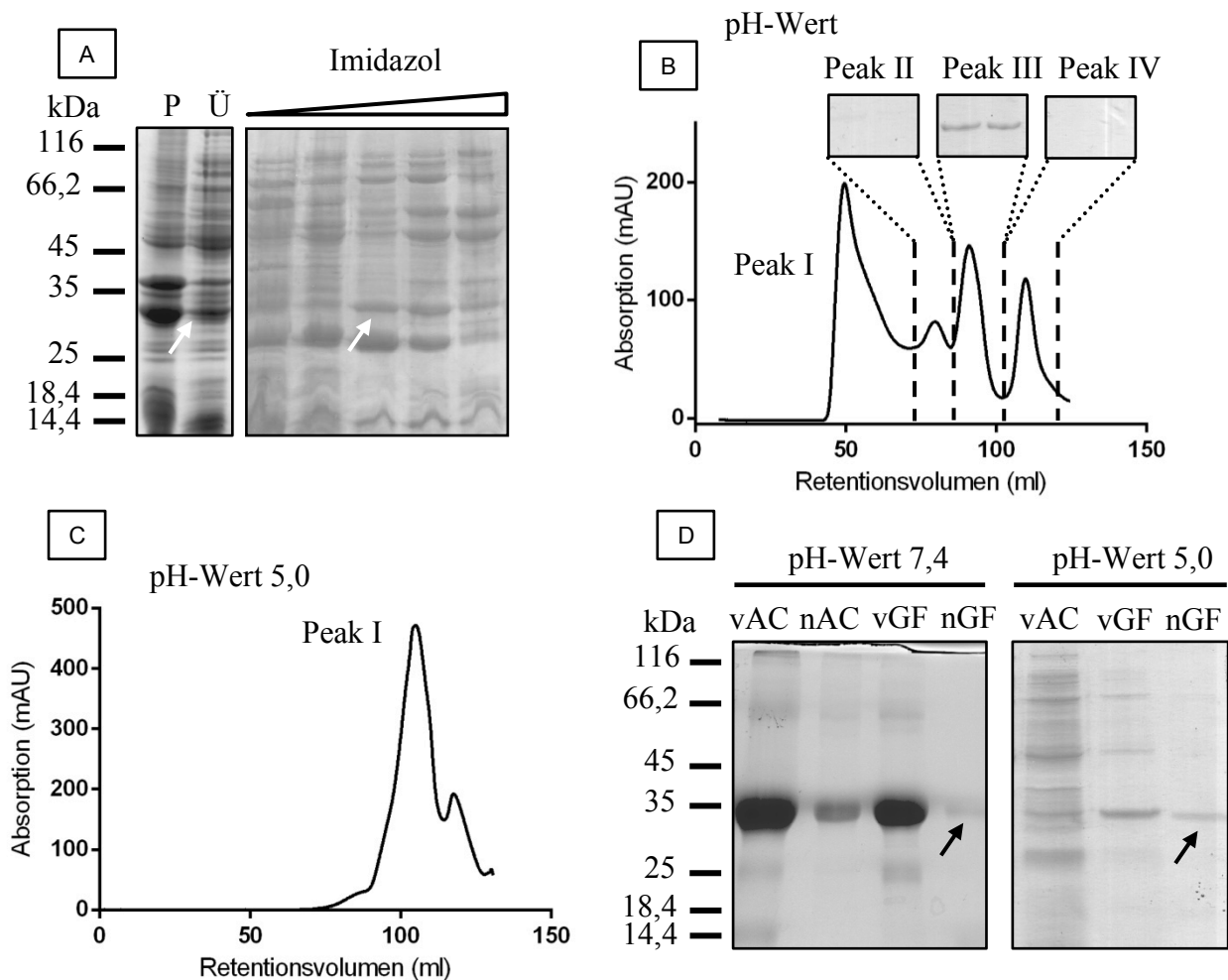


Abbildung 4.1 | *Rekombinante Synthese und Reinigung des M1-Proteins* | **A.** Das 28,8 kDa große M1 Protein wurde im *E. coli*-Stamm Rosetta™ 2 erfolgreich hergestellt (links, Pfeil), wobei der größere Anteil des synthetisierten Proteins im Zellpellet (P) detektiert wurde. Lediglich ein kleiner Anteil war im löslichen im Überstand (Ü) enthalten. Im ersten Reinigungsschritt wurde eine Affinitätschromatographie mit einem linearen Imidazol-Gradienten durchgeführt (rechts). Die Reinheit der Proteinprobe nach der Affinitätschromatographie war für die Charakterisierung nicht hoch genug, daher wurde anschließend eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. **B.** Sollten weiterführende Untersuchungen bei pH 7,4 durchgeführt werden, wurde der Gelfiltrationspuffer I verwendet um die Reinheit der M1-Probe für analytische Zwecke zu erhöhen. In den Fraktionen des *Peak III* des Absorptionsspektrums konnte das M1-Protein mittels SDS-PAGE (15% PAA) nachgewiesen werden. **C.** Sollten strukturelle Methoden mit dem M1-Protein bei pH 5,0 durchgeführt werden, wurde der Gelfiltrationspuffer II verwendet. Das zugehörige Absorptionsspektrum zeigt nur ein dominierendes Maximum. **D.** Die Reinheit des M1-Proteins (Pfeil, schwarz) konnte durch SDS-PAGE-Analysen (15% PAA) nach erfolgreicher Größenausschlusschromatographie auf >95% abgeschätzt werden (vAC: vor Affinitätschromatographie, nAC: nach Affinitätschromatographie, vGF: vor Größenausschlusschromatographie, nGF: nach Größenausschlusschromatographie).

4.1.3. Klonierung der NEP *E. coli* Konstrukte

Das Influenza-A-Virus Nukleus-Export-Protein (NEP) stellt die 121 Aminosäure lange Spließ-Variante des Gensegments 8 dar. Bisher wurde noch nicht gezeigt, dass die NEP-Gensequenz anhand des vollständigen Gensegments 8 amplifiziert wurde. Dementsprechend wurde eine drei-

stufige PCR angewandt, um die Gensequenz des NEP Proteins aus einer kompletten Gensegment 8-Vorlage zu amplifizieren (Abbildung 4.2).



Abbildung 4.2| PCR-Schema zur Amplifikation des NEP-Gens| Für die Amplifikation des NEP-Gens wurde eine drei Stufen PCR durchgeführt. Bei der ersten PCR wird zunächst das Exon 1 des Influenza-A-Virus Segmentes 8 amplifiziert. In der zweiten PCR wird über den vorwärts *Primer* das Exon 2 eingeführt. In der letzten PCR wird das komplette NEP-Gen mit Restriktionsschnittstellen für die weitere Klonierung vervielfältigt.

Mit der ersten PCR wurde das Exon 1 amplifiziert und nach erfolgter Reinigung als Vorlage für die zweite PCR verwendet. In der zweiten PCR wurde mit Hilfe des vorwärts gerichteten Oligonukleotids das Exon 2 eingefügt. In der dritten PCR wurde die komplette Gensequenz des NEP Proteins mit Restriktionsschnittstellen für die folgende Klonierung amplifiziert. Unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* wurde das Gen anschließend erfolgreich in die unterschiedlichen Tetracyclin-regulierten pASK-Vektoren kloniert (Tabelle 4.2). Diese Vektoren erlauben es zwischen dem His₆- bzw. STREP-Affinitätstag zu wählen. Außerdem bietet der Vektor mit einem doppelten Affinitätstag bei eventueller Unzugänglichkeit eines Affinitätstags das Protein dennoch über den anderen reinigen zu können.

Tabelle 4.2| Klonierte NEP-Konstrukte für die rekombinante Protein-Herstellung|

Name	His ₆ -Tag	STREP-Tag
pASK-IBA5plus-NEP	-	N-terminal
pASK-IBA35plus-NEP	N-terminal	-
pASK-IBA43plus-NEP	N-terminal	C-terminal

4.1.4. Expression und Reinigung von NEP

Nach erfolgreicher Klonierung wurden Test-Synthesen des rekombinanten NEP in unterschiedlichen für die Proteinbiosynthese optimierten *E. coli*-Stämmen durchgeführt um herauszufinden welcher der *E. coli*-Stämme, sich für eine rekombinante Synthese des NEP eignet (Tabelle 4.3)

Tabelle 4.3 | Abschätzung der *E. coli*-Proteinbiosynthese der NEP-Konstrukte unter Standardbedingungen vor Validierung durch Western Blot (37°C, 4 Stunden Induktion, 0,2 µg/ml AHT) | (- = keine; + = gering; ++ = gute; +++ = hohe Proteinbiosynthese)

<i>E. coli</i> -Stamm	pASK-IBA5plus-NEP	pASK-IBA35plus-NEP	pASK-IBA43plus-NEP
BLR TM (DE3)	-	-	-
BL21-Star TM (DE3)	-	-	-
BL21-AI TM	+	+	+
BL21 (DE3)pLysS	++	++	++

Hierzu wurden Testexpressionen im 100 ml Maßstab bei 37°C über 4 Stunden bei einer OD₆₀₀ der Zellsuspension von 0,8 mit 0,2 µg/ml AHT induziert. Die anschließende SDS-PAGE-Analyse zeigte im erwarteten MW-Bereich von 15 kDa eine Intensitätszunahme einer Proteinbande im zeitlichen Verlauf der Induktion bei den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3) pLysS und BL21-AITM zu verzeichnen (Abbildung 4.3 Pfeil). Systematische Untersuchungen der optimalen Temperatur für die Proteinbiosynthese des Zielproteins wurden bei 37°C, 30°C, 25°C und 20°C jeweils über vier Stunden nach Induktion mit 0,2 µg/ml AHT durchgeführt, konnten jedoch keine Intensitäts-Zunahme der Proteinbande bei 15 kDa bewirken. Die Validierung der Proteinbande mittels Western Blots über immunhistochemische Anfärbung des His₆-Affinitätstag zeigte, dass es sich nicht um das NEP handelte. Vielmehr zeigte sich, dass das Zielprotein nicht synthetisiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Fehlgeschlagene oder mangelnde Ausbeute an Zielprotein ist bei der *E. coli*-basierten Überexpression keine Seltenheit. Häufig wird dann auf alternative Expressionssysteme zurückgegriffen wie zum Beispiel Hefe- oder Insektenzellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Insektenzellsystem mit Sf9-Zellen verwendet, um ein alternatives Expressionssystem für die Herstellung des rekombinanten NEP zu testen, aber auch um die Ausbeute an rekombinant hergestelltem M1-Protein möglicherweise zu steigern.

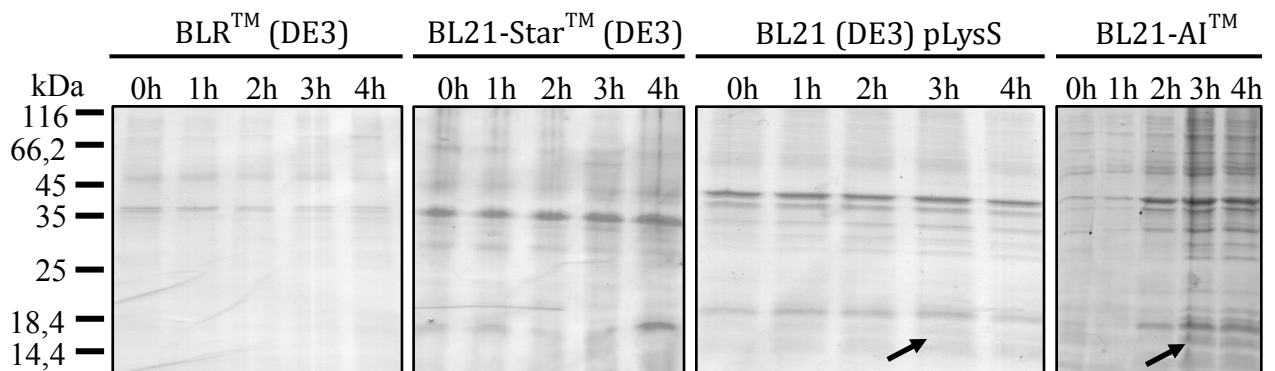


Abbildung 4.3| SDS-PAGE (15% PAA) zur Kontrolle der NEP-Genexpression in verschiedenen *E. coli*-Stämmen| Exemplarisch sind hier die Genexpressionstests für das pASK-IBA43plus-NEP Konstrukt bei 37°C für 4 Stunden nach Erreichen der OD₆₀₀ von 0,8 induziert gezeigt. Aufgetragen wurden jeweils 5 µl eines *E. coli*-Zelllysates vor der Induktion (0h) mit 0,2 µg/ml AHT und jeweils eine stündlich genommene Probe. Nur bei den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3) pLysS und BL21-AI™ ist ein Anstieg der Intensität der erwarteten Proteinbande bei ca. 15 kDa zu erkennen (Pfeil). Die Stämme BLR™ (DE3) und BL21-Star™ (DE3) zeigten keine detektierbaren Proteinmengen an synthetisiertem NEP.

4.1.5. M1- und NEP-Proteinbiosynthese in Sf9-Zellen

Das Insektenzellsystem mit Sf9-Zellen bietet eine alternative Möglichkeit zur rekombinanten Herstellung von Zielproteinen. Das in dieser Arbeit durchgeführte Genexpression in Insektenzellen wurde grundlegend nach der Bac-to-Bac® „*Baculovirus Expression System*“-Anleitung der Firma Invitrogen durchgeführt. In diesem System wird das Zielgen zunächst in einen Shuttle-Vektor (pFastBac™1) kloniert, der es nach Transformation von *E. coli* DH10Bac™-Zellen ermöglicht das Zielgen über Transposition in das Baculovirus-Genom (Bacmid) einzubringen. Das dadurch entstandene Bacmid wird über Transfektion in die Sf9-Zellen gebracht. Durch viertägige Inkubation dieser Zellen entstehen Insektenzell-infektiöse Baculoviren (P1-Stock), die das Zielgen enthalten. Nach der dritten Infektionsrunde befinden sich in der Regel genügend infektiöse Baculoviren im Kulturmedium, sodass die Sf9-Zellen nach erneuter Infektion signifikante Mengen an rekombinantem Zielprotein herstellen können.

Um die Proteinbiosynthese der Zielproteine M1 und NEP detektieren zu können wurden die Zielgensequenzen in einen modifizierten pFastBac™1-Vektor kloniert, der zusätzlich für einen HA-Tag kodierte. Da bereits aus den vorausgegangenen *E. coli*-Expressionstest hervorging, dass der N-Terminus des M1-Proteins unzugänglich ist wurde ein M1-Konstrukt mit C-terminalen HA-Tag hergestellt, während im Falle des NEP ein Konstrukt mit N-terminalem HA-Tag kloniert wurde. Nach erfolgreicher Herstellung der zugehörigen baculoviralen P3-Stocks und Infektion von Sf9-Zellen mit diesen wurden 4 Tage p.i. Zelllysate hergestellt, die mittels SDS-PAGE und Western Blot auf erfolgreiche Proteinbiosynthese des M1-Proteins und des NEP überprüft wurden. Das SDS-PAGE-Gel (Abbildung 4.4) zeigt, dass im Vergleich zu Zelllysaten einer Infektion mit

einem Virus, das lediglich die für die baculovirale Replikation notwendigen Proteine trägt (Kontrolle), eine deutliche Protein-Bande bei einem für das M1-Protein erwarteten Molekulargewicht von ~28 kDa und einem für das NEP erwarteten Molekulargewicht von ~15 kDa vorhanden war. Durch Western Blot-Analyse mit anti-HA-Tag-Antikörpern konnte die Proteinbande bei ~28 kDa der M1-Probe sowie die Bande bei ~15kDa der NEP-Probe spezifisch angefärbt werden, wodurch eine erfolgreiche Proteinbiosynthese beider Zielproteine nachgewiesen wurde.

Die rekombinante Herstellung des NEP konnte in Sf9-Insektenzellsystem etabliert werden, jedoch waren die Proteinausbeuten für weiterführende strukturelle Charakterisierungen zu gering. Zukünftig kann die hier etablierte Synthese-Grundlage für weitere Optimierungen genutzt werden, um anschließend die strukturelle Charakterisierung des Proteins vornehmen zu können. Da diese Ergebnisse erst gegen Ende der Arbeit erhalten wurden, war eine entsprechende Optimierung im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Die rekombinante Sf9-Insektenzell-basierte Herstellung des M1-Proteins konnte ebenfalls etabliert werden, resultierte jedoch ebenso in zu geringen Proteinausbeuten für eine weiterführende strukturelle Charakterisierung. Da jedoch ausreichende Ausbeuten bei der *E.coli*-basierten rekombinanten M1-Herstellung erzielt wurden, konnte mit dieser Methode fortgefahren werden um ausreichende Proteinmengen für strukturelle Charakterisierungen des M1-Proteins herzustellen.

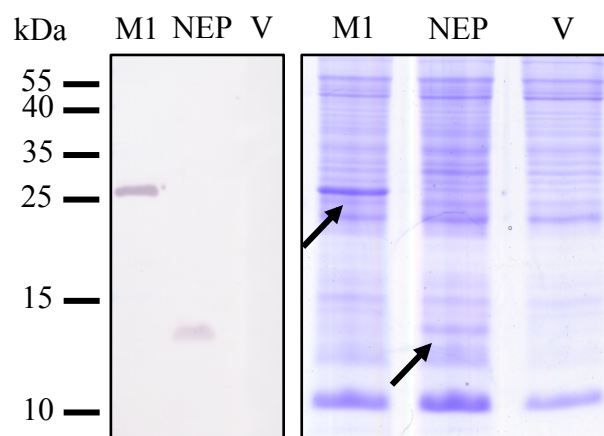


Abbildung 4.4| Kontrolle der Proteinbiosynthese von M1 und NEP in Sf9-Zellen| Die Proteine M1 und NEP konnten mit einem SDS-PAGE Gel (rechts) und einem Western Blot (links) in Sf9-Zelllysaten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde Lysate von Sf9-Zellen, die mit einem Baculovirus, das lediglich die für die baculovirale Replikation notwendigen Proteine kodiert (V), als Kontrolle aufgetragen, um Virus-bedingte Artefakte auszuschließen.

4.2. Strukturelle Charakterisierung des rekombinanten M1-Proteins

Um die Grundlagen der enzymatischen Aktivität oder der funktionellen Eigenschaft von Proteinen besser verstehen und erklären zu können ist ein fundiertes Wissen über den strukturellen Aufbau des Zielproteins von hoher Bedeutung. Um Einblicke in die Struktur und Funktion des M1-Proteins zu erhalten wurde zunächst die Lagerungsfähigkeit bei 4°C von M1-Proteinproben bei pH-Wert 8,0

und 5,0 mittels DLS und CD-Spektroskopie untersucht. Mit konventionellen Röntgenkristallisations-Experimenten wurde anschließend versucht Kristalle des Volllänge-M1-Proteins zu generieren, um die hochaufgelöste Struktur im atomaren Bereich lösen zu können. Außerdem wurde der alternative Ansatz der *in vivo*-Kristallisation verfolgt, der auf spontane Kristallisation des M1-Proteins und des NEP untersucht wurde. Um die strukturelle Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen vorzunehmen wurden Modell-Rekonstruktionen des M1-Proteins in Lösung bei unterschiedlichen pH-Werten unter Zuhilfenahme von SAXS-Messungen und nachgeschalteter computergestützter Datenanalyse durchgeführt. Die unterschiedlichen Auswirkungen der Proteinkonzentration und des pH-Wertes auf die Proteinfaltung wurden im Anschluss mit der CD-Spektroskopie untersucht. Da das M1-Protein eine Tendenz zur Ausbildung von Oligomeren-Strukturen bei physiologischem pH-Wert aufweist, die SAXS-Messungen bestätigte, wurden AFM-Topographien angefertigt.

4.2.1. Dispersitäts- und Faltungsuntersuchungen des M1-Proteins in Lösung

Für strukturelle Charakterisierungen ist es von Vorteil wenn eine Proteinprobe möglichst ausschließlich (Monodispersität) aus Monomeren besteht. Die dynamische Lichtstreuung (DLS) bietet die Möglichkeit den hydrodynamischen Radius von Partikeln in Lösung aufgrund von Lichtstreuung zu bestimmen. Da die Intensität des gestreuten Lichts mit sechster Potenz vom Radius der Partikel in Lösung anhängig ist, erzeugen Partikel mit hohem Molekulargewicht ein deutlich intensiveres Streusignal als Partikel mit kleinem Molekulargewicht¹⁶⁰. Aus diesem Grund werden auch schon sehr kleine Konzentrationen von hochmolekularen Partikeln mit der Methode detektiert und tragen wesentlich effizienter zur Lichtstreuung bei als niedermolekulare Partikel mit gleicher Konzentration.

Um ein ausreichendes DLS-Signal von einem ca. 28,8 kDa großen Protein, dem M1-Protein, messen zu können musste die Proteinprobe durch Ultrazentrifugation auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml konzentriert werden. Erste DLS-Experimente zeigten einen polydispersen Zustand der M1-Proteinprobe, sowohl bei pH 5,0 als auch bei pH 8,0 (Abbildung 4.5). Während bei einem pH-Wert von 8,0 hydrodynamische Radien (R_h) im Bereich von 15 - 100 nm detektiert wurden, erstreckten sich die R_h -Werte bei einem pH-Wert von 5,0 über einen Bereich von 6 - 80 nm. Da der gemessene R_h unter anderem auch von der Protein-Konformation abhängt -umso kompakter ein Partikel ist desto geringer ist der ermittelte R_h - kann es sein dass das M1-Protein bei pH 5,0 eine eher kompakte Konformation einnimmt, während es bei pH 8,0 flexibler bzw. elongierter ist. Von einer monodispersen Proteinprobe mit einem Molekulargewicht von 28,8 kDa wird in etwa ein R_h von 2,3 nm, berechnet nach Georgieva *et al.* 2004¹⁶¹, erwartet. Da bei der DLS-Messung deutlich höhere R_h -Werte bestimmt als für monomeres M1-Protein erwartet wurden, könnten die größeren R_h aus der bereits in anderen Arbeiten beschriebenen Tendenz des M1-Proteins, oligomeren Strukturen auszubilden,

resultieren⁶⁶. Möglicherweise könnten auch Domänen des M1-Proteins ungefaltet vorliegen, was zu einer R_h -Erhöhung beitragen kann. Daher wurde der Faltungszustand des M1-Proteins in Abhängigkeit des pH-Wertes mittels Zirkular Dichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht (Abbildungen 4.5). Die CD-Spektren zeigten übereinstimmend bei 208 nm und bei 223 nm jeweils ein lokales Minimum, was für ein hauptsächlich α -helikales Protein charakteristisch ist¹⁰¹. Der Sekundärstrukturelement-Gehalt konnte nach dem Algorithmus von Louis-Jeune *et al.* (2015)¹⁶² berechnet werden und ergab einen α -Helix-Gehalt von 83,4% und einen β -Faltblatt-Gehalt von 1,42% (Abbildung 4.16 A und B). Folglich ist die Sekundärstrukturzusammensetzung unabhängig vom gemessenen pH-Wertbereich, und es konnten keine Anzeichen für eine zumindest partiell ungefaltete Struktur des M1-Proteins erhalten werden.

Für die Strukturuntersuchung mittels konventioneller Kristallographie ist eine monodisperse Proteinprobe hilfreich, da Dispersitätsunterschiede den initialen Schritt des Kristallwachstums, die Nukleation, entscheidend behindern können. Auch die experimentellen Daten der Röntgenkleinwinkelstreuung können von monodispersen Proben aussagekräftiger analysiert und bessere Modell-Rekonstruktionen berechnet werden. Um die oligomeren Zustände des M1-Proteins aufzulösen, wurde das Detergenz CHAPS in Konzentrationen unterhalb der kritischen Mizellkonzentration (6 - 10 mM)¹⁶³ hinzugegeben. Nach wiederholter DLS-Messung blieben die oligomeren Strukturen jedoch erhalten (Daten nicht gezeigt). Nichtsdestotrotz wurde die Stabilität der Proteinproben bei den pH-Werten 5,0 und 8,0 im 24-Stunden Rhythmus über vier Tage getestet, indem jeweils ein CD-Spektrum aufgenommen sowie eine DLS-Messung durchgeführt wurde (Abbildung 4.5). Selbst nach vier Tagen Lagerung einer 1 mg/ml konzentrierten Probe bei 4°C zeichnete sich keine Änderung ab, weder der CD-Spektren noch der DLS-Messungen. Aufgrund des konstanten Faltungszustandes und der gleichbleibenden DLS-Radien kann die M1-Proteinprobe bis zu vier Tage vor weiteren strukturellen Messungen hergestellt und bei 4°C gelagert werden. Außerdem kann das M1-Protein mit konventionellen Kristallisationsansätzen zur Kristallisation gebracht werden bevor sich die Faltung des Proteins ändert und ein Kristallwachstum behindert.

Wie zuvor beschrieben, handelt es sich bei der DLS-Technik um eine sehr sensitive Methode, die aufgrund des mathematischen Zusammenhangs zwischen R_h und Intensität des Streulichtes schon geringe Konzentrationen an hochmolekularen Partikeln detektieren kann. Daher ist es möglich, dass in DLS-Messungen hochgradig polydispers erscheinende Proteinproben nur einen sehr geringen Anteil an hochmolekularen Partikeln enthalten und weitgehend monodispers sind, so dass diese dennoch für strukturelle Experimente eingesetzt werden können, was im Rahmen dieser Arbeit auch erfolgte.

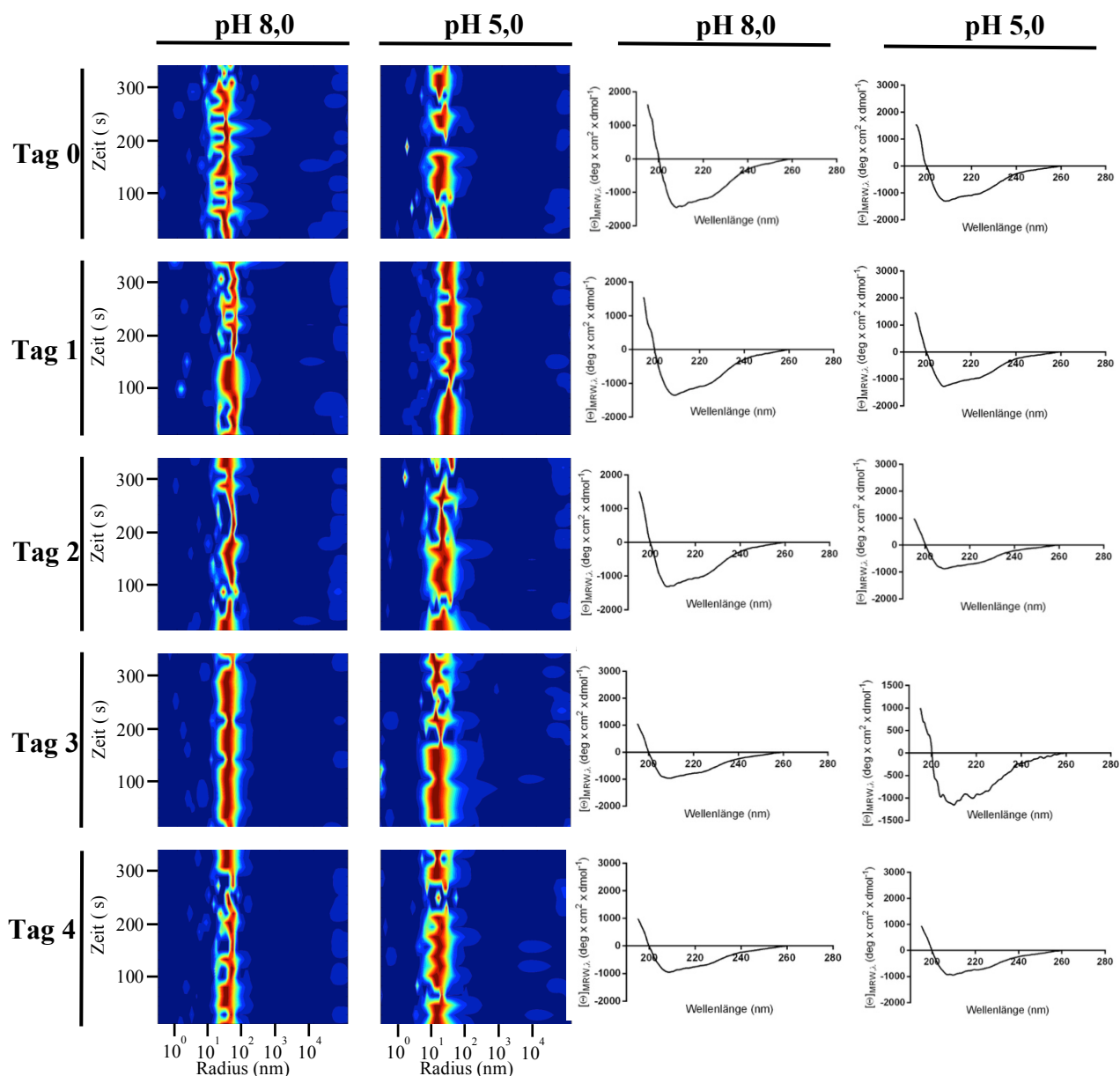


Abbildung 4.5] Stabilitätsuntersuchung von rekombinanten M1 mittels DLS und CD-Spektroskopie| Je eine M1 Proteinprobe mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde bei pH-Wert 8,0 und pH-Wert 5,0 über vier Tage mittels DLS-Messung und CD-Spektroskopie auf deren Stabilität untersucht. Während der viertägigen Untersuchung änderte sich das Partikel-Größenprofil von 6 - 80 nm der pH-Wert 5,0 und von 15 - 100 nm der pH-Wert 8,0 Probe der DLS-Messungen nicht. Ebenso konnte keine Änderung der CD-Spektren oder der Proteinkonzentration in Abhängigkeit der Lagerungsdauer festgestellt werden. Damit ist M1 bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml über vier Tage Lagerung bei 4°C soweit stabil, dass weitere Charakterisierungen durchgeführt werden können.

4.2.2. Konventionelle Kristallisationsversuche des Volllänge-M1-Proteins

Um hochaufgelöste Strukturinformationen des Volllänge-M1 zu generieren, was bis heute trotz intensiver Bemühungen nicht gelungen ist, wurden Kristallisationsansätze für die Röntgenkristallographie durchgeführt.

Die kompakte NM-Domäne des M1-Proteins konnte bereits bei pH 4,5 mittels Röntgenkristallographie untersucht und ein hochaufgelöstes Strukturmodell generiert werden¹⁶⁴.

Basierend auf den beschriebenen Kristallisationsbedingungen wurden Roboter-assistierte *Screening*-Experimente mit Volllänge-M1 bei einem pH-Wert von 5,0 mit einer Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml im *sitting-drop* Verfahren durchgeführt. Unter den 192 getesteten Kristallisationsbedingungen der kommerziell erhältlichen Kristallisations-Lösungen *PEG/Ion Screen*TM (Hampton Research) und *Structure Screen I & II HT96* (Molecular Dimensions), konnten neben Protein-Präzipitation (Abbildung 4.6 A) auch einige Pufferzusammensetzungen mit vielversprechender Phasentrennung (Abbildung 4.6 B) identifiziert werden. In drei Ansätzen konnten potentielle Proteinkristalle detektiert werden (Abbildung 4.6 C und D) Bei der Pufferzusammensetzung B7 (0,2 M Ammoniumnitrat, 20% PEG 3350) des *PEG/Ion Screen*TM (Hampton Research) entstanden nach 90 Tagen bei Raumtemperatur nadelförmige Strukturen mit einer Kantenlänge von etwa 150 µm, ebenso konnte eine nadelförmige Struktur mit einer Kantenlänge von 250 µm bei der Pufferzusammensetzung F9 (0,1 M Ammoniumzitat pH-Wert 7,0,12% PEG 3350) des selben Kristallisations-Screens beobachtet werden. Bei der Pufferzusammensetzung F11 (1,6 M Ammoniumsulfat, 100 mM MES pH-Wert 6,5 und 10 % Dioxan) des *Structure Screen I & II HT96* (Molecular Dimensions) hat sich augenscheinlich ein hochgeordneter hexagonaler Kristall mit ca. 25 µm x 25 µm Kantenlänge nach 90 Tagen bei Raumtemperatur gebildet (Abbildung 4.6 E). Letzterer nahm nach Zugabe von Methylenblau eine bläuliche Färbung an (Abbildung 4.6 F), was als charakteristischer Hinweis auf einen Proteinkristall gilt¹⁶⁵. Durch Änderung von pH-Wert, Präzipitanten- und Proteinkonzentration konnte keine Optimierung der Kristallmorphologie sowie -größe erzielt werden. Ob es sich tatsächlich um einen Proteinkristall handelt, kann erst mit Sicherheit festgestellt werden, wenn ein Röntgenbeugungstest an einer Synchrotronstrahlungsquelle, z.B. dem PETRA III-Ring am DESY (Hamburg) in den für Proteinkristalle charakteristischen Bragg-Beugungssignalen resultiert. Dieses Experiment konnte auf Grund mangelnder Verfügbarkeit von Messzeit im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

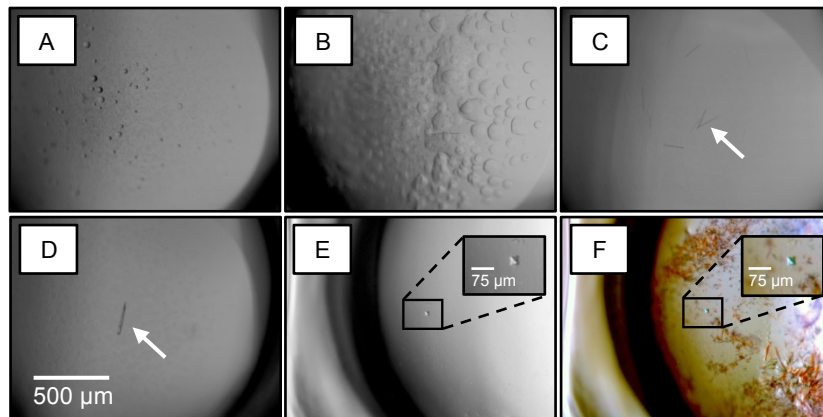


Abbildung 4.6| Lichtmikroskopische Untersuchung verschiedener Kristallisationsbedingungen mit Volllänge-M1| Unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Kristallisations-Lösungen des *PEG/Ion Screen*TM (Hampton Research) konnte neben Protein-Präzipitation (**A**) bei der Pufferzusammensetzung 0,2 Magnesiumazetat mit 20% PEG 3350 (A4) auch vielversprechende Phasentrennung (**B**) bei der Pufferzusammensetzung 0,2 M Lithiumsulfat mit 20% PEG 3350 (C7) detektiert werden. Außerdem konnten in den Ansätzen mit 0,2 M Ammoniumnitrat und 20% PEG 3350 (**C**) sowie 0,1 M Ammoniumzitrat (pH-Wert 7,0) und 12% PEG 3350 (**D**) des gleichen Kristallisations-Screen kleine nadelförmige Kristalle registriert werden. (**E**) Ein hexagonaler Kristall mit den Kantenlängen 25 µm x 25 µm wurde in der Kristallisationsbedingung F11 (1,6 M Ammoniumsulfat, 100 mM MES pH-Wert 6,5 und 10 % Dioxan) des *Structure Screen I & II HT96* (Molecular Dimensions) detektiert. (**F**) Anhand der blauen Anfärbung nach Methyleneblau-Zugabe lässt sich vermuten, dass es sich um einen Proteinkristall handelt, was allerdings zukünftig durch ein Röntgenbeugungsexperiment bestätigt werden muss.

4.2.3. Kristallisationsversuche des M1-Proteins und NEP in Sf9-Zellen

Die spontane Kristallisation von Proteinen in eukaryotischen Zellen ist kein Einzelfall und kann für strukturelle Charakterisierungen ausgenutzt werden^{144,146}. Auch in Sf9-Insektenzellen wurde die Kristallisation von rekombinanten Zielproteinen beobachtet¹⁴³. Durch Arbeiten innerhalb dieser Arbeitsgruppe wurde bereits das Zellkompartiment als ein *Screening*-Parameter identifiziert. Die Detektion von *in vivo*-Kristallen mittels lichtmikroskopischer Methoden wird deutlich vereinfacht, wenn die intrazellulär gewachsenen Kristalle die Zellmembran verformen und dadurch die Zellmorphologie gut sichtbar verändern. Werden die Zellen nicht verformt wird eine Detektion von eventuell gewachsenen Kristallen schwierig.

Da es bisher keine hochaufgelöste Kristallstruktur der Volllänge-Proteine von M1 und NEP gibt, wurde im Folgenden parallel zu den konventionellen Kristallisationsansätzen mit gereinigtem M1-Protein getestet, ob es in Sf9-Insektenzellen zur spontanen intrazellulären Proteinkristallisation in Abhängigkeit des Zellkompartimentes kommt. Um diese Untersuchung durchführen zu können wurden zunächst Konstrukte der Zielgene mit Lokalisations-Signalen für unterschiedliche Zellkompartimente kloniert (Tabelle 4.4). Zielproteine werden standardmäßig aufgrund der regulären Proteinbiosynthese, sofern kein Lokalisationssignal im Zielprotein selbst vorhanden ist,

im Zytosol synthetisiert und verbleiben dort. Die Aminosäuren Serin (S), Lysin (K) und Leucin (L), die durch eine Klonierung in den pFastBac1-SKL-Vektor, während der zytosolischen Proteinbiosynthese zusätzlich C-terminal an das Zielprotein angehängt wurden, bewirken den Transport in die Peroxisomen der Sf9-Zelle¹⁶⁶. Die Signalsequenz für das endoplasmatische Retikulum (ER) entstammt aus der trypanosomalen Cystein-Protease Cathepsin B und wurde zusätzlich mit dem Retentionssignal bestehend aus den Aminosäuren Lysin (K), Aspartat (D), Glutamat (E) und Leucin (L)¹⁴³. Die Klonierung des Zielgens in den pFastBac1-ER KDEL-Vektor bewirkt demnach eine Synthese des Proteins in das ER mit anschließendem Verbleib in diesem Kompartiment.

Tabelle 4.4 | Klonierte M1- und NEP-Konstrukte für Translokation in unterschiedliche Zellkompartimente

modifizierter Vektor	M1-Protein	NEP
pFastBac1-cyto	Zytosol	Zytosol
pFastBac1-SKL	Peroxisomen	Peroxisomen
pFastBac1-ER KDEL	endoplasmatisches Retikulum	endoplasmatisches Retikulum

Wie bereits in Abschnitt XX beschrieben wurden auch die P3-Stocks der Baculoviren, welche das Gen des M1-Proteins sowie des NEP mit den unterschiedlichen Lokalisationssignalen trugen, erfolgreich hergestellt. Vitale nicht infizierte Sf9-Zellen bilden die Kontrolle für Stress-Anzeichen, wie eine deutliche Ausbildung von Granula, geringe Zelldichte, ein vergrößerter Zellkern und vermehrt lysierte Zellen. Im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen, die rund und nicht granulös sind und ungefähr eine einheitliche Größe aufweisen (Abbildung 4.7 Sf9-Zellen), zeigt die mit einem Virus infizierte Kontrolle, das lediglich die für eine baculovirale Vermehrung notwendigen Proteine kodiert, vermehrt Stress-Anzeichen in Form von lysierten, abgestorbenen Zellen (Abbildung 4.7 Leer-Virus). Weitere nennenswerte Stress-Anzeichen sind nicht zu erkennen. Vier Tage nach Infektion mit den Zielgenen-tragenden Baculoviren zeigen die Sf9-Zellen hingegen erhebliche Stress-Anzeichen (Abbildung 4.7, M1- und NEP-Spalte). So ist deutlich die Bildung von Granula, eine geringere Zelldichte und eine vermehrte Lyse von Zellen zu erkennen. Zusätzlich können vermehrt Zellen beobachtet werden, die einen vergrößerten Zellkern aufweisen. Trotz der massiven Anzeichen von Stress, die eine erfolgreiche Infektion mit Zielgen-tragenden Baculoviren suggeriert, konnten keine Anhaltspunkte für das spontane Wachstum von *in vivo*-Kristallen erhalten werden.

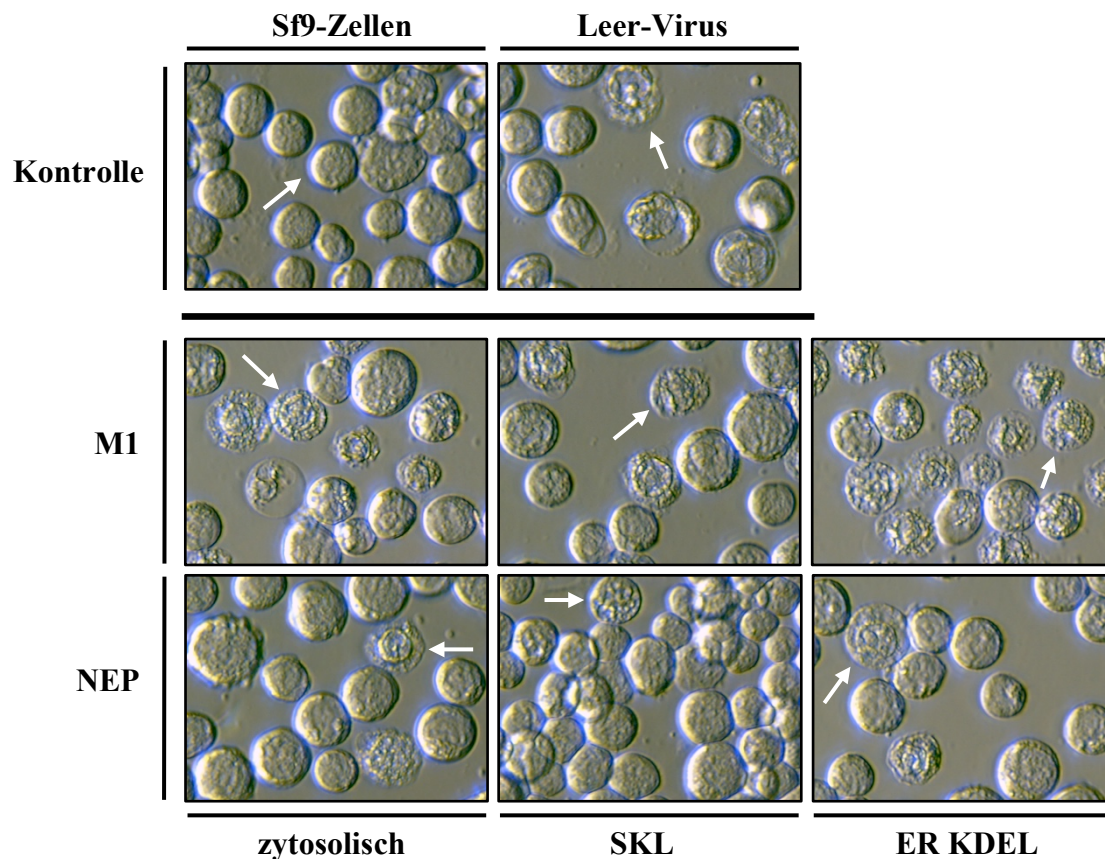


Abbildung 4.7 | Lichtmikroskopische Untersuchung von *Baculovirus*-infizierten Sf9-Zellen auf spontane *in vivo*-Kristallisation vier Tage nach Infektion | Morphologisch intakte Sf9-Zellen sind rund geformt und weisen wenig bis keine Granula auf (Sf9-Zellen, Pfeil). Mit Leer-Virus infizierte Zellen zeigen vereinzelt Stressanzeichen in Form von Granula und vereinzelt lysierte Zellen (Leer-Virus, Pfeil). Ein variabler Parameter der zu einer spontanen Kristallisation führen kann ist das Zellkompartiment. Daher wurden Konstrukte hergestellt die Signalsequenzen für Peroxisomen (SKL) oder das endoplasmatische Retikulum (ER KDEL) aufweisen. Unabhängig vom Konstrukt und Protein weisen alle infizierten Sf9-Zellen vier Tage nach Infektion ein erhöhtes Maß an Granularität sowie eine deutlich verringerte Zelldichte mit einem größeren Anteil an lysierten Zellen im Vergleich zur leer Virus Kontrolle auf. Hinweise auf spontane intrazelluläre Kristallisation der Zielproteine sind nicht erkennbar.

Allerdings kann zu diesem Zeitpunkt noch keine definitive Aussage über den Misserfolg bzw. möglicherweise auch Erfolg der spontanen intrazellulären Kristallisation der Zielproteine getroffen werden. Insbesondere bei sehr kleinen Kristallen mit Kantenlängen im Nanometer-Maßstab, welche die Zellmembran nicht verformen, kann es aufgrund der Limitationen der verfügbaren Mikroskopietechnik sowie der Dichte-Ähnlichkeit von Proteinkristallen zum umgebenden Zellmaterial zu visuellen Detektionsproblemen kommen.

In einigen Fällen war eine Detektion erst nach Lyse der infizierten Zellen zweifelsfrei möglich, da sich durch diesen Prozess die Umgebung der Kristalle signifikant ändert. Allerdings können Kristalle nach Lyse der Zellen mit RIPA-Puffer nur dann entdeckt werden, wenn die Kristall-Stabilität ausreicht um die Lyse durch den Puffer zu überstehen. Neben der konventionellen Lichtmikroskopie kommt der Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Mikroskopie zum Einsatz. DIC ist eine lichtmikroskopische Methode, die aufgrund von Weglängenunterschieden des

eingestrahlt Lichts das betrachtete Objekt in Helligkeitsunterschiedenen abbildet. Dies ermöglicht die Darstellung von Phasenobjekten¹⁶⁷. Mit Hilfe von konventioneller Kontrast-Lichtmikroskopie, DIC und der Lyse von infizierten Sf9-Zellen mit RIPA-Puffer wurde daher erneut versucht Kristalle zu detektieren. Für alle getesteten M1- und NEP-Konstrukte mit Lokalisationssignalen unterschiedlicher Zellkompartimente konnten jedoch keine Kristalle mittels Licht- bzw. DIC-Mikroskopie beobachtet werden, weder vor noch nach Lyse der Insektenzellen, obwohl die Zellen deutliche Anzeichen einer Infektion, wie zum Beispiel Granularisierung, aufwiesen.

Da die grundlegende Proteinbiosynthese der Zielproteine M1 und NEP im Sf9-Insektenzellsystem bereits in dieser Arbeit (Abschnitt XX) gezeigt werden konnte, liegt die nicht erfolgte *in vivo*-Kristallisation entweder daran, dass die untersuchten Zellkompartimente nicht die für eine Kristallisation der Zielproteine notwendigen Bedingungen bereitstellen können oder dass die Kristalle aufgrund der Lyse mit RIPA-Puffer zerstört wurden. Um zu untersuchen ob sich *in vivo*-Kristalle bei zytosolischer Lokalisation gebildet haben, wurden Sf9-Zellen mit dem bereits beschriebenen HA-Konstrukt der Zielgene infiziert und nach viertägiger Inkubation immunhistochemisch angefärbt.

Die Bilder der immunhistochemischen Färbung zeigen, dass das M1-Protein unterschiedlich in den Sf9-Zellen lokalisiert ist (Abbildung 4.8). Zum einen wird das Protein im Zellkern (Abbildung 4.8, rechter Pfeil und Überlagerungsbild) und akkumuliert im Zytosol der Zelle (Abbildung 4.8, linker Pfeil und Überlagerungsbild) nachgewiesen. Die Zellkern-Lokalisation des M1-Proteins zeigt, dass die NLS des Proteins auch vom Zellkern-Import-Mechanismus der Sf9-Insektenzelle erkannt und das Protein in den Zellkern transportiert wird. NEP hingegen wurde mittels Fluoreszenzmarkierung ausschließlich im Randbereich der Zelle (Abbildung 4.8 linkes und mittleres Bild), im engen Kontakt zur Plasmamembran nachgewiesen (Abbildung 4.8, Überlagerungsbild). Hätte die Proteinbiosynthese der Zielproteine zur Ausbildung von Kristallen geführt, so hätten geordnete Strukturen in den Fluoreszenzaufnahmen zu sehen sein müssen. Mit diesen Ergebnissen erhärtet sich die Vermutung, dass die Bedingungen in den untersuchten Kompartimenten für ein Kristall-Wachstum des M1-Proteins und des NEP nicht geeignet sind.

Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit keine Strukturinformationen mittels Röntgenkristallographie erhalten wurden, konnte das löslich rekombinant hergestellte M1-Protein für eine strukturelle Charakterisierung in Lösung verwendet werden, wie im Nachfolgenden dargestellt.

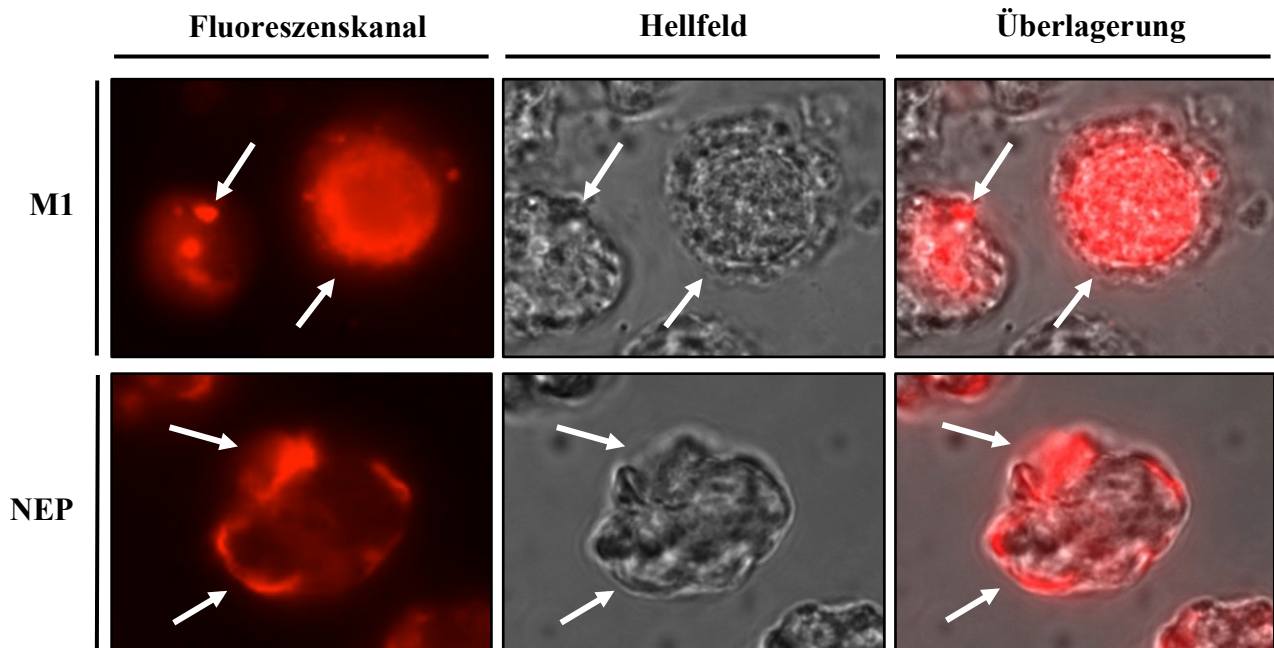


Abbildung 4.8| Lokalisation der rekombinanten Proteine M1 und NEP in Sf9-Zellen| Nach erfolgter M1-Synthese im Zytosol kann das Protein entweder im Zytosol angereichert (rote Punkte, linker Pfeil), oder vermutlich aufgrund des nativ vorhandenen NLS im Zellkern (Rot, rechter Pfeil) detektiert werden. NEP (Pfeile) hingegen zeigt eine starke Assoziation zur Plasmamembran (Hellfeld, Mitte), was durch die Überlagerung der Bilder (untere Spalte, rechts) verdeutlicht wird.

4.2.4. Kleinwinkelstreu-Experimente mit M1-Protein bei verschiedenen pH-Werten

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) bietet die Möglichkeit biologische Makromoleküle, gemäß ihrer physiologischen Umgebung, in Lösung zu untersuchen. Für eine monodisperse Proteinprobe kann mit einem SASX-Experiment neben verlässlichen strukturellen Parametern wie dem Proteinradius, dem maximalen Durchmesser und der Abschätzung des Molekulargewichts auch die niedrigaufgelöste Oberflächenstruktur des Zielproteins computergestützt berechnet werden.

Bei einem Kleinwinkelstreu-Experiment werden die biologischen Makromoleküle mit einem monochromatischen Röntgenstrahl belichtet. Die Röntgenstrahlen treffen auf die Probe und die Elektronen der Atome streuen das Röntgenlicht. Da die Proteine in der Lösung zufällig orientiert sind, entstehen keine Bragg-Beugungsreflexe wie bei der konventionellen Röntgenkristallographie, sondern vielmehr werden Intensitätsunterschiede des Streulichts in Abhängigkeit des Winkels radial um den Hauptstrahl detektiert⁸⁴.

Tabelle 4.5 | Instrumentelle und experimentelle Parameter der SAXS-Messungen|

Experimentelle Parameter		
Instrument	Standard PETRA U29 Undulator	
Strahl Geometrie (mm ²)	0,2 x 0,12	
Wellenlänge (Å)	1,23987	
Konzentrationsbereich der Protein-Probe (mg/ml)	0,25 - 1,45	
Temperatur (K)	293,4	
Struktur Parameter		
	Messung bei pH 5,0	Messung bei pH 7,4
I(0) (cm ⁻¹) [aus p(r)]	8206	7793
R _g (nm) [aus p(r)]	3,13	2,74
I(0) (cm ⁻¹) [aus Guinier]	8037,47 ± 96,7	7420,18 ± 36,4
R _g (nm) [aus Guinier]	2,86 ± 0,25	2,27 ± 0,13
D _{max} (nm)	13,5	10
Porod-Volume-Abschätzung (Å ³)	41	25
Molekulargewichtsbestimmung		
Molekulargewicht MW [aus I(0)] Guinier	28,3 ± 0,34	26,34 ± 0,13
Molekulargewicht MW [aus I(0)] p(r)	28,9	27,7
Anhand der Sequenz berechnetes Molekulargewicht MW	28,8	28,8
Software		
Primärdaten-Reduktion	PRIMUS	
Daten-Prozessierung	GNOM	
Ab initio-Modellierung	DAMMIF/ GASBOR	
Validierung/ Mittelung	DAMFILT/ DAMSEL	
Berechnung der Model-Intensitäten	CRYSOL	
3D Model-Repräsentationen	PyMol	

Anhand der Struktur-Parameter Gyrationradius (R_g), maximaler Partikeldurchmesser (D_{max}) sowie dem berechneten MW lassen sich strukturelle Unterschiede des M1-Proteins bei pH 5,0 und 7,4 ermitteln. Außerdem bilden diese Parameter die Grundlage zum Vergleich mit bereits existierenden Strukturdaten des Volllänge-M1-Proteins. Üblicherweise werden die über die Guinier-Region und die $p(r)$ -Funktion ermittelten Struktur-Parameter einer Proteinprobe miteinander verglichen, um Aufschluss über die Konsistenz der Röntgenstreu Kurve und damit die Qualität der experimentellen Daten zu zeigen.

Für die Kleinwinkelstreu-Experimente von unterschiedlichen Konzentrationen des Influenza-A-Virus M1-Proteins an der Stahlführung P12 des Synchrotron-Strahlenquelle PETRA III (DESY, Hamburg) wurde das Protein einen Tag vor dem SAXS-Experiment säulenchromatographisch gereinigt und die Elutionsfraktionen des Absorptionsmaximums III (Peak III) bei pH 7,4 bzw. des Absorptionsmaximums I (Peak I) bei pH 5,0 vereint

(Abbildung 4.1 B und C). Um die Entstehung von konzentrationsbedingten Proteinaggregaten zu vermeiden, wurden die Proteinproben erst unmittelbar vor dem SAXS-Experiment vorsichtig durch Ultrazentrifugation auf die gewünschte Proteinkonzentration von 0,25 bis 1,45 mg/ml konzentriert. Für die SAXS-Experimente des M1-Proteins bei einem pH-Wert von 5,0 wurden Streudaten bei Proteinkonzentrationen von 0,53 mg/ml, 0,92 mg/ml und 1,45 mg/ml und bei einem pH-Wert von 7,4 mit Konzentrationen von 0,25 mg/ml und 1,32 mg/ml aufgenommen, um zu untersuchen ob das M1-Protein mit zunehmender Proteinkonzentration aggregiert. Bei kleinen Streuwinkeln von $< 0,5 \text{ nm}^{-1}$ haben Proteinaggregate oder oligomere Strukturen einen Einfluss auf die Streulichtintensität, was zu einem schnelleren Abflachen der Streukurve bei kleinen Streuwinkeln und zu einem diskontinuierlichen Intensitätsverlauf („Knick“ im Bereich von Streuwinkeln $< 0,5 \text{ nm}^{-1}$) führt. Die augenscheinlich deckungsgleiche Überlagerung aller Streukurven der Proteinkonzentrationen bei pH 5,0 (Abbildung 4.9 A) sowie bei pH 7,4 (Abbildung 4.9 B) zeigt, dass die Probe über den untersuchten Konzentrationsbereich als homogen angesehen werden kann. Bei näherer Betrachtung der Kurvenform sind Unterschiede im Abklingverhalten der Kurven zu erkennen, die Konformationsunterschiede des M1-Proteins bei den untersuchten pH-Werten andeuten können. Allerdings konnten die SAXS-Ergebnisse eine Beteiligung von Proteinaggregaten bzw. oligomeren Strukturen an der Streukurve ausschließen. Die bei den zuvor dargestellten DLS-Messungen (Abschnitt X) gemessenen R_g -Werte, die auf Proteinaggregate schließen ließen, konnten folglich nicht durch die SAXS-Ergebnisse bestätigt werden. Vielmehr wurde die Vermutung unterstützt, dass der durch DLS-Messung ermittelte polydisperse Anteil der M1-Proteinproben äußerst gering ist, so dass eine verlässliche strukturelle Charakterisierung möglich ist.

Bei den Röntgenkleinwinkelstreu-Experimenten an nativem M1-Protein, welches direkt aus Influenza-A-Viren isoliert wurde, konnte eine Beteiligung von hochmolekularen „Superstrukturen“ bei kleinen Streuwinkeln $< 0,5 \text{ nm}^{-1}$ an den primären Streudaten bemerkt werden⁸⁶. Dieser Effekt wurde nicht durch die Daten des rekombinant hergestellten M1-Proteins bestätigt.

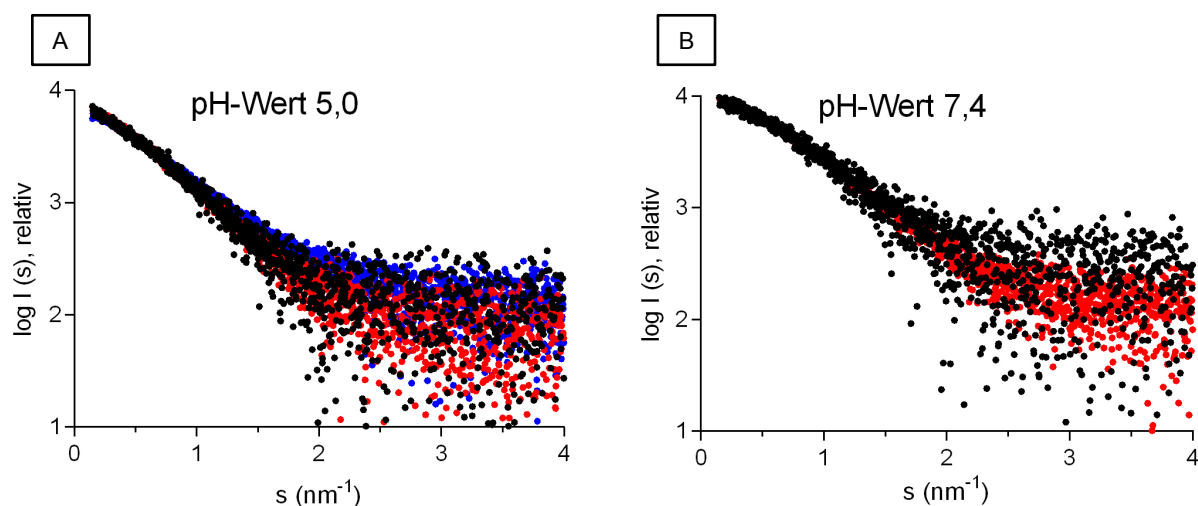


Abbildung 4.9] Primäre Kleinwinkel-Streudaten von M1-Proteinproben bei pH-Werten von 5,0 und 7,4| **A.** M1-Proben mit Proteinkonzentrationen von 0,53 mg/ml (Schwarz), 0,92 mg/ml (Rot) und 1,45 mg/ml (Blau) zeigen bei pH 5,0 keine konzentrationsabhängigen Streueffekte bei kleinen Streuwinkeln $< 0,5 \text{ nm}^{-1}$. Dementsprechend konnten keine oligomeren Strukturen bei den gemessenen Proteinkonzentrationen beobachtet werden. **B.** Auch bei pH 7,4 konnte für die Proben des M1-Proteins unabhängig von der Proteinkonzentration (0,25 mg/ml Schwarz und 1,32 mg/ml Rot) bei kleinen Streuwinkeln keine Anzeichen für eine Oligomerisierung erkannt werden.

Besonders im Bereich dicht am Hauptstrahl sind häufig Streu-Artefakte des abgeblockten Röntgenstrahls zu beobachten, die es verhindern können eine valide Ermittlung der charakteristischen Struktur-Parameter durchzuführen. Bevor die primären Streudaten für die Ermittlung der Struktur-Parameter verwendet werden, müssen Streudaten bis zu Streuwinkeln von ca. $0,075 \text{ nm}^{-1}$ daher von der Analyse ausgeschlossen werden. Im Bereich der kleinen Streuwinkel von etwa $0,1 \text{ nm}^{-1}$ bis ca. $0,5 \text{ nm}^{-1}$ befindet sich die sogenannte Guinier-Region. Mit Hilfe einer linearen Regressionsgeraden durch die Guinier-Region konnte der Gyrationradius des M1-Proteins bei pH 5,0 zu $R_g \approx 2,86 \text{ nm} \pm 0,25 \text{ nm}$ und bei pH 7,4 zu $R_g \approx 2,27 \text{ nm} \pm 0,02 \text{ nm}$ bestimmt werden (Abbildung 4.10 A). Die Qualität der linearen Regression kann mit dem sR_g -Wert abgeschätzt werden und sollte den Wert von 1,3 nicht überschreiten, um eine verlässliche Abschätzung der mit der Guinier-Region ermittelten Struktur-Parameter zu gewährleisten¹⁶⁸. In diesem Fall wies die Guinier-Approximation sR_g -Grenzwerte von 0,40 bis 1,30 (pH 5,0-Probe) und von 0,48 bis 1,18 (pH 7,4-Probe) auf, so dass die ermittelten Gyrationradien damit für beide Bedingungen als valide betrachtet werden konnten. Außerdem stimmen die hier ermittelten Gyrationradien mit den entsprechenden Daten des nativen M1-Proteins überein^{79,86}. Zur Abschätzung zugehöriger MWs mittels einfachem Dreisatz (Abschnitt 3.1.4.3., Formal 3) werden $I(0)$ -Werte benötigt, also die Streuintensitäten bei einem Streuwinkel von null. Diese wurden durch Extrapolation der linearen Regressionsgeraden der Guinier-Region näherungsweise abgeschätzt.

Dementsprechend konnte aus den Kleinwinkelstreudaten ein MW für das M1-Protein bei pH 5,0 von $28,3 \text{ kDa} \pm 0,34 \text{ kDa}$ berechnet werden, während für das M1-Protein bei pH 7,4 ein MW von $26,34 \text{ kDa} \pm 0,13 \text{ kDa}$ erhalten wurde. Unter Berücksichtigung des experimentellen Fehlers liegt das so bestimmte MW in der gleichen Größenordnung wie das anhand der Aminosäurezusammensetzung theoretisch berechnete MW des M1-Proteins von 28,8 kDa.

Mit Hilfe der graphischen Kratky-Darstellung von experimentellen SAXS-Daten lässt sich aufgrund der Form abschätzen, ob es sich um ein gefaltetes Protein handelt. Gefaltete Proteine zeigen üblicherweise in dieser Darstellung eine Glockenform. Zusätzlich kann anhand der Symmetrie der Darstellung beurteilt werden ob das Protein eher in einer globulären oder elongierten Konformation vorliegt. So zeigen globuläre Proteine eine sehr symmetrische Glockenform im Gegensatz zu elongierten Proteinen, die eine langsamer abfallende Glockenform aufweisen. Außerdem kann aufgrund einer erhöhten Streuung der Einzelmesswerte bei Streuwinkeln $> 2 \text{ nm}^{-1}$ eine erhöhte Flexibilität festgestellt werden^{83–85,156,168}. Die graphische Kratky-Darstellung (Abbildung 4.10 B) der

M1-Streudaten zeigt die für gefaltete Proteine typische Glockenform, wobei die nicht-spiegelsymmetrische Form ein Anzeichen für eine nicht optimal globuläre Konformation darstellt. Beide Kratky-Kurven zeigen erhöhte Streuung der Einzel-Messwerte bei Streuwinkeln $> 2 \text{ nm}^{-1}$, was auf eine erhöhte Flexibilität vermutlich durch den elongierten C-Terminus schließen lässt, was von anderen strukturellen Arbeiten postuliert wurde^{81,86}. Die unterschiedlich hohen Maxima der beiden Kurven kommen aufgrund einer nicht durchgeführten Normierung auf die Proteinkonzentration zustande, spielen aber für alle anderen Ergebnisse keine Rolle.

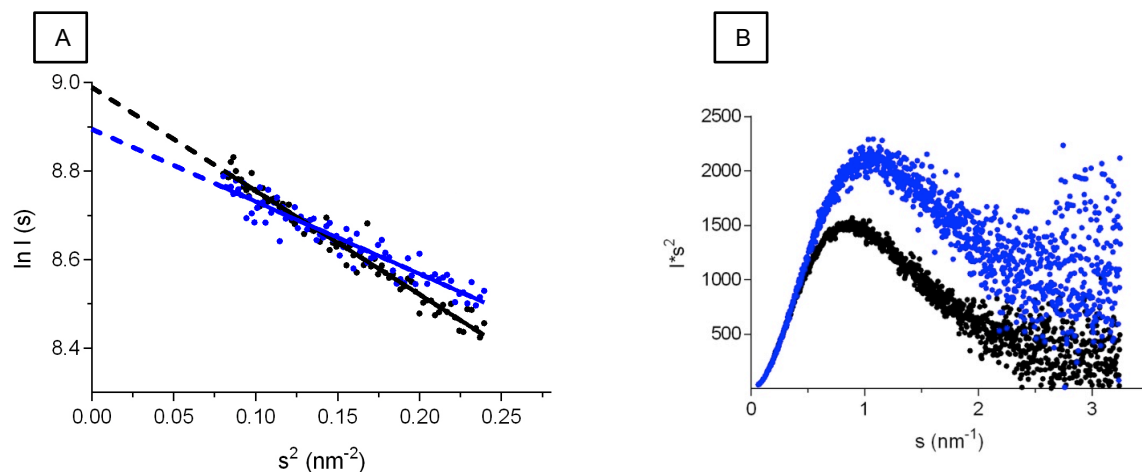


Abbildung 4.10 | Guinier-Region und Kratky-Darstellung der experimentellen SAXS-Primärdaten | **A.** Unter besonders kleinen Streuwinkeln kann mittels linearer Regression (Schwarz: pH 5,0; Blau: pH 7,4) der Gyrationradius R_g der untersuchten Partikel in Lösung näherungsweise bestimmt werden. Der R_g für die M1-Proteinprobe bei pH 5,0 (Schwarz) wurde mit $2,86 \text{ nm} \pm 0,25 \text{ nm}$ und bei pH 7,4 (Blau) mit $2,27 \text{ nm} \pm 0,02 \text{ nm}$ bestimmt. Bei einem pH-Wert von 7,4 nimmt das M1-Protein folglich eine kompaktere Konformation ein, die sich in einem geringeren Gyrationradius widerspiegelt. Die extrapolierten Intensitäten bei einem Streuwinkel von 0 ergaben für die pH 5,0-Probe $I(0) = 8037,47 \pm 96,7 \text{ cm}^{-1}$ und für die pH 7,4-Probe $I(0) = 7420,18 \pm 36,4 \text{ cm}^{-1}$. **B.** Anhand der Kratky-Darstellung lässt sich aufgrund der Glockenform erkennen, dass das M1-Protein bei beiden pH-Werten in einem gefalteten Zustand vorliegt. Allerdings unterstützt die Divergenz des Kratky-Plots bei höheren Streuwinkeln die Annahme, dass das M1-Protein sowohl bei einem pH-Wert von 5,0 (Schwarz) als auch bei einem pH-Wert von 7,4 (Blau) keine optimal globuläre Konformation annimmt.

Mit Hilfe der Größen-Verteilungsfunktion ($p(r)$), bei der alle Messdatenpunkte mit Ausnahme der bereits ausgeschlossenen und unzuverlässigen Messdaten bei Streuwinkeln $< 0,075 \text{ nm}^{-1}$ in die Berechnung der Struktur-Parameter einbezogen werden, können die bereits mit der Guinier-Approximation ermittelten Parameter verglichen werden. Die Berücksichtigung aller Messdatenpunkte hat zur Folge, dass die Struktur-Parameter-Abschätzung des Gyrationradius und die Berechnung des MW des untersuchten Proteins genauere Werte liefern (Abbildung 4.11). Zusätzlich gibt die Berechnung der $p(r)$ -Funktion Aufschluss über den maximalen Partikeldurchmesser (D_{max}) aller Partikel in der Probe. Der mit Hilfe der $p(r)$ -Funktion ermittelte R_g beträgt für das M1-Protein $3,13 \text{ nm}$ bei einem pH-Wert von 5,0 und bestätigt somit die Ergebnisse der Guinier-Region. Bei einem pH-Wert von 7,4 wurde ein R_g von $2,74 \text{ nm}$ bestimmt, der von dem

mit der Guinier-Region ermittelten R_g von 2,27 nm zwar abweicht, jedoch aufgrund der Einbeziehung aller Messdaten besser mit bereits in anderen Arbeiten ermittelten R_g -Werten von $\sim 2,9$ nm übereinstimmt^{79,86}.

Auch mit Hilfe der mit der $p(r)$ -Funktion bestimmten $I(0)$ -Werte lässt sich das MW des M1-Proteins abschätzen. Hierzu wurde ebenfalls die Formel 3 (Abschnitt 3.1.4.3.) verwendet, um durch einfachen Dreisatz das MW zu berechnen. Für das M1-Protein bei pH 5,0 konnte ein MW von 28,9 kDa und bei pH 7,4 von 27,7 kDa bestimmt werden. Damit liegt die MW-Bestimmung über die $p(r)$ -Funktion in der gleichen Größenordnung wie die MW-Werte der Guinier-Region und stimmen mit dem auf Basis der Aminosäuresequenz berechneten MW von 28,8 kDa gut überein.

Der maximale Partikeldurchmesser (D_{max}) der M1-Proteinprobe bestätigt die Annahme einer kompakteren M1-Konformation beim pH-Wert 7,4. Der zugehörige D_{max} -Wert beträgt etwa 10 nm, während bei pH 5,0 ein Wert von etwa 13,5 nm erhalten wird. Die Form der $p(r)$ -Funktion bei pH 5,0 impliziert, dass die Struktur des Volllänge-M1-Proteins eine globuläre Region mit einem Durchmesser von 4 - 5 nm und eine elongierte Region mit einer Länge von 8,5 - 9,5 nm aufweist (Abbildung 4.5 A). Bei pH 7,4 weist die globuläre Region die gleiche Größe (4 - 5 nm) auf, während der elongierte Teil basierend auf der $p(r)$ -Funktion mit 5,5 - 6,5 nm jedoch deutlich kürzer erscheint (Abbildung 4.11 B).

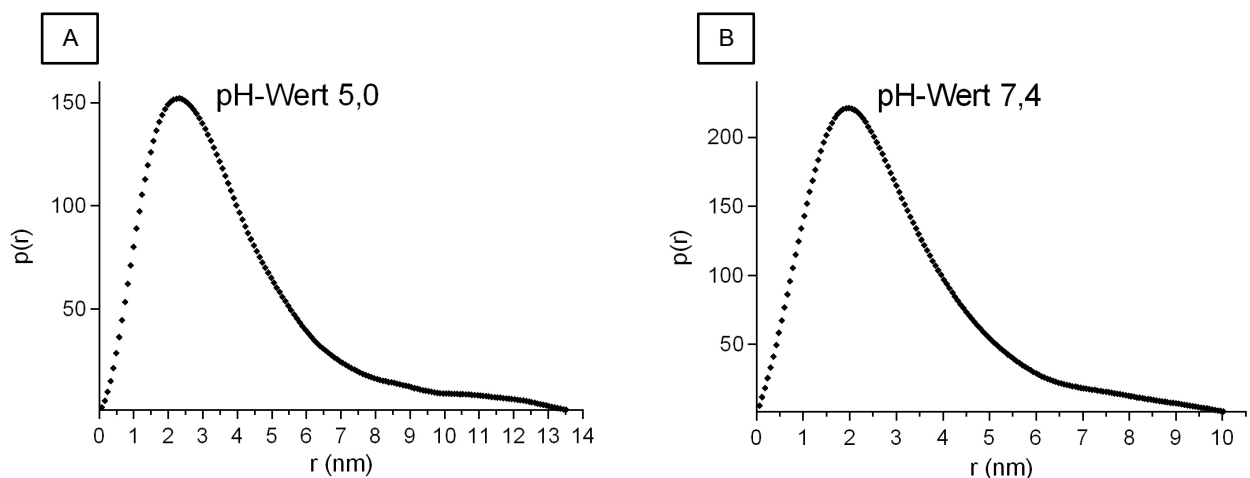


Abbildung 4.11 | Größen-Verteilungsfunktion ($p(r)$) von M1 bei pH 5,0 und pH 7,4 erstellt mit dem Programm GNOM | Die Form der Graphen lässt darauf schließen, dass M1 sowohl bei pH 5,0 (A) als auch bei pH 7,4 (B) eine kompakte Region, die die schmale Glockenform zwischen 0 und 5 nm verursacht, und eine elongierte Region, die durch die asymptotischen Annäherung bei größeren Radien repräsentiert wird. Bei beiden pH-Werten nimmt die kompakte Region eine Ausdehnung von 4 - 5 nm an. Die Größe der elongierten Region variiert in Abhängigkeit des pH-Wertes. So ist die Region bei pH 5,0 mit 8,5 - 9,5 nm länger als bei pH 7,4 (4 - 5 nm). Der Schnittpunkt mit der X-Achse zeigt den maximalen Partikeldurchmesser (D_{max}). Bei einem pH-Wert von 5,0 hat M1 einen D_{max} von etwa 13,5 nm, während der D_{max} -Wert bei pH 7,4 etwa 10 nm beträgt.

Eine Möglichkeit die Konsistenz der anhand der experimentellen Daten berechneten MW zusätzlich zu bestätigen bietet die Berechnung des MW anhand des Porod-Volumen. Beim

Porod-Volumen handelt es sich um das Volumen, das ein hydratisierter Partikel in Lösung verdrängt. Somit bietet dieser Ansatz eine von der Proteinkonzentration unabhängige Variante, das MW einer Proteinprobe zu bestimmen. Der empirische Zusammenhang zwischen *Porod*-Volumen und dem MW von biologischen Makromolekülen in Lösung erlaubt es, die Berechnung des MW von unbekanntem Proteinen durchzuführen, indem das *Porod*-Volumen durch den Dividenden 1,6 geteilt wird¹⁶⁸. Im Fall der pH- 5,0-Probe resultierte aus einem *Porod*-Volumen von 42,01 Å³ ein MW von ca. 25,26 kDa für M1, während die pH 7,4-Probe mit einem *Porod*-Volumen von 25,23 Å³ ein MW von ca. 15,77 kDa ergab. Diese deutliche Abweichung des bestimmten MW bei einem pH-Wert 7,4 wurde im folgenden Abschnitt des Ergebnisteils näher untersucht.

4.2.5. Innovative Methoden zur Optimierung von Kleinwinkelstreudaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, mit Unterstützung der Arbeitsgruppe von Dr. Dmitri Svergun der EMBL Außenstelle am DESY (Hamburg), innovative noch nicht etablierte Methoden zur Steigerung der Datenqualität eines SAXS-Experiments auf die Nutzbarkeit an der P12-Strahlenführung des PETRA III Speicherrings getestet.

Für ein SAXS-Experiment mit biologischen Makromolekülen werden unterschiedliche Proteinkonzentrationen des Zielproteins verwendet, die normalerweise durch Konzentrieren einer verdünnten Proteinprobe erreicht werden. Der Konzentrations-Schritt hat oftmals die Folge, dass sich, abhängig vom untersuchte Protein, besonders bei höherer Proteinkonzentration Aggregate bilden. Nicht nur diese Proteinaggregate, sondern auch unterschiedliche Faltungszustände eines Proteins können mittels größenbasierten Trennverfahren voneinander separiert werden, sofern die Faltungsunterschiede zu einer Änderung des Elutionszeitpunktes führen. Wird der SAXS-Messung eine größenabhängigen Protein-Trenn-Methode, wie der Asymmetrischen-Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4)¹⁶⁹ oder der Größenausschlusschromatographie, direkt vorgeschaltet, kann folglich die Qualität der SAXS-Daten gesteigert werden. Außerdem bietet dieser Versuchsaufbau die Möglichkeit unabhängige SAXS-Datensätze der unterschiedlichen Elutionsfraktionen und somit der unterschiedlichen Partikel-Spezies in Lösung aufzunehmen.

Mit Hilfe der AF4 lassen sich Partikel anhand ihrer Größe von wenigen nm- bis hin zu wenigen µm-Bereich trennen. Dabei wird die Probe nicht wie bei der Größenausschlusschromatographie aufgrund der Interaktion mit einer stationären Phase, sondern durch das Fließverhalten in einem laminaren Flüssigkeitsstrom mit einem dazu senkrechten Flüssigkeits-Querstrom fraktioniert. Die Trennung einer Probe erfolgt bei der AF4 aufgrund unterschiedlicher Diffusions-Koeffizienten und damit nach dem hydrodynamischen Radius der Partikel, wobei im Gegensatz zur Größenausschlusschromatographie zuerst kleine Partikel eluieren, weil sie schneller im Flüssigkeitsstrom fließen als größere Partikel. Bei der AF4-Technik sind der verwendete Druck

sowie die Scherkräfte, dem die Probe ausgesetzt ist, im Vergleich zur Größenausschlusschromatographie verringert. Außerdem ist die Interaktionsfläche minimiert, die bei der Größenausschlusschromatographie aufgrund von Adsorptionseffekten zu Proteinverlust führt. Basierend auf diesen Eigenschaften können mit der AF4-Technik nicht nur Proteinproben, sondern auch Liposomen, Nanopartikel, Polymere und sogar vollständige Virus-ähnliche Partikel getrennt werden^{170,171}.

Da das M1-Protein bei physiologischem pH-Wert eine Tendenz zur Aggregation zeigt wurde untersucht, ob sich die SAXS-Daten-Qualität durch vorherige Anwendung der AF4-Technik und nachfolgender individueller SAXS-Messung der M1-Protein-Probenbestandteile erhöhen lässt. Eine M1-Proteinprobe wurde bei physiologischem pH-Wert wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben für ein SAXS-Experiment vorbereitet und in die AF4-Apparatur gegeben. Allerdings konnte kein Protein in den resultierenden Fraktionen nachgewiesen werden. Im Versuchsaufbau der AF4 wird eine negativ geladene Nitrocellulose-Membran verwendet um die Proben-Partikel in der Apparatur zu halten, weil die Partikel aufgrund des Querstroms herausgespült würden. Aufgrund der positiven Gesamtladung des M1-Proteins, selbst bei physiologischem pH-Wert, ist von einer sehr starken Interaktion des M1-Proteins mit der Nitrocellulose-Membran auszugehen, welche eine Trennung und Elution verhinderte. Folglich zeigten diese initialen Messungen, dass die AF4-Technik vor allem für Proteine, die eine stark positive Nettoladung bei dem untersuchten pH-Wert aufweisen, aufgrund der Interaktion mit der Nitrocellulose-Membran nur bedingt anwendbar ist.

Einen weiteren innovativen Ansatz stellt das *MALVERN* TDA-Instrument dar, welches eine Größenausschlusschromatographie mit einem Refraktometer, einem Rechts-Winkel-Streulicht-Detektor (vom englischen *right angle light scattering*, RALS) und einem UV-Detektor verbindet. Die P12-Strahlenführung der Synchrotron-Strahlenquelle PETRA III (DESY, Hamburg) bietet die Möglichkeit das *MALVERN* TDA-Instrument mit einem SAXS-Experiment zu koppeln, indem nach der säulenchromatographischen Trennung die eluierende Probe aufgeteilt wird. Die eine Hälfte der Probe wird in die Quarzkapillare zur Belichtung mit dem Röntgenstrahl geleitet und die andere Hälfte wird in die Multidetektoreinheit des *MALVERN* TDA-Instruments geführt. Durch diese Anordnung können neben den Kleinwinkelstreudaten Zusatzinformationen wie Probenkonzentration, Molekulargewicht und intrinsische Viskosität simultan ermittelt werden. Eine M1-Proteinprobe bei einem pH-Wert von 7,4 wurde auf die Größenausschlusschromatographie-Säule geladen um mögliche alternative Konformationen der Monomere zu separieren und für jede voneinander trennbare Faltungsmöglichkeit der Probe individuelle Kleinwinkelstreudaten zu erhalten. Während anhand des UV-Detektors sehr geringe Konzentrationen an Proteinbestandteilen zu detektieren waren, konnte kein RALS, kein refraktometrischer Index und auch keine Röntgenkleinwinkelstreuung nach Durchlauf durch das Gerät beobachtet werden. Möglicherweise interagierte auch hier das

M1-Protein stark mit der Matrix der neuen Größenausschlusschromatographie-Säule, sodass nur wenig Protein eluierte, was nicht für die Detektion und die Röntgenkleinwinkelstreuung ausreichte. Dementsprechend konnte auch mit dem *MALVERN* TDA-Instrument keine Verbesserung der primären M1-Streudaten erzielt werden.

Derzeit werden auch zeitaufgelöste SAXS-Experimente etabliert. Bei diesem Ansatz kann ein experimenteller Parameter wie die Temperatur oder der pH-Wert während der Messung geändert werden, um zu untersuchen wie sich die Parameter-Änderung auf das Röntgenkleinwinkelstreu-Verhalten der Probe auswirkt. Zusätzlich kann die Technik Aufschluss über die kinetischen Hintergründe der beobachteten Änderungen liefern. Bei der zeitlichen Verfolgung der Auswirkungen einer pH-Wert-Änderung mittels SAXS-Technik werden kontinuierlich SAXS-Messungen durchgeführt und die Probe durch die Messkapillare gespült, während durch Pufferzugabe der pH-Wert der Probe geändert wird. Um einen Verdünnungs-Effekt möglichst gering zu halten und die Aufnahme einer kompletten Echt-Zeit-SAXS-Messung zu gewährleisten sind besondere Probenvoraussetzungen erforderlich. Die Proteinprobe sollte für eine erfolgreiche zeitaufgelöste SAXS-Messung eine hohe Proteinkonzentration von mehr als 2,5 mg/ml und ein Volumen von mindestens 2 ml aufweisen. Die Form der in Abschnitt 4.2.4 beschriebenen primären SAXS-Streukurven des M1-Proteins wiesen in Abhängigkeit des pH-Wertes kleine Unterschiede im Abklingverhalten der Kurven auf, was auf unterschiedliche Konformationen des M1-Proteins hindeutet. Um zu untersuchen ob die beobachteten Unterschiede während der pH-Wert-Änderung durch einen langsamen kontinuierlichen oder durch einen kurzen schnellen Übergang entstehen wurde die zeitaufgelöste SAXS-Methode angewandt. Die erforderlichen Proben-Voraussetzungen waren aufgrund der ausgeprägten Präzipitations-Tendenz des M1-Proteins bei Konzentrationen größer als 2,0 mg/ml und der geringen Proteinausbeute bei der Herstellung nur schwer zu erreichen. Es konnte nur eine M1-Probe mit einer finalen Konzentration von 2,0 mg/ml und einem Volumen von 1 ml hergestellt werden. Aufgrund des geringen Volumens und der geringen Proteinkonzentration konnten keine aussagekräftigen zeitaufgelöster SAXS-Messdaten aufgenommen werden. Da die zeitaufgelöste SAXS-Technik noch in der Etablierungsphase ist und die Zugänglichkeit sehr limitiert ist, konnten im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit die Echt-Zeit-SAXS-Messung nicht wiederholt werden.

Auch wenn die innovativen neuen SAXS-Ansätze für M1-Proteinproben auf Grund der beschriebenen Probleme nicht anwendbar waren, konnten die in Abschnitt 4.2.4. dargestellten SAXS-Daten für Oberflächenrekonstruktionen in Form von 3D-Modellen verwendet werden, die im folgenden Abschnitt präsentiert werden.

4.2.6. *Ab initio* Modell-Rekonstruktion des M1-Proteins bei physiologischen und sauren pH-Werten

Neben der Ermittlung struktureller Charakteristika wie R_g , D_{max} und dem MW des M1-Proteins in Lösung können die SAXS-Streukurven auch zur *ab initio*-Rekonstruktion von Strukturmodellen des Proteins mit geringer Auflösung verwendet werden. Bei der Modell-Rekonstruktion von SAXS-Daten handelt es sich immer um eine Algorithmen-basierte Interpretation der experimentellen Streudaten, die anhand von Qualitätsmerkmalen wie der Übereinstimmung der experimentellen Daten mit dem Modell (χ^2) beurteilt werden. Zur weiteren Validierung der berechneten Modelle werden unterschiedliche Modell-Rekonstruktions-Programme wie *DAMMIF*¹⁵⁷ oder *GASBOR*¹⁵⁸, die sich anhand ihres Rekonstruktions-Algorithmus unterscheiden, verwendet und deren Ergebnisse miteinander verglichen.

Alle berechneten Modell-Rekonstruktionen (Abbildung 4.12 A) weisen unabhängig vom verwendeten Programm grundlegend die gleichen Struktur-Merkmale auf. Diese beinhalten einen kompakten Bereich (in der Abbildung nach rechts oben gerichtet) sowie eine elongierte Region (in der Abbildung nach links unten gerichtet). Die blauen Sphären, aus denen die Modelle aufgebaut sind, repräsentieren die für die Berechnung verwendeten Attrappen, die dem Protein zugeteilt wurden. Die kleineren grauen Sphären des *GASBOR*-Modells (Abbildung 4.12 A, zweite Zeile) repräsentieren hingegen Lösungsmittel-Moleküle, die sich in direkter Umgebung des Proteins befinden. Die bereits bekannte hochaufgelöste Röntgenstruktur der NM-Domäne des M1-Proteins (PDB: 1AA7) kann mit allen gezeigten Modellen überlagert werden (Abbildung 4.12 A, Rot) und unterstützt die Vermutung, dass der elongierte Teil der Modelle dem C-Terminus des M1-Proteins entspricht. Die Berechnung der Modell-Rekonstruktionen mit den Programmen *DAMMIF* und *GASBOR* wurde zur Validierung in 20 individuellen voneinander unabhängigen Läufen wiederholt. Das zugehörige Durchschnittsmodell konnte mit dem Programm *DAMFILT* erstellt werden (Abbildung 4.12 A, rechts).

Das Programm *DAMMIF* verwendet die experimentellen Daten bei Streuwinkeln mit $\leq 3,7 \text{ nm}^{-1}$ für die *ab initio* Modell-Rekonstruktion und geht bei der iterativen Rekonstruktion von einem sphärischen Volumen aus, das mit kugelförmigen Attrappen gefüllt ist. Die Attrappen werden während der Modell-Berechnung entweder dem Lösungsmittel oder dem gesuchten Partikel zugeordnet. Nach jedem Berechnungszyklus wird eine theoretische Streukurve des entstandenen Modells berechnet und diese mit den experimentellen Daten abgeglichen um die Verfeinerung des Modells intern zu überwachen und schlussendlich eine größtmögliche Übereinstimmung zu erzielen¹⁵⁷.

Die Rekonstruktion mit *DAMMIF* ergab eine Diskrepanz zwischen experimentellen Daten und dem berechneten Modell von $\chi^2 \approx 0,88$ und $\chi^2 \approx 1,1$ für die pH-Werte 5,0 und 7,4. Generell kann bei einem χ^2 mit dem Wert 1,0 von einer vollständigen Übereinstimmung des theoretischen Modells

mit den experimentellen Daten ausgegangen werden. Folglich stimmen die berechneten M1-*DAMMIF*-Modelle mit den experimentellen Daten gut überein und repräsentieren somit die durchschnittliche Form der Proteine in Lösung bei pH 5,0 und pH 7,4 (Abbildung 4.12 B und C). Die normalisierte Standard-Diskrepanz (*NSD*) ist ein weiteres Qualitätsmerkmal, das die Übereinstimmung von verschiedenen unabhängig berechneten Strukturmodellen angibt und wurde mit dem Programm *DAMSEL* ermittelt. Für die 20 unabhängigen mit dem Programm *DAMMIF* berechneten Modell-Rekonstruktionen bei pH 5,0 konnte eine *NSD* von $0,614 \pm 0,015$ und für die Modelle bei pH 7,4 eine *NSD* von $0,554 \pm 0,018$ bestimmt werden. Ab einer *NSD* von ca. 0,5 kann unter Verwendung des *DAMMIF*-Algorithmus davon ausgegangen werden, dass sich die verglichenen Modelle sehr ähnlich sind, was bei den im Rahmen dieser Arbeit generierten Modellen der Fall ist.

Um die *DAMMIF*-Modelle zu bestätigen wurde zusätzlich das *ab initio* Modell-Rekonstruktionsprogramm *GASBOR* verwendet. Der Algorithmus des *GASBOR*-Programms geht von einer zufälligen räumlichen Anordnung einer aneinandergereihten Attrappen-Kette, die die einzelnen Aminosäuren repräsentieren, aus. Während der Berechnung wird das Modell soweit verfeinert bis *GASBOR* die größtmögliche Übereinstimmung anhand der eingegebenen Informationen mit den experimentellen Daten erzielt. Im Gegensatz zu *DAMMIF* verwendet *GASBOR* die vollständigen experimentellen Daten um die Übereinstimmung zu berechnen und resultiert daher in aussagekräftigeren Modell-Rekonstruktionen.

Die berechneten Oberflächen-Modelle wiesen eine Übereinstimmung von $\chi^2 \approx 1,0$ für den pH-Wert 5,0 und $\chi^2 \approx 2,8$ für den pH-Wert 7,4 auf, was nur im Falle des Modells bei pH 5,0 eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zeigt, während bei pH 7,4 eine deutliche Diskrepanz des *GASBOR*-Modells zu den primären Streudaten deutlich wird. Diese Abweichung wird im nächsten Abschnitt des Ergebnisteils näher analysiert. In der Regel sind *NSD*-Werte von mit *GASBOR*-berechneten Modellen höher zu erwarten als *NSD*-Werte von *DAMMIF*-Modellen, da *GASBOR* alle experimentellen Daten in die Rekonstruktion einbezieht und daher konsistentere unabhängige Modelle berechnet werden können. So ist es nicht verwunderlich, dass *DAMSEL* für die Modelle bei pH 5,0 einen *NSD* von $1,038 \pm 0,060$ ermittelte. Auch bei dem *GASBOR*-Modell implizieren die *NSD*-Werte, dass die berechneten voneinander unabhängigen Modelle eine konsistente Konformation aufweisen.

Die Modell-Rekonstruktionen des M1-Proteins bei einem pH-Wert von 5,0 konnten mit beiden verwendeten Algorithmen (*DAMMIF* und *GASBOR*) strukturell konsistente Modelle mit einem kompakten Bereich und einer elongierten Region ermitteln. Die Modell-Rekonstruktion des M1-Proteins bei pH 7,4 konnte jedoch nur mit dem Algorithmus *DAMMIF* vergleichbare Ergebnisse erzielen. Diese Ergebnisse stimmen grundlegend mit den bereits von anderen Arbeitsgruppen erstellten Modellen des M1-Proteins überein^{78,79,81,86}. Die Diskrepanz von $\chi^2 \approx 2,8$ des pH-Wert 7,4 *GASBOR*-M1-Modells wird mit dem Programm *EOM* im folgenden Abschnitt näher untersucht.

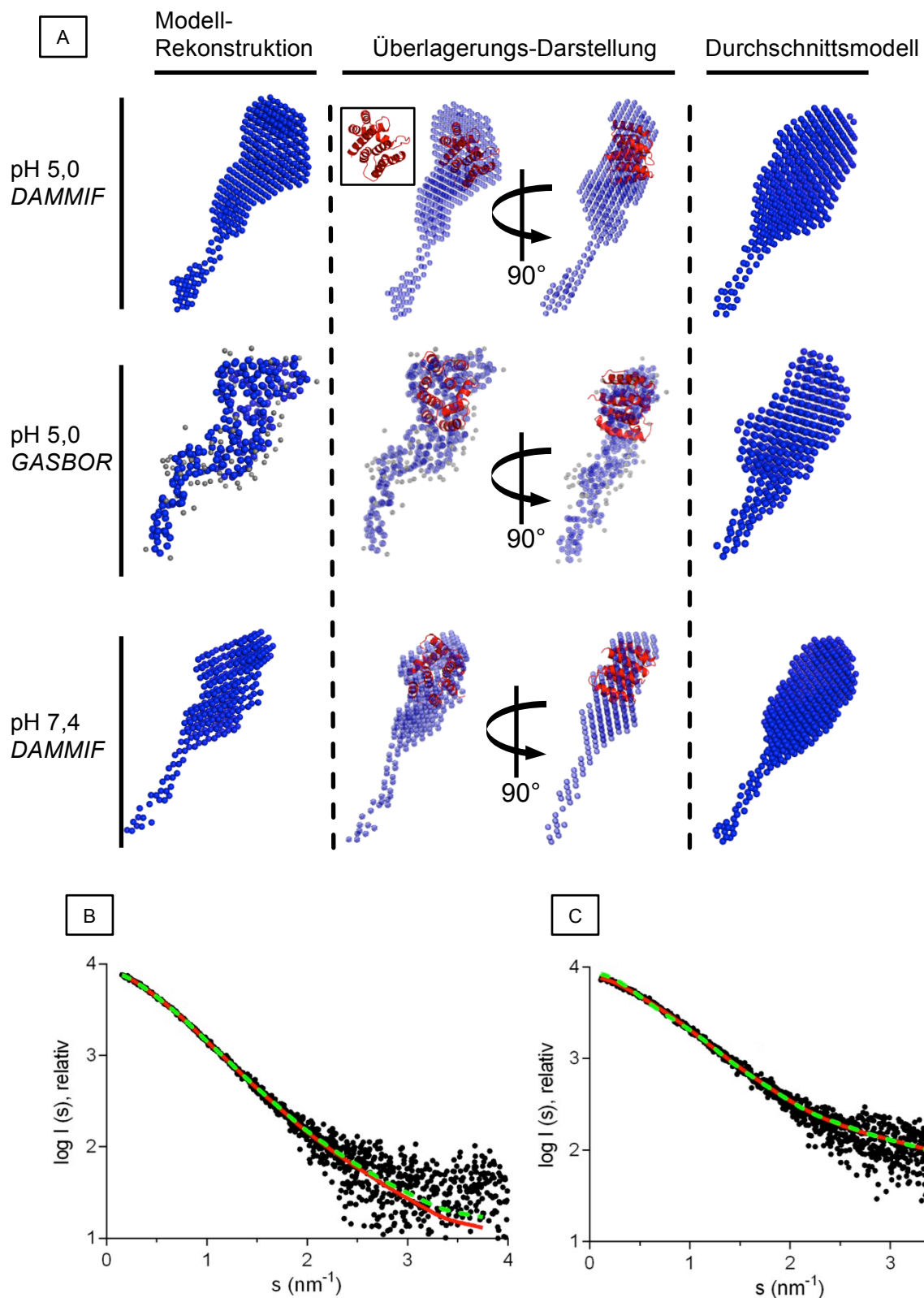


Abbildung 4.12 | *Ab initio* Rekonstruktion von Strukturmodellen des M1-Proteins | **A.** Anhand des NSD-Wertes ausgewählte *ab initio* Modell-Rekonstruktionen (Blau, links) des Programms *DAMMIF* und *GASBOR* zeigen einen kompakten Bereich des M1-Proteins, der sich mit der hochaufgelösten Röntgenstruktur der NM-Domäne (Rot) zur Deckung bringen lässt. Die Durchschnittsmodelle von 20 individuell berechneten *ab initio*-Modellen zeigen ebenfalls einen

kompakten Bereich und eine elongierte Region. Die theoretisch berechneten Streukurven der *ab initio* Modelle, die mit den Programmen *DAMMIF* (Rot) und *GASBOR* (Grün gestrichelt) erstellt wurden stimmen mit den experimentellen Daten (Schwarz) des SAXS-Experiments überein (**B** und **C**). **B**. Die Diskrepanz (χ^2) des gezeigten *DAMMIF*-Modells beträgt $\approx 0,88$ und des *GASBOR*-Modells $\approx 1,0$, daher sind die berechneten Strukturmodelle eine gute Repräsentation der Konformation des M1 Proteins bei einem pH-Wert von 5,0. **C**. Das mit dem Programm *DAMMIF* berechnete *ab initio*-Modell des M1-Proteins bei pH 7,4 stimmt mit einer Diskrepanz von $\chi^2 \approx 1,1$ mit den experimentellen Daten gut überein. Das mit dem Programm *GASBOR* ermittelte Modell weicht mit $\chi^2 \approx 2.8$ erheblich von den experimentellen Daten ab, was auf Probleme des Algorithmus beim Erstellen von repräsentativen Modellen schließen lässt.

4.2.7. Flexibilitäts- und Diskrepanz-Untersuchung der M1-Modell-Rekonstruktion

Um die zuvor beschriebenen Abweichungen der *ab initio*-Modellierung zu den experimentellen Daten näher zu untersuchen, wurde das Programm *EOM* verwendet. Dieses Programm generiert Zufallsmodelle anhand der experimentellen Daten und speicherte zu jedem Modell die Strukturellen-Parameter R_g und D_{max} . Im Anschluss werden von dem Programm Graphen erstellt, die die relative Häufigkeit der bestimmten R_g - und D_{max} -Populationen darstellen. Anhand der Verteilung der Strukturellen-Parameter lässt sich beurteilen, ob das Protein unterschiedliche Konformationszustände einnimmt, erhöhte Flexibilität aufweist oder gespalten wurde. Sind unterschiedliche Konformationszustände vorhanden oder wird das Protein gespalten würden bei der Betrachtung der Verteilung von R_g und D_{max} zwei voneinander getrennte Cluster zu erkennen sein. In einer zweiten *EOM*-Berechnung können dann die gewonnen Informationen der ersten *EOM*-Berechnung berücksichtigt werden um zwischen unterschiedlichen Konformationszuständen oder Spaltung des Proteins zu unterscheiden. Bei erhöhter Flexibilität des untersuchten Proteins würden die unterschiedlichen Cluster von R_g - und D_{max} -Werten überlappen. Außerdem berechnet das Programm *EOM* eine relative Häufigkeit der generierten voneinander unterscheidbaren Zufallsmodelle und gibt damit Auskunft über den Probenbestandteil, der die größte Auswirkung auf die experimentelle Streukurve besitzt.

Um vor allem die Diskrepanz zwischen dem *GASBOR*-Modell bei pH 7,4 von den experimentellen SAXS-Daten zu untersuchen, wurden die zugehörigen primären SAXS-Daten beider pH-Bedingungen mit dem Programm *EOM* ausgewertet. Da alle in Abbildung 4.12 gezeigten Modelle des M1-Proteins die gleichen Struktur-Merkmale aufwiesen, nämlich den kompakten Bereich und die elongierte Region, liegt die Vermutung nahe, dass der elongierte Bereich erhöhter Flexibilität unterliegt. Dieser Aspekt wird ebenfalls mit dem Programm *EOM* untersucht.

Bei pH 5,0 bestimmte der Algorithmus von *EOM* mit einer Diskrepanz von $\chi^2 \approx 0,8$ (Abbildung 4.13 A), dass die errechneten Zufallsmodelle mit den zugehörigen Struktur-Parametern gut mit den experimentellen SAXS-Daten übereinstimmen. Die R_g - sowie die D_{max} -Verteilung der M1-Proteinprobe bei pH 5,0 zeigt sich in überlappenden Clustern mit unterschiedlich häufigem Vorkommen (Abbildung 4.13 B und C, Grün). Dominierend sind Modelle mit einem R_g im Bereich von 2 - 3 nm und einem D_{max} von 6 - 11 nm, während Strukturmodelle mit $R_g > 3$ nm sowie $D_{max} > 11$ nm seltener auftreten. Die durch *EOM* berechneten Mittelwerte für R_g (~ 3 nm) und

D_{max} (~11 nm) stimmen mit den R_g - und D_{max} -Werten, die durch die Guinier-Region und die $p(r)$ -Funktion bestimmt wurden, überein. Aufgrund der überlappenden Cluster lässt sich vermuten, dass die M1-Probe bei pH 5,0 ausschließlich Monomere ausbildet. Unterstützt wird diese Vermutung durch die mit EOM-berechneten Zufallsstrukturen, mit einem R_g und D_{max} um den mit EOM-bestimmten Mittelwert, die zu 70% an der experimentellen Streukurve beitragen. Außerdem wurden die maximalen Werte für R_g und D_{max} unter Annahme vollständiger Entfaltung nicht erreicht, was auf eine limitierte Flexibilität schließen lässt. Zusätzlich stimmen die Mittelwerte der Struktur-Parameter R_g und D_{max} mit den in dieser Arbeit bereits ermittelten Struktur-Parametern des M1-Proteins bei pH 5,0 überein.

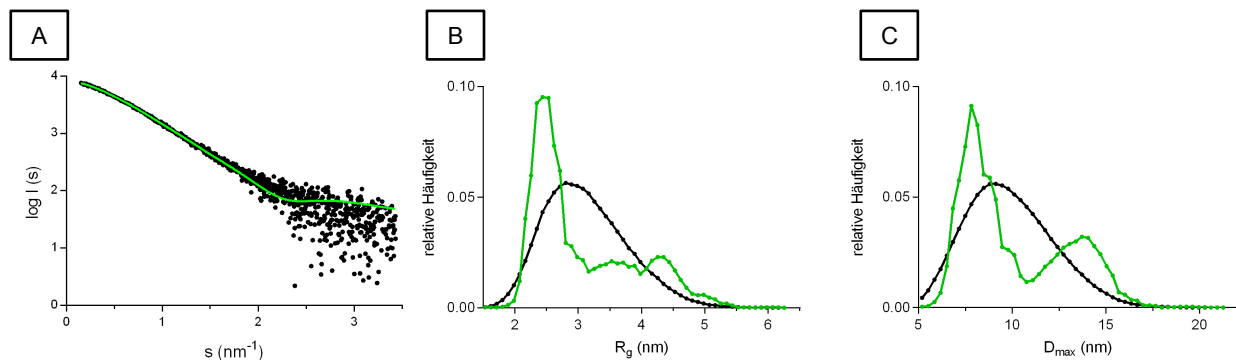


Abbildung 4.13| EOM-Analyse der experimentellen Daten des M1-Proteins bei pH 5,0| Das Programm EOM hat Zufallsmodelle erstellt und deren Gyrationradien (R_g) sowie maximalen Partikeldurchmesser (D_{max}) gespeichert. **A.** Die Übereinstimmung der EOM-Berechnung mit den experimentellen Daten ergab eine Diskrepanz von $\chi^2 \approx 0,8$. **B.** Die relative Häufigkeit der ermittelten R_g zeigt, dass Konformationen mit einem R_g zwischen 2 - 3 nm häufig eingenommen werden (Grün). Konformationen mit weitaus größeren R_g -Werten werden hingegen seltener eingenommen. Die durchschnittliche Verteilung (Schwarz) der R_g -Werte zeigt einen Mittelwert bei ca. 3 nm, der mit den bereits durch die Guinier-Region und $p(r)$ -Funktion ermittelten R_g -Werten der M1-Proteinprobe bei pH 5,0 übereinstimmt. **C.** Die eingenommenen D_{max} der Zufallsmodelle zeigen am häufigsten eine Ausdehnung von 6 - 11 nm (Grün). Zusätzlich ist eine zweite Population von Zufallsmodellen mit 11 - 17 nm zu erkennen. Der Mittelwert der durchschnittlichen Verteilung (Schwarz) liegt für die D_{max} -Werte bei ca. 9 nm und stimmt mit den bereits ermittelten D_{max} -Werten gut überein. Aufgrund der Verteilung der relativen Häufigkeiten von R_g und D_{max} ist davon auszugehen, dass M1 bei pH 5,0 eine bevorzugte Konformation einnimmt, die in Abbildung 4.6 dargestellt wurde. Zusätzlich wird besonders der C-Terminus durch limitierte Flexibilität einen Anteil an den größeren Konformationszuständen haben.

In einer ersten EOM-Analyse der Streudaten des M1-Proteins bei einem pH-Wert von 7,4 zeigten sich zwei eindeutig voneinander getrennte Cluster von Zufallsmodellen ähnlich wie die in Abbildung 4.14 B und C dargestellt. Die Übereinstimmung der berechneten Zufallsmodelle mit den SAXS-Daten ergab eine Diskrepanz von $\chi^2 \approx 2,8$ und stellte keine Verbesserung verglichen zu den GASBOR-Berechnungen dar. Diese Diskrepanz könnte entweder durch die Mischung von zwei gänzlich unterschiedlichen Konformationen oder durch die Anwesenheit von Spaltprodukten des M1-Proteins in der Proteinprobe zustande kommen.

Um die deutliche Diskrepanz zwischen Ergebnissen der ersten *EOM*-Berechnungen und den experimentellen Daten der pH 7,4-Probe weiter zu untersuchen, wurde eine erneute Daten-Analyse mit *EOM* durchgeführt. Dieses Mal erhielt das Programm die Information, dass neben dem Volllänge-Protein auch die NM-Domäne und der C-Terminus als eigenständige Probenanteile zur Streuung des Röntgenlichts während des SAXS-Experiments beitragen und sich nebeneinander in der Probe befanden. *EOM* konnte eine Zusammensetzung von Zufallsmodellen erstellen, dessen theoretische Streukurve die experimentellen SAXS-Daten bei pH-Wert 7,4 signifikant besser repräsentieren (Abbildung 4.14 A). Mit einer Diskrepanz von nun $\chi^2 \approx 1,2$ ergab die Berechnung R_g -Populationen von 1,7 - 3 nm sowie 4,5 - 6 nm (Abbildung 4.14 B) sowie D_{max} -Populationen von 6 - 10 nm und 14 - 20 nm (Abbildung 4.14 C). Die Ergebnisse repräsentieren ein Mischungsverhältnis von 11% : 11% : 78% Volllänge-M1 zu NM-Domäne zu abgespaltenem C-Terminus. Diese Ergebnisse werfen die Hypothese auf, dass das Volllänge-M1-Protein bei pH 7,4 hydrolytisch in NM-Domäne und C-Terminus gespalten wurde und deshalb drei Komponenten simultan in der Probe vorlagen, die alle zur Streuung des Röntgenstrahls während des SAXS-Experiments beitragen.

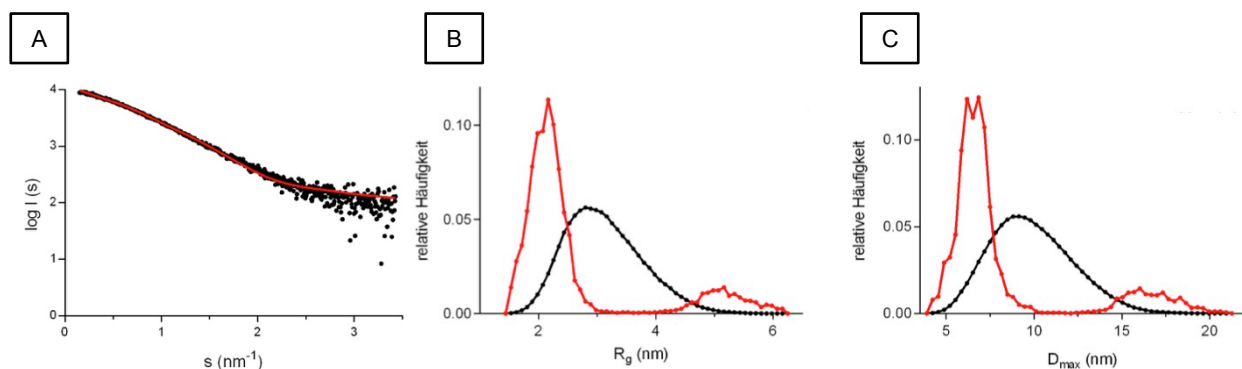


Abbildung 4.14 | Untersuchung der Diskrepanz zwischen der Partikelgröße und des Porod-Volumen von M1 bei pH 7,4 mit Hilfe des Programms *EOM* | **A.** Mit der Vorgabe, dass die vermessene Probe eine Mischung aus Volllänge-M1, NM-Domäne und C-Terminus enthält konnte der *EOM*-Algorithmus eine theoretische Streukurve berechnen, die die experimentellen Daten bei pH 7,4 mit einer Diskrepanz von $\chi^2 \approx 1,2$ sehr gut repräsentiert. Das optimale Mischungsverhältnis, das zu den experimentellen Daten passt, beträgt 11% Volllänge-M1, 11% NM-Domäne und 78% C-Terminus. Damit scheint das M1-Protein bei pH 7,4 durch Hydrolyse zwischen der NM-Domäne und dem C-Terminus gespalten worden zu sein. **B.** und **C.** Die R_g - sowie die D_{max} -Verteilung der relativen Häufigkeit der Zufallsmodelle zeigen jeweils zwei Cluster von Ensembles, von denen der Cluster der Konformationen mit R_g von 1,7 - 3 nm und mit D_{max} von 6 - 10 nm dominiert. Außerdem weist der zweite Cluster deutlich größere Werte mit R_g von 4,5 - 6 nm und mit D_{max} von 14 - 20 nm auf.

Die postulierte hydrolytische Spaltung des M1-Proteins bei pH 7,4 wurde anschließend mittels Größenausschlusschromatographie untersucht (Abbildung 4.15). Bei pH 5,0 zeigt das Chromatogramm der kalibrierten analytischen Größenausschlusschromatographie lediglich einen Absorptionsmaximum bei einem Retentionsvolumen von etwa 15,7 ml (Abbildung 4.15 A), was einem berechneten MW von etwa 30 kDa entspricht und mit dem theoretisch erwarteten MW des

M1-Proteins übereinstimmt. Das Profil der kalibrierten analytischen Größenausschlusschromatographie des M1-Proteins bei einem pH-Wert von 7,4 (Abbildung 4.15 B) zeigt eine Überlagerung von mindestens drei Absorptionsmaxima zwischen Retentionsvolumina von etwa 11 ml bis 18 ml und einer kleinen Fraktion, die bei 20 ml eluiert. Damit entspricht der Elutionsbereich der überlagerten Absorptionsmaxima berechneten Molekulargewichten von etwa 17 kDa bis 110 kDa, was im ersten Moment auf unterschiedliche Oligomerisations-Zustände in Kombination mit hydrolytischen Abbauprodukten schließen lässt. Jedoch konnten sowohl die primären SAXS-Streukurven als auch die *EOM*-Analyse die Anwesenheit von oligomeren Strukturen widerlegen, was wiederum auf unterschiedliche Konformationszustände bei physiologischem pH-Wert hindeutet. Die Elutionsfraktion von 20 ml entspricht einem MW von etwa 12kDa und repräsentiert damit die NM-Domäne. Außerdem wird ein Absorptionsmaximum bei etwa 22 ml Retentionsvolumen beobachtet, das einem MW von 2 kDa nach MW-Berechnung entspricht und was den hochflexiblen C-Terminus zugeordnet werden kann.

Die Auswertung der Kleinwinkelstreu-Experimente zeigt, dass die beiden verwendeten Modell-Rekonstruktions-Programme *DAMMIF* und *GASBOR* für das bei pH 5,0 als Monomer vorliegende M1-Protein konsistente Modelle mit einer guten Übereinstimmung zu den experimentellen Daten berechnen konnten. Dabei wiesen die Struktur-Merkmale einen kompakten Bereich, der vermutlich der NM-Domäne der M1-Proteins entspricht, sowie eine elongierte Region mit limitierter Flexibilität, die dementsprechend dem M1-C-Terminus entspricht, auf. Die Modell-Rekonstruktionen der experimentellen SAXS-Daten der M1-Probe bei einem pH-Wert von 7,4 mit *DAMMIF* ergab mit einer guten Übereinstimmung ein ähnliches Modell wie die Rekonstruktionen bei pH 5,0-. Der Grund für die anfängliche Diskrepanz der *GASBOR*-Rekonstruktion des M1-Proteins bei einem pH-Wert von 7,4 konnte durch die *EOM*-Analyse erfolgreich untersucht werden und warf die Hypothese der Hydrolyse von M1 bei physiologischem pH-Wert auf. Mit einer analytischen Größenausschlusschromatographie konnten erste Bestätigungen dieser Hypothese erzielt werden, die aber im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden konnten. Allerdings resultierte die Frage, ob die ausgeprägte Tendenz des M1-Proteins zu aggregieren oder die postulierte Hydrolyse-Aktivität bei physiologischem pH-Wert Auswirkungen auf die Faltung des Proteins haben, was im folgenden Abschnitt untersucht wird.

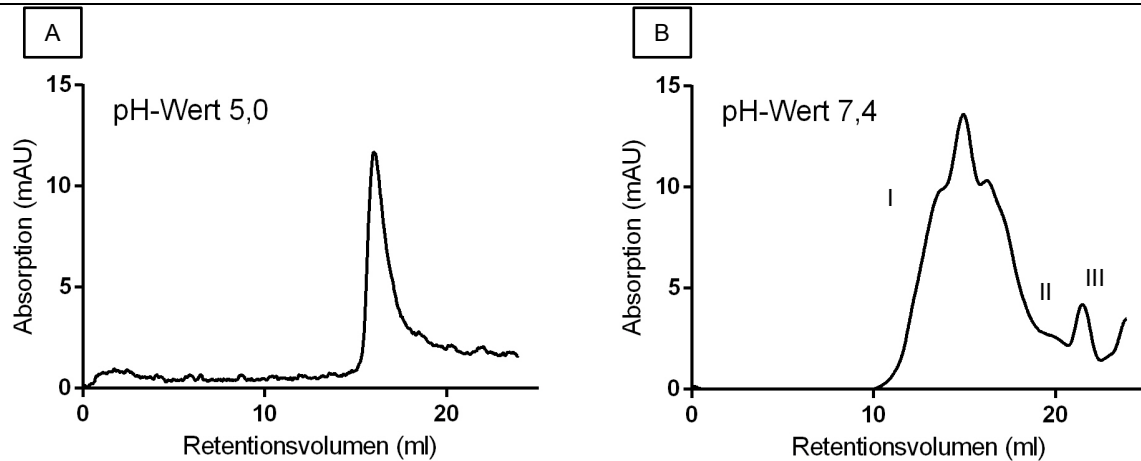


Abbildung 4.15 | Analytische Größenausschlusschromatographie einer M1-Proteinprobe bei pH 5,0 und 7,4

A. Die analytische Größenausschlusschromatographie von reinem M1-Protein bei pH 5,0 zeigte lediglich ein Absorptionsmaximum, das anhand des Retentionsvolumens von etwa 15,7 ml dem monomeren M1-Protein zugeordnet werden konnte. **B.** Die analytische Größenausschlusschromatographie einer M1-Probe bei pH 7,4 zeigt hingegen mehrere Absorptionsmaxima. Basierend auf den Retentionsvolumina können die Maxima I im Bereich der Retentionsvolumina von 11 - 18 ml einem Molekulargesichtsbereich von 17 bis 110 kDa zugeordnet werden, der unterschiedliche flexible Konformationen des Volllänge-M1-Proteins repräsentieren kann. Das Maximum II bei 20 ml kann hingegen dem MW der einzelnen NM-Domäne (12 kDa) sowie das Maximum III dem einzelnen hochflexiblen C-Terminus (10 kDa) zugeordnet werden.

4.2.8. Untersuchung der Sekundärstrukturelemente des M1-Proteins mittels

CD-Spektroskopie

Einer der Gründe der Multifunktionalität sowie des Aufbaus und des pH-Wert induzierten Abbaus von oligomeren Strukturen des M1-Proteins liegt in der Eigenschaft begründet, verschiedene Konformationen einnehmen zu können. In wie fern die Konformationen bei saurem und physiologischen pH-Wert sowie die Ausbildung von Protein-Aggregaten und die postulierte Hydrolyse-Aktivität Einfluss auf die Sekundärstruktur-Zusammensetzung und auf die räumliche Umgebung von aromatischen Aminosäuren haben, wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht.

Während der Infektion einer Zelle mit Influenza A-Viren wird kontinuierlich M1-Protein synthetisiert, wodurch die Konzentration im Zytosol steigt. An der apikalen Seite der Wirtszelle bildet das M1-Protein eine Proteinschicht aus Homo-Oligomeren und fördert damit die Wölbung der Plasmamembran^{44,45}. Um zunächst zu untersuchen, ob sich die Sekundärstruktur proteinkonzentrationsbedingt ändert, wurden CD-Spektren unterschiedlicher M1-Protein-Konzentration aufgenommen. Diese zeigten bei physiologischem pH-Wert keine signifikanten Unterschiede im fernen UV-Bereich in Abhängigkeit der Konzentration (Abbildung 4.16 A). Die Spektren wiesen charakteristische Minima bei einer Wellenlänge von 208 nm und 223 nm sowie einen Wendepunkt bei ca. 218 nm auf. Ein derartiger Verlauf ist

charakteristisch für Proteine mit einem dominierenden Anteil an α -helikalen Strukturelementen¹⁰¹. Aufgrund der konzentrationsbedingten Absorptionseffekte kann keine Aussage über den Schnittpunkt mit der X-Achse getroffen werden.

Sind neue Virione gebildet können diese weitere Wirtszellen infizieren, indem das Virus durch rezeptorabhängige Endozytose internalisiert wird. Als Abwehrmechanismus werden die Endosomen angesäuert, was die Dissoziation der M1-Multimere aufgrund der Änderung der Konformation zur Folge hat und in der Freisetzung der vRNPs resultiert^{18,20,21,23}. In Abbildung 4.16 B sind die CD-Spektren des M1-Proteins mit konstanter Proteinkonzentration bei unterschiedlichen pH-Werten gezeigt. Die pH-Werte simulieren die schrittweise Ansäuerung in den Endosomen. Die Form der Spektren ändert sich in Abhängigkeit des pH-Wertes nicht, so dass auch der Schnittpunkt mit der X-Achse konstant ist. Dementsprechend bleibt auch die Sekundärstruktur unabhängig vom pH-Wert gleich. Alle CD-Spektren des fernen UV-Bereiches zeigen also, dass die Sekundärstrukturzusammensetzung des M1-Proteins unabhängig von der Proteinkonzentration sowie des pH-Wertes ist.

Bei gleichbleibender Sekundärstruktur ist es jedoch möglich, dass sich die Anordnung der Sekundärstrukturelemente im Raum ändert, also die Tertiärstruktur. Dies kann anhand der Elliptizitäts-Änderung im nahen UV-Bereich (260 - 320 nm) überprüft werden, in dem die einzelnen aromatischen Aminosäuren zirkular polarisiertes Licht in Abhängigkeit ihrer räumlichen Umgebung im Protein absorbieren. Im nahen UV-Bereich eines CD-Spektrums können daher die konformationell Umstrukturierungen der Proteine bei gleichbleibender Sekundärstruktur untersucht werden.

Die Spektren der unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der Proben des M1-Proteins bei pH 7,4 zeigen generell ein ähnliches Profil. Mit steigender Konzentration scheinen die Spektren sich zu größeren Wellenlängen zu verschieben (Abbildung 4.16 C, Pfeil). In Abhängigkeit des pH-Wertes werden jedoch leichte Unterschiede bei einer Konzentration des M1-Proteins von 0,25 mg/ml deutlich. Bei pH 5,0 zeigt das nahe UV-Spektrum im charakteristischen Absorptionsbereich für Phenylalanin (255 - 270 nm) ein lokales Minimum im Gegensatz zum Spektrum bei pH 7,4, welches in diesem Bereich ein lokales Maximum aufweist (Abbildung 4.16 D). Die Unterschiede zwischen dem M1-Spektrum bei pH 5,0 und 7,4 deuten auf Änderungen der lokalen räumlichen Umgebung bzw. Interaktionsabstände einer oder mehrerer aromatischer Aminosäuren hin. Die angesprochenen Änderungen liegen in den charakteristischen Elliptizitätsbereich von Phenylalanin, von dem sieben im M1-Protein vorhanden sind. Aufgrund der geringen Anzahl an Tyrosin (5) und Tryptophan (1) ist es jedoch nicht möglich eine valide Beurteilung der CD-Spektren im charakteristischen Elliptizitätsbereich dieser Aminosäuren vornehmen zu können.

Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie zeigen, dass das M1-Protein eine Konzentrations-unabhängige Faltung mit einem dominierenden α -helikalen Anteil aufweist. Die Untersuchung der pH-Wert-Abhängigkeit der Sekundärstruktur ergab ebenfalls keine Unterschiede

bei der Faltung des Proteins. Unterschiede die eine Änderung der räumlichen Anordnung der α -helikalen Strukturen andeuten konnten im nahen UV-Bereich zwischen den pH-Werten 5,0 und 7,4 für die aromatische Aminosäure Phenylalanin beobachtet werden.

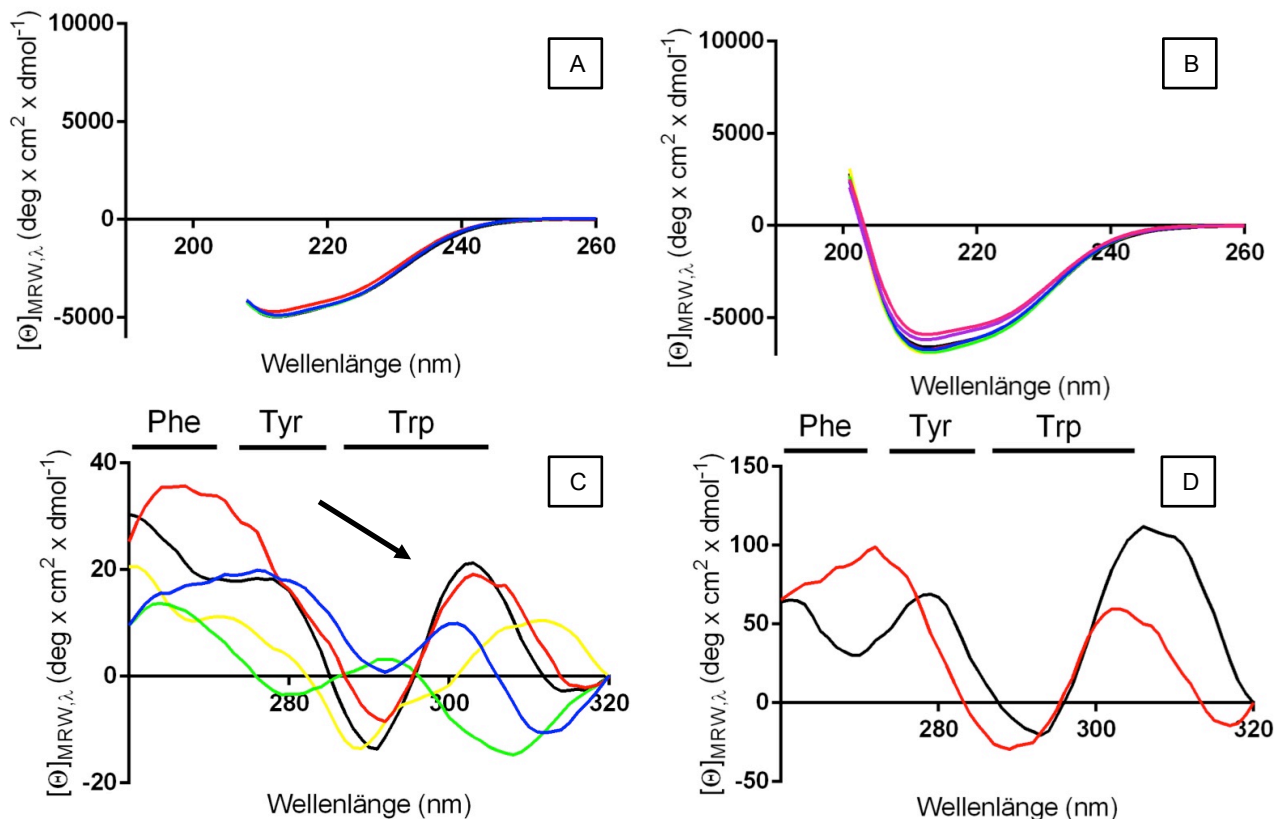


Abbildung 4.16 | Untersuchung der Sekundärstruktur und der Absorption der aromatischen Aminosäuren des M1-Proteins in Abhängigkeit der Proteinkonzentration und des pH-Wertes mittels CD-Spektroskopie | **A.** Alle CD-Spektren von Proben mit unterschiedlicher Proteinkonzentration bei pH 7,4 (0,25 mg/ml: Schwarz, 0,5 mg/ml: Rot, 0,75 mg/ml: Grün und 1 mg/ml: Blau) sind deckungsgleich mit zwei lokalen Minima, eins bei 210 nm und das andere bei 223 nm, und weisen somit auf eine vergleichbare Sekundärstruktur, unabhängig von der Proteinkonzentration, auf. **B.** Die CD-Spektren der M1-Proteinproben bei pH 4,5 (Schwarz), 5,0 (Rot), 5,5 (Orange), 6,0 (Gelb), 6,5 (Grün), 7,0 (Blau), 7,4 (Violett) und 8,0 (Pink) sind nahezu deckungsgleich und zeigen übereinstimmenden zwei lokalen Minima, eins bei 210 nm und eins bei 223 nm. Daher ändert sich die Sekundärelementzusammensetzung in Abhängigkeit des pH-Wert nicht. Mit einem Anteil von 83,4 % ist die α -Helix das Haupt-Sekundärstrukturelement des M1-Proteins. **C.** Augenscheinlich verschieben sich die CD-Spektren des nahen UV-Bereichs in Abhängigkeit der Proteinkonzentration bei pH 7,4 (0,5 mg/ml: Schwarz, 0,6 mg/ml: Rot, 0,75 mg/ml: Gelb, 1 mg/ml: Grün und 1,26 mg/ml: Blau) in Richtung größerer Wellenlängen. Die Richtung der Verschiebung ist mit einem Pfeil angedeutet. **D.** Im charakteristischen Absorptionsbereich für Phenylalanin (Phe) von 255 bis 270 nm zeigt sich bei pH 5,0 (Schwarz) ein lokales Minimum im Gegensatz zur Proteinprobe (beide pH-Wert Proben haben 0,25 mg/ml) bei pH 7,4 (Rot). Da lediglich ein Trp in der M1-Proteinsequenz vorhanden ist, lässt der Absorptionsanteil von Tryptophan (Trp) keine Aussage über Umgebungsänderung der einzelnen Aminosäure zu.

4.3. Aggregations-Tendenz des M1-Proteins bei physiologischem pH-Wert

Wie bereits in dieser Arbeit beschrieben, haben aggregierte Bestandteile von Proteinproben, unabhängig ob sie spezifisch oder unspezifisch entstanden sind, einen signifikanten Einfluss auf

den Streukurven-Verlauf von SAXS-Daten, besonders bei Streuwinkeln $< 0,5 \text{ nm}^{-1}$. Um die Aggregations-Tendenz des M1-Proteins bei physiologischem pH-Wert näher zu untersuchen wurden zwei M1-Proteinproben ähnlicher Proteinkonzentration hergestellt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass eine Probe zwei Tage vor der SAXS-Messung auf die gewünschte Proteinkonzentration von etwa $0,8 \text{ mg/ml}$ eingestellt wurde, während dies bei der anderen Probe erst unmittelbar vor der Messung erfolgte. In Abbildung 4.17 wird ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden gemessenen Streukurven bei Streuwinkeln $< 0,6 \text{ nm}^{-1}$ deutlich. Die Proteinprobe, die zwei Tage vor der Messung konzentriert wurde, verzeichnet im Vergleich zu der kurz vor der Messung konzentrierten Probe einen Aufwärtstrend ab Streuwinkeln $< 0,8 \text{ nm}^{-1}$, was ein deutliches Anzeichen für Protein-Aggregation darstellt. Anscheinend entstehen die M1-Protein-Aggregate zeitabhängig erst dann, wenn die Proteinkonzentration eine gewisse Schwellen-Konzentration überschritten hat. Ansonsten hätte auch die unmittelbar vor der Messung konzentrierte Probe Anzeichen von aggregiertem M1-Protein aufweisen müssen, was aufgrund des Verlaufes der zugehörigen Streukurve ausgeschlossen werden kann. Allerdings kann die Kleinwinkelbeugung nicht zwischen unspezifischer oder spezifischer Proteinaggregation des M1-Proteins unterscheiden. Daher wurden abschließend M1-Proteinaggregate mittels AFM-Topographie untersucht.

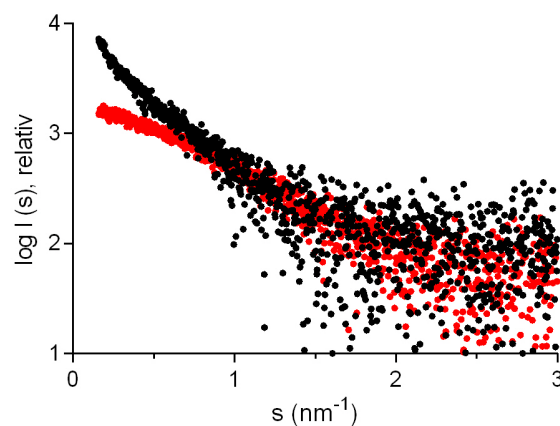


Abbildung 4.17 | SAXS-Streukurven zur Untersuchung der Aggregations-Tendenz des M1-Proteins bei physiologischem pH-Wert | Zwei M1-Proben mit einer Konzentration von etwa $0,8 \text{ mg/ml}$ wurden bei pH 7,4 mittels SAXS-Messung untersucht. Eine Probe wurde zwei Tage vor der Messung auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt (Schwarz), während die zweite Probe erst unmittelbar vor der Messung auf die Konzentration eingestellt wurde (Rot). Die Streudaten der zwei Tage alten Probe zeigen einen deutlichen Aufwärtstrend ab Streuwinkeln $< 0,8 \text{ nm}^{-1}$, im Gegensatz zu der unmittelbar vor der Messung konzentrierten Probe. Ein Aufwärtstrend einer Streukurve, wie es in der Abbildung zu sehen ist, gilt als deutliches Anzeichen für Proteinaggregation.

4.3.1. AFM-Topographie von M1 Proteinstrukturen bei unterschiedlichen pH-Werten

Wie bereits zuvor dargestellt zeigt das M1-Protein eine verstärkte Tendenz bei physiologischen pH-Wert Protein-Aggregate auszubilden. Da es sich dabei um eine physiologische Eigenschaft des

M1-Proteins beim Aufbau neue Virione handelt und die aufgebauten Strukturen während der endosomalen Ansäuerung pH-abhängig wieder dissoziieren müssen, sollen mit Hilfe der AFM-Topographie der Aufbau der Protein-Aggregate untersucht und der pH-Wert eingegrenzt werden bei dem diese beginnen zu dissoziieren.

Die AFM-Topographie bietet die Möglichkeit selbst Strukturen im niedrigen Nanometerbereich abzubilden. Dabei wird eine Probe auf einer ultraglaten MICA-Oberfläche aufgebracht und mit einem Cantilever abgerastert. Die ermittelten Höhenunterschiede werden dann bildlich dargestellt. Um zu gewährleisten dass sich Protein-Aggregate in der Probe befinden wurde die M1-Proben wie unter Punkt 4.2.9 beschrieben zwei Tage vor der AFM-Topographie final auf eine Konzentration von etwa 0,8 mg/ml eingestellt. Bei einem pH-Wert von 7,4 zeigen die AFM-Bilder der M1-Proteinprobe ein röhrenähnliches Netzwerk, anhand der dargestellten Detailansicht wurde die Größe der einzelnen „Protein-Röhren“ mit einem ungefähren Durchmesser von 35 - 50 nm, einer Höhe von etwa 2 - 3 nm und eine Länge von etwa 100 - 200 nm bestimmt (Abbildung 4.18 A, Balken). Diese geordneten Strukturen konnten erst nach starker Verdünnung ab einer Proteinkonzentration von ca. 250 ng/ml beobachtet werden. Die negativ geladene MICA-Oberfläche bietet für die M1-Moleküle aufgrund der positiven Nettoladung der Protein eine gute Interaktionsmöglichkeit, die sich deutlich von den Bedingungen in Lösung unterscheiden, besonders da bei der Probenpräparation die Probe auf der MICA-Oberfläche eingetrocknet wird. Bei höheren Konzentrationen sind hingegen flächige Strukturen mit einer Höhe von etwa 1,5 nm zu erkennen (Abbildung 4.18 B), die vermutlich eine einschichtigen M1-Proteinen-Schicht darstellt, wie sie bereits in Virionen detektiert werden konnte⁶⁷. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das M1-Protein bei physiologischem pH-Wert eine ausgeprägte Aggregationstendenz zeigt. Keine dieser geordneten Strukturen konnte bei M1-Proben mit den pH-Werten 6,0 oder 5,0 detektiert werden (Abbildung 4.18 C). Vielmehr wurden vereinzelte Strukturen mit einem Durchmesser von 120 - 400 nm und einer Höhe von 5 - 70 nm ab einer Proteinkonzentration von 25 µg/ml beobachtet, die jedoch keine zusammenhängenden makroskopischen Strukturen auf der MICA-Oberfläche ausbildeten.

Mit Hilfe der AFM-Topographie konnte folglich die Aggregations-Tendenz des M1-Proteins bei physiologischem pH-Wert bestätigt werden. Außerdem konnten Anhaltspunkte über die Form der Proteinaggregate gewonnen und der pH-Wert, ab dem die Dissoziation der M1-Aggregate beginnt, eingegrenzt werden.

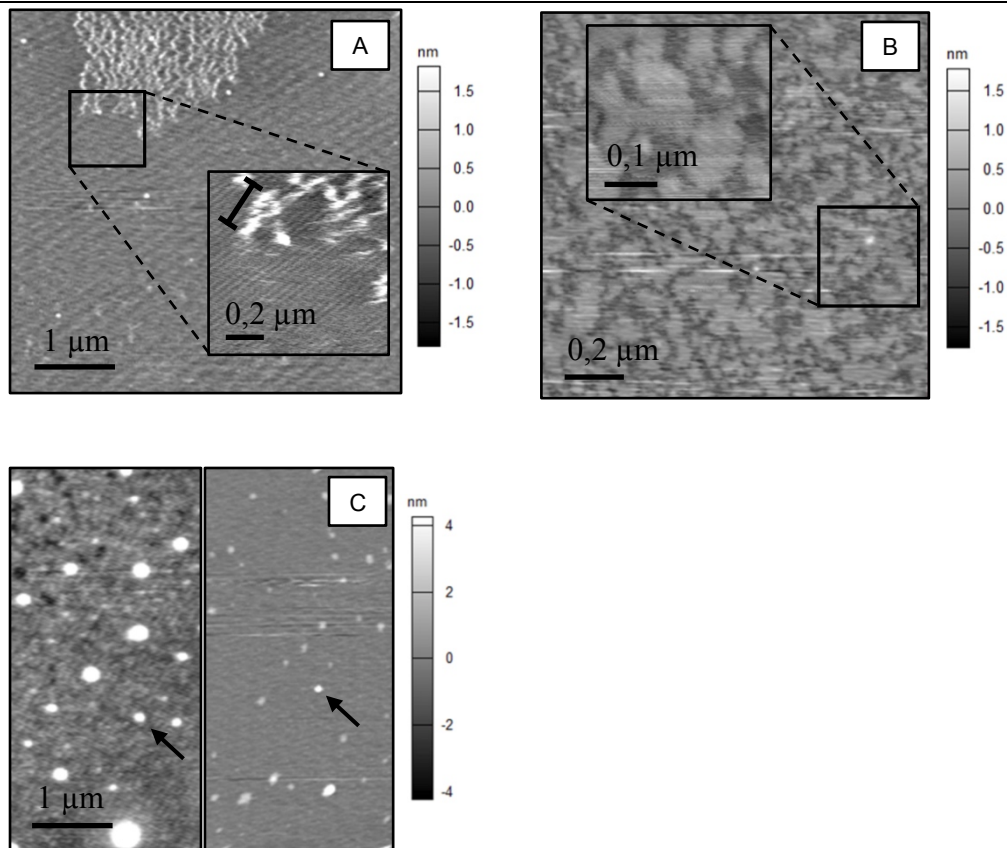


Abbildung 4.18 | *AFM-Topographie von M1 bei verschiedenen pH-Werten* | **A.** Ab einer Proteinkonzentration, von 250 ng/ml konnten bei pH 7,4 hochgeordnete netzwerkähnliche Strukturen registriert werden. Dabei wurden Durchmesser von 35 - 50 nm, Höhen von 2 - 3 nm und Längen von 100 - 200 nm für die Röhren-Strukturen gemessen. **B.** Bei Proteinkonzentrationen im Bereich von 250 µg/ml bis 2,5 µg/ml konnte bei pH 7,4 die Ausbildung flächiger Strukturen des M1-Proteins beobachtet werden, bei denen es sich anhand ihrer Höhe beurteilt um zweidimensionale Aggregate des M1-Proteins handelt. **C.** Bei einem pH-Wert von 6,0 (links) und 5,0 (rechts) wurden ausschließlich vereinzelte runde Strukturen (Pfeile) mit einem Durchmesser von 120 - 400 nm und einer Höhe von 5 - 70 nm ab einer Proteinkonzentrationen von 25 µg/ml detektiert. Im Gegensatz zur Untersuchung bei pH 7,4 führte eine weitere Verdünnung der M1-Proteinprobe nicht zur Detektion hochgeordneter Strukturen (Daten nicht gezeigt).

5. Diskussion

Die saisonalen Influenza-A-Virus-Infektionen bilden nicht nur eine wiederkehrende gesundheitliche Bedrohung für den Menschen, sondern haben auch negative wirtschaftliche Auswirkungen. Thompson *et al.* schätzten 2003, dass die jährlichen Influenza-Infektionen über 50.000 Menschenleben fordern. Deutlich beunruhigender ist das konstante Risiko einer sporadisch auftretenden Pandemie, die unter Umständen mehrere 100.000 bis Millionen Menschen das Leben kosten kann¹⁶. Prominente Beispiele für besonders virulente Influenza-A-Virus-Stämme sind die sogenannte ‚Spanische Grippe‘ (H1N1-Subtyp) von 1918¹⁷², die in acht Monaten etwa 20 - 40 Millionen Menschenleben forderte und der H5N1-Subtyp, der als ‚Vogelgrippe‘ bekannt wurde¹⁷³. In der Regel verläuft eine Influenza-A-Virus-Infektion innerhalb von 1 - 2 Wochen harmlos, vorwiegend mit einer Entzündung des respiratorischen Systems². Bei Risikogruppen, wie Neugeborenen, Senioren oder immunsupprimierten Menschen, kann sie jedoch zu einer Pneumonie bis hin zum Tod führen^{3,4}.

Während des Replikationszyklus des Influenza-A-Virus übernehmen die Schlüsselproteine M1 und NEP essentielle Aufgaben.

Die pH-abhängige Dissoziation der M1-Proteinaggregate, die zuvor das Virion stabilisiert hat, führt nach Ansäuerung der Endosome in der frühen Infektionsphase zur Freisetzung der viralen RNA in das Wirtszell-Zytosol^{23,66}. Außerdem bilden Homo-Oligomere des M1-Proteins eine Proteinmatrix, die formgebend und stabilisierend für die Virione ist^{44,45}. Die zugehörigen molekularen Mechanismen sind jedoch bisher weitgehend unverstanden.

Gleiches gilt für die Wechselwirkung von M1 mit dem Adapter-Protein NEP³⁹⁻⁴², welches für den Aufbau des Kern-Export-Komplexes und somit für den Kern-Export der replizierten vRNA essentiell ist^{25,36-38}. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst die rekombinante Herstellung beider Influenza A-Virus-Proteine etabliert und vor allem die pH-abhängige strukturelle Charakterisierung des M1-Proteins erfolgen, um die grundlegenden Abläufe der Influenza-A-Virus-Infektion besser zu verstehen.

5.1. Rekombinante Herstellung der Influenza-A-Virus Proteine M1 und NEP

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien zur rekombinanten Herstellung der zu untersuchenden Protein M1 und NEP angewandt.

Für die rekombinante Synthese von NEP in *E. coli* musste das Gen zunächst amplifiziert werden. Da in der Literatur nur unvollständige Angaben zur PCR-Amplifikation gemacht werden⁷², konnte mit Hilfe einer drei-stufigen PCR das NEP-Gen anhand der Vorlage des vollständigen Gensegments 8 amplifiziert werden. Trotz Zuhilfenahme des bisher einzigen *E. coli*-basierten Synthese-Protokolls⁷² und dem intensiven Screening der möglichen Synthese-Parameter, konnte kein lösliches NEP-Protein in *E. coli*-Zellen hergestellt werden. Absatz

Es kann vorkommen, dass Zielproteine nach *E. coli*-basierter Herstellung nur eine geringe Menge an löslichem Zielprotein zeigen oder dass überhaupt keine Synthese des Zielproteins zu verzeichnen ist. Für manche Proteine ist eine intensive Unterstützung während der Faltung notwendig, die die *E. coli*-Faltungsproteine nicht bereitstellen können. Somit kommt es vermehrt zu fehlgefalteten Proteinen, die dann als unlöslicher Anteil präzipitieren.

Wirkt ein Zielprotein toxisch auf die *E. coli*-Zellen, so kann es zu einer erhöhten Sterberate der Zellen kommen. Außerdem kann das Zielprotein durch *E. coli*-Proteasen vermehrt abgebaut werden.

Beide Prozesse führen dazu, dass keine Herstellung des Zielproteins nach SDS-PAGE-Analyse beobachtet wird. Ein Wechsel auf ein alternatives Expressionssystem kann nicht nur die Ausbeute an löslich synthetisiertem Zielprotein deutlich erhöhen, sondern eine rekombinante Herstellung sogar erst ermöglichen.

So kann ein Expressionssystem mit eukaryotischen Zellen im Gegensatz zu den *E. coli*-Zellen die angesprochenen Faltungsproteine (Chaperone) zur Verfügung stellen, die für eine native Faltung essentiell sein können. Außerdem kann das synthetisierte Zielprotein eine andere Zytotoxizität in Bezug zu eukaryotischen Zellen aufweisen.

Das etablierte Sf9-Insektenzellsystem bietet die Möglichkeit eines alternativen Ansatzes der rekombinanten Protein-Synthese unter Verwendung von eukaryotischen Zellen und führte in dieser Arbeit zu einer erfolgreichen rekombinanten Herstellung von NEP.

Um den Nachweis der Herstellung zu ermöglichen, musste ein HA-Tag-modifiziertes Protein verwendet werden. Damit bildet dieses Ergebnis die erste erfolgreiche rekombinante Synthese von NEP in Insektenzellen. Jedoch war die Menge an synthetisiertem Protein zu gering, um eine strukturelle Charakterisierung durchführen zu können. Dennoch bietet diese Arbeit eine wichtige Grundlage für die zukünftige Optimierung der rekombinanten Herstellung von NEP.

Im Gegensatz zum NEP konnte das M1-Protein mit einer ausreichenden Ausbeute in *E. coli*-Zellen hergestellt werden und mit einem finalen Reinheitsgrad von etwa 95% erfolgreich isoliert werden.

Auf Grundlage des Herstellungsprotokolls von Zhang *et al.* (2012)⁶⁶ wurde die Reinigung des M1-Proteins optimiert. Auffällig war, dass unabhängig von der Art des Affinitätstags die N-terminal markierten Proteine nicht an die Affinitätsmatrix binden konnten. Wahrscheinlich ist der N-terminale Affinitätstag aufgrund der Faltung des Proteins für eine Reinigung unzugänglich, was aber bis heute noch nicht in anderen Arbeiten gezeigt wurde. Dementsprechend wurde versucht, ein C-terminal His₆-getagtes-Konstrukt mit der C-terminalen Sequenz ²⁵³LEHHHHH²⁶⁰ herzustellen, um einerseits die Reinigung zu ermöglichen, aber auch um eine gute Vergleichsmöglichkeit mit dem gleichen Konstrukt aus einer anderen Arbeit⁶⁶ zu haben. Die Besonderheit an diesem Konstrukt ist, dass nur die Aminosäuren Leucin und Glutaminsäure neben dem His₆-Affinitätstag im M1-Protein verbleiben. Optimiert wurde das Reinigungsprotokoll, indem

die Größenausschlusschromatographie mit dem späteren, in der strukturellen Charakterisierung eingesetzten Puffer, durchgeführt wurde.

Somit konnte ein weiterer Größenausschlusschromatographie-Lauf eingespart werden um die Proteinprobe für die weitere Charakterisierung vorzubereiten.

Zusätzlich konnte ebenfalls erstmalig die rekombinante Synthese des M1-Proteins in Sf9-Insektzellen etabliert werden.

Ähnlich wie beim NEP war auch die Ausbeute des M1-Proteins zu gering, um eine strukturelle Charakterisierung zu ermöglichen. Da die Menge des Proteins trotz großem unlöslichen Anteil unter Verwendung des *E. coli*-Systems für die Charakterisierung ausreichte, wurde dieses System für die Produktion im Rahmen dieser Arbeit genutzt. Da Insektzellen den Säugerzellen ähnlicher sind als *E. coli*-Zellen, bietet das Insektzellensystem eine bessere Faltungsmaschinerie, die zu einer anderen Faltung des Proteins führen kann und damit strukturelle Unterschiede entstehen. Somit wird zukünftig die Etablierung der Insektzell-basierten Herstellung des M1-Proteins ein wichtiger Schritt, um die Strukturanalysen des in *E. coli* hergestellten M1-Proteins mit einer alternativ produzierten Probe zu vergleichen.

5.2. Strukturelle Charakterisierung des M1-Proteins

Das in dieser Arbeit im Fokus stehende M1-Protein, konnte bis heute nur teilweise mit einer hochaufgelösten Röntgenkristallstruktur charakterisiert werden^{68,80}. In der Einheitszelle des Kristalls befinden sich zwei NM-Domänen mit jeweils zwei vier-Helix-Bündel damit zeigt es eine dominierende α -helikale Sekundärstruktur. Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Volllänge-Protein bei saurem pH als polarisiertes Protein vorliegt und dabei die hochgeordnete NM-Domäne einen eher unstrukturierten C-Terminus aufweist^{81,86}. Bei SAXS-Experimenten zum nativen M1-Protein bei pH-Wert 5,0 konnten Oligomere beobachtet und deren Oberflächenstruktur aufgeklärt werden⁸⁶. Untersuchungen des rekombinanten M1-Proteins mittels Größenausschlusschromatographie hingegen, konnten lediglich bei physiologischem pH-Wert unterschiedliche Aggregationszustände detektieren⁶⁶. Besonders die Tendenz des rekombinanten M1-Proteins zu aggregieren, gestaltete die strukturelle Charakterisierung als sehr anspruchsvoll.

5.2.1. Untersuchung zur Qualität und Stabilität der rekombinanten Herstellung

Für die Strukturbiologie ist es von großer Bedeutung, dass die rekombinant hergestellten Zielproteine eine hohe Qualität aufweisen, da Messdaten von zum Beispiel polydispersen Proben nur schwer aussagekräftig interpretiert, sowie die Proteinkristallisation durch Inhomogenität behindert werden können. Außerdem sollte das Protein eine gewisse Stabilität aufweisen, da es oftmals nicht möglich ist, die strukturbiologische Methode direkt am Tag der Protein-Herstellung durchzuführen. Daher wurden initiale Stabilitätstests des rekombinanten M1-Proteins mittels DLS-Messung und CD-Spektroskopie überwacht.

Ein wichtiges Qualitätsmerkmal von rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteinen ist eine korrekte Faltung, die mit der CD-Spektroskopie untersucht werden kann.

Die Ergebnisse der CD-Messung konnten zeigen, dass die Sekundärstruktur über den viertägigen Zeitraum mit Messungen im 24-Stunden-Rhythmus konstant blieb. Außerdem wurde mit Hilfe eines Sekundärstrukturgehalt-Berechnungs-Algorithmus nach Louis-Jeune *et al.* (2012)¹⁶² die Sekundärstruktur des M1-Proteins unabhängig vom pH-Wert mit 83,4% α -Helix und 1,42% β -Faltblatt berechnet.

Mit diesen Ergebnissen wurden bereits bekannte Charakterisierungen durch die ermittelte Kristallstruktur der NM-Domäne und die Hypothese, der C-Terminus liege ebenfalls hauptsächlich α -helikal vor, bestätigt^{68,79,174}.

Für die weitere Einschätzung der Qualität wurden Dispersitäts-Untersuchungen mittels DLS von zwei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt, um die bereits beschriebene Aggregations-Tendenz des M1-Proteins beurteilen zu können. Die DLS-Messung ergab unabhängig vom pH-Wert unterschiedlich hochmolekulare Aggregate, was durch spezifische oder unspezifische Proteinaggregation zustande gekommen sein kann. Alternativ kann sich ein Gleichgewicht bis zur initialen DLS-Messung zwischen kleineren oligomeren Strukturen wie Dimeren, Trimeren usw. und hochmolekularen Strukturen, wie sie bei der Virus-Assemblierung auftreten⁶⁷⁻⁶⁹, eingestellt haben. Absatz

Mit einer Studie zu den Oligomerisierungseigenschaften des rekombinanten M1-Proteins konnte 2012 gezeigt werden, dass mehrere oligomere Zustände konzentrationsabhängig bei physiologischem pH-Wert zu erkennen sind⁶⁶, was die Ergebnisse der DLS-Messungen bestätigen. Weitere hochmolekulare Strukturen konnten mit der SAXS-Technik bei saurem pH-Wert entdeckt werden⁸⁶. Da das Lichtstreu-Vermögen eines Partikels von der sechsten Potenz des Radius abhängt, kann in den gemessenen rekombinanten M1-Proteinproben die Konzentration an hochmolekularen Partikeln gering genug sein, um weitere strukturelle Charakterisierungen nicht zu beeinflussen. Außerdem zeigen diese Erkenntnisse, dass das M1-Protein genügend Stabilität aufweist, um weitere strukturelle Techniken anwenden zu können.

5.2.2. Kristallisations-Experimente

Eine etablierte Methode zur Generierung von hochaufgelösten Strukturdaten von biologischen Makromolekülen ist die Röntgenkristallographie. Durch Anwendung dieser Methode konnte bisher jedoch nur die NM-Domäne des M1-Proteins aufgeklärt werden^{68,80}. Auch wenn ursprünglich das rekombinante Volllänge-Protein in Kristallisationsuntersuchungen eingesetzt wurde, kam es zur Kristallisation der NM-Domäne ohne C-Terminus, was durch eine spaltungssensible Region erklärt wurde⁷⁹. Diese Beobachtungen implizieren, dass der C-Terminus die Kristallisation vermutlich durch erhöhte Flexibilität oder Maskierung wichtiger Protein-Protein-Kontaktflächen behindert.

Folglich existiert noch kein Strukturmodell des Volllänge-Proteins mit atomarer Auflösung. Dennoch wurde im Rahmen dieser Arbeit ein konventionelles Kristallisations-*Screening* des rekombinanten M1-Proteins bei pH-Wert 5,0 durchgeführt, welches in einem vielversprechenden hochgeordneten hexagonalen Kristall mit den Kantenlängen 25 µm x 25 µm resultierte. Dies war bisher mit dieser Morphologie nicht gelungen^{68,79,80,174}.

Die Anfärbung des Kristalls mit Methylenblau unterstützt die Vermutung, dass es sich um einen Proteinkristall handelt. Es war im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit aufgrund von nicht verfügbaren Strahlzeiten jedoch nicht möglich, die proteinkristallcharakteristische Bragg-Beugung an einer Synchrotron-Strahlenquelle nachzuweisen. Damit steht der letzte Beweis aus, um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um einen Proteinkristall handelt.

An dieser Stelle lässt sich nicht ausschließen, dass nach der Sammlung von Beugungsdaten erneut nur die NM-Domäne in der Elektronendichte sichtbar wird würde, ähnlich wie bereits berichtet⁷⁹, obwohl das Volllänge-M1-Protein eingesetzt wurde. Jedoch suggeriert die erstmals beobachtete hexagonale Morphologie, dass es sich tatsächlich um das Volllänge-Protein im Kristall handelt.

Seit Kurzem steht neben der konventionellen Kristallographie auch ein innovativer Ansatz zur Generierung von Proteinkristallen zur Verfügung- die so genannte *in vivo*-Kristallisation von rekombinanten Proteinen in lebenden Insektenzellen.

Dieser alternative Ansatz konnte bisher mehrfach erfolgreich angewendet werden, um Kristalle von Proteinen zu erhalten, die durch konventionelle Methoden nicht röntgenbeugungstauglich generiert werden konnten^{143,175}.

Daher wurde in dieser Arbeit der Einzige bisher identifizierte Screening-Parameter¹⁷⁶, das zelluläre Kompartiment, für das M1-Protein und das NEP getestet, um die Wahrscheinlichkeit des Wachstums von *in vivo*-Kristallen zu erhöhen. Da weder Isolation, noch Reinigung einer großen Mengen an rekombinantem Protein erforderlich ist, konnte auch das NEO einbezogen werden; die Produktion sowohl des M1-Proteins, als auch des NEP konnten bereits erfolgreich gezeigt werden. Allerdings konnten im üblichen Zeitraum von vier Tagen nach Infektion keine eindeutigen Anzeichen von spontanem Kristallwachstum detektiert werden- weder für Konstrukte, die zytosolisch lokalisiert waren, noch für Konstrukte mit ER- oder Peroxisomen-Translokations-Signal. Stattdessen wurden vielmehr typische Anzeichen für zellulären Stress (erhöhte Granularisierung, geringere Zelldichte und zunehmend lysierte Zellen) verzeichnet im Vergleich zu der Kontrollinfektion mit einem Baculovirus, das kein zusätzliches rekombinantes Gen trug (Leer-Virus). als bei der Kontrollinfektion mit einem Baculovirus, das kein zusätzliches rekombinantes Gen trug (Leer-Virus).

Aufgrund der Membranbindungseigenschaft des M1-Proteins ist es denkbar, dass das Protein in den Sf9-Zellen die Membranarchitektur beeinträchtigt, sodass die Zellen erhöhtem Stress ausgesetzt sind.

Da NEP mit dem Zellkern-Exportsystem interagieren kann, könnte die Beeinträchtigung des regulären Zellkern-Exports ein Grund für die starken Stressanzeichen sein. Die Überproduktion beider Zielproteine ergab mit den derzeitigen Detektionsmethoden kein spontanes Kristallwachstum in den Sf9-Insektenzellen in Abhängigkeit des untersuchten Zellkompartiments. Problematisch wird eine Detektion von *in vivo*-Kristallen, wenn diese den Zelldurchmesser nicht überschreiten, da sie aufgrund der sehr ähnlichen Dichte¹⁷⁷, verglichen mit dem umliegenden Kompartiment, für lichtmikroskopische Beobachtungen unsichtbar sind.

Die Lyse der infizierten Zellen mit zum Beispiel RIPA-Puffer, kann bei der Detektion unterstützen, indem das kristallumgebende Kompartiment zerstört wird und somit die Dichteunterschiede erhöht werden, was wiederum zur Folge hat, dass die Kristalle im Lichtmikroskop sichtbar werden. Absatz Auch nach Zellyse konnten keine kristallinen-Strukturen beobachtet werden. Da die Kristalle auch durch den Gebrauch von RIPA-Puffer gegebenenfalls zerstört werden können, ist es ungewiss, ob die *in vivo*-Kristallisation erfolgreich oder erfolglos war.

Daher ist es wichtig, zukünftig die Auswirkung alternativer Puffer auf *in vivo*-Kristalle zu testen. Außerdem besteht Handlungsbedarf im Bereich der Detektion: so werden zum Beispiel neue Detektionsmethoden, derzeit in der Arbeitsgruppe etabliert, um die *in vivo*-Kristalle zukünftig spezifisch mit Kantenlängen bis in den geringen nm-Bereich detektieren zu können. Ein Beispiel hierfür ist die Methode der 2-Photonenspektroskopie.

Allerdings wurden zum ersten Mal Untersuchungen von Proteinen mit einem NLS im Sf9-Insektenzellsystem durchgeführt. Der modifizierte pFastBac1-cyto-HA-Vektor bietet nicht nur die Möglichkeit durch einen HA-Tag die erfolgreiche Synthese des Zielproteins nachzuweisen, sondern auch die Lokalisation der Zielproteine in den Zellen zu untersuchen. absatz

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen konnte das M1-Protein nach zytosolischer Synthese, entweder im Zellkern oder vermutlich in Aggregaten zusammengelagert, detektiert werden. Diese Beobachtung zeigt erste Anzeichen der ausgeprägten Tendenz des M1-Proteins Homo-Multimere-Strukturen auszubilden, was bisher in diesem Zusammenhang noch nicht gezeigt wurde. Außerdem scheint der Zellkern-Import aufgrund des Zellkern-Lokalisations-Signals des M1-Proteins auch in Sf9-Insektenzellen möglich zu sein. Erstaunlicherweise wurde das NEP nach zytosolischer Synthese ausschließlich mit der Plasmamembran assoziiert beobachtet.

Aufgrund der physiologischen Hauptaufgabe von was?, dem Zellkernexport⁹⁵, wurde erwartet, dass das NEP überwiegend im Zellkern anzutreffen ist. Möglicherweise kann das Zellkern-Importsystem der Sf9-Insektenzellen den Import von NEP, aufgrund dessen Nukleus-Lokalisations-Signals, nicht durchführen, da das Influenza-A-Virus auf andere Wirtsorganismen spezialisiert ist. Die Assoziation des NEP mit der Plasmamembran könnte ein Hinweis auf eine noch nicht beschriebene Membranbindungseigenschaft darstellen.

Die immunhistochemischen Färbungen sind auch ein weiterer Beweis, der zumindest bei einer zytosolischen Synthese des M1-Proteins und des NEP die Ausbildung von spontanen kristallinen

Strukturen weitestgehend ausschließt. Um eine ähnliche Beweisführung für die Kompartimente ER und Peroxisomen durchzuführen, muss der HA-Tag zukünftig in die Vektoren mit den Lokalisationssignalen dieser Kompartimente eingefügt werden.

Da zelluläre Grundlagen der in vivo-Kristallisation noch nicht verstanden sind, kann keine Aussage über Gründe des Ausbleibens der Kristallisation zumindest im Zytosol getroffen werden. Grundlegend zeigt sich aber, dass das ER oder die Peroxisome besser für ein Kristallwachstum geeignet sind¹⁷⁶, wobei die Kristallisation in diesen Kompartimenten derzeit nicht ausgeschlossen werden kann.

Da alle Bemühungen zur Kristallisation des M1-Proteins und des NEP erfolglos blieben, aber das M1-Protein in ausreichender Menge löslich rekombinant hergestellt werden konnte, wurde die strukturelle Charakterisierung des M1-Proteins in Lösung fortgesetzt.

5.2.3. Charakterisierung des M1-Proteins mittels SAXS in Lösung

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) bietet im Gegensatz zur Röntgenkristallographie die Möglichkeit, biologische Makromoleküle in ihrer physiologischen Umgebung (in Lösung) strukturell zu charakterisieren. Es lassen sich mit einem SAXS-Experiment flexible Bereiche von Proteinen, sowie strukturelle Änderungen in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur oder Ligandenbindung untersuchen^{83,85,122,123}.

Diese Vorteile bürgen auch gleichzeitig einen Nachteil im Vergleich zur Röntgenkristallographie: da alle Partikel und alle möglichen Konformationszustände in der Probe als Summe eine Auswirkung auf die experimentellen SAXS-Daten haben, muss immer ein Durchschnitt ermittelt werden. Dadurch gehen die Strukturinformationen für eine hochaufgelöste Modellierung verloren^{121,156}.

Bei der Röntgenkristallographie werden hingegen die Strukturdaten anhand eines hochgeordneten Kristallgitters erhoben und bieten damit je nach Kristallqualität eine Strukturaufklärung im atomaren Größenbereich¹⁷⁸. Aufgrund der postulierten Flexibilität erscheint SAXS geeignet, um strukturelle Einblicke in die Struktur des rekombinanten M1-Proteins zu erhalten und vor allem pH-abhängige konformationelle Unterschiede zu detektieren.

Zunächst zeigte der Verlauf der SAXS-Streukurven, dass unabhängig von der eingesetzten Konzentration, nach dargestellter Präparationsmethode, keine signifikanten Konzentrationen an hochmolekularen Aggregaten vorhanden waren. Damit wird die Vermutung bestätigt, dass eine äußerst geringe Menge an Aggregaten für die Inhomogenität der DLS-Signale verantwortlich war ist?. Protein-Aggregate, unabhängig ob spezifisch oder unspezifisch entstanden, zeigen besonders im Bereich von kleinen Streuwinkeln einen charakteristischen Aufwärtstrend, der sowohl bei pH 5,0 als auch bei pH 7,4 nicht erkannt werden konnte. Daher konnten die Proteinproben unabhängig vom pH-Wert als homogen betrachtet werden. Die über die Guinier-Region und die $p(r)$ -Funktion ermittelten Struktur-Parameter der Streukurven des

rekombinanten M1-Proteins stimmen grundlegend mit denen des nativen M1-Proteins in anderen Arbeiten mit $R_g \approx 2,9 \pm 0,1$ nm, $D_{max} \approx 10,5 \pm 1$ nm und dem MW von 27 ± 3 kDa überein^{79,86} und bestätigen damit, dass es sich bei der rekombinanten M1-Probe um ein monomeres Protein handelt.

Allerdings deuten primäre Röntgenstreudaten des nativen M1-Proteins hingegen auf eine Beteiligung von multimeren Strukturen bei pH 5,0 hin⁸⁶, was für das rekombinante M1-Protein in dieser Arbeit bei gleichem pH nicht gezeigt werden konnte.

Diese SAXS-Ergebnisse konnten erstmalig zeigen, dass das rekombinant hergestellte M1-Protein bei pH-Wert 5,0 die gleichen strukturellen Parameter wie das native M1-Protein ebenfalls bei pH-Wert 5,0 liefert. Daher wird für das rekombinante M1-Protein eine ähnliche wie anisotrope Form des nativen M1-Proteins⁸⁶ mit einer kompakten Domäne, die die NM-Domäne repräsentiert, und einer eher unstrukturierten Region, die den C-Terminus repräsentiert, erwartet.

Die Modellvorstellung eines eher unstrukturierten C-Terminus konnte erstmals mit Tritium Schichtbildaufnahmen gezeigt werden⁸¹. Dabei fiel außerdem die erhöhte Flexibilität bei saurem pH-Wert dieser Proteindomäne auf, die durch eine postulierte pH-Wert-abhängige Konformationsänderung hervorgerufen wird⁸¹. Die in Formunterschiede in Abhängigkeit des pH-Wertes auf, was auf unterschiedliche Konformationszustände hindeuten kann. Daher wurden verschiedene neuartige methodische Erweiterungen der SAXS-Technik mit dem M1-Protein getestet.

5.2.4. Innovative Techniken für die SAXS-Daten-Erhebung

Durch partikelgrößenbasierte Trennverfahren unmittelbar vor SAXS-Messungen, können zum Beispiel bei der AF4-Technik oder auch unter Zuhilfenahme des *MALVERN* TDA-Instrument, oligomere aber auch verschiedene konformationelle Zustände eines Moleküls getrennt werden.

Grundlegend zeigt die Anwendungspraxis, bedingt durch die charakteristischen Eigenschaften des M1-Proteins, insbesondere der sehr stark positiven Proteinoberfläche bei physiologischem pH-Wert, aus der die starke Interaktionsneigung resultiert, Die Anwendungspraxis machte charakteristische Eigenschaften des Proteins erneut sichtbar: Die sehr stark positiv geladene Proteinoberfläche des M1-Proteins hat eine hohe Interaktionsneigung. Dies zeigte sich mit der negativ geladenen Nitrozellulosemembran bei AF4 bzw. mit der Dextran-Matrix bei dem *MALVERN* TDA-Instrument starke Interaktion mit der negativ geladenen Nitrozellulosemembran bei AF4 bzw. mit der Dextran-Matrix bei dem *MALVERN* TDA-Instrument. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Trennmethode aufgrund der Interaktion des Zielproteins mit einer Oberfläche für Proteine mit einer ähnlichen intrinsischen Interaktionstendenz, nur bedingt geeignet sind. Dennoch können nach vollständiger Etablierung und Optimierung die neue Ansätze in naher Zukunft die Qualität der experimentellen Daten erhöhen.

Eine Möglichkeit der direkten Verfolgung von konformationellen Änderungen stellt die zeitaufgelöste SAXS-Messung dar¹⁷⁹.

Bei dieser Messung werden kontinuierlich SAXS-Daten erhoben, währenddessen ein Parameter, wie zum Beispiel der pH-Wert, geändert wird. Mit Hilfe der Ergebnisse lässt sich dann eine Aussage über die Art der Veränderung durch die Analyse der individuellen Streukurven sowie über die Kinetik der Veränderung treffen.

Die für solch ein Experiment kritischen Anforderungen mit mehr als 2,5 mg/ml und einem Volumen von mindestens 2 ml sind jedoch sehr hoch und konnten für das mit der etablierten Synthesestrategie rekombinant hergestellte M1-Protein kaum erfüllt werden. Initiale Tests verliefen daher erwartungsgemäß negativ.

Auch wenn neuartige Fraktionierungsverfahren und zeitaufgelöste SAXS-Messungen mit dem M1-Protein nicht erfolgreich waren, sind die vorhandenen experimentellen Streudaten für eine *ab initio* Modell-Rekonstruktion aufgrund der guten Struktur Parameter verwendbar, um dadurch Hinweise auf die Unterschiede bei pH 5,0 und 7,4 zu erhalten. Die Güte der SAXS-Daten lässt sich mit der redundanten Ermittlung sehr ähnlicher Werte für R_g , D_{max} und dem MW beurteilen, je konsistenter desto besser sind die experimentellen Daten.

5.2.5. *Ab initio* Modell-Rekonstruktion des M1-Proteins

Die *ab initio* Modell-Rekonstruktion stellt eine Interpretation der direkt ermittelten experimentellen SAXS-Daten dar. Dabei wird ein zweidimensionaler Datensatz verwendet um ein dreidimensionales Modell zu berechnen. Um eine aussagekräftige Rekonstruktion zu erhalten müssen die Ergebnisse verschiedener Rekonstruktionsprogramme miteinander verglichen werden. Dabei liefern die heutigen Programme mittlerweile zuverlässige Modelle, die zur Überprüfung eine simulierte SAXS-Streukurve des Modells mit den experimentellen Daten vergleicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Programme *DAMMIF*¹⁵⁷ und *GASBOR*¹⁵⁸ angewendet. Die Modell-Rekonstruktionen der pH-Wert 5,0 Daten ergaben sowohl mit *DAMMIF* als auch mit *GASBOR* ein einheitliches Strukturmodell. Bereits die individuell berechneten Modelle der einzelnen Programme waren sehr konsistent, was auf eine gute SAXS-Datenqualität und Validität des durchschnittlichen Modells hindeutet. Die *ab initio* sowie die *rigid body*-Rekonstruktion des nativen M1-Proteins weisen ebenfalls die gleichen Merkmale bei den Modell-Rekonstruktionen auf⁸⁶.

Daher liegt es nahe, dass die globuläre Domäne der bereits existierenden hochaufgelösten 3D-Struktur der ebenfalls globulären NM-Domäne der Modell-Rekonstruktionen entspricht^{68,80}, dementsprechend wird die elongierte Region den C-Terminus des M1-Proteins repräsentieren. Aufgrund der Übereinstimmung von rekombinantem und nativen Struktur-Modell bei pH-Wert 5,0 wird vermutet, dass der C-Terminus der rekombinanten M1-Proteins eine ähnliche Flexibilität besitzt.

Während *DAMMIF* Rekonstruktionen der pH-Wert 7,4 Daten die Modelle der pH-Wert 5,0-Berechnung grundlegend und mit guten Qualitätsfakten bestätigt, berechnet *GASBOR* lediglich Modelle mit einer großen Abweichung zu den experimentellen Daten.

Alle Konformationszustände eines Proteins tragen zur Röntgenstreuung bei, deshalb sind die experimentellen Daten eines SAXS-Experiments immer die Summe aller Proteinkonformationen und Aggregationszustände zur Zeit der Belichtung.

Gibt es bei einem Protein zum Beispiel eine offene und eine geschlossene Konformation oder unterschiedliche hydrolytische Abbauprodukte, so können verschiedene plausible $p(r)$ -Funktionen mit unterschiedlichen Strukturparametern für eine SAXS-Messung erstellt werden. Bei der Erstellung der $p(r)$ -Funktionen dienen als erste Näherung die Strukturparameter, die mit Hilfe der Guinier-Region bestimmt wurden. Zusätzlich muss der Kurvenverlauf der $p(r)$ -Funktionen asymptotisch Richtung X-Achse verlaufen, ansonsten wird die falsche $p(r)$ -Funktionen berechnet. Bietet die $p(r)$ -Funktion mehrere augenscheinlich passende Alternativen, kann es vorkommen, dass das Qualitätsmerkmal χ^2 erheblich von 1,0 abweicht. Folglich repräsentiert das Modell nicht die Summe aller Proteinkonformationen bzw. aller Partikel in der Probe.

Ein weiterer Aspekt, weshalb *GASBOR* keine Modelle für die pH-Wert 7,4 Messwerte mit guten χ^2 -Werten berechnen konnte, war das geringe *Porod*-Volumen von 25 \AA^3 der Probe. Der *GASBOR*-Algorithmus berücksichtigt neben der $p(r)$ -Funktion auch das *Porod*-Volumen für die Modellberechnung¹⁵⁸. Im Gegensatz dazu berücksichtigt *DAMMIF*¹⁵⁷ lediglich die experimentellen Daten für die Berechnung. Die Ursache für ein kleines *Porod*-Volumen ist, dass der Durchschnitt der Partikel in der Probe, lediglich das angegebene Volumen verdrängt. Für das monomere M1-Protein wird basierend auf den pH-Wert 5,0-Daten ein *Porod*-Volumen von ca. 40 \AA^3 erwartet. Versucht der *GASBOR*-Algorithmus 260 Aminosäuren, aus denen das M1-Protein inklusive Affinitätstag aufgebaut ist, in das *Porod*-Volumen zu modellieren, kommt eine hohe Diskrepanz zustande.

Um die Diskrepanz näher zu untersuchen, wurde das Programm *EOM*¹²³ verwendet. Dieses Programm bietet die Möglichkeit, Informationen über die unterschiedlichen Konformationszustände, die das Streusignal einer Probe zusammensetzen, zu gewinnen und damit Aussagen über die Flexibilität des Proteins, sowie die quantitative Zusammensetzung der Konformationszustände zu treffen¹²³. Der *EOM*-Algorithmus generiert Zufallsmodelle anhand der experimentellen Daten und quantifiziert die R_g - sowie die D_{max} -Werte der einzeln generierten Modelle. Außerdem wird die Übereinstimmung der experimentellen Daten mit der theoretischen Streukurve der erstellten Ensemble an Zufallsmodellen angegeben.

Die Ergebnisse der *EOM*-Berechnung der pH-Wert 5,0 M1-Proteinprobe sind konsistent zu den ermittelten Daten der *DAMMIF*- und *GASBOR*-Berechnung und sind somit zusätzlich validiert. Wie schon die *DAMMIF*- und *GASBOR*-Ergebnisse zeigt auch die *EOM*-Analyse des rekombinanten M1-Proteins eine gute Übereinstimmung mit den *EOM*-Berechnungen des nativen M1-Proteins bei

pH-Wert 5,0⁸⁶. Damit besitzt der C-Terminus des rekombinanten M1-Proteins ebenfalls eine limitierte Flexibilität.

Die *EOM*-Berechnung der Daten zu pH-Wert 7,4 ergab zwei Populationen von Zufallsmodellen; jedoch konnte keine Verbesserung der Übereinstimmung mit den experimentellen Daten erzielt werden. Aufgrund der bereits beschriebenen spaltungssensiblen Region des M1-Proteins um die Aminosäure 164⁷⁹, wurden als neue Information mögliche Bestandteile der Probe neu definiert. So wurde eingegeben, dass sich in der Probe neben dem Volllänge-M1-Protein auch die NM-Domäne und der C-Terminus als Probenbestandteile befinden. Damit konnte die Diskrepanz der *EOM*-Zufallsmodelle signifikant verbessert werden. Die Berechnung ermittelte ein Verhältnis von 11% Volllänge-M1-Protein, 11% NM-Domäne und 78% C-Terminus-Konformationen, die zur Entstehung der Streukurve bei pH 7,4 beitrugen. Die verbesserte Übereinstimmung von berechneten Zufallsmodellen mit den experimentellen Daten lassen vermuten, dass bei pH-Wert 7,4 das Volllänge-M1-Protein hydrolytisch gespalten wurde. Nach erfolgter Synthese in *E. coli* wurden die Zellen mit einem Puffer lysiert, der den Protease-Inhibitor PMFS beinhaltet, um die proteolytische Spaltung des Zielproteins zu verhindern. Außerdem wurden während der Proteinpräparation die Proteinproben unabhängig vom finalen pH-Wert bis zur Größenausschlusschromatographie komplett gleich behandelt; erst ab anschließend wurden die Proben in unterschiedliche Puffer überführt.

Wären minimale Verunreinigungen mit Protease im Laufe der Reinigung ungewollt mitgeführt worden, so hätte die Probe bei pH-Wert 5,0 ebenfalls Abbau-Produkte aufweisen müssen. Absatz Die Hydrolyse-Hypothese konnte durch Untersuchungen der pH-Wert 5,0- und 7,4-M1-Proteinproben mittels analytischer Größenausschlusschromatographie bestätigt werden. Dementsprechend wurde bei der Probe bei pH-Wert 5,0 ausschließlich eine Konformation durch ein Absorptionsmaximum repräsentiert, mit dem das korrekte MW für monomeres M1-Protein anhand des Retentionsvolumens berechnet werden konnte.

Bei pH-Wert 5,0 herrschen im Vergleich zu pH-Wert 7,4 andere Ladungsverhältnisse: da das Protein mit Affinitätstag insgesamt 11 Histidine aufweist, ist die Ladungsdifferenz +11, die das Protein veranlasst, vorzugsweise eine Konformation einzunehmen.

Bei pH-Wert 7,4 weist/wies die M1-Probe jedoch eine deutlich höhere Anzahl an Absorptionsmaxima auf. Da es sich um eine kalibrierte Größenausschlusschromatographie-Säule handelte, konnte das MW des Retentionsvolumen-Bereichs auf etwa 17 bis 110 kDa abgeschätzt werden. Davon ausgehend, dass eine reine M1-Proteinprobe (Monomer entspricht etwa 28,8 kDa) analysiert wurde, lässt eine Interpretation zu, dass die erhaltenen MWs mit unterschiedlichen oligomeren Zuständen wie Monomer, Dimer, Trimer und sogar noch höhere Oligomere vorliegen.

Da durch die vorherige SAXS-Messung eine Beteiligung an oligomeren Bestandteilen ausgeschlossen werden konnte, kann dieses Absorptionsprofil nicht durch Oligomerisation entstanden sein. Unter Voraussetzung, dass das M1-Protein unterschiedliche Gyrationradien (R_g)

bei pH-Wert 7,4 annimmt, wie durch die *EOM*-Berechnung gezeigt werden konnte, ist es möglich, das MW anhand des R_g durch Umformung der Formel nach Georgieva *et al.* (2004)¹⁶¹ abzuschätzen.

Die Ausgangsformel (5), bei der eine optimale Kugelform zur Abschätzung verwendet wurde, wird für eine zylindrischen Form ersetzt (6), da das M1-Protein eher der Form eines Stäbchens ähnelt, als der einer Kugel.

$$\text{MW} = \frac{4\pi \cdot r^3 \cdot N_A}{3V_S} \quad (5)$$

$$\text{MW} = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot h \cdot N_A}{V_S} \quad (6)$$

In der Formel (4) Abschnitt 3.1.4.3. ist N_A die Avogadrokonstante, h die Höhe des Zylinders in cm, r der Durchmesser des Zylinders in cm und V_S das Volumen pro Masse in $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ für Proteine.

Absatz

Die Höhe h des Zylinders entspricht dem mit *EOM* ermittelten D_{max} mit $20 \cdot 10^{-7}$ cm und der Radius des Zylinders r entspricht dem anhand der hochaufgelösten 3D-Struktur der NM-Domäne abgeschätzten Radius mit $1,5 \cdot 10^{-7}$ cm.

Das Volumen pro Masse wurde mit $0,73 \text{ cm}^3 \text{g}^{-1}$ nach Georgieva *et al.* (2004)¹⁶¹ festgelegt.

Mit dieser Näherung kann das MW eines M1-Moleküls mit einem D_{max} von 20 nm auf etwa 116 kDa abgeschätzt werden. Diese Abschätzung anhand des mit *EOM*-ermittelten größten Wertes für D_{max} liegt mit dem anhand des Retentionsvolumen berechneten größten MW von 110 kDa in der gleichen Größenordnung und zeigt, dass das monomere M1-Protein Konformationen einnehmen kann, die vom Elutionsverhalten eher oligomere Strukturen repräsentieren. Die anderen beobachteten Absorptionsmaxima der analytischen Größenausschlusschromatographie entsprechen den Molekulargewichten der globulären NM-Domäne und dem C-Terminus.

Die Ergebnisse der analytischen Größenausschlusschromatographie unterstützen die Kleinwinkelstreuungsergebnisse und erhärten die Theorie der auftretenden Hydrolyse des Volllänge-M1-Proteins bei physiologischem pH-Wert.

Mit den SAXS-Experimenten konnten zuverlässige, mit den experimentellen Daten vereinbare, Modell-Rekonstruktionen für das M1-Protein bei pH-Wert 5,0 berechnet werden. Außerdem wurden Anzeichen von hydrolytischer Spaltung des M1-Proteins bei physiologischem pH-Wert beobachtet. Die Hydrolyse könnte eine Grundlage für die Protein-Aggregation-Tendenz des M1-Proteins bei pH-Wert 7,4 sein.

In der Literatur sind bereits Hinweise zu einer möglichen Hydrolyse-Eigenschaft zu finden⁷⁹, jedoch wurde sie bisher nicht als Eigenschaft des M1-Proteins beschrieben. Anhand des M1-Proteins lässt sich gut erkennen wieso es wichtig ist, bei der Modell-Rekonstruktion anhand von zweidimensionalen experimentellen SAXS-Daten mehr als nur ein Programm für die Berechnung zu verwenden. Sobald ein Rekonstruktions-Programm ein plausibles Modell anbietet sollte dieses mit einem zweiten Algorithmus validiert werden. Die SAXS-Ergebnisse konnten deutliche Unterschiede zwischen den beiden pH-Wert-Proben zeigen. Inwiefern der pH-Wert auf die Faltung des M1-Proteins eine Auswirkung hat, wird mittels CD-Spektroskopie untersucht vor dem Hintergrund, dass eine pH-Wert-abhängige Oligomerisation bereits bekannt ist⁶⁶.

5.3. Untersuchung des Oligomerisationsverhalten des M1-Proteins

Die korrekte Faltung von Proteinen bildet die zentrale Grundlage für die physiologische Aktivität des Proteins. Die CD-Spektroskopie bietet die Möglichkeit Informationen über die Sekundärstruktur und deren räumliche Anordnung zu gewinnen. Zusätzlich lässt sich anhand der Spektren beurteilen, ob sich das betrachtete biologische Makromolekül in einem gefalteten oder eher ungefalteten Zustand befindet. Die CD-Spektren des fernen UV-Bereichs (190 bis 260 nm) zeigen eindeutig ein Profil, das für ein gefaltetes Protein spricht. Die lokalen Elliptizitäts-Minima bei etwa 208 und 223 nm sind für ein Protein mit einer überwiegend α -helikalen Sekundärstruktur charakteristisch. Da der Bereich der X-Achse aufgrund von proteinkonzentrationsbedingten Absorptions-Effekten eine aussagekräftige Beurteilung verhindert, kann über den gemessenen Konzentrationsbereich keine Interpretation der konstanten Proteinfaltung stattfinden. Jedoch bleibt der α -Helix-Gehalt unabhängig der Proteinkonzentration konstant und macht daher eine Faltungsänderung in Abhängigkeit der Konzentration sehr unwahrscheinlich.

In einer späten Phase des Influenza-A-Virus-Replikationszyklus bildet sich auf der Innenseite der apikalen Wirtszellmembran durch intermolekulare M1-M1-Interaktion ein M1-Netzwerk, das sich vermutlich unter anderem durch steigende M1-Proteinkonzentration formt^{44,45}. Durch die Ergebnisse der CD-Spektroskopie von unterschiedlichen M1-Proteinkonzentrationen bei physiologischem pH-Wert konnte gezeigt werden, dass sich die Sekundärstruktur in Abhängigkeit der Proteinkonzentrationen nicht ändert. Daher wird beim Aufbau des M1-Netzwerkes die Sekundärstruktur der Monomere unverändert bleiben. Es ist dennoch möglich, dass eine Konformationsänderung nicht zwangsläufig auch die Sekundärstruktur ändert. Veränderungen der räumlichen Anordnung aromatischer Aminosäuren innerhalb eines biologischen Makromoleküls können zusätzlichen Aufschluss über eine mögliche Konformationsänderung geben¹⁰¹.

CD-Spektren im nahen UV-Bereich (260 - 320 nm) ermöglichen, eine Aussage über die räumliche Anordnung der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin anhand von Unterschieden in den Spektren zu treffen¹⁰⁹. Dabei spielen die Änderungen der

Wasserstoffbrückenbindungen, der polaren Gruppen und der Polarisierungen eine Rolle, die sich in räumlicher Nähe zu den aromatischen Aminosäuren befinden¹⁰¹.

Bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen zeigen die CD-Spektren des nahen UV-Bereichs der pH-Wert 7,4 M1-Proben ein sehr ähnliches Profil, mit steigender Proteinkonzentration scheinen sich die Spektren zu größeren Wellenlängen zu verschieben. Werden die CD-Spektren von pH-Wert 5,0 mit denen von pH-Wert 7,4 bei gleicher Proteinkonzentration verglichen, so fällt auf, dass im für die Aminosäure Phenylalanin typischen Wellenlängenbereich ein Minimum bei saurem pH-Wert auftritt. Die Änderung im CD-Spektrum bei pH-Wert 5,0 könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die räumliche Umgebung einer oder mehrerer Phenylalanine des M1-Proteins geändert hat, bei gleichzeitig konstanter Sekundärstruktur.

Die geringe Anzahl an Tryptophan (1) und Tyrosin (5) lässt keine verlässliche Charakterisierung des Absorptionsverhaltens des M1-Proteins in den charakteristischen Fingerabdrucks-Bereich dieser Aminosäuren zu¹⁰¹. Die CD-Spektren der unterschiedlichen Proteinkonzentrationen lassen sich nicht aussagekräftig interpretieren, daher muss auch die Interpretation der pH-Wert-Effekte mit Vorsicht betrachtet werden. Ein Konzentrations- oder pH-Wert-bedingter Effekt auf die räumliche Anordnung der aromatischen Aminosäuren des Proteins kann nicht ausgeschlossen werden. Da das Protein zu wenig aromatische Aminosäuren besitzt, lassen die Spektren der nahen UV-Bereiche keine eindeutige Interpretation zu.

Die CD-Messungen konnten weder eine pH-Wert-, noch eine Konzentrationsabhängigkeit der Konformation des M1-Proteins erkennen lassen. Die DLS-Messung zu Anfang der Charakterisierung zeigten schon die Tendenz des M1-Proteins zu aggregieren, die ebenfalls in anderen Arbeiten, auffallend häufig bei physiologischem pH-Wert beobachtet wurde⁶⁶. Eine der Hauptfunktionen des M1-Proteins ist die Ausbildung der inneren Struktur des infektiösen Virions durch konzentrationsabhängige Homo-Oligomerisierung, sowie die Freisetzung der vRNP's in das Zytosol nach endosomaler Aufnahme^{12,57,65,66,76,86,180}.

Daher ist in dieser Arbeit auch die Untersuchung der proteinkonzentrationsbedingten Oligomerisierung⁶⁵ und des pH-Wert-abhängigen Auf-⁷⁸ bzw. Abbaus⁶⁶ multimerer Strukturen aufgrund von postulierten Konformationsänderungen von großem Interesse. SAXS-Experimente konnten zeigen, dass das M1-Protein in Abhängigkeit des Lagerungszeitraums zwischen finaler Reinigung und Messzeitpunkt Anzeichen auf Proteinaggregation bei physiologischem pH-Wert aufwies, die im dafür charakteristischen Bereich der Streukurve beobachtet werden konnten¹²¹. Während der Etablierung des Reinigungs-Protokolls konnte vermehrt beobachtet werden, dass das M1-Protein, sobald die Proteinkonzentration durch Ultrazentrifugation versucht wurde zu erhöhen, ab etwa 2 mg/ml zu präzipitieren begann. Anhand dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass der Lagerungszeitraum bei entsprechender Konzentration einen entscheidenden Beitrag an der Entstehung von geordneten oligomeren Strukturen hat. Die Präzipitation aufgrund von hohen Proteinkonzentrationen könnte vielmehr ein Resultat von unspezifischer Proteinaggregation sein.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den durch die Lagerungsdauer bedingte Proteinaggregation um einen geordneten Prozess handelt, wurde die AFM-Topographie entsprechend hergestellter Proteinproben angewandt.

Während der Bildung der neuen Virione lagern sich M1-Moleküle von innen an der apikalen Wirtszell-Plasmamembran an und verursachen die Plasmamembran vorzuwölben^{44,45}.

Die negativ geladene MICA-Oberfläche bietet für die M1-Moleküle eine ähnliche Interaktionsmöglichkeit wie die negativ geladene Fläche einer Lipidmembran, die durch Phosphatgruppen verursacht wird. Bei der Präparation wurde die Proteinprobe auf der MICA-Oberfläche eingetrocknet. Während des Trocknungsprozesses erhöht sich die Proteinkonzentration mit zunehmender Verdunstung exponentiell. Vermutlich können geordnete Strukturen mit dieser Methode beobachtet werden, da die Kinetik der M1-M1-Interaktion möglicherweise im Vergleich zu dem Verdunstungsprozess, langsamer ist. Unter dieser Annahme würden sich die in Lösung befindlichen Strukturen während der Lösemittelverdunstung in Abhängigkeit der elektrostatischen M1-MICA-Interaktion auf der Oberfläche ablagern.

So wurden bei den M1-Proteinproben mit pH-Wert 5,0 und 6,0 sehr große Strukturen, vermutlich unspezifische punktuelle Protein-Aggregate, beobachtet. Die flächigen Strukturen bei pH-Wert 7,4 hingegen entsprachen eher etwas geordneteren Strukturen; der Höhe nach beurteilt, einer einfachen M1-Proteinschicht, die sich stark zusammenlagert, wie es auch während des Budding-Prozesses in der Wirtszelle stattfindet⁵⁷. Wird die Proteinkonzentration verdünnt, werden detaillierte röhrenförmige Strukturen sichtbar, mit einer Höhe von 2 - 3nm, was einer Schichtdicke von etwa zwei M1-Molekülen entspricht. Der Durchmesser der röhrenähnlichen Strukturen von 35 - 50 nm sind in der gleichen Größenordnung, wie bereits in einer anderen Arbeit diskutierten Protein-Helix mit einem postulierten Durchmesser von 20 nm⁶⁸. Berücksichtigt werden muss die breitere Erscheinung der Proteinprobe aufgrund der Trocknung.

Daher bilden diese Erkenntnisse einen Nachweis für die innere Architektur eines Influenza-A-Virions. Bei ähnlichen Untersuchungen des nativen M1-Proteins mittels AFM-Topographie in Lösung wurden hingegen kleinere Strukturen⁸⁶ entdeckt, die vermutlich nicht pH-abhängig dissoziierende Anteile des M1-Netzwerks aus den Virionen repräsentieren; diese Strukturen konnten bei der rekombinanten pH-Wert 5,0 Probe nicht entdeckt werden. Da bei den pH-Wertproben 6,0 und 5,0 keine geordneten Multimeren-Strukturen beobachtet werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass die pH-Wert-abhängige Abschwächung der M1-M1-Interaktion zwischen pH-Wert 7,4 und 6,0 beginnt. Die AFM-Topographie-Unterschiede zwischen den pH-Wert-Proben 7,4, 6,0 und 5,0 bestätigen die Beobachtung, dass das M1-Protein bei physiologischem pH-Wert eine erhöhte Tendenz zur Ausbildung von geordneten Multimeren-Strukturen besitzt, verglichen zum saurem pH-Wert⁶⁶.

In dieser Arbeit konnte neben der Etablierung und der Optimierung der rekombinanten *E. coli*-basierten Herstellung des Influenza-A-Virus M1-Proteins auch das NEP erstmals rekombinant in Insektenzellen hergestellt werden. Diese grundlegende Etablierung der NEP-Produktion bietet die Möglichkeit, die Synthese zukünftig zu optimieren um genügend rekombinantes Protein herstellen zu können, sodass die Charakterisierung dieses Proteins vorgenommen werden kann. Durch konventionelle Röntgenkristallisations-Experimente des M1-Proteins konnte eine Pufferbedingung ermittelt werden, die zu einem Wachstum eines Kristalls mit einer bisher noch nicht bekannten Morphologie geführt hat^{68,79,80,174}. Damit könnte es erstmals gelungen sein das Volllänge-M1-Protein zu kristallisieren.

Erstmalige Untersuchungen mit zwei NLS tragenden Proteinen im alternativen *in vivo*-Kristallisationssystem zeigten, dass eine der beiden NLS von der Sf9-Zellen-spezifischen Import-Maschinerie erkannt und in den Zellkern transportiert werden konnte. Damit schafft diese Erkenntnis die Grundlage für zukünftige Optimierung der NLS, um den Zellkern als weiteren *Screening*-Parameter in das Translokalisations-Portfolio mit aufzunehmen.

Außerdem konnte durch Charakterisierung des Volllänge-M1-Proteins in Lösung gezeigt werden, dass das Protein pH-Wert- und konzentrationsunabhängig eine dominierend α -helikale Sekundärstruktur aufweist, was die erfolgreiche Faltung nach *E. coli*-basierter Produktion bestätigte.

Neben den ersten qualitativ hochwertigen SAXS-Daten einer rekombinanten M1-Proteinprobe bei pH-Wert 5,0 konnten erstmals eine interpretierbare SAXS-Streukurve des rekombinanten Proteins bei physiologischem pH-Wert aufgenommen werden. Vergleiche anhand der SAXS-Daten zeigten, dass die ermittelten Struktur-Parameter des rekombinanten und nativen Proteins sehr gut übereinstimmen. Anhand von Modell-Rekonstruktionen des rekombinanten M1-Proteins nach SAXS-Experimenten, konnten die Strukturmerkmale des nativen M1-Proteins bei pH-Wert 5,0 komplett bestätigt werden.

Zusätzlich wurde aufgrund der SAXS-Daten-Analyse bei physiologischem pH-Wert eine hydrolytische Spaltung des rekombinanten M1-Proteins postuliert, die durch unterstützende Größenausschlusschromatographien bestätigt wurde.

Untersuchungen zur geordneten Proteinaggregation konnten mittels AFM-Topographie zeigen, dass das M1-Protein bei pH-Wert 7,4 ein röhrenähnliches Netzwerk formt, was mit einer postulierten helikalen Proteinanordnung übereinstimmt⁶⁸.

Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit ist es gelungen, eine einfach zu handhabende, kostengünstige Alternative in Form der *E. coli*-basierten Herstellung des M1-Proteins im Vergleich zur aufwendigen Produktion und Reinigung des Proteins aus den Influenza-A-Viren selbst zu etablieren, die zu vergleichbaren strukturellen Charakteristika des Proteins führte. Somit können mit nur geringem Aufwand beispielsweise Veränderung an der Proteinsequenz eingeführt und anschließen strukturell charakterisiert werden.

6. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Influenza A-Virus M1-Protein erfolgreich rekombinant sowohl in Insektenzellen als auch in *E. coli*-Zellen hergestellt wurde. Obwohl durch bakterielle Synthese große Mengen an Zielprotein generiert wurden, verblieb der größte Anteil an M1-Protein unlöslich im *E. coli*-Zellpellet nach Lyse der Zellen. Da die limitierte Ausbeute an löslichem Protein die Durchführung von bestimmten Untersuchungsmethoden verhinderte, z.B. der zeitaufgelösten SAXS-Messung, sollte zukünftig versucht werden, die Ausbeute an löslichem Protein zu erhöhen. Eine Möglichkeit kann die Synthese als Fusions-Protein mit einem Protein, das sich durch besonders hohe Löslichkeit auszeichnet, bieten. Dafür kommt z.B. das Maltose-bindende Protein (MBP) oder auch die Glutathion-S-Transferase in Frage, die üblicherweise als Löslichkeits- bzw. Faltungsvermittler bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli* eingesetzt werden^{181,182}. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass das M1-Protein bei Proteinkonzentrationen über 2,0 mg/ml präzipitiert, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Daher ist auch bei optimierter Protein-Synthese und nachfolgender Reinigung darauf zu achten, dass die M1-Konzentration diese kritische Konzentration nicht überschritten wird. Die rekombinante Proteinbiosynthese von NEP in *E. coli*-Zellen war bisher erfolglos. Daher könnte das *Screening* noch um weitere *E. coli*-Stämme erweitert werden.

Eine Alternative zur *E. coli*-basierenden Proteinbiosynthese bietet das Sf9-Insektenzellen-System, was in dieser Arbeit erfolgreich zur Synthese von M1 und NEP angewandt wurde. Die Einführung eines HA-Tags bildet nicht nur die Möglichkeit die Proteinbiosynthese und die Lokalisation des Zielproteins in der Zelle zu kontrollieren, sondern auch ein Mittel um die Zielproteine aus den Sf9-Zellen mittels Affinitätschromatographie unter Nutzung HA-Tag-spezifischer Antikörper. Folglich sollte zukünftig die Reinigung der synthetisierten Proteine M1 und NEP aus den Sf9-Zellen mittels HA-Tag etabliert werden. So können insbesondere für das NEP, welches in *E. coli*-Zellen bisher nicht synthetisiert wurde, lösliche Proteinmengen für erste strukturelle Charakterisierungen erhalten werden. Da es sich beim M1-Protein und dem NEP um Interaktionspartner handelt, können anschließend außerdem erste Interaktionsstudien, z.B. in Form von Co-Kristallisation, realisiert werden. Um den M1-NEP-Proteinkomplex näher zu untersuchen können auch Sf9-Zellen mit Baculoviren, die die M1- und NEP-Gene tragen, co-infiziert werden, was auch die Möglichkeit der spontanen Bildung von *in vivo*-Kristallen des Komplexes bietet, wenn beide Proteine das gleiche Lokalisationssignal tragen und somit im gleichen zellulären Kompartiment vorliegen. Mit diesen Experimenten können erste strukturelle Einblicke in den Kern-Export-Komplex, der für den Zellkern-Export der vRNPs während des Replikationszyklus essentiell ist, erhalten werden, welche für ein grundlegendes Verständnis des Aufbaus und der Funktion dieses Komplexes dringend erforderlich sind.

Konventionelle Ansätze zur Proteinkristallisation für das Volllänge-M1-Protein zeigten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene vielversprechende Kristallisationsbedingungen, in denen

Phasentrennung zu erkennen war. Diese können durch weitere Optimierung der Pufferbedingungen möglicherweise in geordneten Proteinkristallen resultieren. Ein augenscheinlich geordneter hexagonaler Kristall mit einer Kantenlänge von ca. 25 μm x 25 μm wurde bereits erhalten. Die Färbung mit Methylenblau ist ein gutes Indiz, aber kein hinreichender Beweis, dass es sich um einen Proteinkristall handelt. Dies kann abschließend nur durch Aufnahme der charakteristischen Bragg-Beugungssignale an einer hochbrillanten Synchrotronstrahlungsquelle nachgewiesen werden. Wenn der Kristall Röntgenstrahlen mit hoher Auflösung beugt und es möglich ist, einen kompletten Diffraktions-Datensatz aufzunehmen, wäre es der erste Datensatz des Volllänge-M1-Proteins überhaupt. Nichtsdestotrotz sollten die vielversprechenden Kristallisationsbedingungen optimiert werden, um größere und möglicherweise besser beugende Proteinkristalle zu erzeugen. Auch wenn der alternative Kristallisationsansatz des M1-Proteins und des NEP in lebenden Insektenzellen im Rahmen dieser Arbeit in den untersuchten Zellkompartimenten nach lichtmikroskopischer Detektion auch nach Lyse mit RIPA-Puffer keine kristallinen Strukturen hervorbrachte, kann derzeit nicht abschließend geklärt werden, ob zumindest Nanokristalle in den Zellen vorhanden waren.

Insbesondere wenn die *in vivo*-Kristalle den Zelldurchmesser der Insektenzelle nicht überschreiten und dabei auch eine sehr ähnliche optische Dichte wie das umgebende Kompartiment aufweisen, sind die Kristalle mittels lichtmikroskopische Detektion kaum erkennbar. Daher sollten die Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen erneut auf M1- bzw. NEP-Kristalle untersucht werden, wenn neue, effektivere Detektionsmethoden wie z.B. die 2-Photonenmikroskopie vollständig für die *in vivo*-Kristalldetektion etabliert sind. NEP wurde in den Insektenzellen durch HA-Tag-abhängige Immunfluoreszenz im engen Kontakt mit der Plasmamembran beobachtet, was eine bisher noch nicht bekannte Eigenschaft des NEPs darstellt. Folglich sollten zukünftig Membranbindungsstudien nach erfolgreicher rekombinanter NEP-Herstellung durchgeführt werden. Die immunhistochemische Färbung des M1-HA-Proteins zeigte unter anderem eine Zellkern-Lokalisation des rekombinanten Proteins. Damit kann die NLS des M1-Proteins dazu verwendet werden, neue Zielproteine nach zytosolischer Synthese in den Zellkern zu dirigieren. Dadurch kann neben dem Zytosol, dem ER und den Peroxisomen auch der Zellkern als zusätzliches Kompartiment für *in vivo*-Kristallisationstests verwendet werden, was die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen *in vivo*-Kristallisation weiter erhöht. Bis heute ist wenig über die zellulären Grundlagen bekannt, die zu einer Ausbildung von *in vivo*-Kristallen beitragen. Daher sollten diese Zusammenhänge in Zukunft näher untersucht werden. Zunächst können wichtige Schlüsselproteine, die die Kristallisation begünstigen, mittels quantitativer PCR identifiziert werden, um einen positiven Einfluss auf die Bildung von Proteinkristallen auszuüben. Ist es möglich aufgrund eines besseren Verständnisses der *in vivo*-Kristallisation die Effizienz der Kristallbildung zu erhöhen und somit die Generierung hochaufgelöster Strukturdaten zu steigern, kann der *in*

in vivo-Kristallisations-Ansatz besonders für die Strukturaufklärung im Allgemeinen eine potente Zusatz-Technik zur konventionellen Kristallographie darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals strukturelle Daten mittels Röntgenkleinwinkelstreuungs-Experimenten für das rekombinant hergestellte Volllänge-M1-Protein ermittelt werden. Dabei wurden übereinstimmende Struktur-Parameter wie für das nativen Volllänge-M1-Protein identifiziert⁸⁶, so dass rekombinantes M1 zukünftig als valides Modellsystem für Struktur- und Funktionsuntersuchungen verwendet werden kann. Außerdem konnten erstmals SAXS-Daten des M1-Proteins bei pH-Wert 7,4 generiert werden, die durch eine hydrolytische Spaltung des M1-Proteins optimal interpretiert werden können. Da analytische Größenausschlusschromatographie-Experimente in der Tat ebenfalls Hinweise auf entstandene Abbauprodukte pH 7,4 zeigten, sollte die Massenspektrometrie zukünftig angewandt werden, um die genauen Massen der Probenbestandteile zu ermitteln, und die Hydrolyse-Hypothese letztendlich zu bestätigen. In Kombination mit dem *MALVERN* TDA-Instrument kann die Wiederholung der SAXS-Messungen einer M1-Proteinprobe bei pH 7,4 separierte strukturelle Informationen über die einzelnen Bestandteile der Probe liefern. Dieser Nachweis wird dazu beitragen neue Erkenntnisse über das Verhalten des rekombinanten M1-Proteins bei physiologischem pH-Wert zu gewinnen. Außerdem kann eine sukzessive pH-Wert Titration und Messung der korrespondierenden SAXS-Daten Informationen über die strukturellen Veränderungen des M1-Proteins unter Einfluss pH-Wert-Änderung geben. Nach optimierter Proteinsynthese kann hierzu auch die zeitaufgelöste SAXS-Technik erneut angewendet werden. Die Charakterisierung von Proteinen des Influenza-A-Virus stellt weiterhin eine wichtige Grundlage dar um Schlüsselfunktionen der viralen Proteine und dessen Interaktionspartner besser verstehen zu können.

7. Literaturverzeichnis

1. Influenza von Lange, Werner, Georg E. Vogel und Helmut Uphoff:: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 9783894124274 Gebundene Ausgabe - getbooks GmbH. at <<http://www.abebooks.de/servlet/BookDetailsPL?bi=15859961063&searchurl=isbn%3D389412427x%26sortby%3D17>>
2. Schaffer, F. L., Soergel, M. E. & Straube, D. C. Survival of airborne influenza virus: effects of propagating host, relative humidity, and composition of spray fluids. *Arch. Virol.* **51**, 263–73 (1976).
3. Jain, V. K. *et al.* Vaccine for prevention of mild and moderate-to-severe influenza in children. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2481–91 (2013).
4. Thompson, W. W. *et al.* Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* **289**, 179–86 (2003).
5. Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R. & Ortin, J. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol.* **8**, 207–215 (2011).
6. Wise, H. M. *et al.* Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
7. Brown, D. A. & Rose, J. K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533–44 (1992).
8. Zhang, J., Pekosz, A. & Lamb, R. A. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J. Virol.* **74**, 4634–44 (2000).
9. Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T. & Simons, K. Influenza Viruses Select Ordered Lipid Domains during Budding from the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 2038–2044 (1999).
10. Lear, J. D. Proton conduction through the M2 protein of the influenza A virus; a quantitative, mechanistic analysis of experimental data. *FEBS Lett.* **552**, 17–22 (2003).
11. Wu, Y. & Voth, G. A. Computational studies of proton transport through the M2 channel. *FEBS Lett.* **552**, 23–27 (2003).
12. Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H. & Barman, S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res.* **143**, 147–61 (2009).
13. Ali, A., Avalos, R. T., Ponimaskin, E. & Nayak, D. P. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J. Virol.* **74**, 8709–19 (2000).
14. Fields, B. *Fields virology*. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
15. Wise, H. M. *et al.* A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J. Virol.* **83**, 8021–31 (2009).
16. Medina, R. a & García-Sastre, A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 590–603 (2011).

17. Heldt, F. S., Frensing, T. & Reichl, U. Modeling the Intracellular Dynamics of Influenza Virus Replication To Understand the Control of Viral RNA Synthesis. *J. Virol.* **86**, 7806–7817 (2012).
18. Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 531–69 (2000).
19. Johnson, N. P. A. S. & Mueller, J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 ‘Spanish’ influenza pandemic. *Bull. Hist. Med.* **76**, 105–15 (2002).
20. Huang, Q. *et al.* Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, 3–13 (2003).
21. Harrison, S. C. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 690–8 (2008).
22. Pinto, L. H., Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**, 517–28 (1992).
23. Pinto, L. H. & Lamb, R. A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* **281**, 8997–9000 (2006).
24. Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R. W. H. & Baudin, F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* **124**, 12–21 (2007).
25. Elton, D. *et al.* Interaction of the Influenza Virus Nucleoprotein with the Cellular CRM1-Mediated Nuclear Export Pathway Interaction of the Influenza Virus Nucleoprotein with the Cellular CRM1-Mediated Nuclear Export Pathway. *Society* (2001). doi:10.1128/JVI.75.1.408
26. Engelhardt, O. G. & Fodor, E. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev. Med. Virol.* **16**, 329–345 (2006).
27. Deng, T., Vreede, F. T. & Brownlee, G. G. Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *J. Virol.* **80**, 2337–48 (2006).
28. Flick, R., Neumann, G., Hoffmann, E., Neumeier, E. & Hobom, G. Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *RNA* **2**, 1046–57 (1996).
29. Krug, R. M., Morgan, M. A. & Shatkin, A. J. Influenza viral mRNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. *J. Virol.* **20**, 45–53 (1976).
30. Gu, W. *et al.* Influenza A virus preferentially snatches noncoding RNA caps. *RNA* **21**, 2067–75 (2015).
31. Koppstein, D., Ashour, J. & Bartel, D. P. Sequencing the cap-snatching repertoire of H1N1 influenza provides insight into the mechanism of viral transcription initiation. *Nucleic Acids Res.* **43**, 5052–64 (2015).
32. Amorim, M. J. & Digard, P. Influenza A virus and the cell nucleus. *Vaccine* **24**, 6651–5 (2006).

33. Fodor, E., Pritlove, D. C. & Brownlee, G. G. The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J. Virol.* **68**, 4092–4096 (1994).
34. Hagen, M., Chung, T. D., Butcher, J. A. & Krystal, M. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J. Virol.* **68**, 1509–15 (1994).
35. Zheng, H., Lee, H. A., Palese, P. & García-Sastre, A. Influenza A virus RNA polymerase has the ability to stutter at the polyadenylation site of a viral RNA template during RNA replication. *J. Virol.* **73**, 5240–3 (1999).
36. Neumann, G., Hughes, M. T. & Kawaoka, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.* **19**, 6751–8 (2000).
37. Shimizu, T., Takizawa, N., Watanabe, K., Nagata, K. & Kobayashi, N. Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. *FEBS Lett.* **585**, 41–46 (2011).
38. Cao, S. *et al.* A nuclear export signal in the matrix protein of Influenza A virus is required for efficient virus replication. *J. Virol.* **86**, 4883–91 (2012).
39. Liu, T., Muller, J. & Ye, Z. Association of Influenza Virus Matrix Protein with Ribonucleoproteins May Control Viral Growth and Morphology. *Virology* **304**, 89–96 (2002).
40. Wakefield, L. & Brownlee, G. G. RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucleic Acids Res.* **17**, 8569–80 (1989).
41. Watanabe, K., Handa, H., Mizumoto, K. & Nagata, K. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J. Virol.* **70**, 241–7 (1996).
42. Elster, C., Larsen, K., Gagnon, J., Ruigrok, R. W. & Baudin, F. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. *J. Gen. Virol.* **78** (Pt 7), 1589–96 (1997).
43. Iwatsuki-Horimoto, K. *et al.* The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J. Virol.* **80**, 5233–40 (2006).
44. Nayak, D. P., Hui, E. K.-W. & Barman, S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res.* **106**, 147–165 (2004).
45. Burleigh, L. M., Calder, L. J., Skehel, J. J. & Steinhauer, D. A. Influenza A viruses with mutations in the M1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. *J. Virol.* **79**, 1262–70 (2005).
46. Gómez-Puertas, P., Albo, C., Pérez-Pastrana, E., Vivo, A. & Portela, A. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J. Virol.* **74**, 11538–11547 (2000).
47. Bancroft, C. T. & Parslow, T. G. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. *J. Virol.* **76**, 7133–9 (2002).
48. Enami, M., Sharma, G., Benham, C. & Palese, P. An influenza virus containing nine different

- RNA segments. *Virology* **185**, 291–8 (1991).
49. Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T. & Kawaoka, Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2002–7 (2003).
 50. Noda, T. *et al.* Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. *Nat. Commun.* **3**, 639 (2012).
 51. Noda, T. *et al.* Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**, 490–2 (2006).
 52. Muramoto, Y. *et al.* Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J. Virol.* **80**, 2318–25 (2006).
 53. Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y. & Kawaoka, Y. Exploitation of Nucleic Acid Packaging Signals To Generate a Novel Influenza Virus-Based Vector Stably Expressing Two Foreign Genes. *J. Virol.* **77**, 10575–10583 (2003).
 54. Liang, Y., Hong, Y. & Parslow, T. G. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J. Virol.* **79**, 10348–55 (2005).
 55. Fujii, K. *et al.* Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J. Virol.* **79**, 3766–74 (2005).
 56. Palese, P., Tobita, K., Ueda, M. & Compans, R. W. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**, 397–410 (1974).
 57. Rossman, J. S. & Lamb, R. a. Influenza virus assembly and budding. *Virology* **411**, 229–236 (2011).
 58. Molinari, N.-A. M. *et al.* The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine* **25**, 5086–96 (2007).
 59. Fouchier, R. A. M. *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* **79**, 2814–22 (2005).
 60. Russell, R. J. *et al.* H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology* **325**, 287–96 (2004).
 61. Air, G. M. Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 7639–43 (1981).
 62. WHO | Pandemic (H1N1) 2009 - update 112. at http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/
 63. CDC Novel H1N1 Flu | CDC Estimates of 2009 H1N1 Influenza Cases, Hospitalizations and Deaths in the United States, April 2009 – January 16, 2010. at http://www.cdc.gov/h1n1flu/estimates_2009_h1n1.htm
 64. Cao, S. *et al.* A Nuclear Export Signal in the Matrix Protein of Influenza A Virus Is Required for Efficient Virus Replication. *J. Virol.* **86**, 4883–4891 (2012).

65. Noton, S. L. *et al.* Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J. Gen. Virol.* **88**, 2280–2290 (2007).
66. Zhang, K. *et al.* Dissection of influenza A virus M1 protein: PH-dependent oligomerization of N-terminal domain and dimerization of C-terminal domain. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).
67. Ruigrok, R. W. *et al.* Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology* **267**, 289–298 (2000).
68. Harris, A., Forouhar, F., Qiu, S., Sha, B. & Luo, M. The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology* **289**, 34–44 (2001).
69. Calder, L. J., Wasilewski, S., Berriman, J. A. & Rosenthal, P. B. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10685–90 (2010).
70. Lee, K. K. Architecture of a nascent viral fusion pore. *EMBO J.* **29**, 1299–311 (2010).
71. Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T. & Ishihama, A. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**, 249–55 (1993).
72. Akarsu, H. *et al.* Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP / NS2). *EMBO J.* **22**, (2003).
73. Bourmakina, S. V. & García-Sastre, A. Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *J. Gen. Virol.* **84**, 517–527 (2003).
74. Elleman, C. J. & Barclay, W. S. The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology* **321**, 144–53 (2004).
75. Neumann, G., Watanabe, T. & Kawaoka, Y. Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *J. Virol.* **74**, 547–551 (2000).
76. Bui, M., Whittaker, G. & Helenius, A. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J. Virol.* **70**, 8391–401 (1996).
77. Bucher, D. *et al.* M protein (M1) of influenza virus: antigenic analysis and intracellular localization with monoclonal antibodies. *J. Virol.* **63**, 3622–33 (1989).
78. Baudin, F., Petit, I., Weissenhorn, W. & Ruigrok, R. W. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology* **281**, 102–108 (2001).
79. Arzt, S. *et al.* Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology* **279**, 439–446 (2001).
80. Sha, B. & Luo, M. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 239–44 (1997).
81. Shishkov, A. *et al.* Spatial structure peculiarities of influenza A virus matrix M1 protein in an acidic solution that simulates the internal lysosomal medium. *FEBS J.* **278**, 4905–16 (2011).

82. Feigin, L. A. & Svergun, D. I. Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering. (1987). doi:10.1007/978-1-4757-6624-0
83. Petoukhov, M. V & Svergun, D. I. Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 562–71 (2007).
84. Svergun, D. I. Small-angle X-ray and neutron scattering as a tool for structural systems biology. *Biol. Chem.* **391**, 737–43 (2010).
85. Mertens, H. D. T. & Svergun, D. I. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J. Struct. Biol.* **172**, 128–41 (2010).
86. Shtykova, E. V. *et al.* Structural analysis of influenza A virus matrix protein M1 and its self-assemblies at low pH. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
87. Cros, J. F. & Palese, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* **95**, 3–12 (2003).
88. Hale, B. G., Randall, R. E., Ortín, J. & Jackson, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **89**, 2359–76 (2008).
89. Lamb, R. A. & Lai, C. J. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* **21**, 475–85 (1980).
90. Paterson, D. & Fodor, E. Emerging Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP). *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
91. Lamb, R. A. & Choppin, P. W. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4908–4912 (1979).
92. Inglis, S. C., Barrett, T., Brown, C. M. & Almond, J. W. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 3790–4 (1979).
93. Virol, A., Science, V. & October, P. A. Vi rology ©. 225–234 (1992).
94. Ward, A. C. *et al.* Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus. *Arch. Virol.* **140**, 2067–2073 (1995).
95. O'Neill, R. E., Talon, J. & Palese, P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* **17**, 288–296 (1998).
96. Mattaj, I. W. & Englmeier, L. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 265–306 (1998).
97. Neumann, G., Hughes, M. T. & Kawaoka, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.* **19**, 6751–8 (2000).
98. Gorai, T. *et al.* F1Fo-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 4615–4620 (2012).
99. Robb, N. C., Smith, M., Vreede, F. T. & Fodor, E. NS2/NEP protein regulates transcription

- and replication of the influenza virus RNA genome. *J. Gen. Virol.* **90**, 1398–407 (2009).
100. Akarsu, H. *et al.* Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J.* **22**, 4646–4655 (2003).
 101. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1751**, 119–139 (2005).
 102. Groll, M. *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463–71 (1997).
 103. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920–30 (2000).
 104. Jacques, D. A. & Trewthella, J. Small-angle scattering for structural biology--expanding the frontier while avoiding the pitfalls. *Protein Sci.* **19**, 642–57 (2010).
 105. Rambo, R. P. & Tainer, J. A. Super-resolution in solution X-ray scattering and its applications to structural systems biology. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 415–41 (2013).
 106. Purdie, N. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* Edited by Gerald D. Fasman (Brandeis University). Plenum Press: New York. 1996. x + 738 pp. \$125.00. ISBN 0-306-45142-5. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12871–12871 (1996).
 107. *Circular dichroism : principles and applications* /. (Wiley-VCH, 2000).
 108. Rodger, A. & Nordén, B. *Circular Dichroism and Linear Dichroism*. (Oxford University Press, 1997). at <<https://books.google.com/books?id=TheKGC99hJcC&pgis=1>>
 109. Kelly, S. M. & Price, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 349–84 (2000).
 110. Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, P. T. & Zagorski, M. G. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J. Mol. Biol.* **225**, 1075–93 (1992).
 111. Woody, A.-Y. M. & Woody, R. W. Individual tyrosine side-chain contributions to circular dichroism of ribonuclease. *Biopolymers* **72**, 500–13 (2003).
 112. Freskgaard, P.-O., Maartensson, L.-G., Jonasson, P., Jonsson, B.-H. & Carlsson, U. Assignment of the Contribution of the Tryptophan Residues to the Circular Dichroism Spectrum of Human Carbonic Anhydrase II. *Biochemistry* **33**, 14281–14288 (1994).
 113. Boxer, D. H. *et al.* Sensing of remote oxyanion binding at the DNA binding domain of the molybdate-dependent transcriptional regulator, ModE. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2829–37 (2004).
 114. Krell, T., Horsburgh, M. J., Cooper, A., Kelly, S. M. & Coggins, J. R. Localization of the active site of type II dehydroquinases. Identification of a common arginine-containing motif in the two classes of dehydroquinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 24492–7 (1996).
 115. Guinier A (1939) La diffraction des rayons X aux tres petits angles; application a l'etude de phenomenes ultramicroscopiques. *Ann Phys (Paris)* **12**: 161–237. - Open Access Library. at

- <<http://www.oalib.com/references/5881731>>
116. Guinier, A. & Fournet, G. *Small-angle scattering of X-rays*. (1955). at <https://books.google.hu/books/about/Small_angle_scattering_of_X-rays.html?hl=hu&id=5zRRAAAAMAAJ&pgis=1>
 117. Glatter, O. & Kratky, O. *Small Angle X-ray Scattering.pdf*. (ACADEMIC PRESS INC. (LONDON) LTD., 1982).
 118. Pilz, I., Glatter, O. & Kratky, O. Röntgenkleinwinkelstudien über die Substruktur von Helix pomatia Hämocyanin. *Z. Naturforsch* **27 b**, 518–524 (1972).
 119. Tardieu, A. & Vachette, P. Analysis of models of irregular shape by solution X-ray scattering: the case of the 50S ribosomal subunit from E. coli. *EMBO J.* **1**, 35–40 (1982).
 120. Koch, M. J. H., Bordas, J., Schöla, E. & Broecker, H. C. Kinetic study of the crystallization of stretched polyisobutylene using synchrotron radiation. *Polym. Bull.* **1**, (1979).
 121. Svergun, D. I. & Koch, M. H. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep.Prog.Phys.* **66**, 1735–1782 (2003).
 122. Allec, N. *et al.* Small-angle X-ray scattering method to characterize molecular interactions: Proof of concept. *Sci. Rep.* **5**, 12085 (2015).
 123. Bernado, P., Mylonas, E., Petoukhov, M. V, Blackledge, M. & Svergun, D. I. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5656–5664 (2007).
 124. Garman, E. F. & Schneider, T. R. Macromolecular Cryocrystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 211–237 (1997).
 125. Cusack, S. *et al.* Small is beautiful: protein micro-crystallography.
 126. Protein crystallography microdiffraction | Gebhard F X Schertler - Academia.edu. at <http://www.academia.edu/14462556/Protein_crystallography_microdiffraction>
 127. Sanishvili, R. *et al.* A 7 μ m mini-beam improves diffraction data from small or imperfect crystals of macromolecules. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **64**, 425–35 (2008).
 128. Flot, D. *et al.* The ID23-2 structural biology microfocuss beamline at the ESRF. *J. Synchrotron Radiat.* **17**, 107–18 (2010).
 129. Nave, C. Matching X-ray source, optics and detectors to protein crystallography requirements. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **55**, 1663–1668 (1999).
 130. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–55 (2011).
 131. Warne, T. *et al.* Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486–91 (2008).
 132. Cherezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258–65 (2007).
 133. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-

- coupled receptor. *Nature* **450**, 383–7 (2007).
134. Nelson, R. *et al.* Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**, 773–8 (2005).
135. Gati, C. *et al.* Serial crystallography on in vivo grown microcrystals using synchrotron radiation. *IUCrJ* **1**, 87–94 (2014).
136. Coulibaly, F. *et al.* The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature* **446**, 97–101 (2007).
137. Emma, P. *et al.* First lasing and operation of an ångstrom-wavelength free-electron laser. *Nat. Photonics* **4**, 641–647 (2010).
138. Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E. & Hajdu, J. Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses. *Nature* **406**, 752–7 (2000).
139. DePonte, D. P. *et al.* Gas dynamic virtual nozzle for generation of microscopic droplet streams. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **41**, 195505 (2008).
140. Chapman, H. N. *et al.* Femtosecond time-delay X-ray holography. *Nature* **448**, 676–9 (2007).
141. Chapman, H. N. *et al.* Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature* **470**, 73–7 (2011).
142. Martin-Garcia, J. M., Conrad, C. E., Coe, J., Roy-Chowdhury, S. & Fromme, P. Review: Serial femtosecond crystallography: A revolution in structural biology. *Arch. Biochem. Biophys.* (2016). doi:10.1016/j.abb.2016.03.036
143. Redecke, L. *et al.* Natively inhibited Trypanosoma brucei cathepsin B structure determined by using an X-ray laser. *Science* **339**, 227–30 (2013).
144. DOYE, J. & POON, W. Protein crystallization in vivo. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 40–46 (2006).
145. Müntz, K. Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* **38**, 77–99 (1998).
146. Dodson, G. & Steiner, D. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 189–194 (1998).
147. Veenhuis, M., Kiel, J. A. K. W. & Van Der Klei, I. J. Peroxisome assembly in yeast. *Microsc. Res. Tech.* **61**, 139–50 (2003).
148. Hill-Perkins, M. S. & Possee, R. D. A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **71** (Pt 4), 971–6 (1990).
149. Rohrmann, G. F. Polyhedrin structure. *J. Gen. Virol.* **67** (Pt 8), 1499–513 (1986).
150. Smith, G. E., Summers, M. D. & Fraser, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 2156–2165 (1983).
151. Fan, G. Y. *et al.* In vivo calcineurin crystals formed using the baculovirus expression system. *Microsc. Res. Tech.* **34**, 77–86 (1996).

152. Axford, D., Ji, X., Stuart, D. I. & Sutton, G. In cellulo structure determination of a novel cypovirus polyhedrin. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **70**, 1435–41 (2014).
153. Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**, 32–43 (1991).
154. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5 (1970).
155. Konarev, P. V. *et al.* PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1277–1282 (2003).
156. Fink, H. -P. Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering. Von L. A. FEIGIN und D. I. SVERGUN. ISBN 0-306-42629-3. New York/London: Plenum Press 1987. XIII, 335 S., geb. US \$ 95.40. *Acta Polym.* **40**, (1989).
157. Franke, D. & Svergun, D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 342–346 (2009).
158. Svergun, D. I., Petoukhov, M. V & Koch, M. H. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.* **80**, 2946–2953 (2001).
159. Volkov, V. V., Svergun, D. I. & IUCr. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *urn:issn:0021-8898* (2003).
160. Young, A. T. Rayleigh scattering. *Appl. Opt.* **20**, 533 (1981).
161. Georgieva, D. *et al.* Oligomerization of the proteolytic products is an intrinsic property of prion proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 1278–1286 (2004).
162. Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. A. & Perez-Iratxeta, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins* **80**, 374–81 (2012).
163. Stark, R. E., Leff, P. D., Milheim, S. G. & Kropf, A. Physical studies of CHAPS, a new detergent for the study of visual pigments. *J. Phys. Chem.* **88**, 6063–6067 (1984).
164. Sha, B. & Luo, M. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of type A influenza virus matrix protein M1. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **53**, 458–460 (1997).
165. Raghunathan, K., Harris, P. T. & Arvidson, D. N. Trial by fire: Are the crystals macromolecules? *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 615–620 (2010).
166. Lodish, H. *et al.* Synthesis and Targeting of Peroxisomal Proteins. (2000).
167. Interferential polarizing device for study of phase objects. (1960). at <<http://www.google.com/patents/US2924142>>
168. Jacques, D. A., Guss, J. M., Svergun, D. I. & Trewella, J. Publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **68**, 620–626 (2012).
169. Luo, J. *et al.* Size characterization of green fluorescent protein inclusion bodies in E. coli


- using asymmetrical flow field-flow fractionation-multi-angle light scattering. *J. Chromatogr. A* **1120**, 158–64 (2006).
170. Chuan, Y. P., Fan, Y. Y., Lua, L. & Middelberg, A. P. J. Quantitative analysis of virus-like particle size and distribution by field-flow fractionation. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 1425–33 (2008).
171. Arifin, D. R. & Palmer, A. F. Determination of size distribution and encapsulation efficiency of liposome-encapsulated hemoglobin blood substitutes using asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multi-angle static light scattering. *Biotechnol. Prog.* **19**, 1798–811
172. Reid, A. H., Taubenberger, J. K. & Fanning, T. G. The 1918 Spanish influenza: Integrating history and biology. *Microbes Infect.* **3**, 81–87 (2001).
173. Das, K., Aramini, J. M., Ma, L.-C., Krug, R. M. & Arnold, E. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 530–8 (2010).
174. Safo, M. K. *et al.* Crystal structures of influenza a virus matrix protein M1: Variations on a theme. *PLoS One* **9**, (2014).
175. Sawaya, M. R. *et al.* Protein crystal structure obtained at 2.9 Å resolution from injecting bacterial cells into an X-ray free-electron laser beam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12769–74 (2014).
176. Schönherr, R. *et al.* Real-time investigation of dynamic protein crystallization in living cells. *Struct. Dyn. (Melville, N.Y.)* **2**, 041712 (2015).
177. White, E. T., Tan, W. H., Ang1, J. M., Tait, S. & Litster, J. D. The density of a protein crystal. *Powder Technol.* **179**, 55–58 (2007).
178. Rupp, B. *Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology.* (Garland Science, 2010).
179. Amenitsch, H. & Marmiroli, B. Time-resolved structure investigation with small angle X-ray scattering using scanning techniques. *Rend. Lincei* **22**, 93–107 (2011).
180. Martin, K. & Helenius, A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J. Virol.* **65**, 232–44 (1991).
181. Fox, J. D. & Waugh, D. S. in *E. coli Gene Expression Protocols* 99–118 (Humana Press). doi:10.1385/1-59259-301-1:99
182. Zhou, P. & Wagner, G. Overcoming the solubility limit with solubility-enhancement tags: successful applications in biomolecular NMR studies. *J. Biomol. NMR* **46**, 23–31 (2010).

8. Anhang

8.1. Gefahrstoffe nach GHS

Chemikalie	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
1,4-Dithiothreitol		302-315-319	302+352-305 +351+338
Acetonitril		225-332-302-312- 319	210-305+351+338- 403+235
Ammoniumpersulfat		272-302-315-319- 335-334- 317	280- 305+351+338- 302+352- 304+341- 342+311
Nickelsulfat		350i-341-360D- 372-332- 302-315- 334-317-410	201-280-273- 308+313- 342+311- 302+352
Ampicillin-Natirumsalz		317-334	261-280-342- 311
Ethidiumbromid		341-330-302	281-302+352- 305+351+338- 304+340- 309- 310
Ethanol		225	210
Essigsäure		226-314	280- 301+330+331- 307+310- 305+351+338
EDTA		319	305+351+338
Imidazol		302-314- 361d	280- 301+330+3 31- 305+351+3 38- 309+310
Isopropanol		225-319- 336	210-233- 305+351+3
Gentamycin		317-334	261-280- 342+311
Kanamycin		360	201-308+313
Bis-Tris		315-319-335	261- 305+351+338
SDS		228-302+ 332-315- 318- 335- 412	210-261- 273-280- 305+351+ 338
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED)		225-332-302-314	210-233-280- 301+330+331- 305+351+338- 309+310
Tris-HCl, Tris-Base		315-319- 335	261- 305+351+ 338
Rotiphorese® Gel 30		350-340-361f-301- 372- 332-312-319- 315-317	201-280- 301+310- 305+351+338- 308+313

8.1.1. Kommerzielle Kristallisationslösungen

Screen (Hersteller)	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
PEG/Ion Screen™ (Hampton Research)		H272, H301-2, H311-2, H315, H319, H331-2, H335, H400, H410, H412	P220, P261, P273, P280, P305, P351, P338, P501
Structure Screen I (Molecular Dimension Limited)			

8.2. Hinweise für Gefahrstoffe

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
P261	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden
P301	Bei Verschlucken
P302	Bei Berührung mit der Haut
P304	Bei Einatmen
P305	Bei Kontakt mit den Augen
P308	Bei Exposition oder falls betroffen
P311	Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen
P312	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen
P313	Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen
P330	Mund ausspülen
P331	Kein Erbrechen herbeiführen
P338	Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen
P340	Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen
P341	Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert
P342	Bei Symptomen der Atemwege
P351	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen
P352	Mit viel Wasser und Seife waschen
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein
H301	Giftig bei Verschlucken
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken
H311	Giftig bei Hautkontakt
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden
H315	Verursacht Hautreizungen
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen
H319	Verursacht schwere Augenreizung
H331	Giftig bei Einatmen
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen
R10	Entzündlich
R45	Kann Krebs erzeugen
R46	Kann vererbare Schäden verursachen
R60	Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen

R61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
R25	Giftig beim Verschlucken
R36	Reizt die Augen
R37	Reizt die Atmungsorgane
R38	Reizt die Haut
R48	Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition
R20	Gesundheitsschädlich beim Einatmen
R22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R51	Giftig für Wasserorganismen
R53	Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
S13	Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten
S20	Bei der Arbeit nicht essen und trinken
S26	Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen
S53	Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
S61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden
S36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
S37	Geeignete Schutzhandschuhe tragen
S39	Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

9. Danksagung

Zum Schluss möchte ich die Gelegenheit nutzen um ein paar lieben Menschen zu danken, die einen erheblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Lars Redecke möchte ich mich ganz herzlich bedanken:

Für die Möglichkeit, an so einem vielseitigen und fesselnden Thema arbeiten zu dürfen; Für die einwandfreie Betreuung; Für die zahlreichen anregenden und motivierenden Tipps während des gesamten Zeitraums der Arbeit. Neben der fachlichen Kompetenz schätze ich ganz besonders Dein stets offenes Ohr bei jeglichen Fragestellungen.

Ein weiterer großer Dank gilt Dr. Dmitri Svergun und Dr. Cy Jeffries:

Für die außergewöhnlich gute Kollaboration auf dem Projekt; Für die vielen konstruktiven und aufklärenden Diskussionen; Und vor allem für die Unterstützung bei allen Fragestellungen bezüglich der SAXS-Experimente und deren Auswertung.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Norbert Tautz und bei Prof. Dr. Christian Hübner für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes meiner Prüfungskommission beziehungsweise die Anfertigung des Zweitgutachtens meiner Dissertation.

Ich danke Dr. Cesar Munos Fontela vom Heinrich-Pette-Institut für die Bereitstellung der Gensegmente des M1-Proteins und des NEP.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Dr. hc Hilgenfeld für die Möglichkeit etliche Teile meiner Arbeit in seinen Laboratorien durchführen zu dürfen.

Außerdem möchte ich mich bei den vielen Studenten bedanken, die mich auf meinem Weg zeitweise begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt dabei denjenigen, die dieses Projekt direkt unterstützt haben: Linda Kis, Svenja Schneegans, Magdalena Mecking, Juliane Peters und Clara Volz. Euer Einsatz hat mir sehr geholfen, vielen Dank.

Ich danke außerdem allen Mitgliedern der SIAS-Gruppe, die mir jederzeit fachlich oder auch emotional zur Seite standen. Danke für die zahlreichen interessanten Diskussionen und Denkanstöße, gemeinsames Freuen über die sommerlichen Witterungsverhältnisse im Labor und kulinarische Reisen in andere Länder, die zusammengenommen dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit in dieser Form vorliegt.

Dabei möchte ich Janine Mia Rudolph für die immer offene Art und freundliche Hilfsbereitschaft danken. Ich wünsche Dir für den restlichen Verlauf Deiner Promotion nur das Beste!

Miriam Heck danke ich für die vielen Fachdiskussionen und für Dein offenes Ohr wenn wieder mal etwas nicht nach Plan verlief. Diesmal ist es nicht CatB!

Magdalena Mecking danke ich für ihr gelassenes Wesen, das im Labor für schöne unvergessliche Momente gesorgt hat. Ich wünsche Dir für deinen weiteren Werdegang nur das Beste. Die nächste Mutagenese klappt bestimmt auf Anhieb.

Robert Schönherr möchte ich insbesondere für die Unterstützung während der Endphase meiner Arbeit danken, sowie für die zahlreichen fachlichen Gespräche und Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art.

Dr. Marco Klinge danke ich für die Unterstützung während der Anfangszeit meiner Arbeit in Hamburg, sowie für die vielen fachlichen aber auch musikalischen Gespräche sowohl im Labor als auch abseits der Arbeit. Ich wünsche Dir und Deiner zukünftigen Frau alles Gute für euren gemeinsamen Weg!

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Biochemie! Ihr standet mir ständig mit Rat und Tat zur Seite. Ein großer Dank geht an Ulrike Hermsdorf für die hilfreiche Unterstützung besonders während der Endphase dieser Arbeit aber vor allem für das offene Ohr bei jeglichen Angelegenheiten.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken, die mich in jeder Phase der Arbeit unterstützt hat. Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter für ihre offenen Ohren. Meinem Bruder gebührt Dank für seine emotionale Unterstützung, denn: „geteiltes Leid ist halbes Leid“.

Mein allergrößter Dank gilt meiner wunderbaren Partnerin Frederike. Ich danke Dir von ganzem Herzen für die viele Kraft, die Du mir in den mehr als 3 Jahren gegeben hast, und für Deine emotionale und tatkräftige Unterstützung besonders in der Endphase der Arbeit. Ohne Dich wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.