

Strukturelle Untersuchung von Protein- Membran Interaktionen mittels Festkörper- NMR-Spektroskopie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Claudia Beumer
aus Münster

Troisdorf, Juni 2017

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Henrike Heise

Korreferent: PD Dr. Bernd König

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Festkörper-NMR-Spektroskopie an Membranproteinen	1
1.1.1	DNP-NMR-Spektroskopie	2
1.1.2	Probenanforderungen und Isotopenmarkierung	3
1.2	Membransysteme	4
1.2.1	Biologische Membranen	4
1.2.2	Phasenzustand von Lipiddoppelschichten	4
1.2.3	Modellmembranen	5
1.3	Das integrale Membranprotein VpU aus HIV-1	6
1.4	Nitrophorine	6
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	11
2	Material	12
2.1	Bakterienstämme	12
2.2	Verwendete Kulturmedien	13
2.3	Plasmide	13
3	Methoden	14
3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	14
3.2	Western Blot	14
3.3	Agarose-Gelelektrophorese	15
3.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	15
3.5	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	16
3.6	Massenspektrometrie	16
3.7	Sequenzierung	16
3.8	Expression und Reinigung der PreScission Protease	16
3.9	Klonierung des VpU-2-Konstrukts	17
3.10	Expression und Reinigung von VpU	19
3.11	Fraktionierung des Zellpellets der VpU Expression	21
3.12	POPC-Liposomenherstellung und VpU-1 Einbau	21
3.13	DNP-Festkörper-NMR-Spektroskopie	22
3.14	Expression und Reinigung von NP7	23

3.15	Herstellung der DMPC / DMPS- und DMPC / DMPG-Liposomen	24
3.16	NP7-Liposomen Bindungstest	25
3.17	Dünnschichtchromatographie	25
3.18	NMR Probenherstellung	26
3.19	Festkörper-NMR-Spektroskopie	26
3.20	Analyse der NP7 Kristallstruktur	28
4	Ergebnisse und Diskussion	29
4.1	Charakterisierung von VpU in Membranen	29
4.1.1	Rekombinante Herstellung des VpU in <i>E. coli</i>	29
4.1.1.1	Analyse des vorhandenen VpU-1 Konstrukts	30
4.1.1.2	Klonierung eines neuen Codon-optimierten VpU-2-Konstrukts	33
4.1.1.3	Vergleich der Expression in LB-Medium	34
4.1.1.4	Fraktionierung der <i>E. coli</i> Zellen nach der Expression in LB-Medium	35
4.1.1.5	Expression in verschiedenen Kulturmedien	37
4.1.2	Reinigung von VpU-1 und VpU-2	39
4.1.2.1	Expression und Reinigung der His-PreScission	39
4.1.2.2	Reinigung von VpU	40
4.1.3	DNP-NMR-Messungen an VpU in Liposomen	42
4.1.3.1	Signalverstärkung durch DNP	42
4.1.3.2	Optimierung der Probenzusammensetzung	43
4.1.3.3	Initiale DNP-NMR Korrelationsexperimente	44
4.1.4	Ausblick	45
4.2	Strukturelle Untersuchung von membrangebundenem vs. präzipitiertem NP7 ..	46
4.2.1	Heterologe Expression, Reinigung und Rekonstitution von NP7	46
4.2.1.1	Etablierung der Expression von NP7 in unserem Labor	46
4.2.1.2	Etablierung der Reinigung von NP7 in unserem Labor	47
4.2.2	Bindung von NP7 an Liposomen	50
4.2.3	NMR-spektroskopische Charakterisierung der NP7 Proben	53
4.2.3.1	Vorüberlegungen zur Membranbindung von NP7	54
4.2.3.2	Effizienz der reversen Isotopenmarkierung des NP7	55
4.2.3.3	Auftreten von Lipidsignalen in den NMR-Spektren	56
4.2.3.4	T ₁ - und T ₂ -Relaxationsmessungen an NP7	59

4.2.3.5	Mobilität von NP7.....	66
4.2.3.6	Temperaturabhängigkeit der NP7 NMR-Spektren.....	69
4.2.4	Zuordnung der NP7-Resonanzen in den Festkörper-NMR-Spektren.....	73
4.2.4.1	Einfluss der Aufnahmeparameter.....	74
4.2.4.2	Aminosäuretyp-spezifische Resonanzzuordnung	77
4.2.4.3	Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung der Lysinsignale.....	79
4.2.4.4	Sequentielle Resonanzzuordnung	83
4.2.4.5	Zusammenfassung der Resonanzzuordnung	89
4.2.5	Vergleich der NMR-Daten mit der publizierten NP7 Kristallstruktur	90
4.2.6	Einfluss der Liposomenbindung auf die NP7 Struktur.....	97
4.2.6.1	Liposomenbindung hat keinen Einfluss auf Gesamtfaltung	97
4.2.6.2	Änderung chemischer Verschiebungen infolge Liposomenbindung	98
4.2.6.3	Änderung der Signalintensität infolge Liposomenbindung	103
4.2.6.4	Abstandsmessungen zwischen Lipid und NP7 mittels REDOR.....	104
4.2.6.5	Zusammenfassung der gefundenen Unterschiede.....	107
4.2.7	Ausblick.....	109
5	Zusammenfassung	110
6	Summary.....	112
7	Literaturverzeichnis	113
8	Danksagung	119
9	Anhang	120
9.1	Experimentelle Details der verwendeten NMR-Spektren	120
9.1.1	$U[^{13}C, ^{15}N]$ VpU-1 in POPC Liposomen.....	120
9.1.2	$U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7 Probe	120
9.1.3	$U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen Probe.....	124
9.1.4	DMPC / DMPS Liposomen Probe	128
9.1.5	$U[^{13}C, ^{15}N(K,V)]$ NP7 Probe.....	129
9.2	SIMPSON Skript	130
9.3	Abbildungsverzeichnis	131
9.4	Tabellenverzeichnis	135
9.5	Eidesstattliche Versicherung	137

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Amp	Ampicillin
BST-2	„Bone Marrow Stromal Antigene 2“
CCR7	CC-Chemokinrezeptor 7
CD4	„Cluster of Differentiation 4“
CP	Kreuzpolarisation / „Cross Polarization“
CV	Säulenvolumen / „Column Volume“
DARR	„Dipolar Assisted Rotational Resonance“
DLS	Dynamische Lichtstreuung / „dynamic light scattering“
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)
DMPS	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	„Dynamic Nuclear Polarisation“
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPS	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin
DREAM	„Dipolar Recoupling Enhanced by Amplitude Modulation“
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie
GdmCl	Guanidinhydrochlorid
GSSG	Glutathiondisulfid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HORROR	„Homonuclear Rotary Resonance“
HRP	Meerrettichperoxidase / „Horseradish Peroxidase“
IMET	Institut für Molekulare Enzymtechnologie
INEPT	„Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer“
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Lac	Laktose
LB	„Lysogeny Broth“
LUV	„Large Unilamellar Vesicles“
MAS	“Magic Angle Spinning”
MLV	Multilamellare Vesikel
Nef	„Negative Regulatory Factor“
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMR	Kernspinresonanz / „Nuclear Magnetic Resonance“
NP7	Nitrophorin 7
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTB-A	Natürliches Killer-T- und B-Zellen Antigen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung / „Phosphate buffered Saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Datenbank
PDSD	„Proton Driven Spin Diffusion“
PG	Phosphatidylglycerol
POPC	1-Hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
PS	Phosphatidylserin

PVDF	Polyvinylidenfluorid
REDOR	„Rotational-Echo Double-Resonance“
RPC	„Reversed Phase Chromatography“
SAP	„Shrimp Alkaline Phosphatase“
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese / „Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis“
SIMPSON	Simulationsprogramm für Festkörper-NMR-Spektroskopie
SMA	„Styrene Maleic Anhydride“
SOB	„Super Optimal Broth“
SOC	“Super Optimal Broth with Catabolite Repression”
SPC5	„Supercycled POST-C5“
SUV	„Small Unilamellar Vesicles“
T7	Bakteriophage T7
TB	„Terrific Broth“
TCA	Trichloressigsäure
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy
TOTAPOL	1-(TEMPO-4-oxy)-3-(TEMPO-4-amino)-propan-2-ol)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UZ	Ultrazentrifuge
Vif	„Viral Infectivity Factor“
VpR	Virales Protein R
VpU	Virales Protein U

1 Einleitung

Membranproteine machen etwa ein Drittel des Proteoms der Zelle aus und kontrollieren viele fundamentale Prozesse in der Zelle.¹ Es wird geschätzt, dass mehr als die Hälfte der Arzneimittel auf dem Markt auf Membranproteine zielen.² Die hochaufgelöste Struktur von Membranproteinen ist einer der Schlüsselfaktoren für das detaillierte Verständnis ihrer Funktion. Jedoch ist das Verständnis von Membranproteinen auf molekularem Level wesentlich geringer, als das von löslichen Proteinen. Im Juni 2017 sind nur ca. 3,4 % der Einträge in der Protein Datenbank (PDB) Strukturen von Membranproteinen.³ In den letzten Jahren wurden sowohl in der Röntgenstrukturanalyse als auch in der Flüssig-NMR-Spektroskopie Fortschritte in der Strukturaufklärung von Membranproteinen gemacht. Jedoch können die hierbei verwendeten Lipidmimetika die Struktur von Membranproteinen verfälschen.² Festkörper-NMR-Spektroskopie ist eine praktikable und vorteilhafte Alternative, da mit ihr Membranproteine in Lipiddoppelschichten mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung, über eine große Spannweite von pH-Werten, Temperaturen und Salzkonzentrationen untersucht werden können.² Somit bietet sie die Flexibilität, die Untersuchungsbedingungen nahe denen in der Zellmembran zu wählen. Zudem ist in der Festkörper-NMR-Spektroskopie im Gegensatz zur Flüssig-NMR-Spektroskopie keine Molekularbewegung zur Auflösung der Signale notwendig, so dass hier das Molekulargewicht kein begrenzender Faktor für die strukturelle Untersuchung von Membranproteinen ist.²

1.1 Festkörper-NMR-Spektroskopie an Membranproteinen

Sowohl in der Flüssig- als auch in der Festkörper-NMR-Spektroskopie sind atomare Abstände die Hauptquellen für strukturelle Information. Durch die Rotation der Probe im magischen Winkel (MAS, „Magic Angle Spinning“) sind in der Festkörper-NMR-Spektroskopie die internuklearen dipolaren Wechselwirkungen ausgemittelt. Allerdings enthalten dipolare Kopplungen wertvolle Distanzinformationen, da ihre Stärke invers proportional zur dritten Potenz des interatomaren Abstands ist. Die dipolare Kopplungskonstante D (in Hz) ist folgendermaßen definiert:

$$D = \hbar \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{\gamma_1 \gamma_2}{r_{1,2}^3} \quad [1]$$

μ_0 ist die Vakuumpemreabilität, γ_1 and γ_2 sind die gyromagnetischen Verhältnisse der Kerne und $r_{1,2}$ ist der Abstand zwischen den dipolar gekoppelten Kernen.

Die dipolaren Kopplungen können durch die Einstrahlung von Rotor-synchronisierten Radiofrequenzpulsen wieder eingekoppelt werden. Dies wird in Experimenten wie z. B. SPC5⁴, HORROR^{5,6} und DREAM⁷ genutzt. Allerdings sind diese homonuklearen dipolaren Wiedereinkopplungs-Techniken der 0. Ordnung sehr sensitiv bezüglich „dipolar truncation“. „Dipolar truncation“ beschreibt die Ausmittlung von schwachen dipolaren Kopplungen von Kernen über größere Distanzen in Gegenwart von starken dipolaren Kopplungen benachbarter Kerne. Allerdings stecken gerade in den schwachen dipolaren Kopplungen wichtige Informationen für die Aufklärung der dreidimensionalen

Proteinstruktur. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu überwinden, ist die Verwendung von Experimenten, die auf homonuklearen dipolaren Kopplungen der 2. Ordnung basieren (z. B. PDS⁸ und DARR^{9,10}).

Während homonukleare dipolare Kopplungen die Grundlage für die meisten Festkörper-NMR-Experimente zur Korrelation von ¹³C-Kernen bilden, werden heteronukleare dipolare Kopplungen genutzt, um ¹³C-Kerne mit ¹⁵N-Kernen zu verknüpfen. Diese bilden die Grundlage für die Resonanzzuordnung des Proteins. Die Resonanzzuordnung ist Voraussetzung für die detaillierte Analyse der Struktur, Dynamik und molekularen Wechselwirkungen des Proteins. Das generelle Vorgehen ist hierbei analog zu dem in der Flüssig-NMR-Spektroskopie. Die Resonanzzuordnung basiert auf der Aufnahme von mehreren multidimensionalen Korrelationsspektren, die durch eine Anzahl von gemeinsamen Korrelationen untereinander in Zusammenhang stehen und so den „sequential walk“ ermöglichen. Dieser beschreibt den Transfer der Magnetisierung entlang des Proteinrückgrats. Hierzu werden häufig NC-Korrelationsexperimente mit ¹³C-¹³C-Mischungsblöcken zu NCC-Experimenten kombiniert. Eine ausführliche Beschreibung der für einen effizienten „sequential walk“ benötigten NCC-Experimente findet man z. B. bei Schütz *et al.*¹¹. Für den „sequential walk“ werden üblicherweise zunächst ¹⁵N-chemische Verschiebungen einer Aminosäure (i) in NCαCX- oder NCαCβ-Experimenten zugeordnet. In einem weiteren Experiment, üblicherweise NCOCX oder NCOCXα, werden dann diese ¹⁵N_i-chemischen Verschiebungen mit den ¹³C-chemischen Verschiebungen der im Protein jeweils vorherigen Aminosäure (i-1) verknüpft. Für kleine Proteine bis zu ca. 40 Aminosäuren können hierfür 2D Spektren ausreichend sein. Für Proteine mit höherem Molekulargewicht ist hingegen die Aufnahme von 3D Spektren in Kombination mit vereinfachenden Isotopenmarkierungsschemata notwendig.

Experimente für die Bestimmung von heteronuklearen Abständen basieren ebenfalls auf heteronuklearen dipolaren Kopplungen (z. B. REDOR¹²).

1.1.1 DNP-NMR-Spektroskopie

„Dynamic nuclear polarization“ (DNP) ist eine leistungsstarke Methode, um die Sensitivität in der NMR-Spektroskopie zu erhöhen. Dazu werden ungepaarte Elektronen durch die kontinuierliche Einstrahlung von hochenergetischer Mikrowellenstrahlung angeregt und die Magnetisierung anschließend auf die Atomkerne in der unmittelbaren Umgebung übertragen. Das Konzept wurde im Jahr 1953 von Overhauser¹³ vorgeschlagen und danach durch Carver und Slichter¹⁴ experimentell in einem statischen Magnetfeld von 3 mT für Lithium verifiziert. Diese Experimente basierten auf dem Overhauser Effekt, der jedoch nur bei niedrigen Magnetfeldern und für Systeme mit mobilen Elektronen oder Flüssigkeiten effektiv ist.¹⁵ Zusätzlich gibt es noch drei weitere Mechanismen für den Polarisierungstransfer von ungepaarten Elektronen auf benachbarte Kernspins: den „Solid Effect“, den „Cross Effect“ und das „Thermal Mixing“.¹⁵ Der „Cross Effect“ ist momentan der am häufigsten verwendete Transfermechanismus in der Festkörper-DNP-NMR-

Spektroskopie. Er basiert auf einem drei-Spin Prozess von zwei stark dipolar gekoppelten Elektronen und einem Kern.¹⁵

Die initiale Hyperpolarisation findet normalerweise bei kryogenen Temperaturen statt (~100 K), um die Relaxationsprozesse zu optimieren. Als Elektronenquelle werden üblicherweise stabile Nitroxid-Biradikale, wie z. B. TOTAPOL¹⁶ verwendet. Zur Verhinderung der Eiskristallbildung wird der Probe zusätzlich Glycerin als Kryoprotektant zugefügt.¹⁷

Die Signalverstärkung durch DNP ist proportional zum Quotienten aus dem gyromagnetischen Verhältnis der Elektronen (γ_e) und dem der Kernspins (γ_I).¹⁸ Somit ist für Protonen theoretisch eine Signalverstärkung von $\epsilon = (\gamma_e / \gamma_I) = 660$ möglich.¹⁸ In der Praxis wird jedoch eher eine Signalverstärkung von $\epsilon = 100 - 200$ für Modellverbindungen und von $\epsilon = 40 - 50$ für Proteine erreicht.¹⁸

Die DNP-NMR-Spektroskopie ermöglicht die Untersuchung von Proteinen in geringen Konzentrationen, deren Untersuchung in angemessener Zeit ohne DNP nicht möglich wäre.¹⁸

1.1.2 Probenanforderungen und Isotopenmarkierung

Die Probenherstellung ist ein wichtiger Punkt für den Erfolg der Festkörper-NMR-Untersuchung von Membranproteinen. Es werden mehrere Milligramm ¹³C- und ¹⁵N-isotopenmarkiertes Protein benötigt.¹⁹ Zudem muss sich das nativ gefaltete Protein in einer Umgebung befinden, in der es über Wochen bis Monate, die für Festkörper-NMR-Experimente benötigt werden, stabil ist.² Da das Volumen der für die Festkörper-NMR-Spektroskopie verwendeten Rotoren begrenzt ist, ist es aufgrund der naturgemäß niedrigen Sensitivität der NMR-Spektroskopie häufig notwendig, ein möglichst hohes Protein-zu-Lipid Verhältnis zu wählen.² Zudem sollte die Probe strukturell homogen sein, um eine hohe spektrale Auflösung zu erreichen.²

Die heterologe rekombinante Expression in *Escherichia coli* ist das am häufigsten verwendete Verfahren für die Isotopenmarkierung von Proteinen für die Festkörper-NMR Analyse.¹⁹ Vorteile sind die große Anzahl an verfügbaren Klonierungsplasmiden, mutierten Wirtsstämmen und Kulturmedien. Zudem ist es ein kosteneffektives System mit schnellen Wachstumsraten und üblicherweise hohen Ausbeuten.¹⁹ Es bietet die Möglichkeit, verschiedene Isotopenmarkierungsschemata zu verwenden, die auf die Größe des Proteins und die gewünschten Informationen abgestimmt sind.²⁰

Uniforme ¹³C-, ¹⁵N-Isotopenmarkierung ist die am häufigsten verwendete und einfachste Markierungsmethode.¹⁹ Sie wird durch die Expression des Zielproteins in Minimalmedium, dem ¹³C-Glukose als alleinige Kohlenstoffquelle und ¹⁵N-Ammoniumchlorid als alleinige Stickstoffquelle hinzugefügt werden, erreicht.

Für größere Proteine ist eine Verringerung der spektralen Signaldichte für die Zuordnung der einzelnen Signale notwendig.¹⁹ Eine Methode hierfür ist die reverse Isotopenmarkierung.^{21,22} Dabei werden einige unmarkierte Aminosäuretypen zum

^{13}C -, ^{15}N -isotopenmarkierten Minimalmedium zugefügt. Dies führt in erster Linie zur ^{13}C -, ^{15}N -Isotopenmarkierung in den nicht hinzugefügten Aminosäuren, da *E. coli* bevorzugt vollständige Aminosäuren in das Protein einbaut.

1.2 Membransysteme

1.2.1 Biologische Membranen

Hauptbestandteile der Biomembranen sind Lipide und Proteine. Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell²³ von Singer *et al.* aus dem Jahr 1972 bestehen sie aus einer flüssig-kristallinen Lipiddoppelschicht, in der sich integrale Membranproteine und Lipide lateral frei bewegen können. Dieses Modell gilt mittlerweile als überholt, da Membranen wesentlich mehr Proteine enthalten als zunächst angenommen und die laterale Diffusion durch Wechselwirkung der Membrankomponenten untereinander bzw. sterische Gründe eingeschränkt ist.^{24,25} Die transversale Diffusion, der sogenannte Flip-Flop Austausch von Lipiden zwischen den beiden Schichten der Lipiddoppelschichten, benötigt mehrere Stunden.²⁶ In biologischen Membranen wird dieser Austausch durch Transportproteine (Flippasen, Floppasen und Scramblasen) erleichtert.²⁷

Lipiddoppelschichten bilden sich aus amphiphilen Lipiden in polaren Lösungsmitteln.²⁶ Dabei zeigen die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide nach außen und die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten in das Innere der Lipiddoppelschicht.²⁶ Lipiddoppelschichten werden durch hydrophobe Wechselwirkungen, van-der-Waals Wechselwirkungen, elektrostatische Anziehungskräfte und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert.²⁶ Cholesterin kann durch sein rigides Ringsystem und seine Fähigkeit, Zwischenräume auszufüllen, die Fluidität der Membran beeinflussen.²⁸

In Eukaryoten gibt es mehr als tausend verschiedene Lipide.²⁹ Die am häufigsten in eukaryotischen Membranen vorkommenden Lipide sind Glycerophospholipide, wie zum Beispiel die Phosphatidylcholine.²⁹

1.2.2 Phasenzustand von Lipiddoppelschichten

Lipiddoppelschichten können in Abhängigkeit von Temperatur und Hydratation unterschiedliche Phasen einnehmen.³⁰ Die lamellare flüssig-kristalline Phase $L\alpha$, die lamellaren Gelphasen $P\beta'$ und $L\beta'$ und die lamellare kristalline Phase Lc .³⁰ Der Übergang von der $P\beta'$ -Phase in die $L\alpha$ -Phase wird als Hauptphasenübergang bezeichnet.³⁰ Dieser ist für jede Lipiddoppelschicht charakteristisch und hängt von der Lipidzusammensetzung ab.³⁰ Die Hauptphasenübergangstemperatur erhöht sich je länger die Fettsäureketten sind und je höher der Anteil an gesättigten Fettsäuren ist.

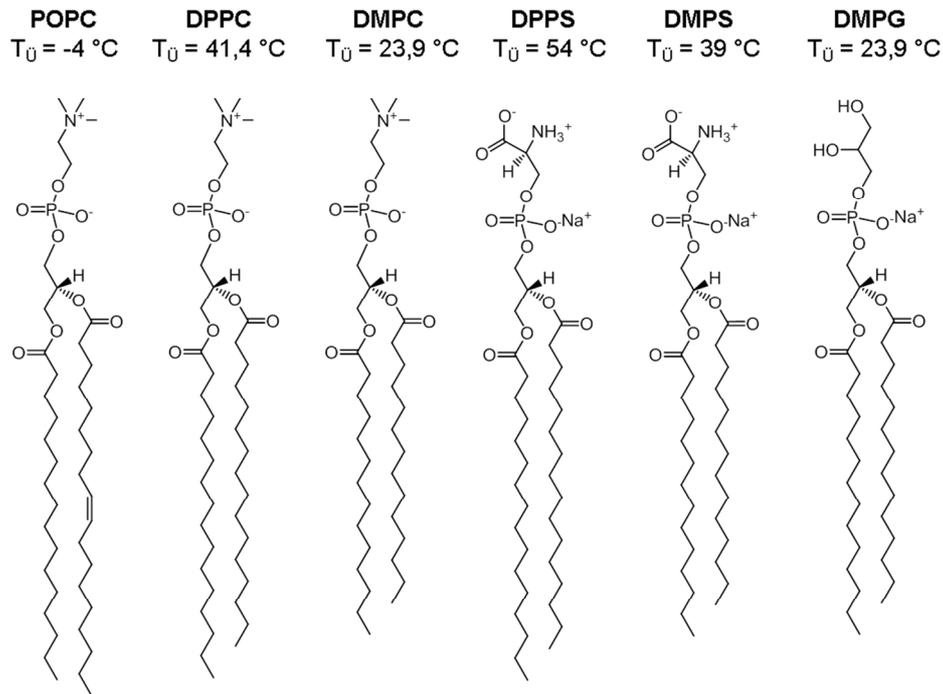


Abb. 1: Strukturformeln und Hauptphasenübergangstemperaturen ($T_{\bar{U}}$) in Überschusswasser der in dieser Arbeit verwendeten Lipide.³⁰

1.2.3 Modellmembranen

Modellmembranen ermöglichen die Untersuchung von Membranproteinen oder Membran-assoziierten Proteinen außerhalb ihrer natürlichen zellulären Umgebung. Die am häufigsten verwendete Methode, um die dreidimensionale Struktur von Membranproteinen in wässriger Lösung zu untersuchen, ist die Verwendung von Mizellen bestehend aus Detergenzien.³¹ Diese bewahren jedoch aufgrund der fehlenden Lipiddoppelschicht und der Limitierung in der Größe möglicherweise nicht die strukturelle und dynamische Integrität der Membranproteine unter physiologischen Bedingungen.³² Daher wurden verschiedene Modellmembransysteme entwickelt, die aus Lipiddoppelschichten aufgebaut sind. Dies sind unter anderem Liposomen, Bizellen, Nanodiscs und die relativ neuen Lipodisqs.³¹

Liposomen

Liposomen sind kleine kugelförmige Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 30 nm bis zu mehreren Mikrometern.³³ Sie bestehen aus einer oder mehreren hydratisierten Lipiddoppelschichten und Wasser bzw. Puffer.³³ Sie lassen sich in multilamellare (MLV) und unilamellare Vesikel unterteilen.³³ Unilamellare Vesikel werden wiederum in große unilamellare Vesikel (LUV) mit einem Durchmesser von ca. 100 nm und kleine unilamellare Vesikel (SUV) mit einem Durchmesser von ca. 30 nm unterteilt.^{33,34} LUV können durch Extrusion durch spezielle Kernspurfilter aus Polycarbonat und SUV durch Ultraschallbehandlung von Lipiddispersionen in Wasser hergestellt werden.³⁴ Liposomen ermöglichen eine auf das zu untersuchende Protein abgestimmte Wahl der

Lipidzusammensetzung und stellen eine naturnahe lokale Umgebung für das Membranprotein dar.³⁴

1.3 Das integrale Membranprotein VpU aus HIV-1

Die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) kann unbehandelt zur Entwicklung des „Acquired Immune Deficiency Syndrome“ (AIDS) führen. Im Jahr 2015 waren weltweit ca. 37 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert.³⁵ Durch die lebenslange Behandlung mit antiviralen Medikamenten kann die Ausbreitung des Virus im Körper und die Entwicklung des AIDS verhindert werden, allerdings ist es bisher nicht möglich, das Virus zu eliminieren.³⁶

Im Genom des HIV-1 sind die akzessorischen Proteine „Viral Infectivity Factor“ (Vif), „Negative Regulatory Factor“ (Nef), Virales Protein U (VpU) und Virales Protein R (VpR) kodiert, die für die Umgehung der Immunantwort des Wirts und die Ausbreitung des Virus eine wichtige Rolle spielen.³⁷ VpU ist ein 81 Aminosäuren langes Typ-1 integrales Membranprotein. Es besteht aus einer kurzen extrazellulären Region, einer Transmembranhelix und zwei zytoplasmatischen α -Helices.³⁸ VpU induziert die Herabregulierung von neu synthetisierten CD4-Rezeptoren („Cluster of Differentiation 4“) im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch Induktion des protosomalen CD4 Abbaus.³⁷ Dies verhindert die Bindung des CD4-Rezeptors an das virale „Envelope Precursor“ Protein gp160 und erhöht so die virale Infektiosität.³⁷ Weiterhin unterstützt VpU die Freisetzung von neu gebildeten viralen Partikeln durch Neutralisation des Restriktionsfaktors „Bone Marrow Stromal Antigene 2“ (BST-2), auch Tetherin genannt. In Abwesenheit von VpU immobilisiert BST-2 virale Partikel an der Oberfläche der infizierten Zelle und verhindert dadurch deren Freisetzung.³⁷ VpU induziert zudem die Herabregulierung des natürlichen Killer-T- und B-Zellen Antigen (NTB-A)-Rezeptors der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) von der Zelloberfläche und verhindert so die Degranulation und Lyse von HIV-infizierten NK-Zellen.³⁹ Außerdem verringert es durch die Herabregulation des CC-Chemokinrezeptors 7 (CCR7) von der Zelloberfläche die Möglichkeit der CD4+ T-Zellen, in die Lymphknoten zu migrieren, wo die adaptive Immunreaktion ausgelöst wird.⁴⁰ Zur Erfüllung der zuvor genannten Funktionen interagiert VpU mit den Transmembranproteinen CD4, BST-2, NTB-A und CCR7.³⁸

1.4 Nitrophorine

Die Raubwanze *Rhodnius prolixus* ist ein wichtiger Überträger der Chagas-Krankheit, eine der weltweit am stärksten verbreiteten tödlichen Krankheiten, die durch ein blutsaugendes Insekt übertragen werden.⁴¹ Das Insekt überträgt den Parasit *Trypanosoma cruzi*, der im Darm des Insekts lebt, durch die Darmentleerung an der Bissstelle.⁴¹ Im Jahr 2004 wurden von der Weltgesundheitsorganisation 15000 Todesfälle pro Jahr durch diese Krankheit berichtet. Die meisten Krankheitsfälle treten in Süd- und Zentralamerika auf, sowie in den südlichen Staaten von Nordamerika.⁴¹ Dieser Umstand führte zur detaillierten

Untersuchung der biologischen und physiologischen Prozesse der Vektor-Wirt Interaktionen.⁴¹

Nitrophorine werden in den Endothelzellen der Speicheldrüsen von *Rhodnius prolixus* mit einem N-terminalen Signalpeptid exprimiert und sekretiert bevor das Signalpeptid abgespalten wird.⁴¹ Dann wird der Häm *b* Kofaktor durch eine Nitroxid (NO)-Synthase mit NO beladen.⁴¹ Bei niedrigem pH-Wert im Speichel des Insekts (pH-Wert von 5 - 6) bleibt der Fe(III)NO-Komplex über längere Zeiten stabil.^{42,43} Die Injektion der Nitrophorine (NP) in das Gewebe des Opfers führt zu einem drastischen Anstieg des pH-Wertes auf $\sim 7,4$ im Blutplasma.⁴² Dadurch wird die Affinität der Fe(III)-Ionen für NO um 1 - 2 Größenordnungen reduziert, was zusammen mit der starken Verdünnung des Proteins (um ca. den Faktor 100 im Gewebe, im Blutstrom jedoch noch größer) dazu führt, dass NO freigesetzt wird.^{41,42,44} NO dissoziiert von der NP Bindestelle und diffundiert durch das Gewebe zu nahegelegenen Kapillaren und führt dort zur Vasodilatation.⁴³ Zeitgleich binden die NPs Histamin, das von den Mastzellen als Folge der Immunsystem Aktivierung freigesetzt wird, so dass die Immunsystemantwort verzögert wird.⁴² NPs sind außerdem dazu in der Lage, NO aus NO₂ herzustellen.⁴⁵

Nitroxid wurde 1992 von dem Journal Science als das Molekül des Jahres ausgewählt, nachdem von Ignarro, Furchgott und Murad, die im Jahr 1998 zusammen den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin verliehen bekommen haben, gezeigt wurde, dass es ein zentrales Signalmolekül im kardiovaskulären System ist.⁴⁶⁻⁴⁹ Die Verabreichung von Nitroxid als pharmakologisch aktives Molekül ist von großem Interesse für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen und Krebs.⁵⁰ Allerdings ist das Signalmolekül im Blutplasma sehr instabil, die Halbwertszeit beträgt nur $t_{1/2} \approx 100$ ms.⁵¹ Daher ist das Verständnis der strukturellen und dynamischen Aspekte des Nitroxidtransports und dessen Speicherung durch Nitrophorine, als natürlich vorkommendes System, von großer Bedeutung und einer der Hauptgründe für ihre detaillierte Untersuchung.^{50,51}

Im Erwachsenenstadium der Raubwanze *Rhodnius prolixus* befinden sich mindestens vier NPs (NP1 - 4) im Speichel.^{42,43} Diese wurden aus den Speicheldrüsen des Insekts isoliert.⁴² Zwei weitere NPs (NP5 - 6) wurden hauptsächlich im fünften Nymphen Entwicklungsstadium des Insekts identifiziert.⁴³ Ein anderes NP (NP7) wurde in einer cDNA Bibliothek, die aus den Speicheldrüsen des Insekts im fünften Nymphen Entwicklungsstadium erzeugt wurde, entdeckt und dann rekombinant exprimiert.^{42,43}

Die räumliche Struktur der Nitrophorine besteht hauptsächlich aus einem achtsträngigen antiparallelen β -Faltblatt (A - H) mit einem zentralen Hohlraum, der den Häm-Kofaktor enthält, und wird daher als Faltung des Lipocalin-Typs klassifiziert (vgl. Abb. 2A).⁴² Ein weiteres strukturelles Merkmal der Lipocalin-Faltung ist das Vorhandensein von Disulfidbrücken.⁵² Hiervon besitzen die Nitrophorine zwei, deren Position unter den Nitrophorinen sehr ähnlich ist.⁵⁰ Das Fe(III) des Häm-Kofaktors ist durch die Koordination an die Aminosäure Histidin an das Protein gebunden.^{42,52} Die sechste Bindestelle des Eisens ist frei und ermöglicht die Bindung von kleinen Liganden wie NO, CN-, NH₃ oder Histamin.⁴² Für die Funktion der Nitrophorine als NO-Transporter ist es wichtig, dass das Eisen in der Oxidationsstufe III erhalten bleibt. So bleibt die Affinität des Eisens zu NO

gering genug, um die Freisetzung im Blut des Wirtes zu ermöglichen.⁴² Dies gelingt durch die elektrostatische Stabilisierung und durch die Deformierung des Häm-Kofaktors.⁴² Der Häm-Kofaktor kann in zwei Orientierungen (A und B) in dem Hohlraum der Nitrophorine binden (vgl. Abb. 2B). In NP7 wird der Häm-Kofaktor durch die unter den Nitrophorinen einzigartige Aminosäure E27 in der A-Orientierung stabilisiert. (In den NP7 Kristallstrukturen ist allerdings aufgrund der Zugabe von Additiven der Häm-Kofaktor teilweise auch in der B Orientierung zu finden.⁵⁰) In den anderen Nitrophorinen ist ein Valin an dieser Position zu finden.^{41,53,54} Molekulardynamik-Simulationen und die Analyse der Kristallstrukturen von NP2 und NP4 weisen darauf hin, dass die AB- und GH-Schleifen (vgl. Abb. 2) die hauptsächlichen strukturellen Motive sind, die die pH-Wert abhängige Freisetzung von NO in Nitrophorinen ermöglichen.⁵⁵ Beide Schleifen flankieren die Öffnung der Häm-Tasche.⁵⁵ Sie verschließen die Tasche bei niedrigem pH-Wert (pH-Wert von 5 - 6) und weisen eine höhere Flexibilität bei höherem pH-Wert (pH-Wert von ca. 7,4) auf, wodurch eine Freisetzung des gebundenen NOs ermöglicht wird.⁵⁵ Es finden sich diverse Kristallstrukturen von NP1, NP2 und NP4 mit verschiedenen Liganden in der Protein Datenbank (PDB).³ Im Jahr 2012 wurden erstmals Konditionen für die Kristallisation von NP7 beschrieben.⁵² Im Jahr 2015 wurden dann Kristallstrukturen von NP7 ohne Ligand bei den pH-Werten 5,8 (PDB: 4XMC) und 7,8 (PDB: 4XMD) und mit den Liganden NO (PDB: 4XME), Histamin (PDB: 4XMF) und Imidazol (PDB: 4XMG) bei dem pH-Wert 7,8 veröffentlicht.⁵⁰

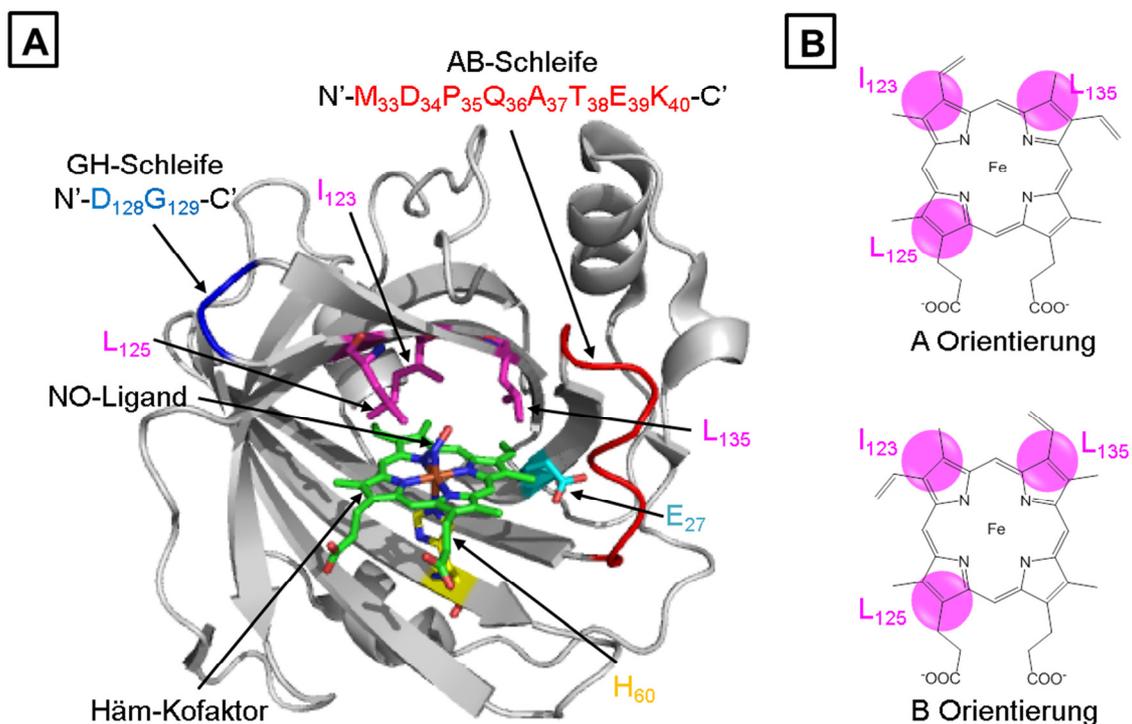


Abb. 2: A: Kristallstruktur von NP7 mit dem Liganden NO bei pH 7,8 (PDB: 4XME). B: Mögliche Häm *b* Orientierungen in der NP7 Bindetasche.

A: AB-Schleife (rot), GH-Schleife (blau), Häm-Kofaktor (grün), Histidin 60 (gelb), Glutaminsäure 27 (cyan), Isoleucin 123, Leucin 125 und Leucin 135 (pink). B: Die Häm *b*-Bindetasche von NP7 ist durch pinke Kreise angedeutet, die die Positionen der drei aliphatischen Seitenketten der Aminosäuren angeben, deren Seitenketten von der Oberseite der Bindetasche auf die Häm-Ebene zeigen.⁵⁰

Nitrophorin 7

Nitrophorin 7 besteht aus 185 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 21 kDa. Die NP7-Sequenz zeigt eine Übereinstimmung mit der Sequenz von NP1 von 41 %, mit der von NP2 von 60 %, mit der von NP3 von 61 % und mit der von NP4 von 42 %.^{43,55} NP7 unterscheidet sich von den anderen Nitrophorinen hauptsächlich durch die Fähigkeit mit negativ geladenen Oberflächen zu interagieren und durch einen um drei Aminosäuren (L1-P2-G3) verlängerten N-Terminus.⁴²

Vergleiche des NP7s mit der NP7(Δ 1-3) Mutante haben gezeigt, dass die drei zusätzlichen N-terminalen Aminosäurereste einen großen Effekt auf die thermodynamischen und kinetischen Parameter der Bindung von NO an das Fe(III) von NP7 haben. Dies deutet auf eine wichtige Funktion dieser zusätzlichen Aminosäuren in der Modulation der biologischen Funktion von NP7 hin.⁴²

Phospholipid-Flippasen sorgen für die Aufrechterhaltung der Membranasymmetrie, aufgrund derer sich anionische Phospholipide, insbesondere Phosphatidylserin (PS), hauptsächlich in der inneren Schicht der Lipiddoppelschicht ansammeln.⁵⁶ Aktivierungsprozesse ausgelöst durch Kollagen oder Thrombin führen zum Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und einem Verlust der Membranasymmetrie durch die Runterregulierung der Phospholipid-Flippasen und die Aktivierung der Phospholipid Scramblasen.⁵⁶ Dadurch tritt in aktivierten Blutplättchen und Mastzellen PS gehäuft auf der äußeren Oberfläche auf.^{41,43} Dies ermöglicht die Bindung von NP7 an diese aktivierten Oberflächen, während die anderen Nitrophorine von der Bissstelle wegdiffundieren und NO über eine größere Region freisetzen.⁴³ Es wurde vermutet, dass der zielgerichtete Transport von NO zu aktivierten Oberflächen an der Bissstelle die Aktivität von NP7 als Blutplättchen-Aggregationsinhibitor erhöhen könnte.⁴³ Eine weitere Funktion von NP7 ist die Inhibition der Prothrombin Aktivierung durch die Verhinderung der Bindung des Prothrombinase-Komplexes an die Lipide der Vesikel und aktivierten Blutplättchen.⁵⁶

NP7 weist einen wesentlich höheren Isoelektrischen Punkt (pI) von 9,2 verglichen mit den anderen Nitrophorinen (pI = 6,1 - 6,5) auf.⁵⁰ Dieser kommt dadurch zustande, dass unter den 185 Aminosäuren, aus denen das Protein aufgebaut ist, 27 Lysine zu finden sind.⁵⁰ Diese gruppieren sich überwiegend an der Proteinoberfläche, die der Häm-Tasche gegenüberliegt.⁵⁰ Dies ist in Abb. 3 in der dreidimensionalen Kristallstruktur von NP7 (PDB: 4XME) von Knipp *et al.*, gezeigt.⁵⁰ Es wurde vermutet, dass die hohe Affinität (4,8 nM) von NP7 zu negativ geladenen Phospholipid-Membranen durch die Gruppierung der positiv geladenen Lysinseitenketten vermittelt wird.⁵⁰ Zudem wurde gezeigt, dass die Bindung an die Phospholipide relativ unspezifisch ist, da diese unabhängig von der Kopfgruppe der Lipide ist und nur durch deren negative Ladung zustande kommt.⁴³ Durch den Vergleich der elektrostatischen Oberfläche eines Modells von NP7 (erstellt mit dem Swiss-Modell Server basierend auf einer Kristallstruktur von NP2) mit denen der anderen Nitrophorine wurde die außerhalb der Lipocalin-Faltblattstruktur liegende Helix- α 1 als mutmaßliche Membran-Bindestelle ermittelt (vgl. Abb. 3).⁵⁶ Diese enthält fünf Lysinreste, deren Seitenketten in Richtung des Lösungsmittels zeigen. Das vorgeschlagene Membranbindungsmodell wurde durch eine Liposomen-Bindungsstudie mit einer

NP7-Mutatante NP7(K149A) unterstützt, die in Folge der K → A Mutation eine um den Faktor 3 verringerte Bindungsaffinität zu 3 : 1 PC / PS-Vesikeln aufwies.⁵⁶

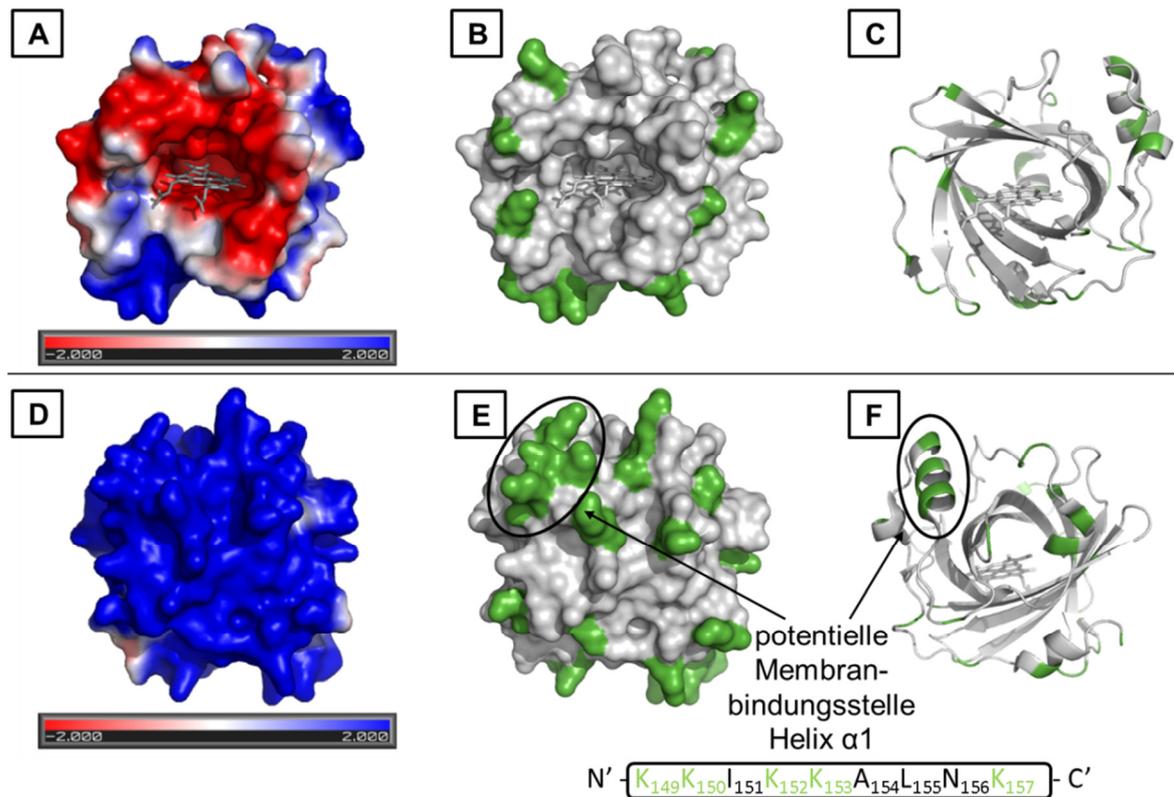


Abb. 3: Elektrostatische Oberfläche von NP7 und Verteilung der Lysine im Protein mit Markierung der potentiellen Membranbindungsstelle.

Elektrostatische Oberfläche (rot = negativ, blau = positiv) der Kristallstruktur von NP7 (PDB: 4XME) (A, D). Strukturmodell der Kristallstruktur von NP7 in der Oberflächendarstellung (B, E) und in der Bänderdarstellung (C, F) mit Hervorhebung der Lysine (grün). Vorder- (A - C) und Rückansicht (D - F).

Im Gegensatz zu der Oberfläche mit dem positiven Ladungspotential auf der einen Seite des Proteins weist die Seite mit der Häm-Tasche ein negatives Ladungspotential auf, so dass die Oberfläche des Proteins insgesamt eine bipolaren Ladungsverteilung zeigt (vgl. Abb. 3).⁵⁰ Es wurde gezeigt, dass NP7 aufgrund der bipolare Ladungsverteilung in höheren Konzentrationen (1 - 2 mM) zur Aggregation neigt.^{41,57} Dies wurde durch eine „head-to-tail“-Anordnung der einzelnen NP7 Moleküle im Kristallgitter bestätigt.⁵⁰ Zudem wurde gezeigt, dass Liposomen, bestehend aus 25 % negativ geladenen Lipiden, ebenfalls in Gegenwart von NP7 aggregieren.⁴³

Obwohl die Ladungsverteilung auf der Oberfläche der Kristallstruktur nur auf die Existenz einer Bindestelle für negativ geladene Oberflächen hindeutet, wurde die Existenz einer zweiten Bindestelle vermutet.⁴³ Diese könnte die verknüpfenden Eigenschaften von NP7, die zur Aggregation der Liposomen führten, besser erklären.⁴³ Biphaseische Bindungskinetiken für die Bindung von NP7 an PC / PS-Liposomen (K_D -Werte von 4,8 und 755 nM) unterstützten diese Hypothese.⁴³

Wie zuvor bereits beschrieben, setzen die Nitrophorine in Folge der Erhöhung des pH-Wertes *in vivo* NO frei. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die

Assoziationskonstante von NP7 besonders stark pH-abhängig ist. Sie ändert sich im pH-Wert Bereich von 5,5 bis 7,5 um 3 Größenordnungen ($K_{\text{eq}}^{\text{III}}(\text{NO}) > 10^9 \text{ M}^{-1}$ (pH 5,5) vs. $K_{\text{eq}}^{\text{III}}(\text{NO}) = 4 * 10^6 \text{ M}^{-1}$ (pH 7,5)), wohingegen sich diejenigen von NP1 - 4 nur um je 1 Größenordnung ändern.^{41,50} Es konnte allerdings keine signifikante Konformationsänderung in den NP7 Kristallstrukturen bei unterschiedlichen pH-Werten festgestellt werden.⁵⁰ Es wurde vermutet, dass dies auf eine reduzierte konformationelle Flexibilität der AB-Schleife aufgrund der Kristallpackung und der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen im Kristallgitter zurückzuführen sein könnte.⁵⁰

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Zum besseren Verständnis der vielfältigen Funktionen des Transmembranproteins VpU in der HIV-1 Infektion ist die strukturelle Untersuchung des Proteins von großer Bedeutung. Zur Untersuchung von Membranproteinen in naturnaher Umgebung eignen sich insbesondere Festkörper- und DNP-NMR-Spektroskopie. In dieser Arbeit wurde die Herstellung von VpU optimiert, um ausreichende Mengen des Proteins für spektroskopische Untersuchungen zu erhalten. Zudem wurden erste DNP-NMR-Spektren des Proteins in Liposomen aufgenommen.

In einem zweiten Projekt wurde die Interaktion von NP7 mit Membranen strukturell untersucht. Weiter oben wurden die bereits vorhandenen Kristallstrukturen von NP7 vorgestellt. Mit Röntgenstrukturanalyse ist es nicht möglich, die Interaktion von NP7 mit Membranen zu charakterisieren, da membrangebundene Proteine nicht mit Lipiddoppelschichten gemeinsam kristallisiert werden können. Die Tendenz von NP7, in höheren Konzentrationen Oligomere und unlösliche Aggregate zu bilden, erschwert die Untersuchung von NP7 mit Flüssig-NMR-Spektroskopie. Aggregation verlangsamt Rotationsdiffusionsbewegungen und führt zur Linienverbreiterung und verkürzten T_2 -Relaxationszeiten.⁵⁷ Daher wurde die Festkörper-NMR-Spektroskopie für die Untersuchung der NP7-Membran Interaktion gewählt. In dieser Arbeit wurde isotoopenmarkiertes NP7 hergestellt und an Liposomen gebunden. Freies und an Liposomen gebundenes NP7 wurde dann zunächst mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Anschließend erfolgte die Resonanzzuordnung in den aufgenommenen Festkörper-NMR-Spektren und der Vergleich dieser mit einer NP7 Kristallstruktur. Schließlich wurden die Spektren von freiem und an Liposomen gebundenem NP7 miteinander verglichen, um Hinweise auf den Einfluss der Membranbindung von NP7 auf dessen Struktur zu erhalten.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Genotyp und Referenz der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B (r_B-m_B-) gal dcm</i> (DE3)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> BL21(DE3)T1 ^R	F- <i>ompT hsdS_B (r_B-m_B-) gal dcmλ tonA</i> (DE3)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>E. coli</i> C43(DE3)	F- <i>omp ThsdS_B (r_B- m_B-) gal dcm</i> (DE3)	Miroux, B. <i>et al.</i> ⁵⁸
<i>E. coli</i> Mach1 T1 ^R	F- ϕ 80 (<i>lacZ</i>) Δ M15 Δ <i>lacX74 hsdR (r_K- m_K+) Δ<i>recA1398 endA1 tonA</i></i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B (r_B- m_B-) gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)pLysS	F- <i>ompT hsdS_B (r_B- m_B-) gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE2 (Cam ^R)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B (r_B- m_B-) gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Novagen, Darmstadt, Deutschland

2.2 Verwendete Kulturmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
TB-Medium	12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml/l Glycerin, 10 % (v/v) 1M KHPO ₄ (pH 7,5)
SOB-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glukose
LB-Agarplatten	10 g/l Trypton, 5 g/l (w/v) Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 20 g/l Agar
M9-Medium	0,2 % (v/v) TS2-Spurenelemente, 5 µg/ml Thiaminhydrochlorid, 1 % (v/v) Vitamincocktail, 2 g/l Glukose, 8,3 g/l NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O, 3 g/l KH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O, 0,5 g/l NaCl, 1 g/l NH ₄ Cl, 100 µM CaCl ₂ , 2 mM MgSO ₄ , 10 µM Eisen(III)citrat
Vitamincocktail	1 g/l d-Biotin, 1 g/l Folsäure, 1 g/l Cholinchlorid, 1 g/l Nicotinamid, 1 g/l Natrium-D-pathothenat, 1 g/l Pyridoxalhydrochlorid, 0,1 g/l Riboflavin
TS2-Spurenelemente	30 mg/l MnCl ₂ x 4 H ₂ O, 100 mg/l ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, 300 mg/l H ₃ BO ₃ , 200 mg/l CoCl ₂ x 6 H ₂ O, 20 mg/l NiCl ₂ x 6 H ₂ O, 10 mg/l CuCl ₂ x 2 H ₂ O, 900 mg/l Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O, 20 mg/l NaSeO ₃
M9-Medium aus Varghese <i>et al.</i> ⁵⁷	0,2 % (v/v) TS2-Spurenelemente, 2 g/l Glukose, 8,3 g/l NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O, 3 g/l KH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O, 0,5 g/l NaCl, 1 g/l NH ₄ Cl, 800 µM CaCl ₂ , 8 mM MgSO ₄ , 0,01 % (v/v) Hefeextrakt, 1 ml/l 100xBME Vitamins (Sigma), 5 mg/l (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ +7H ₂ O

2.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 3 aufgelistet.

Tab. 3: Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Antibiotikaresistenz	Quelle
pET15b_kombi-PreScission	Amp	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pTKK19xb/ub_ubi_fVpU	Kan	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pMAT_Ubi-fVpU	Amp	Invitrogen, Carlsbad, USA
pET41b_Ubi-fVpU	Kan	Eigene Arbeit
pET28a_NP7	Kan	Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion, Mülheim

3 Methoden

3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diente zur analytischen Auftrennung von Proteingemischen. Es wurden 15%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Gel mit Lämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde der Größenmarker „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ (Thermo Scientific) mit aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit 40 mA für 45 min im SDS-Laufpuffer durchgeführt. Die Proteine wurden durch Anfärben in Coomassie Färbelösung bei 60 °C für 30 min sichtbar gemacht. Die SDS-Gele wurden anschließend mit kochendem Wasser entfärbt, bis deutliche Banden sichtbar wurden.

Tab. 4: Komponenten für die SDS-PAGE.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Sammelgel 5%	4,85 % (w/v) Acrylamid, 0,15 % (w/v) N,N'-Methyldisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Trenngel 15 %	14,55 % (w/v) Acrylamid, 0,45 % (w/v) N,N'-Methyldisacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Coomassie Färbelösung	25 % (v/v) Isopropanol, 1 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
4x Lämmli-Puffer	40 % (v/v) Glycerin, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau Na-Salz, 8 % (v/v) SDS, 225 mM Tris, 8 % (v/v) β -Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

3.2 Western Blot

Mit dem Western Blot werden Proteingemische gelelektrophoretisch getrennt, auf eine Membran überführt und mit Hilfe von spezifisch bindenden Antikörpern detektiert. Dazu wurde zunächst eine SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.1) durchgeführt. In diesem Fall wurde der Größenmarker „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific) verwendet. Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran erfolgte in einer Semidry-Blot Kammer (Trans-Blot Turbo). Hierzu wurden auf die Anode des Geräts zunächst drei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1, aufgebracht. Auf diese wurden drei weitere Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 2 gelegt. Auf die Whatman-Papiere wurde die PVDF-Membran gelegt, welche zuvor für 30 s in Methanol aktiviert, für 5 min in Wasser gewaschen und für 5 min in Kathodenpuffer 2 inkubiert wurde. Danach wurde das Gel oben auf die Membran gelegt. Anschließend folgten drei weitere Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer. Abschließend folgt die Kathode selbst. Der Transfer auf die Membran erfolgte bei 100 mA für 45 min. Anschließend wurde die Membran 1 h in TBS-Puffer mit 2 % Milchpulver inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran 3 x 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper „penta His anti mouse“ (Qiagen), zur Detektion von Proteinen mit His-Tag, erfolgte in einer Verdünnung von 1 : 2000 in TBS-T-Puffer bei 4 °C über Nacht. Anschließend erfolgten wieder drei

Waschschritte mit TBS-T-Puffer für je 5 min. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper „immunopure goat anti mouse, HRP“ (Thermo Fisher Scientific) in einer Verdünnung von 1 : 5000 in TBS-T-Puffer bei Raumtemperatur für 2,5 h. Danach erfolgten wieder drei Waschschritte mit TBS-T-Puffer für je 5 min. Für die Signaldetektion mittels Chemilumineszens wurden je 1 ml Peroxid-Lösung und Luminol-Lösung des „Super Signal Detektion Kit“ (Pierce) miteinander vermischt und auf die Membran gegeben und 5 min inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszens erfolgte mit der GelDoc2000.

Tab. 5: Puffer für den Western Blot.

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer 1	300 mM Tris, 10 % (v/v) Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer 2	25 mM Tris, 10 % (v/v) Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM Glycin, pH 9,4
TBS-Puffer	136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 24,7 mM Tris, pH 7,4
TBS-T-Puffer	0,1 % (v/v) Tween-20 in TBS

3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 0,8%ige Agarosegele verwendet und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Proben wurden mit 5 x DNA Ladepuffer versetzt bevor sie in die Taschen geladen wurden. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Größenmarker („GeneRuler 1 kb DNA Ladder“, Thermo Scientific) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 95 V in TAE-Puffer durchgeführt.

Tab. 6: Komponenten für die Agarose-Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris, 19 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH 8,0
0,8 % Agaroselösung	0,8 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer
5x DNA Ladepuffer	50 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylencyanol

3.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde die CaCl₂ Methode angewandt. Dazu wurden *E. coli* Zellen auf einer LB-Agarplatte vereinzelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus einer Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur in 100 ml SOC-Medium bei 37 °C und 130 rpm angezogen. Mit der Übernachtskultur wurden 150 ml SOC-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 bis 0,55 im Schüttler bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und bei 3000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem TFB-I-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder bei 3000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und das Pellet dann in 6 ml eiskaltem TFB-II-Puffer resuspendiert. Aliquots von 100 µl wurden in vorgekühlte Eppendorfgefäße pipettiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tab. 7: Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen.

Puffer	Zusammensetzung
TFB-I-Puffer	30 mM Natriumacetat, 50 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 1 M CaCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin, pH 6,0
TFB-II-Puffer	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM NaCl, 15 % (v/v) Glycerin, pH 7,0

3.5 Transformation von *E. coli* Zellen

Für die Transformation von *E. coli* Zellen wurden jeweils 100 µl Suspensionen chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Im Anschluss wurde dem Transfektionsansatz 900 µl LB-Medium zugefügt und 45 min bei 37 °C und 130 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechender Antibiotikazugabe ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.6 Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der molaren Masse der hergestellten Proteine wurde Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) verwendet. Dazu wurden jeweils 100 µl einer Proteinprobe der Konzentration von ca. 15 µM gegen hochreines Wasser dialysiert. Für die Messungen wurden der Probe 200 µl Acetonitril und 0,1 % Methansäure (Endkonzentration) zugefügt. Das Massenspektrum wurde an einer QTRAP4000 der Firma ABSciex aufgenommen. Die Probe wurde mit Fließinjektion injiziert (15 µl / min). Die Daten wurden mit der Software Analyst 1.5.1 ausgewertet. Zur Deconvolution der Daten wurde das Programm Bioanalyst 1.5 verwendet.

3.7 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Sequlab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden 600 bis 700 ng DNA und 20 pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 7 µl benötigt. Für die Sequenzierungen wurden jeweils ein Primer für den T7-Promotor und ein Primer für den T7-Terminator verwendet. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Clone Manager 9 Professional Edition.

3.8 Expression und Reinigung der PreScission Protease

Für die Expression der PreScission Protease mit N-terminalem 6 x His-Tag wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)T1^R mit dem Plasmid pET15b_kombi-PreScission transformiert (Kap. 3.5). Aus einer Einzelkolonie wurde über Nacht eine Vorkultur in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C angezogen. Diese wurde zum Animpfen von 1 l LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verwendet. Die Expressionskultur wurde bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 inkubiert und dann mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Nach 4,5 h Expression bei 37 °C und 130 rpm wurden die Zellen für 25 min bei 5000 g und 8 °C

pelletiert, mit PBS-Puffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Reinigung der Protease wurde das Zellpellet aus 1 l Expressionskultur in 40 ml Lysepuffer resuspendiert und die Zellen mit einem Branson 250 Sonifier (5 Zyklen à 35 s mit einer Pause von 1 min, Duty Cycle 50 %, Power 6) aufgeschlossen. Das Lysat wurde 1,5 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und danach bei 12000 g für 30 min bei $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu präzipitieren. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet noch einmal wie zuvor beschrieben aufgeschlossen, über Nacht inkubiert und dann auch nochmal zentrifugiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte mittels Metallaffinitätschromatographie, die auf der Affinität von Histin Seitenketten zu Ni^{2+} -NTA Agarose basiert. Dazu wurde das Säulenmaterial mit 15 Säulenvolumen (CV, „Colum Volume“) Arbeitspuffer äquilibriert und dann mit dem Überstand der ersten Zelllyse beladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch einen Waschschrift mit 10 CV 10 mM Imidazol in Arbeitspuffer von der Säule gewaschen. Dann wurde der Überstand der zweiten Zelllyse auf die Säule geladen und ebenfalls mit 10 CV 10 mM Imidazol in Arbeitspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des Proteins mit aufsteigender Imidazol Konzentration (20 mM bis 500 mM). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. PreScission Protease enthaltende Fraktionen wurden über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gegen Dialysepuffer dialysiert und anschließend bis zu ihrer Verwendung in 1 ml Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tab. 8: Puffer zur Expression und Reinigung der PreScission Protease.

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS-Puffer	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH_2PO_4 , 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,4
Lysepuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 1 Tablette Protease Inhibitor auf 50 ml Puffer, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lysozym, pH 8,0
Arbeitspuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 % (v/v) Triton X-100, pH 8,0
Dialysepuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 % (v/v) Glycerol, 10 mM EDTA, pH 7,0

3.9 Klonierung des VpU-2-Konstrukts

Für die Klonierung des VpU-2-Konstrukts wurde das pET41b-Plasmid (Novagen) ausgewählt, da pET Plasmide für *E. coli* optimierte Klonierungs- und Expressionsplasmide darstellen. Des Weiteren wurde die Thrombin-Erkennungssequenz des im ICS-6 des FZ Jülich vorhandenen VpU-1-Konstrukts (vgl. Kapitel 3.10) entfernt, da diese nicht verwendet wurde und daher nur zu einem längeren artifiziellen N-terminalen Überhang führte. Dadurch konnte der artifizielle N-terminale Überhang von 8 Aminosäuren auf 2 Aminosäuren reduziert werden. Zudem wurde die DNA-Sequenz Codon-optimiert. Das Insert wurde bei der Firma Invitrogen bestellt und in das Plasmid pMAT einkloniert erhalten (pMAT_Ubi-fVpU).

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA in ausreichenden Mengen für die Klonierung des Codon-optimierten VpU-2-Konstrukts (pET41b_Ubi-fVpU) wurde der Klonierungsstamm *E. coli* Mach1T1^R jeweils mit dem Lieferplasmid pMAT_Ubi-fVpU und dem Expressionsplasmid pET41b transformiert. Aus je einer Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ angezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits „NucleoBond Xtra Midi“ (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Die

gereinigte DNA wurde in 100 µl H₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau der beiden Plasmide mit den Restriktionsenzymen NcoI und NdeI, um das synthetische Gen Ubi-VpU-2 aus dem Lieferplasmid herauszuschneiden und das pET41b-Plasmid zu linearisieren. Für den Restriktionsverdau des Expressionsplasmids wurden 5 µg pET41b in einem Volumen von 20 µl mit je 1 µl „FastDigest NcoI“ und „FastDigest NdeI“ (Thermo Scientific) und 2 µl 10x „FastDigest Buffer“ (Thermo Scientific) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Für den Restriktionsverdau des Lieferplasmids wurden 10 µg pMAT_Ubi-fVpU in einem Volumen von 50 µl mit je 2 µl „FastDigest NcoI“ und „FastDigest NdeI“ (Thermo Scientific) und 5 µl 10x „FastDigest Buffer“ (Thermo Scientific) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung des Erfolgs der Restriktion und zur Reinigung der DNA. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kits (Macherey-Nagel). Dazu wurde das Agarosegelstück mit der gewünschten DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA nach Herstellerangaben isoliert. Zur Verhinderung der Religation des pET41b Plasmids wurden die 5'-Enden der DNA mit Hilfe der Phosphatase SAP („shrimp alkaline phosphatase“) dephosphoryliert. Dazu wurden in einem 22 µl Ansatz 832 ng des linearisierten pET41b Plasmids mit 0,5 µl SAP (Fermentas) und 2,2 µl 10 x „SAP buffer“ (Fermentas) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die SAP für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Nun erfolgte die Ligation des pET41b_Ubi-fVpU Plasmids durch die Insertion des Ubi-VpU-2 Fragments in das dephosphorylierte linearisierte pET41b-Plasmid mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4. Dazu wurden in mehreren 20 µl Ansätzen die Ligation von Plasmid-zu-Insert DNA im molare Verhältnis von 1 : 3, 1 : 6 und 1 : 9 getestet, indem 1 µl „T4 DNA Ligase“ (Fermentas) und 2 µl 10 x „T4 DNA Ligase Buffer“ (Fermentas) mit 50 - 100 ng linearisiertes pET41b-Plasmid und 17 - 150 ng Ubi-VpU-2 Fragment über Nacht bei 16 °C inkubiert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Ansatz ohne Insert, um den Erfolg der Dephosphorylierung der Plasmid-DNA zu überprüfen. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* Mach1T1^R Zellen mit dem Ligationsansatz. Aus je einer Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C angezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits „innuPREP Plasmid Mini“ (Analytik Jena AG) nach Herstellerangaben. Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Sequenzierung der Klonierungs- und Expressionsregion des Plasmids mit Primern für die T7-Promotor- und Terminatorsequenz überprüft. Von dem erfolgreich sequenzierten Klon wurde erneut eine Übernachtskultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C angezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits „NucleoBond Xtra Midi“ (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Die gereinigte DNA wurde in 100 µl H₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm an einem Nano Drop Spektrophotometer (Thermo Scientific).

3.10 Expression und Reinigung von VpU

Für die Expression von VpU wurden drei verschiedene Konstrukte verwendet. Die VpU-Konstrukte VpU-1, VpU-2 und VpU-3. Die VpU-1 und VpU-2-Konstrukte kodieren für das 81 Aminosäure lange VpU (UniProt: P19554) als Fusionsprotein mit dem 76 Aminosäuren langen Ubiquitin aus *S. cerevisiae* (UniProt: P0CG63) (Ubi-VpU-1 und Ubi-VpU-2). Das VpU-1-Konstrukt verfügt über einen N-terminalen 10 x His-Tag, der die Reinigung über eine Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie ermöglicht. Zur Abtrennung des Ubiquitin-Tags sind zwischen der Ubiquitin- und der VpU-Sequenz Erkennungssequenzen für die Thrombin und die PreScission Protease vorhanden. Es war bereits vor Beginn der hier vorliegenden Dissertation in unserem Institut vorhanden. Das VpU-2-Konstrukt wurde im Rahmen dieser Dissertation, wie in Kapitel 3.9 beschrieben, hergestellt. Es ist im Gegensatz zum VpU-1-Konstrukt für *E. coli* Codon-optimiert und enthält keine Thrombin-Erkennungssequenz. Das VpU-3-Konstrukt kodiert ausschließlich für VpU und wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Drepper des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie des Forschungszentrums Jülich konzipiert und erstellt.

Für die Testexpressionen von VpU wurden die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)T1^R, BL21(DE3), C43(DE3), Rosetta(DE3), Rosetta2(DE3) oder Rosetta2(DE3)pLysS mit dem Plasmid pTKK19xb/ub_ubi_fVpU (VpU-1-Konstrukt) oder pET41b_Ubi-fVpU (VpU-2-Konstrukt) transformiert (Kap. 3.5). Aus einer Einzelkolonie wurde über Nacht eine Vorkultur in LB-, TB- oder M9-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin bei 37 oder 30 °C angezogen. Diese wurden zum Animpfen von 50 -100 ml LB-, TB- oder M9-Medium mit 50 µ/ml Kanamycin auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verwendet. Die Expressionskultur wurde bei 37 oder 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 inkubiert und dann mit einer Endkonzentration von 0,5 mM oder 1 mM IPTG induziert. Nach 3 – 22 h Expression bei 37 °C oder 30 °C wurden die Zellen für 30 min bei 5000 g und 8 °C pelletiert, mit PBS-Puffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Expression von VpU im präparativen Maßstab wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)T1^R mit dem Plasmid pET41b_Ubi-fVpU (VpU-2-Konstrukt) oder Expressionsstamm *E. coli* C43(DE3) mit dem Plasmid pTKK19xb/ub_ubi_fVpU (VpU-1-Konstrukt) transformiert. Aus einer Einzelkolonie wurde über Nacht eine Vorkultur in M9-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin bei 37 °C angezogen. Diese wurde zum Animpfen von 500 ml M9-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verwendet. Die Expressionskultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 inkubiert und dann mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h (VpU-2) oder über Nacht (VpU-1) Expression bei 37 °C wurden die Zellen für 30 min bei 5000 g und 8 °C pelletiert, mit PBS-Puffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Reinigung wurde nach einem bereits vorhandenen Protokoll durchgeführt.^{59,60} Die im Folgenden angegebenen Volumina beziehen sich auf eine 1 l Expressionskultur. Das Zellpellet wurde in 5 ml Resuspensionspuffer pro Gramm Zellpellet resuspendiert und mit einem Branson 250 Sonifier (5 Zyklen à 35 s mit einer Pause von 1 min, Duty Cycle 50 %, Power 6) aufgeschlossen. Danach wurde dem Zelllysat dasselbe Volumen Lysepuffer und MgCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 8 mM hinzugefügt und 1 h bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 50000 g und 10 °C für 10 min präzipitiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wie zuvor beschrieben noch einmal lysiert, über Nacht inkubiert und zentrifugiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte über eine Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie. Dazu wurden 2,5 ml Ni²⁺-NTA mit 5 CV Arbeitspuffer äquilibriert und dann mit dem Überstand der ersten Zelllyse beladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch einen Waschschrift mit 10 CV Arbeitspuffer von der Säule heruntergewaschen. Dann wurde der Überstand der zweiten Zelllyse auf die Säule geladen. Anschließend erfolgte die Elution des Proteins mit aufsteigender Imidazol Konzentration (5 mM bis 500 mM). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Ubi-VpU-1 bzw. Ubi-VpU-2 enthaltende Fraktionen wurden durch Ultrafiltration auf 30 - 40 ml aufkonzentriert und über Nacht bei 4 °C gegen Proteolysepuffer dialysiert. Zur Abspaltung des VpUs vom Fusionsprotein Ubi-VpU-1 bzw. Ubi-VpU-2 erfolgte die Inkubation mit der PreScission Protease im Massenverhältnis 3 : 1 (Abschätzung erfolgte anhand der Bandenintensität der SDS-PAGE) unter Hinzugabe von DTT mit einer Endkonzentration von 3 mM über Nacht bei 4 °C. Hierdurch wurde VpU mit einem 8 Aminosäure langen N-terminalen Überhang (VpU-1) bzw. mit einem 2 Aminosäure langen N-terminalen Überhang (VpU-2) freigesetzt. Der Erfolg des Proteaseverdau wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Zur Entfernung des Histidin-Ubiquitin Tags und der PreScission Protease wurde eine weitere Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie durchgeführt. Dazu wurde die Lösung des Proteaseverdau für 1 h bei 4 °C mit 10 ml Ni²⁺-NTA inkubiert. Nach dem Absetzen der Ni²⁺-NTA Agarose wurde der VpU enthaltende Durchfluss aufgefangen und unspezifisch gebundenes VpU durch einen Waschschrift mit 5 CV Arbeitspuffer von der Säule heruntergewaschen. Anschließend erfolgte die Präzipitation des Proteins durch TCA zur Entfernung des Detergenzes. Dazu wurde den VpU enthaltenden Fraktionen eiskalte TCA in einer Endkonzentration von 10 % (v/v) zugefügt und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Abtrennung des präzipitierten Proteins erfolgte durch Zentrifugation bei 15000 g und 10 °C für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml eiskaltem Aceton gewaschen und durch Zentrifugation bei 15000 g und 10 °C für 15 min wieder pelletiert. Der Waschschrift mit Aceton wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet 10 min auf Eis getrocknet und dann in 2 ml eiskaltem Puffer X aufgenommen. Als letzter Reinigungsschritt erfolgte eine „Reversed Phase“ Chromatographie mit Hilfe einer Resource RPC 3 ml Säule. Dazu wurde die Säule mit Puffer A äquilibriert bevor das resuspendierte Pellet der TCA-Fällung auf die Säule geladen wurde. Dann erfolgte ein Waschschrift mit Puffer A, bevor die Elution des Proteins durch einen Gradienten von 0 % bis 100 % Puffer B erfolgte. Die Analyse der gesammelten Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE. VpU enthaltende Fraktionen wurden lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tab. 9: Puffer zur Expression und Reinigung von VpU.

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS-Puffer	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, pH 7,4
Resuspensionspuffer	50 mM Tris, 25 % (w/v) Sucrose, 0,1 % (v/v) NaN ₃ , 1 Tablette Protease Cocktail Inhibitor, EDTA-frei (Roche) auf 50 ml Puffer, pH 8,0
Lysepuffer	50 mM Tris, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 % (w/v) Cholinsäure, 600 mM NaCl, 0,1 % (v/v) NaN ₃ , pH 8,0
Arbeitspuffer	50 mM Tris, 12,5 % (w/v) Sucrose, 0,5 % (w/v) Cholinsäure, 0,1 % (v/v) NaN ₃ , 300 mM NaCl, 0,8 mM MgCl ₂ , 1 Tablette Protease Cocktail Inhibitor, EDTA-frei (Roche) auf 500 ml Puffer, 0,5 % (v/v) Triton X-100
Proteolysepuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) Triton X-100, pH 7,0
Puffer X	0,04% (v/v) Trifluoressigsäure, 40% (v/v) Acetonitril
Puffer A	0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure
Puffer B	80 % (v/v) Acetonitril, 0,08 % (v/v) Trifluoressigsäure

3.11 Fraktionierung des Zellpellets der VpU Expression

Da die in Kapitel 3.10 beschriebene Herstellung von VpU nur sehr geringe Ausbeuten ergab, erfolgte eine Fraktionierung des Zellpellets nach der Expression von Ubi-VpU-1, Ubi-VpU-2 und VpU-3 in die „Inclusion body“-Fraktion, die Membran-Fraktion und die lösliche Fraktion.

Für die Fraktionierung des Zellpellets wurde das Zellpellet, entsprechend einer OD₅₈₀ = 3 der Expressionskultur bezogen auf 1 ml, in 800 µl Zellysepuffer mit ca. 1 mg/ml Lysozym resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurden 100 - 150 µl Glasperlen hinzugefügt und die Zellen 15 min in der Schwingmühle bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit aufgeschlossen. Das Zellysate wurde für 10 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet (I) enthielt die „Inclusion body“-Fraktion und wurde bei -20 °C gelagert. Der Überstand wurde 1 h bei 150000 g und 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet (M) enthielt die Membran-Fraktion und wurde ebenfalls bei -20 °C gelagert. Der Überstand wurde 20 min mit 7%iger TCA (Endkonzentration) inkubiert und dann 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet (L) wurde mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen und nochmals 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Aceton Waschschrift wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet (L) 10 - 15 min bei 37 °C getrocknet. Es enthielt die lösliche Fraktion und wurde ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Tab. 10: Für die Fraktionierung des Zellpellets der VpU Expression verwendete Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Zellysepuffer	40 mM K ₂ HPO ₄ , 22 mM KH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7,2

3.12 POPC-Liposomenherstellung und VpU-1 Einbau

Die Probenpräparation erfolgte analog zu Wittlich *et al.*⁵⁹ Für die Herstellung der VpU-1 enthaltenden POPC-Liposomen wurden in einem Reagenzglas 1,5 mg lyophilisiertes VpU-1 in 500 µl Chloroform/Methanol (Verhältnis 7 : 3) mit 10 mg POPC in 500 µl Chloroform gemischt. Hieraus ergab sich ein molares Verhältnis von VpU-zu-POPC von 1 : 92. Zur Handhabung der organischen Lösungsmittel wurde eine mit Methanol gereinigte Glasspritze verwendet. Das organische Lösungsmittel wurde unter Rotation mit

einem Stickstoffgasstrom verdampft, so dass ein dünner Film aus POPC und VpU an der inneren Reagenzglaswand entstand. Dieser wurde in 1 ml Cyclohexan aufgenommen und 1 min in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Lipid-VpU-1 Gemisch wurde anschließend 6 h an einer Vakuumpumpe getrocknet, dann in 5 µl Hydratationspuffer aufgenommen und mit 400 µl H₂O gemischt. Die Emulsion wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß transferiert. Zur Bildung von Liposomen wurden 5 Einfrier- und Auftauzyklen durchgeführt, indem die Probe für 30 s in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann 2 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur aufgetaut wurde. Anschließend wurde die Probe über Nacht bei 4 °C aufbewahrt und am nächsten Morgen weitere 5 Einfrier- und Auftauzyklen durchgeführt, bis eine homogene weiße Emulsion vorhanden war. Die so präparierten VpU-1 enthaltenden Liposomen wurden dann 30 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und 8 h lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 11: Puffer zur Herstellung von VpU-1 enthaltenden POPC-Liposomen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Hydratationspuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , 70 mM NaCl, 0,02 % (w/v) NaN ₃ , pH 7,4

3.13 DNP-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die DNP-NMR-Spektren von VpU-1 in POPC-Liposomen wurden mit „Dynamic nuclear polarization“ (DNP) Verstärkung^{15,18} an 400 MHz und 600 MHz Bruker Spektrometern bei einer Proben temperatur von ~100 K aufgenommen. Das Gyrotron erzeugt Mikrowellen der Frequenzen 263 GHz bzw. 395 GHz. Für die DNP-Messungen wurde ¹³C, ¹⁵N-markiertes VpU-1 wie in Kapitel 3.10 beschrieben hergestellt und wie in Kapitel 3.12 beschrieben in POPC-Liposomen eingebaut. Daraus wurden die drei in Tab. 12 aufgeführten Proben von ¹³C, ¹⁵N-markiertem VpU-1 in POPC-Liposomen präpariert, die unterschiedliche Konzentrationen des Biradikals TOTAPOLs¹⁶ und des Kryoprotektors Glycerin-d₈ enthielten.

Tab. 12: DNP-Probenzusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Probe 1	3,2 mg lyophilisiertes ¹³ C, ¹⁵ N-markiertes VpU-1 in POPC-Liposomen in 20 mM TOTAPOL in Glycerin-d ₈ : D ₂ O : H ₂ O (60 : 30 : 10 Vol.-%)
Probe 2	2,1 mg lyophilisiertes ¹³ C, ¹⁵ N-markiertes VpU-1 in POPC-Liposomen in einer Lösung aus 10 mM TOTAPOL in Glycerin-d ₈ : D ₂ O : H ₂ O (20 : 70 : 10 Vol.-%)
Probe 3	ca. 2,5 mg lyophilisiertes ¹³ C, ¹⁵ N-markiertes VpU-1 in POPC-Liposomen in einer Lösung aus 10 mM TOTAPOL in Glycerin-d ₈ : D ₂ O : H ₂ O (60 : 30 : 10 Vol.-%)

Für die DNP-NMR-Messungen wurden die Proben jeweils in 3,2 mm Bruker Festkörper-NMR-Rotoren gepackt. Mit den Proben wurden ¹H / ¹³C-Kreuzpolarisationsexperimente⁶¹ und PDS⁸-Experimente durchgeführt. Die experimentellen Parameter aller durchgeführten Experimente sind im Anhang in Kapitel 9.1.1 aufgeführt. Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit dem Programm TopSpin 3.2 (Bruker BioSpin GmbH) und die Auswertung mit dem Programm CcpNmr Analysis.⁶²

3.14 Expression und Reinigung von NP7

Für die Expression von NP7 wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)T1^R mit dem Expressionsplamid pET28a_NP7 transformiert. Aus einer Einzelkolonie wurde über Nacht eine Vorkultur in LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin bei 37 °C angezogen. Für die Expression von unmarkiertem NP7 wurde diese zum Animpfen von 500 ml LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verwendet. Die Expressionskultur wurde bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 inkubiert, anschließend mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert und dann weitere 5 h inkubiert. Für die Expression von VLFY-revers ¹³C, ¹⁵N-markiertem NP7 wurde die Zellen aus der Vorkultur bei 5000 g und 4 °C für 20 min pelletiert, in 1 l 0,9 % (w/v) NaCl resuspendiert und erneut bei 5000 g und 4 °C für 20 min pelletiert. Das Pellet wurde dann in 10 ml 0,9 % (w/v) NaCl resuspendiert und zum Animpfen von 500 ml M9-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin und je 1 mM der Aminosäuren Leucin, Phenylalanin und Tyrosin und 4 mM Valin in nicht isotopenmarkierter Form verwendet. Dieses wurde direkt mit 1 mM IPTG induziert und dann 5 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen für 20 min bei 5000 g und 10 °C pelletiert, in 0,9 % (w/v) NaCl gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Reinigung des Proteins wurde das Zellpellet in 20 ml Resuspensionspuffer pro Liter Expressionskultur resuspendiert, mit Hilfe eines Potter-Elvehjem Homogenisators homogenisiert und mit einem Zellaufschluss-System (Constant Systems Ltd.) aufgeschlossen. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 10400 g und 4 °C für 20 min präzipitiert. Da das Protein in „Inclusion bodies“ exprimiert wurde, befand es sich nun im Pellet. Dieses wurde 2 x mit 10 ml Waschpuffer 1 gewaschen, indem es mit Hilfe eines Potter-Elvehjem Homogenisators homogenisiert wurde und dann durch Zentrifugation bei 10400 g und 4 °C 15 min pelletiert wurde. Es folgten weitere Waschschrte des Pellets mit 2 x 10 ml Waschpuffer 2, 2 x 10 ml Waschpuffer 3 und 1 x 7,5 ml Waschpuffer 4. Dann wurden die „Inclusion bodies“ in 7,5 ml Solubilisierungspuffer solubilisiert und 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Ultrazentrifugation bei 100000 g und 4 °C 1 h abgetrennt.

Zur Rückfaltung des Proteins wurde der Überstand langsam bei Raumtemperatur in 75 ml schnell rotierenden Rückfaltungspuffer getropft und anschließend 3 Nächte bei 4 °C gegen 750 ml Dialysepuffer dialysiert. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation entfernt. Die Rekonstitution des NP7s erfolgte durch schrittweise Titration des Kofaktors Häm. Dazu wurde eine 50 mM Lösung von Hemin-Cl in 100 mM NaOH 1 : 50 in 100 mM NaH₂PO₄(pH 7,5) verdünnt. 20 µl Aliquots dieser Hemin-Cl-Lösung wurden bei Raumtemperatur zu der schnell rührenden NP7-Lösung hinzupipettiert und die Insertion photometrisch durch den Anstieg der Soret Absorptionsbande bei 403 nm verfolgt. Zwischenzeitlich wurde aggregiertes Häm durch Zentrifugation bei 10400 g für 10 min entfernt. Die Titration wurde bis zum Erreichen eines Absorptionsverhältnisses von $A_{403 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} \approx 2$ fortgeführt, um ein Häm-zu-Protein Verhältnis von ungefähr 1 zu erreichen. Nach der Zugabe von 10 % (v/v) 1 M NaOAc (pH 5,0) und Einstellung des pH-Wertes der

Proteinlösung auf 5,0 mit Essigsäure wurde die Lösung bei 10400 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand durch Ultrafiltration auf ca. 40 ml aufkonzentriert. Das Protein wurde über eine Größenausschlusschromatographie mit einer HiLoad 26/600 Superdex 75 PG Säule in Größenausschlusspuffer gereinigt. Die NP7 enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und durch Ultrafiltration auf ca. 10 ml aufkonzentriert und dann über Nacht gegen Kationenaustauschpuffer 1 dialysiert. Der finale Reinigungsschritt erfolgte über eine Kationenaustauschchromatographie über zwei hintereinandergeschaltete 5 ml HiTrap Chelating HP Säulen, die mit Ca^{2+} -Ionen beladen waren. Die Elution erfolgte über einen Calciumionengradienten mit 0 mM - 40 mM CaCl_2 . Zur Aufbewahrung wurde das Protein gegen Aufbewahrungspuffer dialysiert und dann bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Direkt vor der Verwendung von NP7 wurde der Ligand Nitroxid rekonstituiert. Dazu wurde die NP7-Lösung aufgetaut, auf die gewünschte Konzentration aufkonzentriert und zum Pufferaustausch 2 x mit 200 μl NMR-Puffer gewaschen. Dann wurde auf Eis eine Spatelspitze 2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid (Enzo Life Sciences) in 50 μl 10 mM NaOH aufgelöst. Die Konzentration des Proteins und des 2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxids wurden photometrisch bestimmt (NP7: $\epsilon_{403\text{nm}} = 81000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, 2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid: $\epsilon_{250\text{nm}} = 6500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) und 2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid im molaren Verhältnis von 1 1/3 : 1 zum Protein zugegeben. Daraus ergab sich ein molares Verhältnis von Nitroxid zu NP7 von 2 : 1, da aus einem Mol 2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid 1,5 Mol Nitroxid freigesetzt werden. Die Rekonstitution von Nitroxid in NP7 ließ sich durch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 403 nm nach 417 nm verfolgen.

Tab. 13: Für die Expression und Reinigung von NP7 verwendete Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer	0,9 (w/v) NaCl, 2 $\mu\text{g/ml}$ DNAse I
Waschpuffer 1	30 mM Tris, 30 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 % (v/v) Tween 20, 1 mM DTT, pH 7,4
Waschpuffer 2	30 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,4
Waschpuffer 3	30 mM Tris, 30 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,4
Waschpuffer 4	1,5 M GdmCl, 10 mM Mops, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7,0
Solubilisierungspuffer	3,5 M GdmCl, 10 mM Mops, 1 mM EDTA, 2 mM TCEP, pH 7,0
Rückfaltungspuffer	10 mM Mops, 10 % (w/v) Sucrose, 500 mM L-Arginin, 1 mM EDTA, 1 mM GSSG, pH 6,6
Dialysepuffer	10 mM Mops, 10 % (w/v) Sucrose, 50 mM L-Glutamat, 50 mM NaCl, pH 6,6
Größenausschlusspuffer	200 mM NaOAc, 2 % (w/v) Glycerin, pH 5,0
Kationenaustauschpuffer 1	10 mM Hepes, 2 % (w/v) Glycerin, pH 6,8
Aufbewahrungspuffer	200 mM NaOAc, 10 % (w/v) Glycerin, pH 5,0
NMR-Puffer	20 mM MOPS, 2 % (w/v) Glycerin, pH 6,8

3.15 Herstellung der DMPC / DMPS- und DMPC / DMPG-Liposomen

Für die Herstellung von DMPC / DMPS-Liposomen wurden DMPC und DMPS in einem Massenverhältnis von 3 : 1 in einem Reagenzglas in Chloroform/Methanol/ H_2O (Volumenverhältnis 2 : 1 : 0,01) gelöst. Für die Herstellung von DMPC / DMPG-Liposomen wurden DMPC und DMPG in einem Massenverhältnis von 3 : 1 in einem

Reagenzglas in Chloroform/Methanol (2 : 1) gelöst. Das Lösungsmittel wurde unter Rotation mit einem Stickstoffgasstrom verdampft. Der so entstandene Lipidfilm wurde an der Vakuumpumpe für 3 h getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Der Lipidfilm wurde in 1 ml NMR-Puffer aufgenommen, so dass die gewünschte Lipidkonzentration von 5 - 40 mg/ml erhalten wurde. Anschließend wurden 5 Einfrier- und Auftauzyklen durchgeführt, indem die Emulsion in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einen 50 °C warmem Wasserbad wieder aufgetaut und dann durchmischt wurde. Anschließend wurde die Emulsion mit Hilfe eines Extruder (Mini Extruder, Avanti Polar Lipids, Inc.) 15 x durch eine Membran mit einer Porengröße von 50 nm gedrückt, um Liposomen einheitlicher Größe zu erhalten. Für die Herstellung von Liposomen mit geringerem Durchmesser wurden diese anschließend noch mit einem Ultraschallstab beschallt. Zur Überprüfung der Liposomenhomogenität und -größe wurden DLS-Messungen der Liposomenproben durchgeführt. Die Liposomen wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche verwendet.

Tab. 14: Für die Herstellung von Liposomen verwendete Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
NMR-Puffer	20 mM MOPS, 2 % (w/v) Glycerin, pH 6,8

3.16 NP7-Liposomen Bindungstest

Für den NP7-Liposomen Bindungstest wurden die Liposomen und NP7 separat auf 37 °C erwärmt und dann wurde das Protein langsam zu der Liposomenemulsion gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Ultrazentrifugation bei 186000 g und 20 °C für 1 h, um das NP7-Liposomen Pellet zu separieren. Der Anteil des ungebundenen NP7 im Überstand wurde anschließend photometrisch bestimmt ($\epsilon_{417} = 92100\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.17 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden die Proben in 100 µl Chloroform / Methanol (65 Vol % : 35 Vol %) aufgenommen. Dazu wurden wässrige Proben zuvor in der Speedvac bei 45 °C eingetrocknet. Die DC-Kammer wurde mit Whatman-Papier ausgekleidet, 1 cm hoch mit DC-Puffer gefüllt, geschlossen und dann 1 h bis zur Sättigung des Whatman-Papiers gewartet. Die DC-Platte wurde 30 min bei 80 °C aktiviert und mit je 1 µl der Proben beladen. Anschließend wurde die DC-Platte noch einmal für 5 min bei 80 °C getrocknet und dann erfolgte die Auftrennung der Proben in der DC-Kammer. Anschließend wurde die DC-Platte wieder bei 80 °C für 10 min getrocknet und die Lipide wurden durch Einsprühen der Platte mit Färbelösung sichtbar gemacht.

Tab. 15: Für die Dünnschichtchromatographie verwendete Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
DC-Puffer	72,2 % (v/v) Chloroform, 22,2 % (v/v) Methanol, 5,6 % (v/v) 28%ige Ammoniaklösung
Färbelösung	0,02 % (w/v) Kaliumhydroxid, 0,02 % (w/v) Bromophenolblau

3.18 NMR Probenherstellung

Für die Herstellung der NMR-Probe mit Liposomen ohne Protein wurden ca. 4 mg DMPC / DMPS-Liposomen mit einem Durchmesser von 50 nm und einer Konzentration von 5 mg/ml, wie in Kapitel 3.15 beschrieben, hergestellt. Für die Pelletierung der Liposomen wurden diese dann 1h bei 186000 g und 20 °C ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde mit Hilfe eines Spatels und kurzen zwischenzeitlichen Zentrifugationsschritten in einen 36 µl fassenden 3,2 mm Varian Festkörper-NMR-Rotor gepackt.

Für die Herstellung der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen Probe wurden $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7, wie in Kapitel 3.14 beschrieben, und DMPC / DMPS-Liposomen mit einem Durchmesser von 50 nm und einer Konzentration von 5 mg/ml, wie in Kapitel 3.15 beschrieben, hergestellt. Dann wurden 5,1 mg der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7 Probe, wie in Kapitel 3.16 beschrieben, an 8,57 mg DMPC / DMPS-Liposomen gebunden und pelletiert. Zum Pellet wurden 3 µl 100 mM Glutathiondisulfid (GSSG) hinzugefügt, um eine Reduktion der Disulfidbrücken des Proteins zu verhindern. Anschließend wurde das Pellet mit Hilfe eines Spatels und kurzen zwischenzeitlichen Zentrifugationsschritten in einen 36 µl fassenden 3,2 mm Varian Festkörper-NMR-Rotor gepackt.

Für die Herstellung der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7 Probe wurde ca. 3,7 mg $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7, wie in Kapitel 3.14 beschrieben, hergestellt. Das Protein wurde in Zentrifugen-Filtereinheiten auf ca. 20 µl aufkonzentriert, dabei erfolgte eine teilweise Präzipitation des Proteins. Dann wurden 2 µl 100 mM GSSG hinzugefügt, um eine Reduktion der Disulfidbrücken des Proteins zu verhindern. Die Suspension wurde mit Hilfe einer Pipette in einen 22 µl fassenden 3,2 mm Varian Festkörper-NMR-Rotor transferiert.

Die Lagerung der Rotoren zwischen den NMR-Messungen erfolgte bei einer Temperatur von -20 °C.

3.19 Festkörper-NMR-Spektroskopie

MAS-Festkörper-NMR-Experimente wurden an Varian NMR-Spektrometern mit 1H -Resonanzfrequenzen von 600 MHz und 800 MHz durchgeführt. Die verwendeten Parameter aller durchgeführten Experimente sind im Anhang in Kapitel 9.1 aufgeführt.

Die externe Kalibrierung der Proben temperatur durch die Verwendung der 1H chemischen Verschiebung von Nickelocen als Temperaturstandard⁶³ zeigte, dass die Proben temperatur 10 ± 3 °C über der Temperatur der variablen Temperatureinheit (VT) lag, die im Folgenden als nominale Proben temperatur angegeben wird.

Leistungsstarke Breitband-Protonenentkopplung mit SPINAL-Phasenmodulation⁶⁴ erfolgte in allen Experimenten während der Aufnahme und der t_1 - und t_2 -Evolutionszeiten.

Zur Detektion mobiler Anteile in der Probe wurden auf J-Kopplungen basierende INEPT-Experimente⁶⁵ durchgeführt. Zur Detektion rigider Anteile der Probe wurden

^{13}C -Direktanregungsexperimente und $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -Kreuzpolarisationsexperimente⁶¹ durchgeführt.

Für die Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten von ^{13}C und ^{15}N wurde ein für die Festkörper-NMR-Spektroskopie entwickeltes Experiment zur Bestimmung von T_1 -Relaxationszeiten von Heterokernen verwendet, bei dem die X-Kerne durch einen $^1\text{H} / \text{X-CP}$ -Schritt magnetisiert werden.⁶⁶ Auf den $^1\text{H} / \text{X-CP}$ -Schritt folgte ein 90° Puls. Danach erfolgte eine Wartezeit von ansteigender Dauer zur Relaxation der X-Spins. Im Anschluss daran erfolgt dann erneut ein 90° Puls mit anschließender direkter Detektion der Magnetisierung der X-Spins. Für die T_1 -Relaxationszeitbestimmung der ^1H -Kerne wurde ein Inversion-Recovery-Experiment⁶⁷ mit ansteigender Wartezeit und anschließendem $^1\text{H} / \text{X-CP}$ -Schritt verwendet. Für die Bestimmung der T_2 -Relaxationszeiten der ^1H -Kerne wurde ein $^1\text{H} / \text{X-CP}$ mit anschließendem Spin-Echo⁶⁸ mit ansteigender Wartezeit durchgeführt.

Für die Resonanzzuordnung wurden die folgenden Experimente durchgeführt. PDS-Experimente⁸ erfolgten mit longitudinalen Mischzeiten von 5 - 200 ms. Mischzeiten bis zu 80 ms zeigten hauptsächlich intraresiduale ^{13}C -Korrelation und bei höheren Mischzeiten wurden auch interresiduale Korrelationen sichtbar. PDS-RR-Experimente⁶⁹ wurden an einem 18,8 T NMR-Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 12,5 kHz durchgeführt. Diese Frequenz wurde nah an der $\text{C}\alpha / \text{CO}$ -Rotations-Resonanz-Bedingung gewählt und ermöglichte dadurch die Detektion von schwach dipolar gekoppelten interresidualen $\text{CO}_{(i-1)} / \text{C}\alpha_{(i)}$ -Korrelationen in Gegenwart von stark dipolar gekoppelten intraresidualen Korrelationen. Diese Korrelationen wurden für die sequenzielle Zuordnung der Aminosäuren verwendet. Um zwischen interresidualen Korrelationen und intraresidualen Korrelationen über mehrere Bindungen einerseits und Korrelationen zwischen direkt benachbarten Kernen andererseits zu differenzieren, wurden SPC5_2-⁴, HORROR-^{5,6} und DREAM-Experimente⁷ durchgeführt. Hierbei werden homonukleare Doppelquantenkohärenzen angeregt, welche in der Regel zur Detektion von ^{13}C -Korrelationen über eine Bindung führen. In 2D und 3D ^{15}N -, ^{13}C -Korrelationsspektren basierte der zweite Transfer auf frequenzselektiver Kreuzpolarisation in Kombination mit einem SPECIFIC-CP⁷⁰ und ermöglichte so einen frequenzselektiven Poliarisierungstransfer von N auf $\text{C}\alpha$, CO bzw. $\text{C}\epsilon$ -Kerne. Der anschließende Transfer entlang der Kette erfolgte durch PDS-, DARR-^{9,10} oder DREAM-Transfer. $\text{NC}\alpha$ -, $\text{NC}\alpha\text{CX}$ - und $\text{NC}\alpha\text{C}\beta$ -Spektren ermöglichten die Zuordnung von ^{15}N -Verschiebungen des Proteinrückgrats und NCOCX -Spektren ermöglichten die Verknüpfung der Aminosäuren. $\text{N}\zeta\text{C}\epsilon\text{CX}$ -Spektren ermöglichten die Zuordnung von ^{15}N -Verschiebungen des Lysin $\text{N}\zeta$. Für die $^{13}\text{C} / ^{31}\text{P}$ -Abstandsmessungen wurden REDOR-Experimente¹² durchgeführt.

Die Prozessierung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm NMRPipe⁷¹ und die Analyse der Spektren wurde mit dem Programm CcpNmr Analysis⁶² durchgeführt. Signalintensitäten und Signalintegrale wurden ebenfalls mit dem Programm CcpNmr Analysis bestimmt.

3.20 Analyse der NP7 Kristallstruktur

Zum Vergleich mit den durch Festkörper-NMR-Spektroskopie erhaltenen Daten wurde eine Kristallstruktur von NP7 in NO gebundener Form bei einem pH-Wert von 7,8 (PDB: 4XME) verwendet.⁵⁰ Die Analyse und Darstellung der Kristallstruktur erfolgte mit dem Programm PyMOL⁷². Die elektrostatische Oberfläche wurde mit den Standardeinstellungen der Programme PDB2PQR^{73,74} und APBS⁷⁵ berechnet. Die chemischen Verschiebungsvorhersagen aus Proteinkoordinaten erfolgte mit dem Programm shiftX2⁷⁶.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung von VpU in Membranen

Die Expression von kleinen Membranproteinen in *E. coli* stellt eine Herausforderung dar, da sie nach der Expression aufgrund ihrer Hydrophobizität in der Wirtsmembran akkumulieren und dadurch zytotoxisch wirken.⁵⁹ Außerdem nehmen sie normalerweise keine geordnete Struktur an und werden dadurch bevorzugt von zellulären Proteasen abgebaut.⁷⁷ Für die Expression und Reinigung des Membranproteins VpU war bereits ein Protokoll vorhanden.^{59,60} Nach diesem erfolgte die Expression von VpU als Fusionsprotein mit dem 76 Aminosäuren langen Ubiquitin (Ubi-VpU-1).⁵⁹ Allerdings konnten mit dem vorhandenen Konstrukt bzw. Protokoll keine ausreichenden Mengen an VpU für die geplanten Festkörper-NMR-Untersuchungen hergestellt werden. Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Expression des 81 Aminosäuren langen VpU-Proteins optimiert.

4.1.1 Rekombinante Herstellung des VpU in *E. coli*

Im Folgenden werden die Schritte zur Optimierung der Expression von VpU beschrieben. Das vorhandene VpU-1-Konstrukt wurde in Bezug auf Mutationen und die Codon-Verwendungshäufigkeit in *E. coli* untersucht. Es wurde ein neues, für *E. coli* Codon-optimiertes Plasmid kloniert (VpU-2-Konstrukt), welches das Fusionsprotein Ubi-VpU-2 kodiert. Dieses Konstrukt gestattet die Herstellung von VpU mit einem verkürzten artifiziellen N-terminalen Überhang. Die Expression von Ubi-VpU-1 und Ubi-VpU-2 wurde in verschiedenen *E. coli* Zelltypen, bei verschiedenen Temperaturen, unter Zugabe von Glukose und bei Induktion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen in LB-Medium verglichen. Zudem erfolgte eine Lokalisation des Fusionsproteins in der *E. coli* Zelle nach der Expression durch Fraktionierung des Zellpellets. Weiterhin wurde die Expression bezüglich des verwendeten Expressionsmediums in verschiedenen *E. coli* Zelltypen optimiert. In M9-Minimalmedium wurde zudem die Ammoniumchlorid- und Glukose-Konzentration sowie das Kultur-zu-Flasche Verhältnis variiert.

4.1.1.1 Analyse des vorhandenen VpU-1 Konstrukts

Das vor Beginn der hier vorliegenden Dissertation im Institut bereits vorhandene pTKK19xb/ub_Ubi_fVpU-Konstrukt ist in Abb. 4 im Detail dargestellt und wird im Folgenden als VpU-1-Konstrukt bezeichnet.

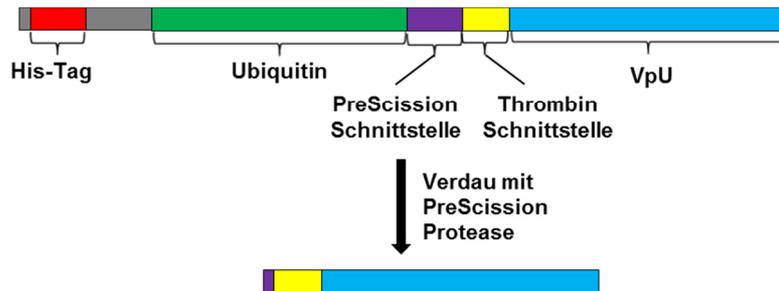


Abb. 4: Schematischer Aufbau des VpU-1-Konstrukts zur Herstellung von VpU-1.

Kaum Expression von Ubi-VpU-1 in *E. coli*

Zunächst wurde eine Testexpression mit dem VpU-1-Konstrukt durchgeführt. Abb. 5 zeigt das Expressionslevel von Ubi-VpU-1 auf einer SDS-PAGE zu unterschiedlichen Zeiten nach Induktion der Expression mit IPTG. Es ist allenfalls eine marginale Expression des Ubi-VpU-1-Proteins erkennbar. In der SDS-PAGE sind sowohl Proteine aus der löslichen Fraktion, der Membran- und der „Inclusion body“-Fraktion sichtbar, da das Zellpellet vor dem Auftragen durch Erhitzen und Denaturierung mittels SDS aufgeschlossen wurde und die Proteine linearisiert vorliegen.

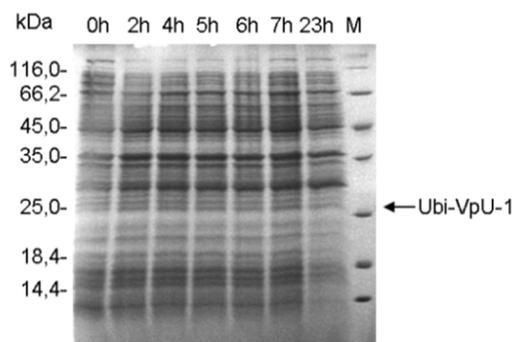


Abb. 5: Testexpression von Ubi-VpU-1.

SDS-PAGE der Expression von Ubi-VpU-1 in *E. coli* C43(DE3) Zellen bei 37 °C zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 - 23 h) nach Induktion in 1 l LB-Medium.

Merkmale des vorhandenen VpU-1-Konstrukts

Um die Ursache für die geringe Expressionsrate zu ergründen, wurde das VpU-1-Konstrukt analysiert. Dazu wurden die einzelnen Klonierungsschritte zur Herstellung des pTKK19xb/ub_ubi_fVpU-Plasmids (VpU-1-Konstrukt) analysiert, um den genauen Aufbau des Plasmids zu ermitteln. Das verwendete pTKK19xb/ub_ubi_fVpU-Plasmid (VpU-1-Konstrukt) basiert auf einem pET19b-Plasmid (Novagen), in dem der Replikationsursprung durch den eines pUC-Plasmids⁷⁸ ausgetauscht war und die β -Lactamaseregion durch ein Kanamycinresistenzgen ersetzt war, um das pTKK19-

Plasmid zu generieren.⁷⁷ Das pTKK19xb/ub-Plasmid (auch pUBK19 genannt) enthält zwischen den Restriktionsschnittstellen *Nde* I und *Bam*H I ein Insert, bestehend aus der Ubiquitin-Sequenz von *S. cerevisiae* und den C-terminalen Schnittstellen für *Eco*T22 I, *Sal* I, *Not* I und *Pst* I.^{59,77} In das pTKK19xb/ub_ubi_fVpU-Plasmid war analog zu Wittlich *et al.*⁵⁹ zwischen die Restriktionsschnittstellen *Eco*T22 I und *Not* I das Insert aus PreScission und Thrombin-Erkennungssequenz und VpU(1-81)-Sequenz kloniert. Die Veränderungen der Klonierungs- und Expressionsregion in Folge der einzelnen Klonierungsschritte sind in Abb. 6 gezeigt.

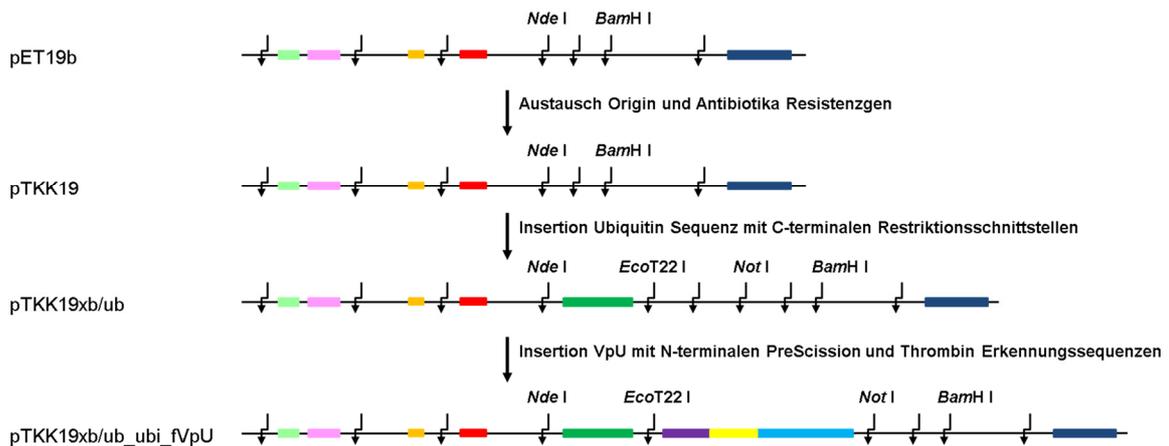


Abb. 6: Klonierungsschritte des vorhandenen VpU-1-Konstrukts.^{59,60,77}

Dargestellt sind Veränderungen in der Klonierungs- und Expressionsregion in Folge der einzelnen Klonierungsschritte. Gezackte Pfeile stellen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme dar. Nur die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind beschriftet. Farbige Rechtecke kennzeichnen die folgenden Sequenzen: T7-Promotor (hellgrün), lac-Operator (rosa), Ribosomenbindestelle (orange), 10 x His-Tag (rot), Ubiquitin-Sequenz (dunkelgrün), PreScission Protease-Erkennungssequenz (lila), Thrombin Protease-Erkennungssequenz (gelb), VpU (1-81)-Sequenz (hellblau) und T7-Terminator (dunkelblau).

Das VpU-1-Konstrukt enthält Mutationen im lac-Operator

Zur Überprüfung des VpU-1-Konstrukts wurde eine Sequenzierung des Expressions- und Klonierungsbereichs durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass die Sequenz des Inserts keine Mutationen aufweist. Um die umliegende Klonierungs- und Expressionsregion auf Mutationen zu überprüfen, wurde ein Sequenzalignment mit dem pET19b-Plasmid (Novagen) durchgeführt, da das Expressionsplasmid auf diesem Plasmid basiert (vgl. Abb. 6). Hierbei stellte sich heraus, dass in der lac-Operatorregion Sequenzunterschiede zu finden sind (siehe Abb. 7). Aufgrund dessen wurde zusätzlich auch das ursprünglich von Kohno *et al.*⁷⁷ zur Verfügung gestellte Plasmid pTKK19xb/ub sequenziert. Dieses enthielt das Ubiquitin-Fusionsprotein, jedoch nicht die PreScission- und Thrombin-Erkennungssequenzen und die VpU-Sequenz. Dabei stellte sich heraus, dass die Sequenzunterschiede zum pET19b-Plasmid in der lac-Operator Region im Plasmid pTKK19xb/ub bereits vorhanden sind (siehe Abb. 7). Diese lassen sich durch die von Kohno *et al.*⁷⁷ beschriebenen Klonierungsschritte allerdings nicht erklären.

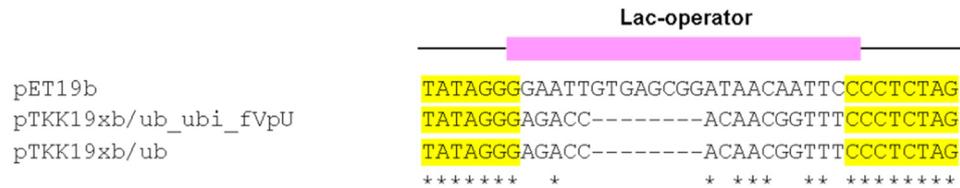


Abb. 7: Mutationen im Bereich des lac Operators im VpU-1-Konstrukt.

Sequenzalignment des lac-Operators des pET19b-Plasmids mit dem VpU-1-Konstrukt (pTKK19xb/ub_ubi_fVpU) und dem Originalplasmid von Kohno *et al.*⁷⁷ pTKK19xb/ub (erstellt mit MUSCLE). „*“ markieren identische Reste in allen Sequenzen. Bereiche mehrerer aufeinander folgender übereinstimmender Nukleotide wurden gelb unterlegt.

Mutationen im lac-Operator führen dazu, dass der lac-Repressor nicht mehr binden kann und die Expression des Zielproteins bereits vor der Einleitung der Expression durch die Zugabe von IPTG erfolgt. Diese Expression wird als „leaky“ Expression bezeichnet. Dadurch kann das Wachstum der Zellen verlangsamt oder verhindert werden oder es kann zum Verlust des Expressionsplasmids kommen. Da insbesondere die Expression von Membranproteinen zytotoxisch sein kann, sollte eine „leaky“ Expression des Zielproteins möglichst vermieden werden.

Das VpU-1-Konstrukt enthält selten in *E. coli* verwendete Codons

Das VpU-1-Konstrukt wurde außerdem auf selten in *E. coli* verwendete Codons untersucht, da diese ebenfalls zu verringerter Expression führen können. Die Verwendungshäufigkeit der einzelnen Codons wurde Chen *et al.*⁷⁹ entnommen. Die Codonanalyse des VpU-1-Konstruktes ist in Abb. 8 dargestellt.

```

AUG GGC CAU CAU CAU CAU CAU CAU CAU CAU CAC AGC AGC GGC CAU AUC GAC GAC GAC GAC
AAG CAU AUG CAA AUU UUU GUC AAG ACA CUG ACA GGU AAG ACU AUA ACC CUA GAG GUU GAA UCU
UCU GAC ACU AUC GAC AAC GUU AAG UCG AAA AUU CAA GAC AAG GAA GGU AUU CCU CCA GAU CAA
CAA AGA UUG AUU UUU GCU GGU AAG CAA CUG GAA GAC GGU AGA ACG CUG UCU GAU UAU AAC AUU
CAG AAA GAG UCU ACG UUG CAU UUG GUG UUG AGA UUG AGA GGU GGA CUG GAA GUU CUG UUC CAG
GGG CCC CUG GUG CCG CGC GGA UCC AUG CAA CCG CUG CAG AUU CUG GCU AUC GUU GCU CUG GUU
GUU GCU GCU AUC AUC GCA AUU GUU GUU UGG ACC AUC GUU UAC AUC GAA UAC CGU AAA AUC CUG
CGU CAG CGU AAA AUU GAU CGU CUG AUC GAU CGC AUC ACC GAG CGC GCU GAA GAC UCC GGU AAC
GAA UCC GAA GGU GAC CAG GAA GAG CUC UCU GCA CUG GUU GAA CGC GGU CAC CUG GCU CCG UGG
GAC GUC GAC GAC CUG UAA

```

Abb. 8: Analyse der im VpU-1-Konstrukt enthaltenen Codons.

Codons mit einer Verwendungshäufigkeit von <0,5 % sind rot umrandet und solche mit einer Verwendungshäufigkeit zwischen 0,5 und 1,1 % sind orange umrandet. Die Verwendungshäufigkeit der Codons in *E. coli* wurde von Chen *et al.*⁷⁹ übernommen. Die verschiedenen Abschnitte des Konstruktes sind durch farbige Buchstaben gekennzeichnet: 10 x His-Tag (rot), Ubiquitin Sequenz (grün), PreScission Schnittstelle (lila), Thrombin Schnittstelle (orange), VpU Sequenz (blau).

Die für VpU kodierende Sequenz selbst enthält keine Codons mit einer geringen Verwendungshäufigkeit in *E. coli*. Da jedoch das gesamte Konstrukt inklusive His-Tag und Ubiquitin-Tag exprimiert wird, beeinflussen alle für das Fusionsprotein verwendeten Codons die Expression. Es finden sich sieben Codons mit einer Verwendungshäufigkeit von unter 0,5 % in der Ubiquitin-Sequenz bzw. der PreScission-Schnittstelle sowie

sieben Codons mit einer Verwendungshäufigkeit von 0,5 – 1,1 % in der Ubiquitin-Sequenz bzw. der Thrombin-Erkennungssequenz.

4.1.1.2 Klonierung eines neuen Codon-optimierten VpU-2-Konstrukts

Die in Kapitel 4.1.1.1 beschriebenen Mutationen im lac-Operator des VpU-1-Konstrukts sowie die fehlende Codon-Optimierung für *E. coli* gaben Anlass, ein neues Codon-optimiertes VpU-Fusionskonstrukt zu klonieren. Dazu wurde in Anlehnung an das VpU-1-Konstrukt ein Codon-optimiertes Insert bei der Firma Invitrogen bestellt. Dieses kodiert für einen 10 x His-Tag, Ubiquitin, eine PreScission Schnittstelle sowie VpU und wurde im Plasmid pMAT eingesetzt geliefert (pMAT_Ubi-fVpU). Im Vergleich zum VpU-1-Konstrukt kodiert das VpU-2-Konstrukt keine Thrombin-Erkennungssequenz, wodurch sich der artifizielle N-terminale Überhang des finalen VpUs von acht auf zwei Aminosäuren reduziert. In Abb. 9 ist das Design des neuen Inserts dargestellt.

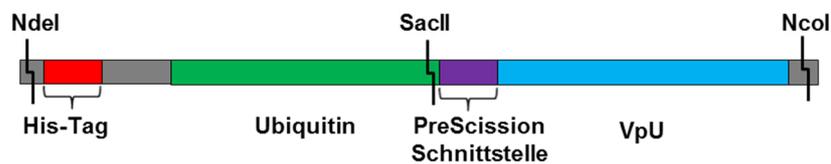


Abb. 9: Insert zur Klonierung des neuen VpU-2-Konstrukts.

Das Insert kodiert für einen N-terminalen 10 x His-Tag gefolgt von einem Linker, der Ubiquitin-Sequenz, einer PreScission Schnittstelle und der VpU-Sequenz. Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in das pET41b-Plasmid sind *Nde* I am 5'-Ende und *Nco* I am 3'-Ende. Am Ende der Ubiquitin-Sequenz befindet sich eine *Sac* II-Restriktionsschnittstelle zum Austausch der VpU-Sequenz gegen eine Nukleotidsequenz, die für ein beliebiges Zielprotein kodiert.

Die Klonierung des VpU-2-Konstrukts ist in Kapitel 3.9 beschrieben. Das Insert wurde zwischen die Restriktionsschnittstellen *Nde* I (Position 1095 in pET41b) und *Nco* I (Position 256 in pET41b) in das pET41b-Plasmid (Novagen) inkloniert. Dazu wurden zunächst die pET41b- und pMAT_Ubi-fVpU-Plasmide amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *Nde* I und *Nco* I verdaut. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden dann durch eine Agarose-Gelelektrophorese separiert.

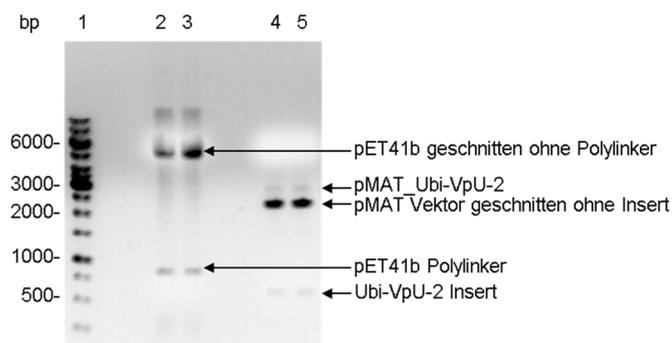


Abb. 10: Auftrennung des Verdau von pET41b und pMAT_Ubi-fVpU auf einem Agarosegel.

Spur 1: Marker, Spur 2, 3: Verdau des pET41b-Plasmids, Spur 4, 5: Verdau des pMAT_Ubi-fVpU Plasmids.

In Abb. 10 ist zu sehen, dass der Verdau beider Plasmide erfolgreich war. Somit konnten das Ubi-VpU-2 Insert und die linearisierte pET41b-Plasmid-DNA ohne Polylinker aus dem

Agarosegel herausgeschnitten und extrahiert werden. Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Sequenzierung mit Primern für den T7-Promotor und den T7-Terminator bestätigt.

4.1.1.3 Vergleich der Expression in LB-Medium

Zum Testen des neu klonierten Konstrukts, das im Folgenden als VpU-2-Konstrukt bezeichnet wird, wurde die Expression des Fusionsproteins Ubi-VpU-2 zunächst ohne Isotopenmarkierung in kleinem Maßstab (50 - 100 ml) in LB-Medium bei 37 °C im Vergleich mit der Ubi-VpU-1 Expression von dem VpU-1-Konstrukt durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche *E. coli* Zelltypen (BL21(DE3)T1^R, C43(DE3), Rosetta(DE3), Rosetta2(DE3), Rosetta2(DE3)pLysS), unterschiedliche Temperaturen und IPTG Konzentrationen sowie die Zugabe von 1 Vol.-% Glukose getestet. Bei diesen Tests zeigte sich keine erkennbare Expression der Zielproteine auf der SDS-PAGE. Diese war nur im Western Blot erkennbar. Aus diesem Grund wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Drepper des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) des Forschungszentrums Jülich eingegangen, in der verschiedene VpU-Varianten gemeinsam im Labor des IMET in LB-Medium exprimiert wurden. Hierdurch sollte vermieden werden, dass laborspezifische Faktoren die Expression der Proteine beeinflussen. Parallel zur Expression von Ubi-VpU-1 und Ubi-VpU-2 wurde das VpU-3-Konstrukt (vgl. Kapitel 3.10) verwendet, um VpU ohne Fusionspartner zu exprimieren. Letztere VpU-Variante ist vergleichsweise hydrophob und lagert sich vermutlich direkt nach der Expression in *E. coli* Membranen ein. Für die Testexpression wurden unsere BL21(DE3)T1^R Zellen und unsere C43(DE3) Zellen verwendet, sowie die BL21(DE3) Zellen der Arbeitsgruppe des IMET.

Höchste Expression von Ubi-VpU-2 und Ubi-VpU-1 in BL21(DE3) Zellen

Zum Vergleich der Expression der VpU-Proteine in den verschiedenen Zelltypen konnten die zum Protein gehörigen Banden mit Hilfe eines Penta-Histidin Antikörpers in Western Blots detektiert werden, da die exprimierten VpU-Proteine über einen His-Tag verfügten.

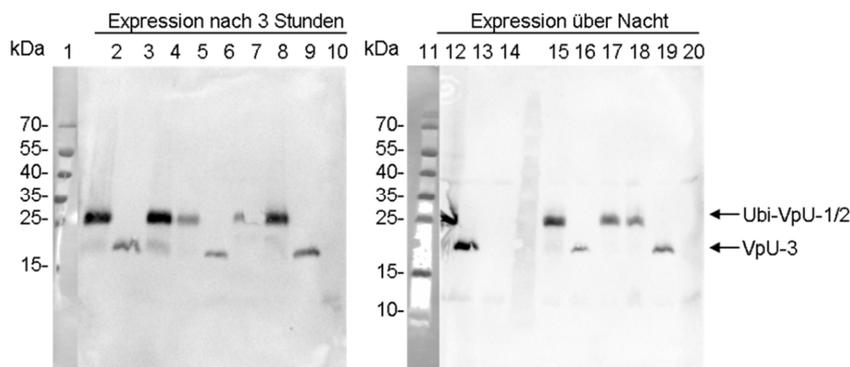


Abb. 11: Testexpression der verschiedenen VpU-Konstrukte in verschiedenen Zelltypen.

Western Blot der Testexpression mit den VpU-Konstrukten in 50 ml LB-Medium nach 3 h (Spur 2-10) und über Nacht (Spur 12-20). Detektion der Proteine mit Hilfe eines Penta-Histidin Antikörpers. VpU-2 in BL21(DE3) Zellen (2, 12), in C43(DE3) Zellen (5, 15) und in BL21(DE3)T1^R Zellen (8, 18). VpU-3 in BL21(DE3) Zellen (3, 13), in C43(DE3) Zellen (6, 16) und in BL21(DE3)T1^R Zellen (9, 19). VpU-1 in BL21(DE3) Zellen (4, 14), in C43(DE3) Zellen (7, 17) und in BL21(DE3)T1^R Zellen (10, 20).

Zur Quantifizierung der Banden wurde die relative Intensität der Banden zueinander mit Hilfe des Quantifizierungs-Tools des Programms Image Lab 4.0.1 bestimmt (die Bande mit der höchsten Intensität entspricht 100 %) und in Tab. 16 aufgeführt.

Tab. 16: Quantifizierung der Expressionsbanden im Western Blot der VpU-Expression mit verschiedenen Konstrukten in verschiedenen *E. coli* Zelltypen.

A: nach 3 h Expression

	BL21(DE3)	C43(DE3)	BL21(DE3)T1 ^R
VpU-2	94 %	31 %	77 %
VpU-1	100 %	11 %	0 %
VpU-3	34 %	18 %	34 %

B: nach über Nacht Expression

	BL21(DE3)	C43(DE3)	BL21(DE3)T1 ^R
VpU-2	100 %	88 %	39 %
VpU-1	0 %	60 %	0 %
VpU-3	84 %	23 %	40 %

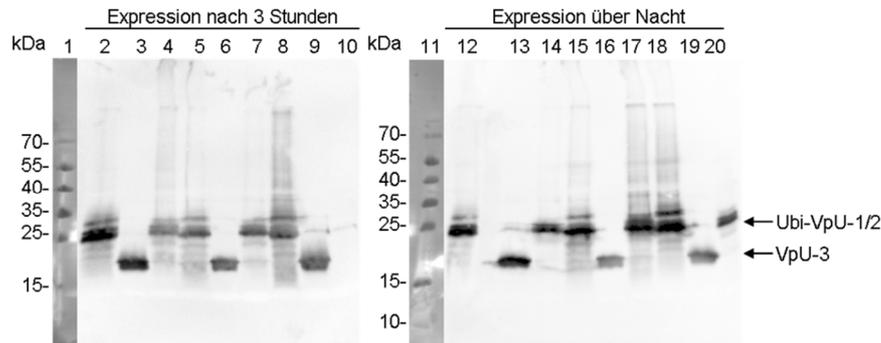
Dem Intensitätsvergleich der Banden im Western Blot ist zu entnehmen, dass die Ubi-VpU-2 Expressionlevel sowohl nach 3 h als auch über Nacht und die Ubi-VpU-1 Expressionlevel nach 3 h bei der Verwendung von LB-Medium in BL21(DE3) Zellen am höchsten waren.

4.1.1.4 Fraktionierung der *E. coli* Zellen nach der Expression in LB-Medium

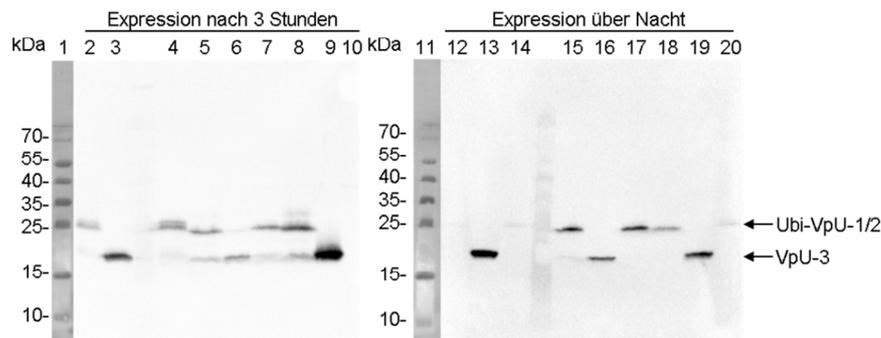
Es wurde untersucht, ob die VpU-Fusionsproteine nach der Expression als lösliche Proteine in den *E. coli* Zellen vorliegen, in „Inclusion bodies“ eingelagert oder in *E. coli* Membranen eingebaut werden. Dazu wurden die Zellpellets im Anschluss an die Testexpression in die „Inclusion body“- , die Membran- und die lösliche Fraktion separiert. Die drei Fraktionen wurden anschließend im Western Blot analysiert.

VpU-Fusionsproteine befinden sich hauptsächlich in der „Inclusion body“-Fraktion

A: „Inclusion Body“-Fraktion



B: Membran-Fraktion



C: Lösliche Fraktion

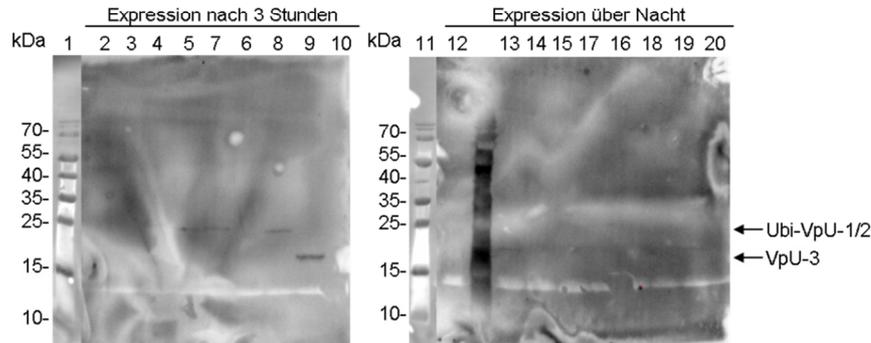


Abb. 12: Fraktionierung der Testexpressionspellets der VpU-Proteine.

Western Blots der Fraktionierung in „Inclusion bodies“ (A), Membran-Fraktion (B) und lösliche Bestandteile (C). Detektion der Proteine mit Hilfe eines Penta-Histidin Antikörpers. Ubi-VpU-2 in BL21(DE3) Zellen (2, 12), in C43(DE3) Zellen (5, 15) und in BL21(DE3)T1^R Zellen (8, 18). VpU-3 in BL21(DE3) Zellen (3, 13), in C43(DE3) Zellen (6, 16) und in BL21(DE3)T1^R Zellen (9, 19). Ubi-VpU-1 in BL21(DE3) Zellen (4, 14), in C43(DE3) Zellen (7, 17) und in BL21(DE3)T1^R Zellen (10, 20).

Die VpU-Fusionsproteine Ubi-VpU-1 und Ubi-VpU-2 befinden sich überwiegend in der „Inclusion body“-Fraktion und zu einem geringen Anteil in der Membran-Fraktion. Nur ein sehr geringer Anteil des Ubi-VpU-2 Proteins in BL21(DE3)T1^R und C43(DE3) Zellen sowie des Ubi-VpU-1 Proteins in C43(DE3) Zellen befindet sich nach 3 h Expression in der löslichen Fraktion. Nach der Expression über Nacht sind keine VpU-Fusionsproteine mehr in der löslichen Fraktion detektierbar.

Die Ergebnisse der Fraktionierung zeigen, dass VpU durch die Expression als Fusionsprotein mit Ubiquitin nicht in Lösung gehalten werden kann, da der Großteil des Proteins in „Inclusion bodies“ exprimiert wird.

4.1.1.5 Expression in verschiedenen Kulturmedien

Expressionslevel von Ubi-VpU-2 in TB-Medium wesentlich höher als in LB-Medium

Da die Expression von Ubi-VpU-2 in LB-Medium nur zu geringen Proteinausbeuten führte und das Fusionsprotein auf der SDS-PAGE nicht sichtbar war, wurde ein reichhaltigeres und gepuffertes Medium, das TB-Medium, getestet. Hier war eine Expression des Zielproteins auf der SDS-PAGE erkennbar. Des Weiteren wurde die Expression eines Abbruchprodukts mit einem Molekulargewicht von ca. 23 kDa nach der Expression über Nacht festgestellt. In Abb. 13 ist der Vergleich der Ubi-VpU-2 Expression in C43(DE3) Zellen in LB- und TB-Medium gezeigt.

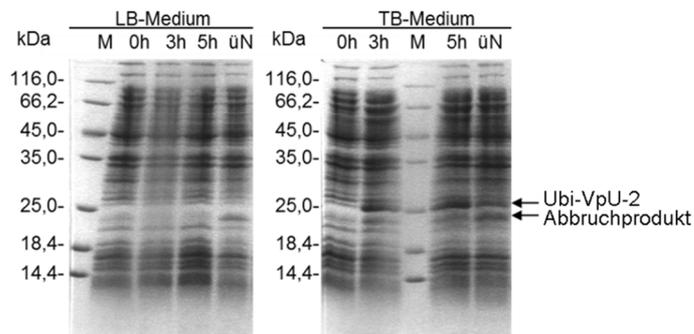


Abb. 13: Vergleich der Testexpression von Ubi-VpU-2 in LB- und TB-Medium.

SDS-PAGE der Testexpression von Ubi-VpU-2 in *E. coli* C43(DE3) Zellen vor der Induktion mit IPTG (0h) und 3 h und 5 h nach Induktion sowie über Nacht (üN) in 100 ml LB-Medium (links) und in 100 ml TB-Medium (rechts) bei 37 °C. M: Marker.

Da die vorliegenden Experimente zeigten, dass die Wahl des Kulturmediums einen großen Einfluss auf die Expression des Zielproteins hat, wurden weitere Expressionstests in dem Minimalmedium M9 durchgeführt, welches für die Expression isotopenmarkierter Proteine für NMR-Untersuchungen verwendet wird. Bei M9 handelt es sich, wie bei dem TB-Medium, um ein gepuffertes Medium.

Expression von Ubi-VpU-2 in M9-Medium ist höher als die von Ubi-VpU-1

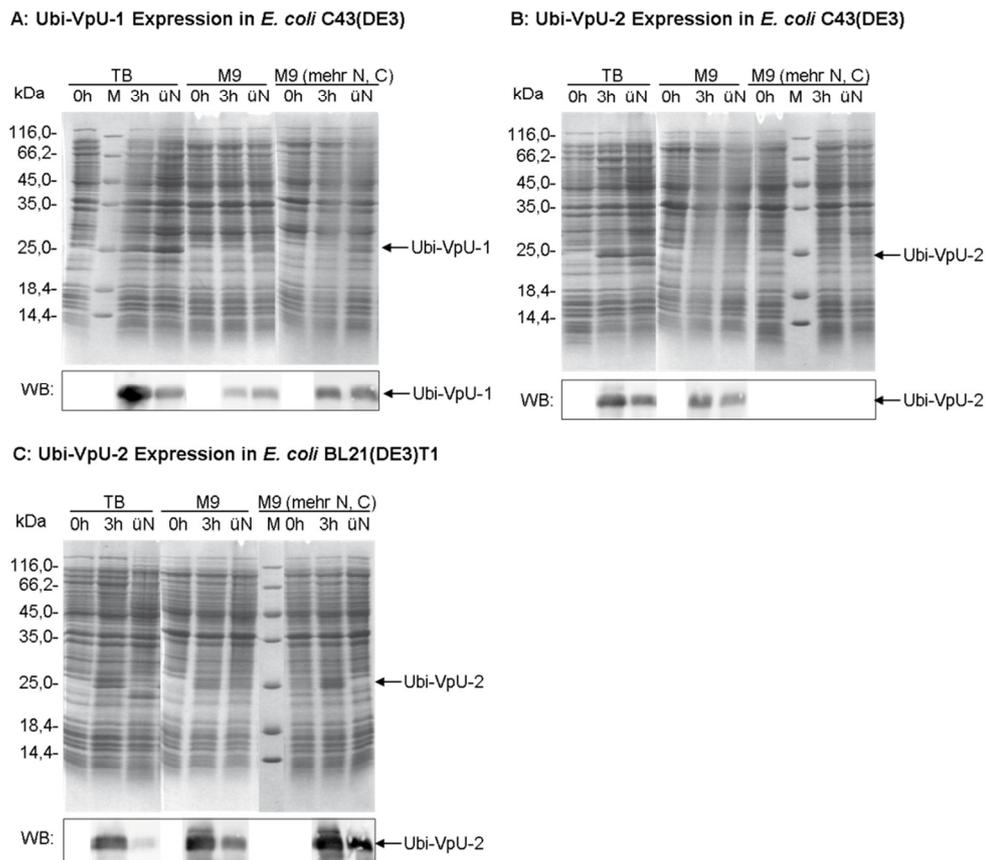


Abb. 14: Vergleich der Expression von Ubi-VpU-1 und Ubi-VpU-2 in verschiedenen *E. coli* Zelltypen in TB- und M9-Medium.

SDS-PAGE und Western Blot (WB) der Testexpression von Ubi-VpU-1 in *E. coli* C43(DE3) Zellen (A) und von Ubi-VpU-2 in *E. coli* C43(DE3) (B) und in *E. coli* BL21(DE3)T1^R Zellen (C) in 50 ml TB-Medium (TB), M9-Medium mit 2 g/l Glukose und 1 g/l NH₄Cl (M9) und M9-Medium mit 4 g/l Glukose und 3 g/l NH₄Cl (M9 (mehr N, C)) vor Induktion (0h), nach 3h Expression (3h) und Expression über Nacht (üN) bei 37 °C. Detektion der Proteine im Western Blot mit Hilfe eines Penta-Histidin Antikörpers. M: Marker.

In Abb. 14 ist zu sehen, dass unter den getesteten Bedingungen die Expression von Ubi-VpU-2 in M9-Medium in BL21(DE3)T1^R Zellen nach 3 Stunden am höchsten ist. Des Weiteren kann die Erhöhung der Glukose- (4 g/l statt 2 g/l) und NH₄Cl-Konzentration (3 g/l statt 1 g/l) die Expression noch zusätzlich steigern. Die Expressionslevel von Ubi-VpU-1 in M9-Medium sind dagegen unter den getesteten Bedingungen wesentlich geringer. In C43(DE3) Zellen steigt das Expressionslevel von Ubi-VpU-1 bei der Expression über Nacht an, wohingegen es bei den BL21(DE3)T1^R Zellen abnimmt. Dies könnte an der Zytotoxizität des Membranproteins liegen.

Das Kultur-zu-Flasche Verhältnis hat keinen Einfluss auf die Expression

Basierend auf den Ergebnissen der Testexpression wurde die Expression von Ubi-VpU-2 in präparativem Maßstab in BL21(DE3)T1^R Zellen für 3 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Da das Kultur-zu-Flasche Verhältnis ebenfalls einen Einfluss auf die Expressionsrate haben kann, wurden in Abb. 15 zwei verschiedene Kultur-zu-Flasche Verhältnisse miteinander verglichen (250 ml und 500 ml Kultur in 2,5 l Erlenmeyerkolben).

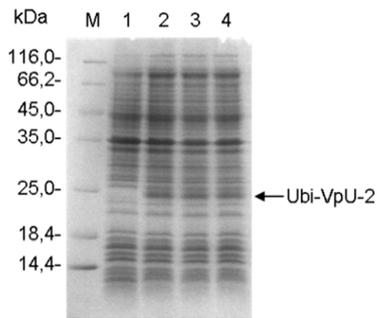


Abb. 15: Expression von Ubi-VpU-2 in präparativem Maßstab.

SDS-PAGE der Expression von Ubi-VpU-2 in *E. coli* BL21(DE3)T1^R im präparativen Maßstab für 3 h bei 37 °C in M9-Medium. 500 ml Expressionskultur in 2,5 l Erlenmeyerkolben (Kultur-zu-Flasche Verhältnis 1 : 5) vor Induktion (Spur 1), nach 3 h Expression (Spur 2 und 3). 250 ml Expressionskultur in 2,5 l Erlenmeyerkolben (Kultur-zu-Flasche Verhältnis 1 : 10) nach 3 h Expression (Spur 4). Zellen vor der Induktion mit IPTG (0h) und 3h und 5h nach Induktion sowie über Nacht (üN) in LB-Medium (links) und in TB-Medium (rechts) bei 37 °C.

Die Expression von Ubi-VpU-2 im präparativen Maßstab war erfolgreich. Die Vergrößerung des Kultur-zu-Flasche Verhältnisses von 1 : 5 auf 1 : 10 hatte keinen erkennbaren Einfluss auf das Expressionslevel, daher wurde die Expression im Weiteren als 500 ml Kultur in 2,5 l Erlenmeyerkolben durchgeführt.

4.1.2 Reinigung von VpU-1 und VpU-2

4.1.2.1 Expression und Reinigung der His-PreScission

Für die Abspaltung des VpUs von dem Ubiquitin-Fusionsprotein wurde die Protease PreScission benötigt. Diese wurde mit einem N-terminalen 6 x His-Tag, wie in Kapitel 3.8 beschrieben, exprimiert und gereinigt. Die Expression wurde in *E. coli* BL21(DE3)T1^R Zellen bei 37 °C durchgeführt. 4,5 h nach der Induktion mit 1 mM IPTG war eine deutliche Überexpression mittels SDS-PAGE zu erkennen (siehe Abb. 16) und die Zellen konnten geerntet werden.

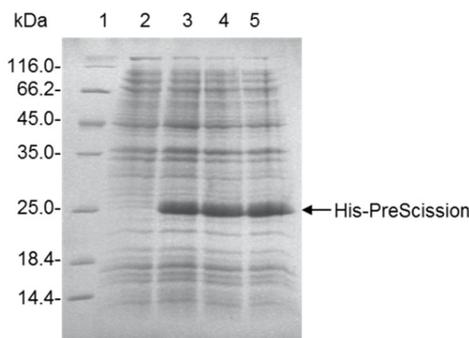


Abb. 16: Expressionslevel der His-PreScission.

SDS-PAGE der Expression von His-PreScission. Spur 1: Marker, Spur 2: vor Induktion, Spur 3: nach 1 h Expression, Spur 4: nach 3 h Expression, Spur 5: nach 4,5 h Expression.

Nach dem Zellaufschluss mit Hilfe eines Ultraschallstabs wurde das Protein über eine Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA Agarose gereinigt. Die Analyse der einzelnen Reinigungsschritte erfolgte mittels SDS-PAGE und ist in Abb. 17 dargestellt.

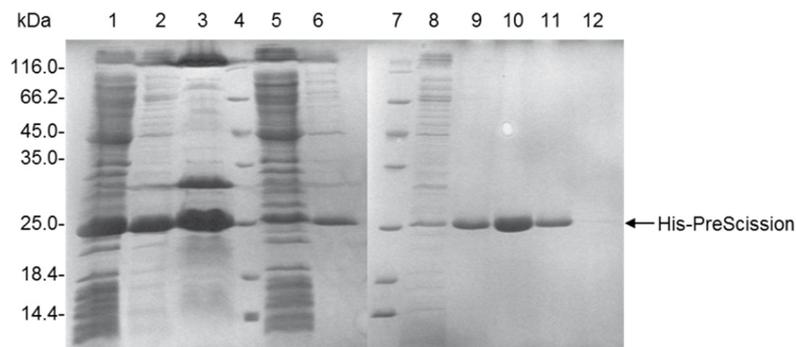


Abb. 17: Reinigung der His-PreScission.

SDS-PAGE der einzelnen Reinigungsschritte der His-PreScission. Spur 1: Überstand der ersten Zellyse, Spur 2: Überstand der zweiten Zellyse, Spur 3: Pellet nach zweiter Zellyse, Spur 4: Marker, Spur 5: Durchfluss des Überstands der ersten Zellyse, Spur 6: Waschschrift mit 20 mM Imidazol, Spur 7: Marker, Spur 8: Durchfluss des Überstands der zweiten Zellyse, Spur 9: Waschschrift mit 20 mM Imidazol, Spur 10: Elution mit 50 mM Imidazol, Spur 11: Elution mit 100 mM Imidazol, Spur 12: Elution mit 300 mM Imidazol.

Zur Entfernung des Imidazols wurde anschließend eine Dialyse unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, um die Ausbildung von Disulfidbrücken zu verhindern.

4.1.2.2 Reinigung von VpU

Die Reinigung von VpU-1 und VpU-2 wurde, wie in Kapitel 3.10 beschrieben, anhand des vorhandenen Protokolls aus Wittlich *et al.*⁵⁹ durchgeführt. VpU-1 bezeichnet das VpU-Protein mit einem acht Aminosäuren langem N-terminalen Überhang, das durch den Verdau von Ubi-VpU-1 mit der PreScission Protease generiert wird. VpU-2 wird analog aus Ubi-VpU-2 generiert und hat einen zwei Aminosäuren langen N-terminalen Überhang. Die molaren Massen der gereinigten Proteine wurde mittels ESI-MS überprüft. Für VpU-2 wurde eine Masse von 9411,0 Da bestimmt. Die Abweichung von 3,2 Da zur berechneten Masse von 9407,8 Da liegt innerhalb der Fehlertoleranz des Massenspektrometers. Für VpU-1 wurde eine Masse von 10021,0 Da bestimmt. Die Abweichung zur berechneten Masse von 10017,6 Da betrug 3,4 Da und liegt damit ebenfalls innerhalb der Fehlertoleranz des Gerätes.

Die Analyse der einzelnen Reinigungsschritte mittels SDS-PAGE ist in Abb. 18 dargestellt.

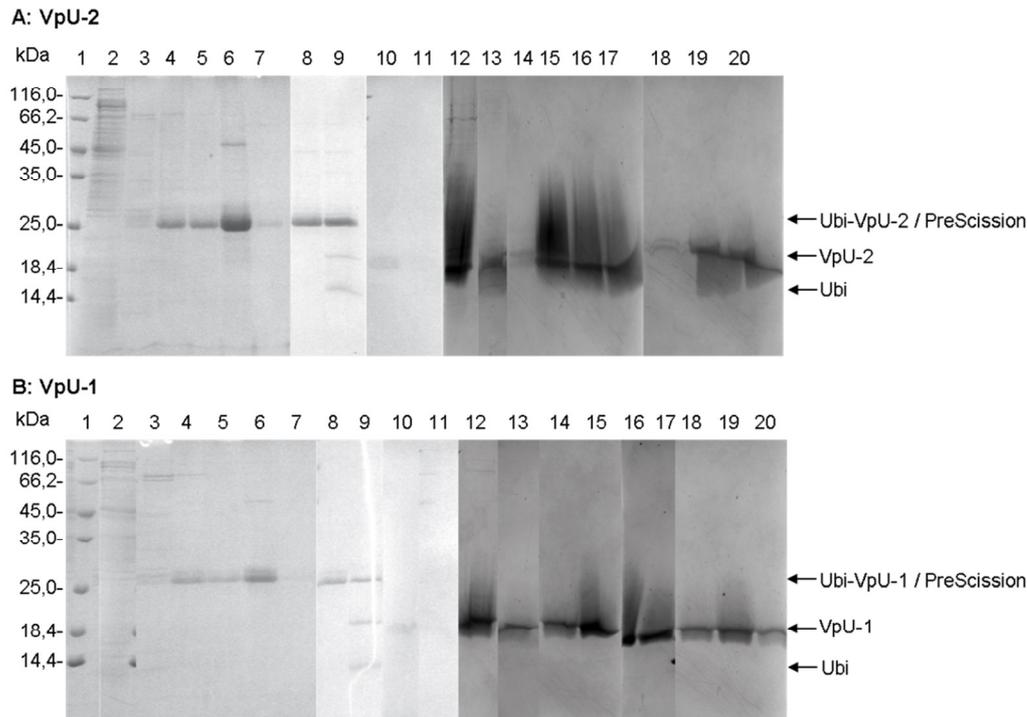


Abb. 18: Reinigung von VpU-1 und VpU-2.

Reinigung aus dem Expressionspellet einer 21 Expressionskultur in M9-Medium von VpU-2 in BL21(DE3)T1^R Zellen nach 3h Expression bei 37 °C (A) und von VpU-1 in C43(DE3) Zellen nach Expression über Nacht bei 37 °C (B). Spur 1: Marker, Spur 2-7: Ni-NTA Chromatographie (Waschschritte mit 10 CV 20 mM (Spur 2) und 10 CV 50 mM Imidazol (Spur 3), Elution mit je 2 x 5 CV 100 mM (Spur 4, 5) und 2 x 300 mM Imidazol (Spur 6, 7)), Spur 8-9: Verdau mit His-PreScission Protease (vor Inkubation (Spur 8), nach Inkubation über Nacht (Spur 9)), Spur 10-11: 2. Ni-NTA Chromatographie (Durchfluss (Spur 10) und Waschschritt mit 2,5 CV Puffer (Spur 11)), Spur 12-13: TCA-Fällung des Durchflusses (Spur 12) und des Waschschrittes (Spur 13) der Ni²⁺-NTA Chromatographie. Spur 14 - 20: „Reversed Phase“ Chromatographie (VpU enthaltende Fraktionen des Durchflusses (Spur 14 -17) und des Waschschrittes (Spur 18-20)).

Höhere VpU-Ausbeute bei Verwendung des VpU-2-Konstrukts

Die Ausbeute der Reinigung betrug pro Liter Expressionskultur ca. 0,42 mg (VpU-2) bzw. ca. 0,19 mg (VpU-1). Somit konnte die Ausbeute des VpU-Proteins durch die Verwendung des neuen Konstrukts ungefähr verdoppelt werden. Gemessen am Bedarf der Festkörper-NMR-Spektroskopie war die erzielte Ausbeute von < 0,5 mg je Liter Expressionskultur jedoch nicht ausreichend für umfangreiche Messungen. Die geringen Ausbeuten sind einerseits auf die noch immer geringe Expression des Fusionsproteins Ubi-VpU-2 und zum anderen auf die Einlagerung des Proteins in „Inclusion bodies“ zurückzuführen. Der letztgenannte Anteil wurde im Rahmen des vorhandenen Reinigungsprotokolls nicht verwertet.

4.1.3 DNP-NMR-Messungen an VpU in Liposomen

Es wurden erste DNP-NMR-Messungen des ^{13}C , ^{15}N -isotopenmarkierten VpU-1 in POPC-Liposomen an 9,4 T und 14,1 T DNP-NMR-Spektrometern bei der Firma Bruker BioSpin in Billerica, Massachusetts, USA durchgeführt. Das ^{13}C , ^{15}N -isotopenmarkierte VpU-1 war zu Beginn dieser Doktorarbeit bereits vorhanden.^{80,81} Der Einbau von VpU-1 in POPC-Liposomen erfolgte nach dem Protokoll von Wittlich *et al.*⁵⁹ Für VpU-1 enthaltende Liposomen wurde ein molares Verhältnis von Protein-zu-Lipid von 1 : 92 gewählt.

4.1.3.1 Signalverstärkung durch DNP

Mit Hilfe der DNP-NMR-Spektroskopie ist es möglich, Spektren in kürzerer Zeit und mit geringerer Probenmenge aufzunehmen, da es durch die Übertragung der Magnetisierung von Elektronenspins auf Kernspins aufgrund der unterschiedlichen gyromagnetischen Verhältnisse zu einer starken Signalverstärkung kommt.^{15,18} Aus dem Verhältnis der gyromagnetischen Verhältnisse von Elektronenspins zu Kernspins ergibt sich eine theoretisch mögliche maximale Signalverstärkung von ~ 660 für Protonen.¹⁵

Die Signalverstärkung der Probe des ^{13}C , ^{15}N -isotopenmarkierten VpU-1 in POPC-Liposomen durch die Verwendung eines DNP-NMR-Spektrometers wurde experimentell für ein 9,4 T NMR Spektrometer mit DNP-Modul ermittelt. Abb. 19 zeigt den Vergleich der 1D ^1H / ^{13}C -CP-Spektren dieser Probe mit und ohne Mikrowellenanregung.

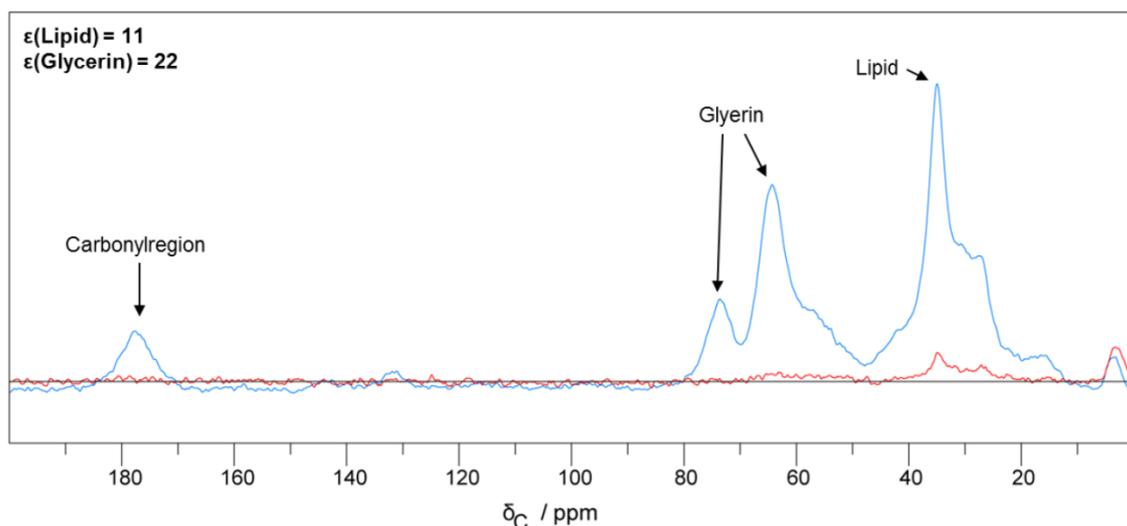


Abb. 19: Signalverstärkung durch DNP in den 1D ^{13}C -Spektren des ^{13}C -, ^{15}N -markierten VpU-1 in POPC-Liposomen.

Die 1D ^{13}C -CP-MAS-DNP-NMR-Spektren von ^{13}C , ^{15}N -markiertem VpU-1 in POPC-Liposomen mit 10 mM TOTAPOL in Glycerin- d_8 : D_2O : H_2O (60 : 30 : 10 Vol.-%) wurden mit 32 Scans an einem 400 MHz DNP-NMR-Spektrometer mit (blau) und ohne (rot) Mikrowellenanregung bei 263 GHz bei einer Probenrotationsfrequenz von 8 kHz und einer nominalen Proben temperatur von ca. 100 K aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer Exponentialfunktion (Linienverbreiterung: 25 Hz) prozessiert.

Aus den Signalintensitäten der ^1H / ^{13}C -CP-Spektren von ^{13}C -, ^{15}N -markiertem VpU-1 in POPC-Liposomen mit und ohne Mikrowellenanregung wurde ein Signalverstärkungsfaktor von 11 bei Verwendung von DNP für die Lipide ermittelt.

4.1.3.2 Optimierung der Probenzusammensetzung

Zur Optimierung der Probenzusammensetzung wurden drei Proben des ^{13}C , ^{15}N -markierten VpU-1 in POPC-Liposomen hergestellt, in denen die Konzentration des Biradikals TOTAPOL¹⁶ sowie der Anteil des Glycerins variiert wurden.⁸²

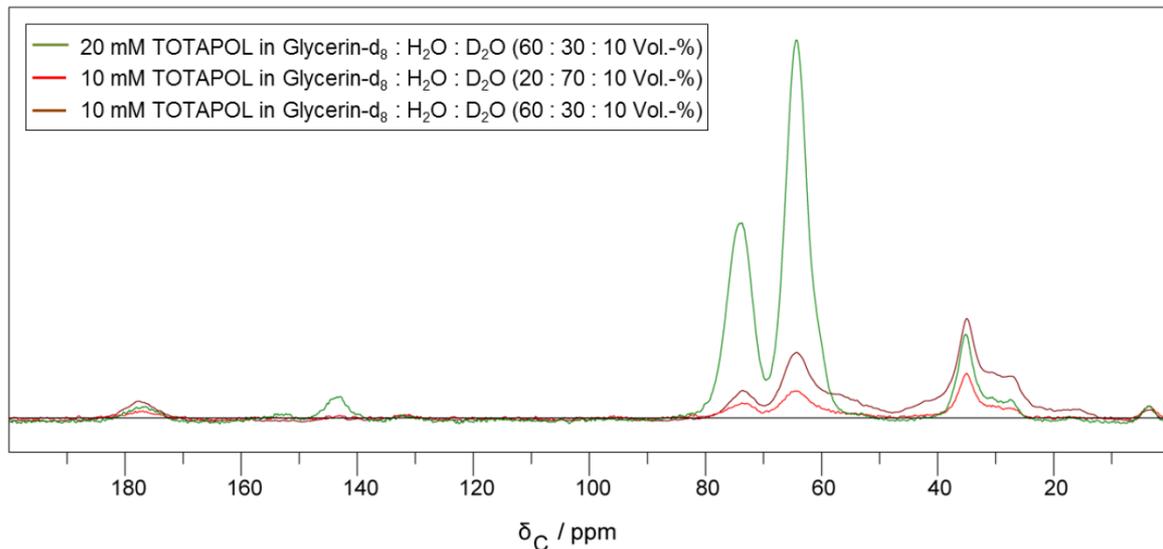


Abb. 20: Vergleich der 1D ^1H / ^{13}C -CP-MAS-DNP-NMR-Spektren von ^{13}C , ^{15}N -markiertem VpU-1 in POPC-Liposomen bei unterschiedlicher Probenzusammensetzung.

Für das grüne Spektrum wurde 3,2 mg lyophilisiertes ^{13}C , ^{15}N -markiertes VpU-1 in POPC-Liposomen in einer Lösung mit 20 mM TOTAPOL in Glycerin d_8 : D_2O : H_2O (60 : 30 : 10 Vol.-%) resuspendiert. Für das rote Spektrum wurde 2,1 mg lyophilisiertes ^{13}C , ^{15}N -markiertes VpU-1 in POPC-Liposomen in einer Lösung mit 10 mM TOTAPOL in Glycerin- d_8 : D_2O : H_2O (20 : 70 : 10 Vol.-%) resuspendiert. Für das braune Spektrum wurde ca. 2,5 mg lyophilisiertes ^{13}C -, ^{15}N -markiertes VpU-1 in POPC-Liposomen in einer Lösung mit 10 mM TOTAPOL in Glycerin- d_8 : D_2O : H_2O (60 : 30 : 10 Vol.-%) resuspendiert. Die Spektren wurden mit 32 Scans an einem 400 MHz DNP-NMR-Spektrometer mit einer Mikrowellenanregung bei 263 GHz bei einer Rotationsfrequenz von 8 kHz und einer nominalen Proben temperatur von ca. 100 K aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer Exponentialfunktion (Linienverbreiterung: 25 Hz) prozessiert.

In Abb. 20 ist zu sehen, dass von den getesteten DNP-Probenzusammensetzungen die Lösung bestehend aus 10 mM TOTAPOL in Glycerin- d_8 : H_2O : D_2O (60 : 30 : 10 Vol.-%) am besten geeignet ist, da hier die beste Signalverstärkung der Lipide und des aliphatischen Bereichs erreicht werden konnte und nur eine geringere Signalverstärkung der Glycerinsignale erfolgte. Da die Proteinsignale die gewünschten Informationen enthalten und die Glycerinsignale in den Spektren eher stören, war eine hohe Signalverstärkung im aliphatischen Bereich gewünscht und im Bereich der Glycerinsignale unerwünscht. Eine höhere Konzentration des Biradikals TOTAPOL verstärkte die Signale des Glycerins wesentlich stärker und die Signale im Bereich der Lipide und im aliphatischen Bereich weniger. Dies könnte an der unterschiedlichen räumlichen Nähe des TOTAPOLs zum Glycerin, zu den Lipiden und zum Protein liegen, da der Polarisierungstransfer bei geringerem Abstand der Elektronen zu den Kernen effektiver ist. Eine Verringerung der Glycerinkonzentration in der Probe führte dahingegen zu einer insgesamt geringeren Signalintensität. Die Glycerin-Wasser Mischung in der Probe sorgt als Kryoprotektant für eine homogene Probe und verhindert die Bildung von Eiskristallen. Durch eine zu geringe Glycerinkonzentration in der Probe kann es zur Phasentrennung

zwischen Lösungsmittel, Protein und Biradikal kommen, wodurch der effektive Polarisierungstransfer von den Elektronen auf die Kerne verhindert wird.¹⁷

4.1.3.3 Initiale DNP-NMR Korrelationsexperimente

Basierend auf den oben genannten Untersuchungen wurde ein 2D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ Korrelationsspektrum der ^{13}C , ^{15}N -markierten VpU-1 Probe in POPC-Liposomen in 10 mM TOTAPOL, Glycerin- d_8 : H_2O : D_2O (60 : 30 : 10 Vol.-%) aufgenommen und mit einem bereits vorhandenen Festkörper-NMR-Spektrum von ^{13}C , ^{15}N -markiertem VpU-1 in POPC-Liposomen aus Do, H. Q.⁸¹ verglichen.

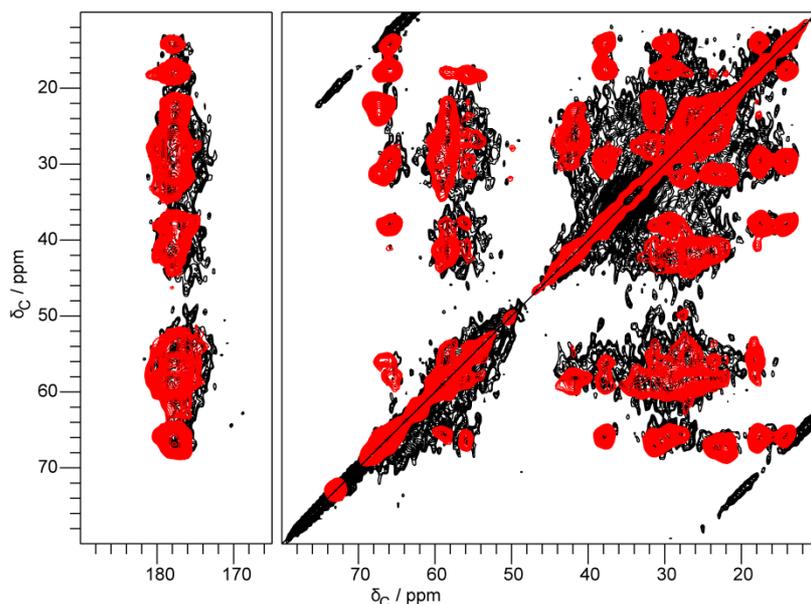


Abb. 21: Vergleich des DNP-NMR 2D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrums von ^{13}C -, ^{15}N -markiertem VpU-1 in POPC-Liposomen (schwarz) mit einem Festkörper-NMR 2D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrums derselben Probe (rot).

Das DNP-NMR PDS-D-Spektrum mit einer Mischzeit von 100 ms wurde an einem 600 MHz DNP-NMR-Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 8 kHz und einer nominalen Proben temperatur von 95 - 100 K aufgenommen und mit einer Kombination aus einer quadratischen Sinus- und Cosinusfunktion (SSB: 2,7) prozessiert. Das Festkörper-NMR PDS-D-Spektrum mit einer Mischzeit von 70 ms wurde an 600 MHz NMR-Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 9,375 kHz und einer nominalen Proben temperatur von 10 °C aufgenommen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 100 Hz, Linienverbreiterung: 200 Hz, Gaußmaximum: 0) prozessiert.

In Abb. 21 ist zu sehen, dass die Signale des Festkörper-NMR-Spektrums von ^{13}C , ^{15}N -markiertem VpU-1 in POPC-Liposomen mit den Signalen des DNP-NMR-Spektrums überlappen. Das bedeutet, dass sich die Gesamtstruktur des Proteins unter den Bedingungen der DNP-NMR-Messungen nicht verändert hat. Die geringere Auflösung des DNP-NMR-Spektrums im Vergleich zum Festkörper-NMR-Spektrum beruht auf dem Ausfrieren aller verbliebenen Moleküldynamiken des Proteins bei der niedrigeren Temperatur von ungefähr 100 K.⁸³ Die daraus resultierenden unterschiedlichen Konformationen führen zur inhomogenen Linienverbreiterung im DNP-NMR-Spektrum.

4.1.4 Ausblick

Zur Erhöhung der Ausbeute der VpU-Herstellung könnte eine denaturierende Reinigung aus den „Inclusion bodies“ überprüft werden, da sich herausgestellt hat, dass ein Großteil des Proteins in unlösliche „Inclusion bodies“ exprimiert wird.

4.2 Strukturelle Untersuchung von membrangebundenem vs. präzipitiertem NP7

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Veränderung der Struktur des Proteins NP7 durch die Bindung an eine Modellmembran zu untersuchen. Dazu wurde das Protein zunächst heterolog in *E. coli* exprimiert und dann gereinigt. Hierzu wurde ein bereits vorhandenes Protokoll aus der Publikation von Knipp *et al.*⁴³ in unserem Labor etabliert und optimiert. Für die Expression von isotopenmarkiertem NP7 wurde das Protokoll der Publikation von Varghese *et al.*⁵⁷ in unserem Labor etabliert und angepasst. Für die Untersuchung der Bindung von NP7 an Modellmembranen wurden Liposomen ausgewählt. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der NP7 Proben mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie und die Resonanzzuordnung. Es wurde zudem ein Vergleich mit einer publizierten NP7-Kristallstruktur (PDB: 4XME) angestellt. Zum Schluss folgte der Vergleich der Festkörper-NMR-Spektren von freiem und an Liposomen gebundenem NP7.

4.2.1 Heterologe Expression, Reinigung und Rekonstitution von NP7

4.2.1.1 Etablierung der Expression von NP7 in unserem Labor

Zur Adaption der Expression von NP7 an die Bedingungen in unserem Labor wurde das Protein zunächst in LB-Medium und dann in M9-Medium exprimiert.

Vergleich zweier Rezepturen des M9-Mediums

Das M9-Medium wurde nach zwei verschiedenen Rezepturen hergestellt, da die Rezeptur des M9-Mediums in der Publikation von Varghese *et al.*⁵⁷ zu vorangegangenen Festkörper-NMR-Untersuchungen des Proteins NP7 von der bisher in unserem Labor gebräuchlichen Rezeptur abwich (A: Rezeptur in der Publikation⁵⁷, B: Rezeptur in unserem Labor). Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)T1^R Zellen bei 37 °C.

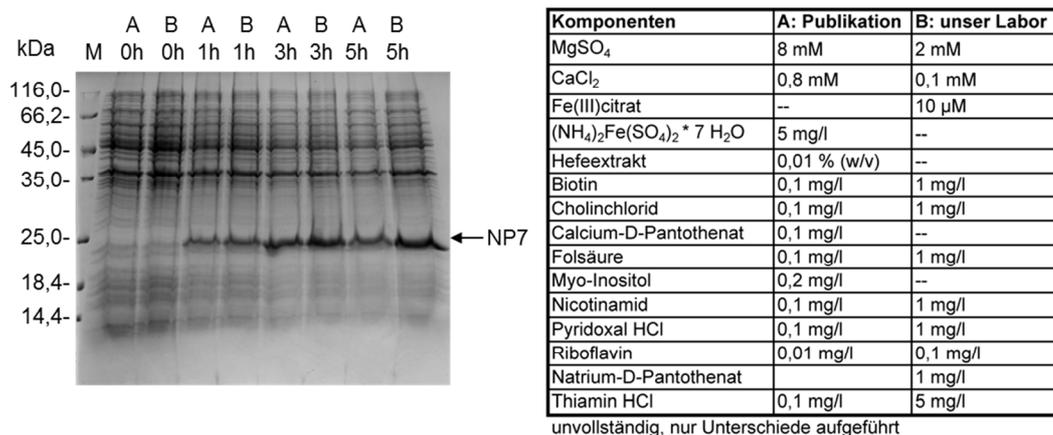


Abb. 22: Vergleich der Expression von NP7 in M9-Medium hergestellt nach zwei unterschiedlichen Rezepturen (A: Varghese *et al.*⁵⁷, B: unser Labor).

SDS-PAGE der Expression von NP7 in *E. coli* BL21(DE3)T1^R Zellen bei 37 °C in 1 l M9-Medium zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 - 5 h) nach Induktion (links). Unterschiede in den Rezepturen der M9-Medien aus Varghese *et al.*⁵⁷ (A) und in unserem Labor (B) (rechts).

In Abb. 22 ist zu sehen, dass die Expression von NP7 nach 5 Stunden in unserem M9-Medium am höchsten war, daher wurde dieses für die folgenden Expressionen verwendet. Die Bande der Expression von NP7 in dem M9-Medium nach Varghese *et al.*⁵⁷ wies dahingegen nach 5 Stunden Expression nur eine Intensität von 61 % von derjenigen der Expression in unserem M9-Medium auf (Zur Quantifizierung der Banden wurde die relative Intensität der Banden zueinander mit Hilfe des Programms Image Lab 4.0.1 bestimmt (die Bande mit der höchsten Intensität entspricht 100 %)).

Expression des revers isotopenmarkierten NP7s

Die Expression und Reinigung des isotopenmarkierten NP7s erfolgte analog zu der des unmarkierten NP7s. Die Expression von U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7 erfolgte durch die Zugabe der Aminosäuren V, L, F und Y mit nativer Isotopenverteilung sowie von ¹³C-isotopenmarkierter Glukose und ¹⁵N-isotopenmarkiertem NH₄Cl zum M9-Medium (vgl. Kapitel 3.14).

4.2.1.2 Etablierung der Reinigung von NP7 in unserem Labor

Die Reinigung des Proteins wurde wie in Kapitel 3.14 beschrieben durchgeführt. Das Reinigungsprotokoll basierte auf der in Knipp *et al.*⁴³ beschriebenen Reinigung von NP7 und wurde an die Gegebenheiten angepasst. Durch die Zellyse mit einem Zellaufschluss-System (Constant Systems Ltd.) konnte ein vollständiger Zellaufschluss erreicht werden. Dieser war mit dem Branson Sonifier nach dem Protokoll aus Knipp *et al.*⁴³ nicht erfolgreich. Des Weiteren konnte durch eine Verringerung der Flussrate und des Auftragsvolumens der Größenausschlusschromatographie sowie eine Verlängerung des Waschschrilles zwischen den einzelnen Reinigungsschritten die Reinheit des Proteins erhöht werden.

Reinigungsschritte

Die Reinigung von NP7 wurde, wie in Kapitel 3.14 beschrieben, durchgeführt. Nach dem Zellaufschluss mit einem Zellaufschluss-System (Constant Systems Ltd.) wurden die „Inclusion bodies“ über verschiedene Waschschrille gereinigt und dann in 3,5 M GdmCl solubilisiert (vgl. Abb. 23). Da der Waschpuffer 4 bereits 1,5 M GdmCl enthielt, sind im Überstand des Waschschrilles 4 bereits geringe Mengen solubilisiertes NP7 enthalten. Der Großteil des NP7 befindet sich jedoch im Pellet, was nach Solubilisierung der „Inclusion bodies“ mit 3,5 M GdmCl in der Spur SP in Abb. 23 sichtbar wird.

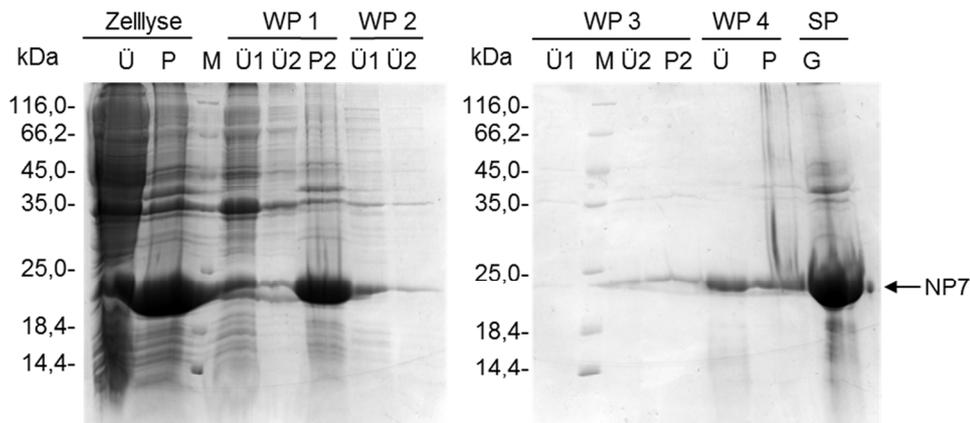


Abb. 23: Reinigung von NP7.

SDS-PAGE der Zellyse und „Inclusion bodies“ Waschschritte und Solubilisierung. Marker (M). Überstand (Ü) und Pellet (P) der Zellyse. Überstand nach erstem (Ü1) und zweitem (Ü2) Waschschritt mit Waschpuffer 1 - 4 (WP 1 - 4) und das Pellet (P2). Solubilisierte „Inclusion bodies“ (G) in Solubilisierungspuffer (SP).

Optimierung der Größenausschlusschromatographie

Da auf der SDS-PAGE nach der Größenausschlusschromatographie noch Verunreinigungen zu sehen waren, wurde die Flussrate von 2,6 ml/min auf 2,0 ml/min verringert und das Auftragsvolumen von 13 ml auf 10 ml verringert, sowie der Waschschritt zwischen den einzelnen Reinigungen von 1,25 CV auf 1,75 CV ausgedehnt. Dadurch konnten die Verunreinigungen im finalen NP7-Protein stark verringert werden. Dies ist auf der SDS-PAGE ersichtlich, welche nach dem abschließenden Reinigungsschritt mittels Kationenaustauschchromatographie erstellt wurden. Auf der linken Seite der Abb. 24 sind die SDS-PAGEs von fünf bzw. sieben Fraktionen der Kationenaustauschchromatographieläufe mit bzw. ohne Optimierung des Größenausschlusschromatographieschrittes gezeigt, welche jeweils im Bereich des NP7-Signals (Retentionsvolumen von ca. 145 ml) entnommen wurden. Auf der rechten Seite ist das Chromatogramm der finalen Kationenaustauschchromatographie mit Elution über einen Calciumionengradienten zu sehen.

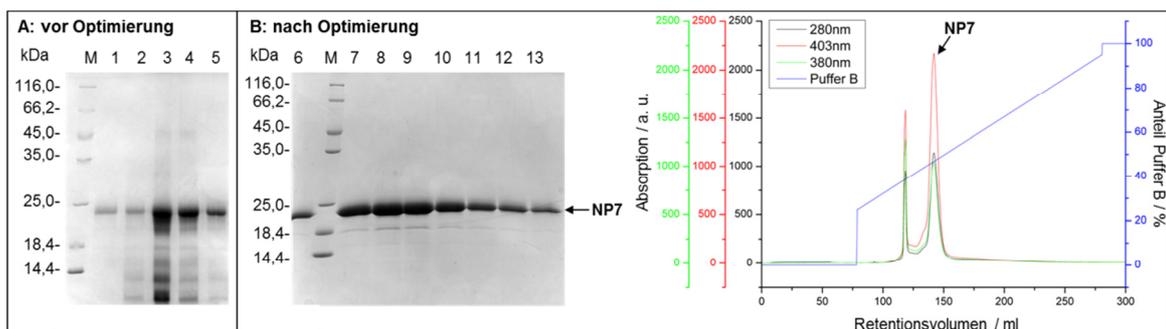


Abb. 24: Erhöhung der Reinheit von NP7 durch Optimierung des Größenausschlusschromatographieschrittes.

SDS-PAGEs der NP7-Fractionen nach der Kationenaustauschchromatographie vor (A) bzw. nach (B) Optimierung des Größenaustauschchromatographieschrittes sowie Chromatogramm der Kationenaustauschchromatographie nach der Optimierung (B).

Revers isotopenmarkiertes NP7 kann für Festkörper-NMR-Untersuchungen verwendet werden

Die SDS-PAGE des Signals der Kationenaustauschchromatographie von U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7 bei einem Retentionsvolumen ca. 145 ml zeigte eine Bande, die dem erwarteten Molekulargewicht des Proteins entsprach. Im Massenspektrum des gleichen Signals wurden Molekulargewichte im Bereich von 21755 Da bis 21774 Da detektiert. Diese sind um 9 - 28 Da kleiner, als das berechnete Molekulargewicht des Proteins von 21783 Da. Die geringere Masse deutet auf den Einbau von 9 - 28 zusätzlichen ¹²C oder ¹⁴N-Kernen anstelle von ¹³C- oder ¹⁵N-Kernen hin. Da eine unvollständige ¹³C- und ¹⁵N-Isotopenmarkierung jedoch normalerweise statistisch im Protein verteilt ist, ist hierdurch kein negativer Einfluss auf die Sichtbarkeit der einzelnen Aminosäuren in den NMR-Spektren zu erwarten. Daher wurden die Fraktionen dieses Signals für die Festkörper-NMR-Untersuchungen verwendet.

Das Signal der Kationenaustauschchromatographie bei einem Retentionsvolumen von ca. 120 ml zeigte zwar in der SDS-PAGE ebenfalls eine Bande im Bereich des erwarteten Molekulargewichts. Die massenspektrometrische Untersuchung ergab jedoch ein um 257 Da größeres Molekulargewicht als berechnet. Die Ursache für diese Abweichung konnte nicht abschließend geklärt werden, und das Protein aus dem Bereich des Signals bei ca. 120 ml wurde daher verworfen.

Reinheit und Ausbeuten von NP7

NP7 konnte in einer Reinheit von > 85 % (SDS-PAGE Intensitätsanalyse mit dem Programm Image Lab 4.0.1) und einer durchschnittlichen Ausbeute von 1,8 mg aus 1 l LB-Medium hergestellt werden. U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7 konnte in einer Reinheit von > 95 % (SDS-PAGE Intensitätsanalyse mit dem Programm Image Lab 4.0.1) und einer durchschnittlichen Ausbeute von 1,4 mg pro Liter M9-Medium hergestellt werden.

Einbau des Liganden Nitroxid in NP7

Die Veränderungen des UV-Vis Absorptionsspektrums von NP7 im Verlauf der Reinigung sind in Abb. 25 dargestellt. Die Entstehung des Absorptionsmaximums bei 403 nm nach Häm Zugabe deutet auf die Bindung des Häm-Kofaktors an NP7 hin und liefert einen Hinweis auf die Funktionalität des rekombinant hergestellten Proteins.

Zur Präparation der NMR Probe musste dann noch der Puffer ausgetauscht und der Ligand Nitroxid in das Protein eingebaut werden. Dies geschah durch die Zugabe von 2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid zum Protein im molaren Verhältnis von 1,33 : 1. Daraus ergab sich ein molares Verhältnis von Nitroxid-zu-NP7 von 2 : 1, da aus einem Mol 2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid 1,5 Mol Nitroxid freigesetzt werden. Der Einbau war durch die Rotfärbung des Proteins und einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 403 nm nach 417 nm (Soret Bande) und der Verschiebung bzw. Verstärkung zweier lokaler Absorptionsmaxima bei ca. 531 nm (β -Bande) und ca. 565 nm (α -Bande) zu verfolgen.

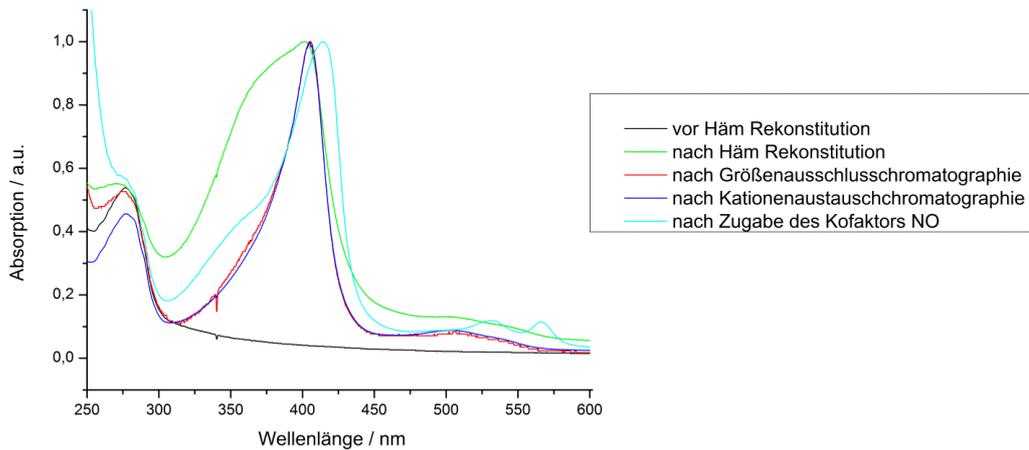


Abb. 25: UV-Vis Absorptionsspektren von NP7 nach unterschiedlichen Schritten der Reinigung.

Die Absorptionsspektren wurden durch Normierung des Absorptionsmaximums auf 1 skaliert. Vor Häm Rekonstitution (schwarz): Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Nach Häm Rekonstitution (grün): zusätzliche Absorption der Soret Bande bei 403 nm und Absorption bei 380 nm, die möglicherweise auf NP7-Aggregation zurückzuführen ist. Nach Größenausschlusschromatographie (rot): Entfernung der Spezies mit Absorption bei 380 nm. Nach Kationenaustauschchromatographie (blau): Keine großen Veränderungen im Absorptionsspektrum. Nach Einbau von NO in die Hämgruppe (hellblau): Verschiebung des Absorptionsmaximums von 403 nm nach 417 nm, sowie Entstehung zwei neuer lokaler Maxima bei 531 nm und bei 565 nm.

4.2.2 Bindung von NP7 an Liposomen

In dieser Arbeit wurde die Veränderung der Struktur von NP7 durch die Bindung an Modellmembranen untersucht. Liposomen sind gut als Modellmembran geeignet, da sie aus Lipiddoppelschichten bestehen und eine auf das zu untersuchende Protein abgestimmte Wahl der Lipidzusammensetzung ermöglichen. Da NP7 über elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativen Ladung von Lipiden interagiert, wurde ein Lipid mit einer einfach negativ geladenen Kopfgruppe verwendet.^{43,56} Dieses wurde im molaren Verhältnis von 1 : 3 mit einem Lipid mit einer neutralen Kopfgruppe, die nicht mit NP7 interagiert, gemischt.⁴³

Die Liposomen wurden wie in Kapitel 3.15 beschrieben hergestellt und die Bindung an NP7 wie in Kapitel 3.16 beschrieben durchgeführt. Nach der Inkubation der Liposomen mit NP7 bei 37 °C für 30 min wurde die Suspension ultrazentrifugiert, um das an Liposomen gebundene NP7 zu pelletieren. Die Pelletierung von NP7 konnte visuell verfolgt werden, da das Protein eine Rotfärbung aufweist (vgl. Abb. 26A). Die Pelletierung der Liposomen wurde mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen.

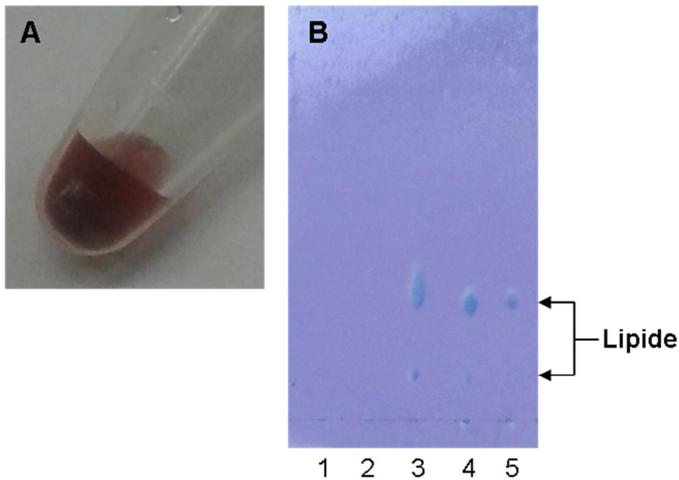


Abb. 26: A: Rotes NP7-Liposomen-Pellet. B: Dünnschichtchromatogramm der NP7-Liposomen Proben nach der Ultrazentrifugation.

1: Überstand der NP7-Liposomen Probe 2, 2: Überstand der NP7-Liposomen Probe 1, 3: DMPC / DMPS Liposomen (3 : 1) Kontrolle, 4: Pellet der NP7-Liposomen Probe 1, 5: Pellet der NP7-Liposomen Probe 3.

Die Lipide DMPC und DMPS konnten nach der Ultrazentrifugation der NP7-Liposomen Probe nur im Pellet detektiert werden (vgl. Abb. 26B). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Liposomen zusammen mit dem NP7 im Pellet befinden und nicht mehr im Überstand.

Zur Ermittlung der besten Liposomengröße für die Bindung von NP7 an die Liposomen wurde die Bindung von unmarkiertem NP7 an DMPC / DMPS-Liposomen unterschiedlicher Größe überprüft. Hierzu wurden Liposomen verwendet, die mittels Extrusion durch eine Membran mit einer Porengröße von 50 nm hergestellt wurden und solche, die durch anschließende Ultraschall-Behandlung der Liposomen-Suspension weiter verkleinert wurden.

Tab. 17: NP7-Liposomen Bindungstest 1: Optimierung der Liposomengröße.

Probe	Liposomen		Lipide		NP7		Lipid-zu-NP7 molares Verhältnis	NP7 im Überstand nach UZ %
	Kopf-gruppe	Herstellung	Konz.*	Stoff-menge*	Konz.*	Stoff-menge*		
			mg / ml	nmol	µM	nmol		
1	PC / PS	Extrusion	40	26553	150	19	1398 : 1	1
2	PC / PS	Ultraschall	40	18190	150	19	957 : 1	12

* Konzentration bezogen auf Stammlösung, Stoffmenge bezogen auf finale Probe

Die Bindungseffizienz von NP7 an die Liposomen wurde durch die Bestimmung der NP7 Masse im Überstand nach der Ultrazentrifugation bezogen auf die eingesetzte NP7 Masse durch Messung der Absorption bei 417 nm ermittelt. Bei den extrudierten Liposomen wurde nur noch ca. 1 % des eingesetzten NP7s nach der Ultrazentrifugation im Überstand gemessen und bei den mittels Ultraschall-Behandlung erzeugten Liposomen noch ca. 12 %. Somit zeigten in diesem Test die extrudierten Liposomen eine stärkere Bindung an NP7 als die durch Ultraschall erzeugten. Daher wurden extrudierte Liposomen für die Bindung an NP7 verwendet.

Da für die Festkörper-NMR-Messungen ein niedriges Lipid-zu-NP7 Verhältnis erwünscht war, um durch eine möglichst hohe NP7-Konzentration im Festkörper-NMR Rotor ein hohes Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erhalten, wurde im nächsten Test die Liposomenkonzentration verringert und die NP7 Konzentration erhöht.

Tab. 18: NP7-Liposomen Bindungstest 2: Optimierung des Lipid-zu-NP7 Verhältnisses.

Probe	Liposomen		Lipide		NP7		Lipid-zu-NP7 molares Verhältnis	NP7 im Überstand nach UZ
	Kopfgruppe	Herstellung	Konz.*	Stoffmenge*	Konz.*	Stoffmenge*		
			mg / ml	nmol	µM	nmol		%
3	PC / PS	Extrusion	10	2924	283,5	28	104 : 1	1
4	PC / PS	Extrusion	5	1462	283,5	28	52 : 1	< 1

* Konzentration bezogen auf Stammlösung, Stoffmenge bezogen auf finale Probe

Bei dem Vergleich der molaren Lipid-zu-NP7 Verhältnisse von 104 : 1 und 52 : 1 wurde kein signifikanter Unterschied bzgl. der NP7 Konzentration im Überstand festgestellt, da bei der gewählten Methode von einem experimentellen Fehler von ca. 5 % auszugehen ist. Es lässt sich allerdings sagen, dass sich in beiden Fällen der Hauptteil des NP7s mit den Liposomen im Pellet befindet, da nur noch ein geringer Anteil (ca. 1 %) des eingesetzten NP7s im Überstand detektiert wurde. Da wie bereits erläutert ein geringes Lipid-zu-NP7 Verhältnis erwünscht war, wurde das molare Lipid-zu-NP7 Verhältnis von 52 : 1 für die Bindung von NP7 an die Liposomen verwendet.

Des Weiteren wurde auch die Auswahl der negativ geladenen Kopfgruppe überprüft, indem der Austausch von Phosphatidylserin (PS) durch Phosphatidylglycerol (PG) untersucht wurde. Des Weiteren wurden die Volumina der Liposomen und der NP7-Lösung erhöht unter Beibehaltung des molaren Verhältnisses zueinander, um zu überprüfen, ob dies die Bindung beeinflusst.

Tab. 19: NP7-Liposomen Bindungstest 3: Auswahl der Lipidkopfgruppe und Erhöhung des Größenmaßstabs

Probe	Liposomen		Lipide		NP7		Lipid-zu-NP7 molares Verhältnis	NP7 im Überstand nach UZ
	Kopfgruppe	Herstellung	Konz.*	Stoffmenge*	Konz.*	Stoffmenge*		
			mg / ml	nmol	µM	nmol		%
5	PC / PG	Extrusion	5	1469	283,5	28	52 : 1	< 1
6	PC / PS	Extrusion	5	7157	283,5	138	52 : 1	< 1

* Konzentration bezogen auf Stammlösung, Stoffmenge bezogen auf finale Probe

Es wurde festgestellt, dass der Austausch der Lipidkopfgruppe PS durch PG keinen Einfluss auf die Bindung an NP7 hat. Dies war zu erwarten, da es sich bei beiden Lipidkopfgruppen um einfach negativ geladene Kopfgruppen handelt und NP7 über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Kopfgruppe interagiert.⁴³ Zudem wurde keine negative Beeinflussung der Bindungseigenschaften von NP7 durch die Erhöhung der Volumina der Liposomen und der NP7-Lösung festgestellt. Daher lassen sich die Ergebnisse der Bindungstests von NP7 an die Liposomen auf die Herstellung der an Liposomen gebundenen NP7 Probe im präparativen Maßstab übertragen.

Somit wurden für die Herstellung der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen NMR Probe extrudierte DMPC / DMPS-Liposomen mit einem Lipid-Verhältnis von 3 : 1 und ein molares Lipid-zu-NP7 Verhältnis von 52 : 1 gewählt. Dabei wurden die Lipid- (5 mg/ml) und NP7-Konzentrationen (283,5 μM) der Stammlösungen wie in den durchgeführten Tests beibehalten und nur die Volumina erhöht.

4.2.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung der NP7 Proben

Wie in der Einleitung beschrieben bindet NP7 an negativ geladenene Membranen, was eine Besonderheit unter den Nitrophorinen darstellt. Es wird vermutet, dass der Membranbindung von NP7 eine besondere Rolle bei der Freisetzung von NO im Blutplasma des Wirts zukommt. Um diese Mechanismen strukturell genauer zu untersuchen, wurden Festkörper-NMR spektroskopische Untersuchungen verschiedener NO-gebundener NP7 Proben mit und ohne Membranbindung durchgeführt.

Um den Einfluss der NP7-Membranbindung auf die Proteinstruktur zu untersuchen, wurden zwei NMR-Proben des NO-gebundenen Proteins einmal mit und einmal ohne Liposomen bei einem pH-Wert von 6,8 hergestellt. Dies entspricht dem pH-Wert im Übergang vom Speichel des Insekts (pH 5 - 6) zum Blutplasma (pH 7,4) und soll somit den Moment der Blutmahlzeit des Insekts wiedergeben. Als Modellmembran wurden DMPC / DMPS-Liposomen ausgewählt, da Phosphatidylserin einfach negativ geladen ist und daher elektrostatisch mit NP7 wechselwirkt. Da die Länge des Proteins immer noch eine Herausforderung für Festkörper-NMR spektroskopische Untersuchungen darstellt, wurden einige Aminosäuren des Proteins wie in Kapitel 3.14 beschrieben revers isotopenmarkiert, um die Signalüberlagerung in den NMR-Spektren zu reduzieren.¹⁹ Somit wurden die Spektren der NMR-Proben $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 als Vertreter des freien NP7s und $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen als Vertreter des an DMPC / DMPS Liposomen gebundenen NP7s miteinander verglichen. Als Referenz wurden zudem Spektren einer Probe von DMPC / DMPS-Liposomen bei pH 6,8 mit denen der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe verglichen, um die Lipidsignale in den Spektren zu identifizieren. Ein besonderes Augenmerk der strukturellen Untersuchungen lag auf der Lysin-reichen Helix- $\alpha 1$ ($K_{149} - K_{157}$), der vermuteten Membran-Interaktionsstelle des NP7s.⁵⁶ Zusätzlich wurden noch Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{K,V})]$ NP7 Probe bei pH 5,0 zum Vergleich mit herangezogen. Die Spektren der Probe $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{K,V})]$ NP7 bei pH 5,0 waren bereits vorhanden, da sie während der Promotion von S. Varghese angefertigt wurden.⁸⁴ Da NP7 bei höheren Konzentration, die für Festkörper-NMR-Untersuchungen benötigt werden, präzipitiert, lagen die Proben $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 bei pH 6,8 und $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{K,V})]$ NP7 bei pH 5,0 Probe in präzipitierter Form vor.

Zunächst wurde der Erfolg der reversen Isotopenmarkierung abgeschätzt. Dann wurde der Einfluss der Lipidsignale auf die NP7 Spektren beurteilt. Des Weiteren wurden die Relaxationszeiten bestimmt. Zudem wurden die Mobilität des NP7 und die temperaturabhängige Veränderung der Spektren überprüft. Dann erfolgte die Resonanzzuordnung zu den Aminosäuren des NP7s und ein Vergleich mit der NP7

Kristallstruktur bei dem pH-Wert 7,8 mit dem Liganden NO (PDB: 4XME). Zuletzt erfolgte die Untersuchung des Einflusses der NP7-Liposomenbindung auf die chemischen Verschiebungen der Aminosäuren von NP7.

Für die initiale Charakterisierung der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7, $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{K,V})]$ NP7 und $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Proben wurden 1D INEPT-, ^{13}C -Direktanregungs- und ^{13}C -Kreuzpolarisationsspektren, sowie 2D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationspektren analysiert. Für die Resonanzzuordnung wurden zusätzlich zu den 2D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationspektren noch 2D und 3D $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ - und $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationspektren verwendet.

4.2.3.1 Vorüberlegungen zur Membranbindung von NP7

Wie bereits erwähnt, wurde insbesondere die Membraninteraktion von NP7 strukturell untersucht. In der Literatur wird die Lysin-reiche Helix- α 1, als potentielle Membran-Interaktionsstelle des NP7s, mit der Sequenz $\text{K}_{149}\text{K}_{150}\text{I}_{151}\text{K}_{152}\text{K}_{153}\text{A}_{154}\text{L}_{155}\text{N}_{156}\text{K}_{157}$, beschrieben.⁵⁶ Zur Eingrenzung der an der Membraninteraktion beteiligten Aminosäuren, wurde die Kristallstruktur von NP7 (PDB: 4XME) genauer analysiert. Dazu wurde die elektrostatische Oberfläche des Proteins mit den Programmen PDB2PQR^{73,74} und APBS⁷⁵ erstellt (vgl. Abb. 3). Anschließend wurde die Lage der basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin im Protein betrachtet, da bekannt ist, dass das Protein über elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Membranen interagiert.^{43,56} Es wurden die Aminosäuren identifiziert, die in der Struktur an der elektrostatisch positiv geladenen Oberfläche zu finden waren. Dies sind die Aminosäuren K_{12} , K_{13} , K_{17} , K_{19} , R_{48} , K_{55} , K_{93} , K_{94} , K_{96} , K_{116} , R_{141} , K_{143} , K_{149} , K_{150} , K_{152} , K_{153} , K_{157} , K_{164} , K_{169} , K_{174} , K_{178} , K_{185} (vgl. Abb. 27). Unter den Aminosäuren finden sich 20 der 27 Lysinreste und 2 der 2 Argininreste von NP7.

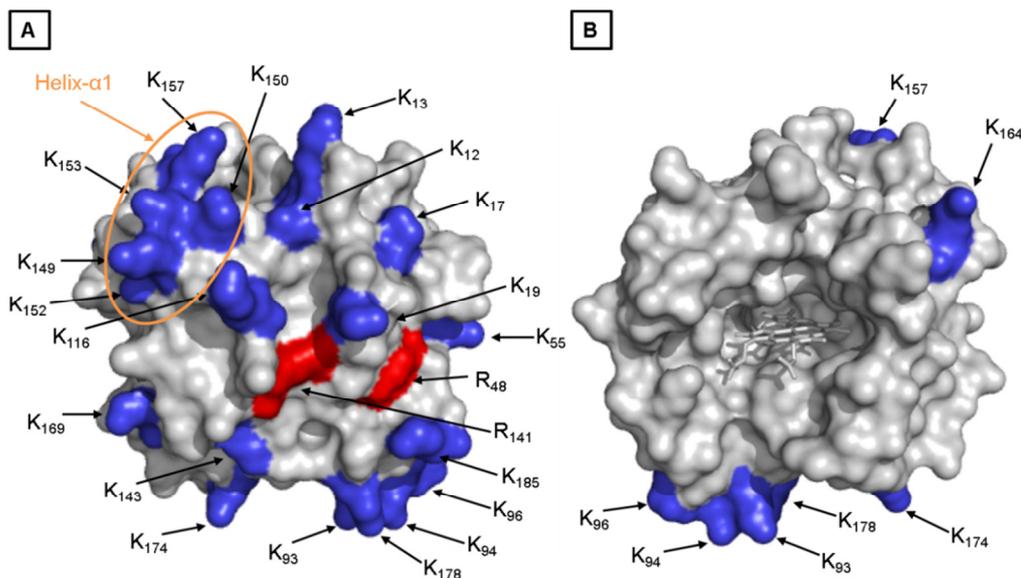


Abb. 27: Lage der basischen Aminosäuren auf der elektrostatisch positiv geladenen Oberfläche von NP7.

Vorder- (B) und Rückansicht (A) des Strukturmodells der Kristallstruktur von NP7 (PDB: 4XME) in der Oberflächendarstellung. Lysinreste (blau), Argininreste (rot), Helix- α 1 (orange eingekreist).

Die Literaturrecherche und die Analyse der der Kristallstruktur von NP7 zeigen, dass vermutlich insbesondere die Lysin-Seitenketten eine wichtige Rolle in der Membraninteraktion von NP7 einnehmen. Daher wurde bei den folgenden Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen ein besonderes Augenmerk auf die Lysinreste gelegt.

4.2.3.2 Effizienz der reversen Isotopenmarkierung des NP7

In revers isotopenmarkierten Proteinen kommt es durch metabolisches „Scrambling“, der metabolischen Konversion einer Aminosäure in der Biosynthese in eine andere, zum Einbau von isotopenmarkierten Kernen in nominal unmarkierte Aminosäuren.¹⁹ Somit ist ein gewisser Anteil an unerwünschten ¹³C- und ¹⁵N-isotopenmarkierten Kernen in den revers isotopenmarkierten Aminosäuretypen der NP7 Proben zu erwarten. Zur Bestimmung des Anteils der unerwünschten Isotopenmarkierung in den Proben wurde die reverse Isotopenmarkierungseffizienz anhand der Signalintensität ausgewählter Signale in den 2D DQ / SQ-Spektren der verschiedenen Proben bestimmt. In DQ / SQ-Spektren sind hauptsächlich benachbarte ¹³C-Kerne sichtbar. Die zugrundeliegenden Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 8 kHz bei einer nominalen Probentemperatur von -20 °C (U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7+Liposomen) bzw. -30 °C (U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7 und U[¹³C, ¹⁵N(K,V)] NP7) aufgenommen. DQ / SQ-Spektren eignen sich im Gegensatz zu PDS-Spektren zur Quantifizierung der Signalintensität, da hier der Magnetisierungstransfer über die Anregung von Doppelquantenkohärenz direkt zwischen den homonuklear dipolar gekoppelten ¹³C-Spins stattfindet. In PDS-Spektren dagegen wird die Magnetisierung durch Flip-Flop Austausch zwischen homonuklear dipolar gekoppelten ¹³C-Spins übertragen. In den revers isotopenmarkierten NP7 Proben waren zum einen die Aminosäuren Valin, Leucin, Phenylalanin und Tyrosin und zum anderen die Aminosäuren Lysin und Valin revers markiert. Da in beiden reversen Isotopenmarkierungsschemata das Valin revers isotopenmarkiert war und die V(C β , C β +C γ)- und V(C γ , C β +C γ)-Signale in den analysierten DQ / SQ-Spektren separiert sind, wurden diese ausgewählt, um die Signalintensität der revers isotopenmarkierten Aminosäuren zu beurteilen (vgl. Abb. 28). Da die NP7-Sequenz 13 Valinreste enthält, wurde für die Berechnung angenommen, dass die Signalintensität der V(C β , C β +C γ)- und V(C γ , C β +C γ)-Signale bei den chemischen Verschiebungen von C β = 35,5 ppm und C γ = 20,3 ppm eine Überlagerung der Signalintensitäten von 13 Valinen darstellt, da die chemischen Verschiebungen der einzelnen Valin C β - und C γ -Werte nicht bekannt war. Als Referenz für die uniform ¹³C-, ¹⁵N-isotopenmarkierten Aminosäuren wurden die A(C α , C α +C β)- und A(C β , C α +C β)-Signale von 3 ausgewählten Alaninresten (C α = 47,7 und C β = 22,0, C α = 49,6 und C β = 18,7, C α = 54,4 und C β = 18,2) verwendet, da diese ebenfalls separiert werden konnten (vgl. Abb. 28). Da alle 12 Alanine der NP7-Sequenz Aminosäuretypspezifisch zugeordnet werden konnten, wurde hier davon ausgegangen, dass die Signale jeweils nur von einem Alaninrest stammen.

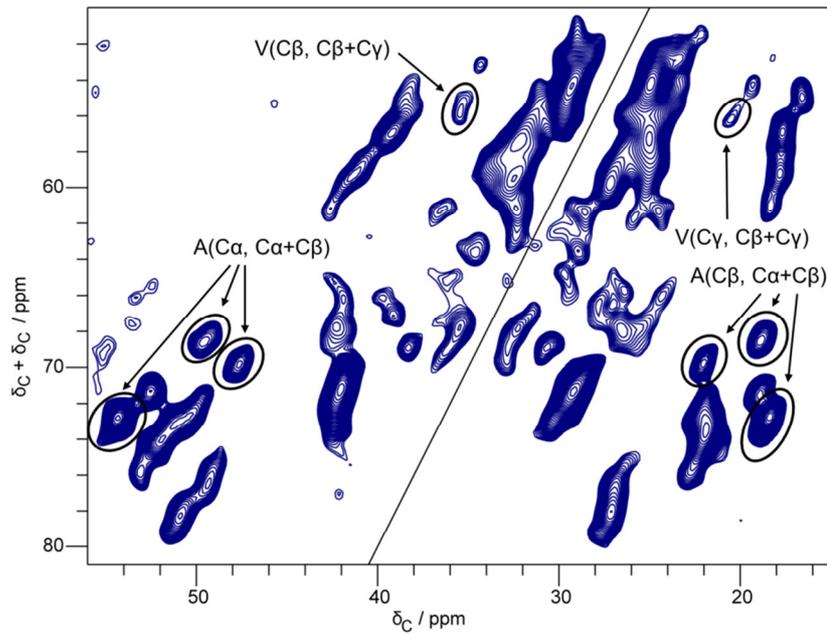


Abb. 28: Exemplarische Darstellung der für die Bestimmung der reversen Isotopenmarkierungseffizienz ausgewählten Valin- und Alaninsignale im 2D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ DQ/SQ-Spektrum der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.

Das Spektrum wurde an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 8 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 100 Hz, Linienverbreiterung: 200 Hz, Gaußmaximum: 0,1) prozessiert.

Zur Bestimmung der Effizienz der reversen Isotopenmarkierung wurden somit die Integrale über die $V(\text{C}\beta, \text{C}\beta+\text{C}\gamma)$ - und $V(\text{C}\gamma, \text{C}\beta+\text{C}\gamma)$ -Signale mit denen der $A(\text{C}\alpha, \text{C}\alpha+\text{C}\beta)$ - und $A(\text{C}\beta, \text{C}\alpha+\text{C}\beta)$ -Signale anhand der folgenden Formel verglichen:

$$\text{reverse Isotopenmarkierungseffizienz} = 1 - \left(\frac{1}{13} \frac{\int V(\text{C}\beta, \text{C}\beta+\text{C}\gamma) + \int V(\text{C}\gamma, \text{C}\beta+\text{C}\gamma)}{\int A(\text{C}\alpha, \text{C}\alpha+\text{C}\beta) + \int A(\text{C}\beta, \text{C}\alpha+\text{C}\beta)} \right) \quad [2]$$

Daraus ergab sich für die $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe eine Effizienz der reversen Isotopenmarkierung von $97,8 \pm 1,2\%$, für die $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{K,V})]$ NP7 Probe eine von $97,2 \pm 1,4\%$ und für die $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe eine von $98,0 \pm 1,0\%$.

4.2.3.3 Auftreten von Lipidsignalen in den NMR-Spektren

Die DMPC / DMPS-Liposomen in der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe sind nicht ^{13}C - und ^{15}N -isotopenmarkiert. Da die ^{13}C - und ^{15}N -Kerne jedoch auch in natürlicher Häufigkeit vorkommen, sind in den DMPC / DMPS-Liposomen 1,11 % der Kohlenstoffatome ^{13}C -Kerne und 0,366 % der Stickstoffatome ^{15}N -Kerne. Um den Einfluss der Liposomen auf die Spektren der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe zu charakterisieren, wurden gesondert Spektren von den DMPC / DMPS-Liposomen aufgenommen.

Lipidsignale müssen in 1D Spektren von NP7 berücksichtigt werden

Einen Überblick verschafften 1D ^{13}C INEPT-, 1D ^{13}C Direktanregungs- und 1D $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren von der DMPC / DMPS-Liposomen Probe bei hohen und niedrigen Temperaturen. In den INEPT-Spektren sind mobile Anteile der Lipide sichtbar, wohingegen in den Direktanregungs- und CP-Spektren die rigiden Anteile sichtbar sind. Aufgrund der natürlichen Häufigkeit der ^{13}C -Kerne von 1,11 % war die Detektion von Lipidsignalen in den 1D ^{13}C -Spektren zu erwarten.

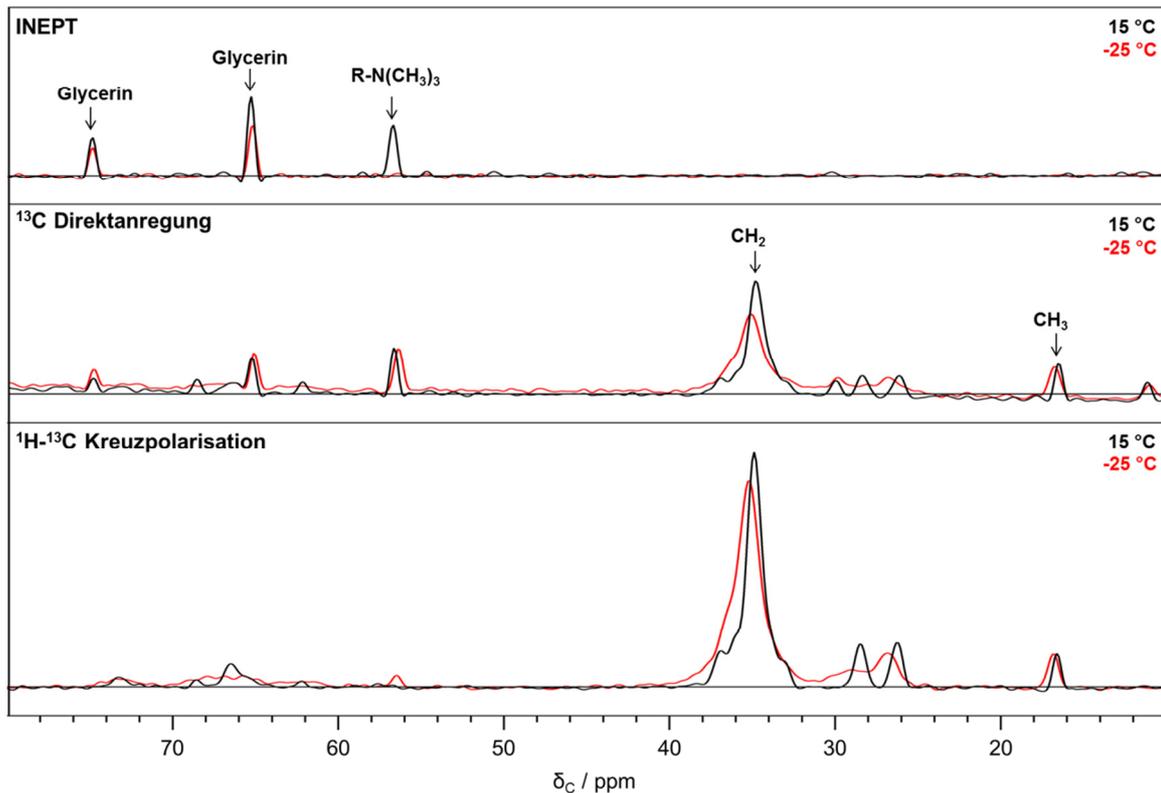


Abb. 29: Signale in 1D ^{13}C -Spektren von DMPC / DMPS-Liposomen.

Die Spektren wurden mit 512 Scans an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Im INEPT-Spektrum sind Glycerinsignale des Puffers, sowie Signale des Trimethylamins der Lipidkopfgruppe, dessen Signal jedoch nur bei hohen Temperaturen sichtbar ist, zu sehen ($c_{\text{Glycerin}} = 20 \text{ mg/ml}$, $c_{\text{Lipid}} = 5 \text{ mg/ml}$). Dies deutet darauf hin, dass bei hohen Temperaturen die Lipidkopfgruppen noch mobil sind und dann bei tieferen Temperaturen erstarren. Die beiden Temperaturen bei denen die Spektren aufgenommen wurden liegen jedoch unterhalb der Hauptphasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide (DMPC $T_{\text{Ü}} = 23,9 \text{ °C}$, DMPS $T_{\text{Ü}} = 39 \text{ °C}$)³⁰. In den ^{13}C -Direktanregungsspektren und den $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren sind sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Temperaturen Signale für die CH₂- und CH₃-Gruppen der Lipidketten sichtbar. Diese sind somit sowohl bei hohen als auch bei tiefen Temperaturen eher rigide. Zudem ist durch das Erstarren der Moleküldynamiken eine Verbreiterung der Signale bei tiefen Temperaturen durch die Einschränkung der Mobilität der Probe zu erkennen.

Lipidsignale können in 2D Spektren von NP7 vernachlässigt werden

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Lipid-Kreuzkorrelationssignalen in 2D Spektren ist etwa um den Faktor 100 geringer, da hierzu zwei benachbarte Kerne isotopenmarkiert sein müssen. In Abb. 30 wurde ein 2D PDS-D-Spektrum der Liposomenprobe mit 80 Scans bei einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. PDS-D-Spektren zeigen Korrelationen zwischen ^{13}C -Kernen. In dem Spektrum war wie erwartet keine Kreuzkorrelationen zwischen den ^{13}C -Kernen erkennbar.

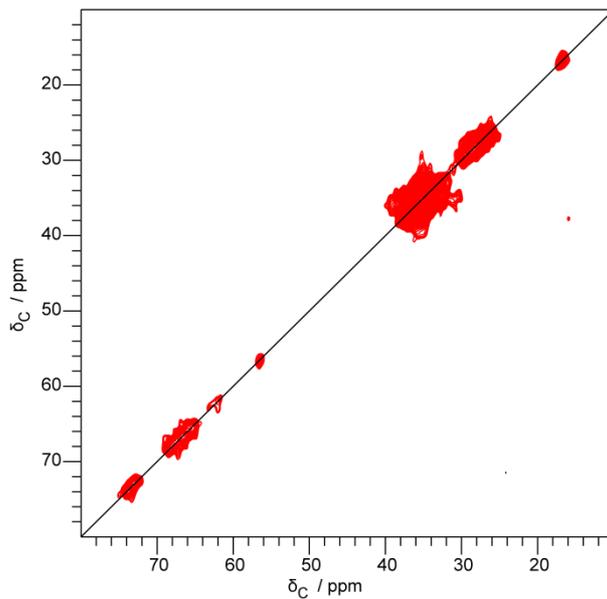


Abb. 30: Keine $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ Korrelationen sichtbar im 2D PDS-D-Spektrum von DMPC / DMPS-Liposomen.

Das PDS-D-Spektrum mit einer Mischzeit von 50 ms wurden mit 80 Scans an einem 600 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ einer Rotationsfrequenz von 11 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,5 prozessiert.

Da in dem 2D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ PDS-D-Spektrum keine Kreuzkorrelationssignale der Lipide auftreten, können bei dem Vergleich der 2D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Spektren von NP7 mit und ohne Liposomen die Lipidsignale vernachlässigt werden. Bei dem Vergleich der 1D ^{13}C -Spektren von NP7 mit und ohne Liposomen müssen die Lipidsignale in der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe berücksichtigt werden, da in den 1D Spektren dieser Probe zusätzliche Signale der Lipide auftreten.

4.2.3.4 T₁- und T₂-Relaxationsmessungen an NP7

Relaxation wird durch lokale fluktuierende Magnetfelder am Kernort, basierend auf Molekülbewegungen wie Rotationen oder Schwingungen verursacht. Man unterscheidet zwei Arten der Relaxation, die longitudinale Relaxation T₁, auch Spin-Gitter Relaxation genannt und die transversale oder Spin-Spin Relaxation T₂. Die T₁-Relaxation beschreibt die Rückkehr der angeregten Spins aus der xy-Ebene zur Boltzmann Gleichgewichtsmagnetisierung in z-Richtung. Damit bestimmt die T₁-Relaxationszeit, die Länge des „Recycle Delays“, die Wartezeit zwischen der Aufnahme zweier Scans. In der Festkörper-NMR-Spektroskopie können die T₁-Relaxationszeiten „verdünnter“ Spins, z. B. ¹³C und ¹⁵N, sehr lang sein (Minuten bis Stunden), wohingegen diejenige der ¹H-Kerne durch die starke dipolare Kopplung der Protonen untereinander deutlich kürzer ist. Die T₂-Relaxation beschreibt die Dephasierung der Magnetisierung in der xy-Ebene und ist damit für das Abklingen des FIDs verantwortlich und beeinflusst somit die Linienbreite der NMR-Signale. Im Festkörper sind die dipolaren Felder der benachbarten Spins sehr groß, so dass die T₂-Relaxationszeit relativ kurz ist (im Millisekunden Bereich). In Flüssigkeit kommt es dagegen durch die Brownsche Molekularbewegung zur teilweisen Ausmittlung der dipolaren Felder benachbarter Spins. Zur Charakterisierung der hergestellten Proben wurden deren T₁- und T₂-Relaxationszeiten bestimmt.

Die Liposomenbindung hat keinen Einfluss auf T₁-Relaxationszeiten für ¹³C und ¹⁵N von NP7

Zunächst erfolgte die Abschätzung der T₁-Relaxationszeiten für ¹³C und ¹⁵N der U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7+Liposomen und der U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7 Probe. Dazu wurde ein für die Festkörper-NMR-Spektroskopie entwickeltes Experiment zur Bestimmung von T₁-Relaxationszeiten von Heterokernen verwendet, bei dem die X-Kerne durch einen ¹H / X-CP-Schritt angeregt werden (siehe Kapitel 3.19). Hierdurch können die langen „Recycle Delay“ Zeiten der ¹³C- und ¹⁵N-Kerne in Festkörpern umgangen werden. In den aufgenommen Spektren wurde dann die Intensitätsabnahme ausgewählter Signale bestimmt und gegen die Wartezeit aufgetragen. Die Signale wurden so ausgewählt, dass die chemischen Verschiebungen nicht oder nur geringfügig durch darunterliegende Lipidsignale beeinflusst werden (vgl. Abb. 31).

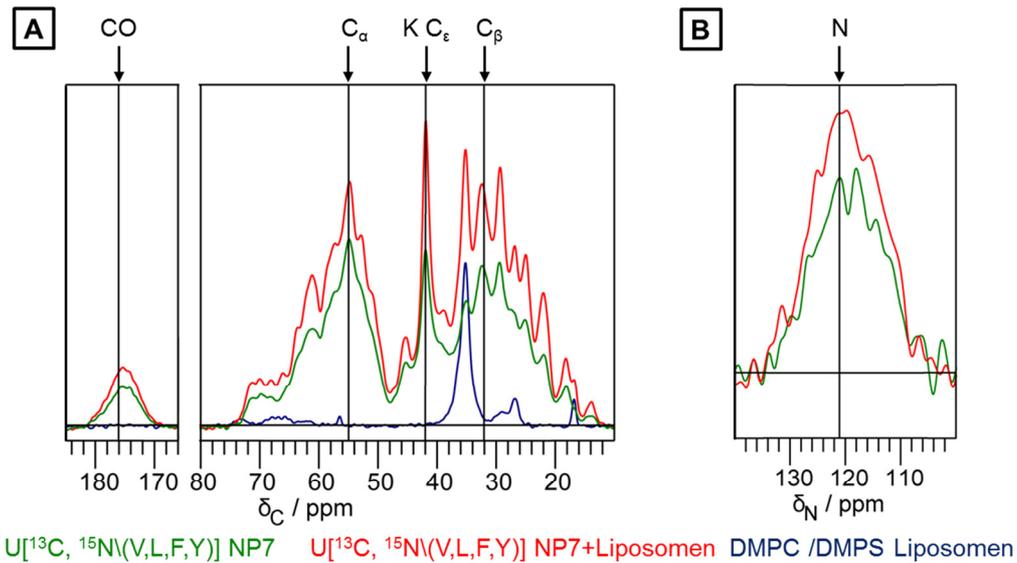


Abb. 31: Ausgewählte chemische Verschiebungen für ^{13}C und ^{15}N für die Bestimmung der Relaxationszeiten.

Überlagerung der 1D $^1H / ^{13}C$ -CP-Spektren (A) und der 1D ^{15}N T_1 -Relaxationsspektren ohne Wartezeit (B) der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen Probe (rot), der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7 Probe (grün) und der DMPC /DMPS-Liposomenprobe (blau). Die ^{13}C -Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-25^\circ C$ mit 512 Scans aufgenommen. Die ^{15}N -Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 10 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-25^\circ C$ mit 64 Scans aufgenommen. Alle Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Zur Bestimmung der Relaxationszeiten wurde die Auftragung der Intensitätswerte bei den gewählten chemischen Verschiebungen gegen die Wartezeit exponentiell angenähert. Für die Kurvenanpassung (Programm: OriginPro 8.5G) wurde die folgende Formel mit der T_1 -Relaxationszeit T_1 , der Konstanten A und dem y-Achsenabschnitt y_0 gewählt:

$$y = A \cdot e^{-\frac{t}{T_1}} \quad [3]$$

Abb. 32 zeigt die T_1 -Relaxationskurven bei den ausgewählten chemischen Verschiebungen von ^{13}C und ^{15}N .

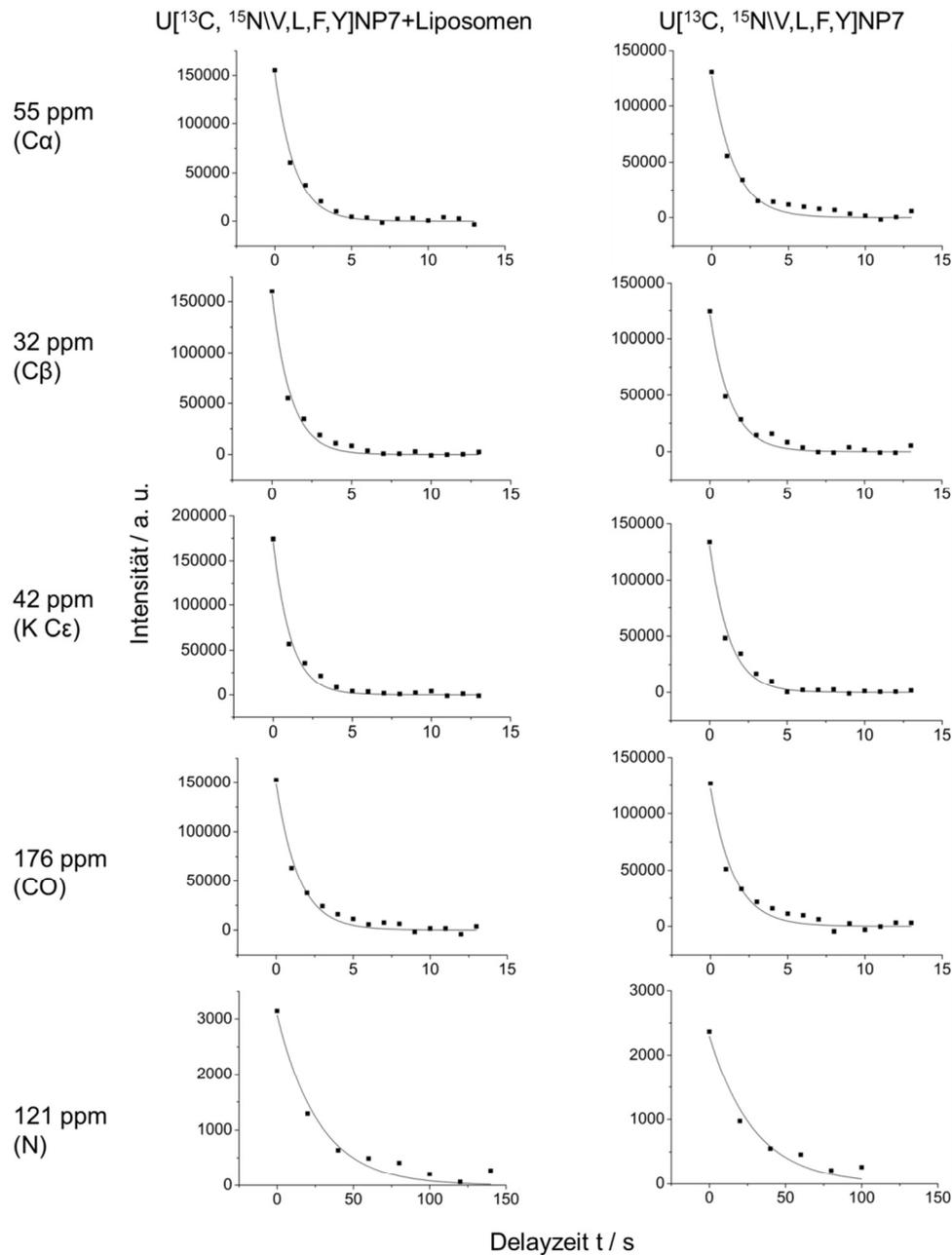


Abb. 32: T_1 -Relaxationskurven für ^{13}C und ^{15}N von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})\text{NP7}+\text{Liposomen}$ Probe und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})\text{NP7}$ Probe.

Auftragung der Signalintensität bei ausgewählten chemischen Verschiebungen gegen die Wartezeit t von T_1 -Relaxationsexperimenten mit variabler Wartezeit. Durchgezogene Linien stellen die Annäherung der Datenpunkte durch die Funktion $y = A \cdot e^{-\frac{t}{T_1}}$ mit der Konstante A zur Ermittlung der T_1 -Relaxationszeit dar. Das Bestimmtheitsmaß der Kurvenanpassung lag bei $R^2 \geq 0,97$ für ^{13}C und $R^2 \geq 0,96$ für ^{15}N . Die zugrundeliegenden T_1 -Relaxationsexperimente wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben temperatur von -25°C und einer Rotationsfrequenz von 10 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Die aus den Relaxationskurven in Abb. 32 mittels Anpassung an die Formel 3 bestimmten T_1 -Relaxationszeiten für ^{13}C und ^{15}N sind in Tab. 20 zusammengefasst.

Tab. 20: T₁-Relaxationszeiten für ¹³C und ¹⁵N von der U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe und der U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7 Probe.

Chemische Verschiebung	U[¹³ C, ¹⁵ N(V,L,F,Y)] NP7+Liposomen	U[¹³ C, ¹⁵ N(V,L,F,Y)] NP7
55 ppm (C _α)	1,29 ± 0,07 s	1,5 ± 0,1 s
32 ppm (C _β)	1,17 ± 0,08 s	1,3 ± 0,1 s
42 ppm (K C _ε)	1,11 ± 0,08 s	1,27 ± 0,09 s
176 ppm (CO)	1,5 ± 0,1 s	1,5 ± 0,1 s
121 ppm (N)	27 ± 3 s	29 ± 4 s

Die T₁-Relaxationszeiten für ¹³C und ¹⁵N des an Liposomen gebundenen NP7s unterscheiden sich nicht signifikant von denen für das freie NP7.

T₁-Relaxationszeiten der ¹H von NP7 werden durch Liposomenbindung verlängert

Zur Bestimmung der T₁-Relaxationszeiten der ¹H wurde ein Inversion-Recovery-Experiment mit anschließender Kreuzpolarisation verwendet, um die Magnetisierung auf dem X-Kern detektieren zu können (siehe Kapitel 3.19). Die Auswertung der Spektren erfolgte analog zu der Auswertung der T₁-Relaxationszeiten von ¹³C und ¹⁵N. Allerdings wurde für die exponentielle Kurvenanpassung die folgende Formel mit der der T₁-Relaxationszeit T₁ und der Konstanten A verwendet:

$$y = A \cdot \left(1 - 2 \cdot e^{-\frac{t}{T_1}}\right) \quad [4]$$

In Abb. 33 sind die T₁-Relaxationskurven von ¹H bei ausgewählten chemischen Verschiebungen von ¹³C gezeigt.

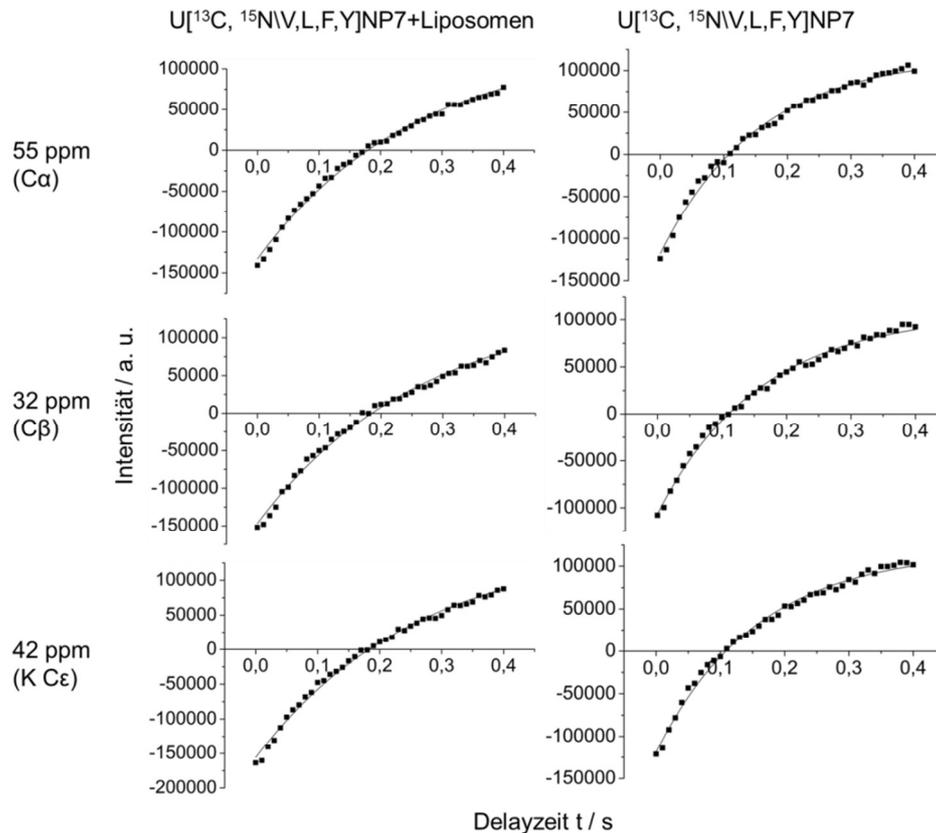


Abb. 33: T_1 -Relaxationskurven für ^1H von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.

Auftragung der Signalintensität bei ausgewählten chemischen Verschiebungen gegen die Wartezeit t von T_1 -Relaxationsexperimenten mit variabler Wartezeit. Durchgezogene Linien stellen die Annäherung der Datenpunkte durch die Funktion $y = A \cdot \left(1 - 2 \cdot e^{-\frac{t}{T_1}}\right)$ mit der Konstanten A zur Ermittlung der T_1 -Relaxationszeit dar. Das Bestimmtheitsmaß der Kurvenanpassung lag bei $R^2 = 0,99$. Die zugrundeliegenden T_1 -Relaxationsexperimente wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^\circ\text{C}$ und einer Rotationsfrequenz von 10 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Die aus den Relaxationskurven in Abb. 33 durch Anpassung an die Formel 4 bestimmten T_1 -Relaxationszeiten für ^1H sind in Tab. 21 zusammengefasst.

Tab. 21: T_1 -Relaxationszeiten für ^1H von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.

Chemische Verschiebung	$\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen	$\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7
55 ppm (C_α)	259 ± 2 ms	155 ± 2 ms
32 ppm (C_β)	267 ± 2 ms	159 ± 2 ms
42 ppm (K C_ϵ)	263 ± 2 ms	156 ± 2 ms

Die T_1 -Relaxationszeiten für ^1H des an Liposomen gebundenen NP7s sind mit 259 - 263 ms um 68 % länger, als die des präzipitierten NP7 mit 155 - 159 ms. Eine Verlängerung der T_1 -Relaxationszeit deutet auf eine Verringerung der Mobilität in der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe gegenüber der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe hin.

Die T_1 -Relaxationszeiten der ^1H -Kerne in den NP7 Festkörper-NMR Proben sind wie erwartet wesentlich kürzer als die der ^{13}C - und ^{15}N -Kerne

Der Vergleich der T_1 -Relaxationszeiten von ^1H mit denen von ^{13}C und ^{15}N bestätigt den zuvor beschriebenen Sachverhalt, dass die T_1 -Relaxationszeiten der stark homonuklear dipolar gekoppelten Protonen in Festkörpern kürzer sind, als die der „verdünnten“ Heterokerne. Die T_1 -Relaxationszeiten der Protonen liegen in den NP7 Proben im Millisekunden-Bereich, wohingegen die der ^{13}C - und ^{15}N -Kerne im Sekundenbereich liegen. Dies ist ein Grund warum in der Festkörper-NMR-Spektroskopie meistens ein $^1\text{H}/\text{X-CP}$ zur Anregung der Heterokerne verwendet wird, da der „Recycle Delay“ zwischen zwei Scans im Idealfall das Fünffache der T_1 -Relaxationszeit betragen sollte. Somit liegt dieser für die NP7 Proben bei der Verwendung eines $^1\text{H}/\text{X-CP}$ -Schrittes zur Anregung der Heterokerne nur bei ca. 1 s, wohingegen er für die Direktanregung der ^{13}C -Kerne 5 x und für die ^{15}N -Kerne 100 x so lang sein müsste. Die Verwendung eines $^1\text{H}/\text{X-CP}$ -Schrittes zur Anregung der Heterokerne bedeutet daher unabhängig von anderen beeinflussenden Faktoren (wie z. B. den unterschiedlichen gyromagnetischen Verhältnissen der Kerne) eine enorme Verkürzung der benötigten Messzeit.

Verlängerung der T_2 -Relaxationszeiten einiger ^{13}C -Kerne der Aminosäureseitenketten von NP7 durch Liposomenbindung

Zur Bestimmung der T_2 -Relaxationszeiten von ^{13}C und ^{15}N wurden Spin-Echo-Experimente mit vorgeschalteter Kreuzpolarisation verwendet (siehe Kapitel 3.19). Die Auswertung der Spektren erfolgte analog zu der Auswertung der T_1 -Relaxationszeiten. Für die exponentielle Kurvenanpassung wurde die folgende Formel mit der T_2 -Relaxationszeit T_2 und der Konstanten A verwendet:

$$y = A \cdot e^{-\frac{t}{T_2}} \quad [5]$$

In Abb. 34 sind die T_2 -Relaxationskurven von ^{13}C und ^{15}N bei ausgewählten chemischen Verschiebungen gezeigt.

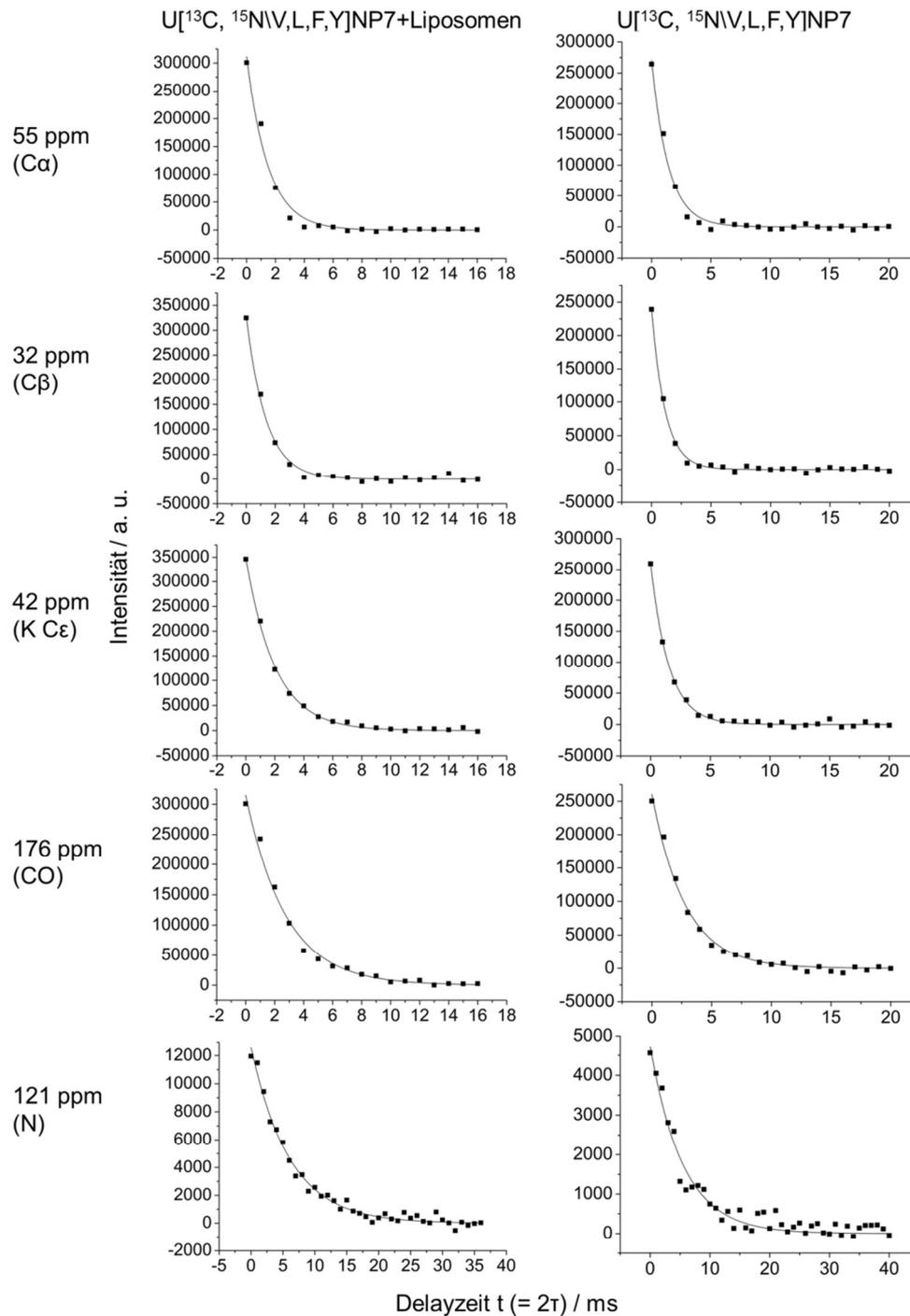


Abb. 34: T_2 -Relaxationskurven für ^{13}C und ^{15}N von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.

Auftragung der Signalintensität bei ausgewählten chemischen Verschiebungen gegen die Wartezeit t von T_2 -Relaxationsexperimenten mit variabler Wartezeit. Durchgezogene Linien stellen die Annäherung der Datenpunkte durch die Funktion $y = A \cdot e^{-\frac{t}{T_2}}$ mit der Konstanten A zur Ermittlung der T_2 -Relaxationszeit dar. Das Bestimmtheitsmaß der Kurvenanpassung lag bei $R^2 \geq 0,98$ für ^{13}C und bei $R^2 \geq 0,96$ für ^{15}N . Die zugrundeliegenden T_2 -Relaxationsexperimente wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben temperatur von -25°C und einer Rotationsfrequenz von 10 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Die aus den Relaxationskurven in Abb. 34 durch Anpassung an die Formel 5 bestimmten T_2 -Relaxationszeiten für ^{13}C und ^{15}N sind in Tab. 22 zusammengefasst.

Tab. 22: T₂-Relaxationszeiten für ¹³C und ¹⁵N von der U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe und der U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7 Probe.

Chemische Verschiebung	U[¹³ C, ¹⁵ N(V,L,F,Y)] NP7+Liposomen	U[¹³ C, ¹⁵ N(V,L,F,Y)] NP7
55 ppm (C _α)	1,5 ± 0,1 ms	1,40 ± 0,07 ms
32 ppm (C _β)	1,36 ± 0,05 ms	1,13 ± 0,03 ms
42 ppm (K C _ε)	2,01 ± 0,04 ms	1,51 ± 0,04 ms
176 ppm (CO)	2,8 ± 0,1 ms	2,77 ± 0,09 ms
121 ppm (N)	6,1 ± 0,2 ms	5,5 ± 0,3 ms

Die T₂-Relaxationszeiten für ¹³C_α, ¹³CO und ¹⁵N unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den beiden Proben. Die T₂-Relaxationszeiten der Aminosäureseitenketten bei 32 ppm (C_β) und 42 ppm (K C_ε) sind bei dem an Liposomen gebundenen NP7 um ca. 17 % (C_β) bzw. ca. 25 % (K C_ε) länger, als bei der Probe des freien NP7s.

Die ermittelten T₂-Relaxationszeiten liegen im Bereich von 1,1 – 2,8 ms für die ¹³C-Kerne und bei 5,5 – 6,1 ms für die ¹⁵N-Kerne und sind damit, wie für eine Festkörper-NMR Probe erwartet, relativ kurz. Dies bedeutet, dass die FIDs im Allgemeinen wesentlich schneller abklingen, als in der Flüssig-NMR-Spektroskopie und somit eine wesentlich breitere Linienbreite zu erwarten ist. Die Linienbreiten in den gemessenen Festkörper-NMR-Spektren sind in Kapitel 4.2.4.1 angegeben.

4.2.3.5 Mobilität von NP7

Zur Untersuchung der Mobilität des NP7s in den Proben mit und ohne Liposomenbindung wurden 1D ¹H / ¹³C-CP- und 1D ¹³C INEPT-Spektren bei Temperaturen über und unter dem Gefrierpunkt der Proteinlösung aufgenommen und miteinander verglichen. Hierbei wurde immer ein Vergleich mit den Spektren der DMPC / DMPS-Liposomen alleine angestellt, da, wie in Kapitel 4.2.3.3 beschrieben, in den Spektren der U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe zusätzlich zu den Proteinsignalen auch Lipidsignale auftreten. Wie bereits erwähnt werden in INEPT-Spektren eher mobile Anteile des Proteins detektiert, wohingegen in CP-Spektren eher rigide Anteile zu sehen sind.

Membranbindung von NP7 schränkt die Mobilität einiger Lysinseitenketten ein

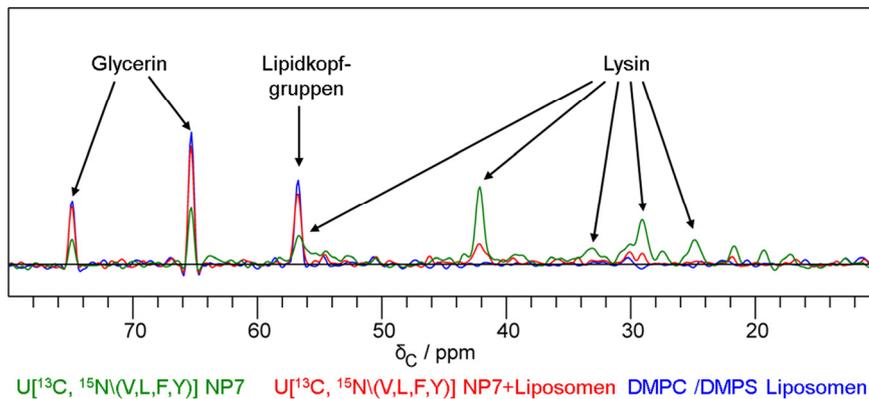


Abb. 35: Mobilität der präzipitierten NP7 Probe im Vergleich zur an Liposomen gebundenen NP7 Probe.

Überlagerung der 1D ^{13}C -INEPT-Spektren von $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7 (grün), von $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen (rot) und von Liposomen (blau) bei einer nominalen Proben temperatur von 15 °C. Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

In dem INEPT-Spektrum des präzipitierten NP7s bei einer nominalen Proben temperatur von 15 °C (vgl. Abb. 35) sind Signale sichtbar, die den chemischen Verschiebungen der ^{13}C -Kerne der Lysin-Seitenketten entsprechen. Diese sind in der an Liposomen gebundenen NP7 Probe wesentlich geringer ausgeprägt. Da im INEPT-Spektrum nur die mobilen Anteile eines Proteins sichtbar sind, deutet dies auf eine Einschränkung der Mobilität der Lysinseitenketten durch die Bindung des NP7s an die Liposomen hin.

Keine mobilen Anteile im gefrorenen NP7

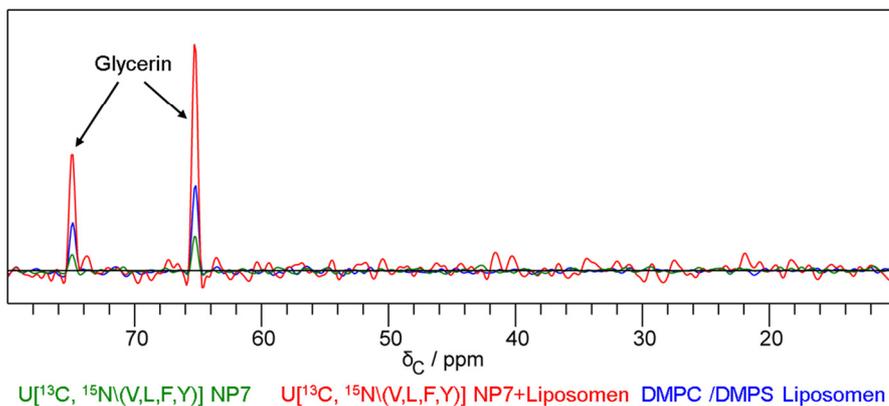


Abb. 36: Mobilität der präzipitierten NP7 Probe im Vergleich zur an Liposomen gebundenen NP7 Probe.

Überlagerung der 1D ^{13}C -INEPT-Spektren von $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7 (grün), von $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen (rot) und von Liposomen (blau) bei einer nominalen Proben temperatur von -25 °C. Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

In dem INEPT-Spektrum des präzipitierten NP7 bei einer nominalen Proben temperatur von -25 °C (vgl. Abb. 36) sind die Lysin-Signale nicht mehr sichtbar. Da die Lösung bei

dieser Temperatur im gefrorenen Zustand vorliegt, sind hier wahrscheinlich auch die bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt mobilen Lysin-Seitenketten erstarrt. Dies wird dadurch bestärkt, dass auch die Lipidkopfgruppen keine im INEPT-Spektrum detektierbare Mobilität mehr aufweisen (vgl. Abb. 29). Nur die kleinen Glycerinmoleküle sind noch mobil.

Der Großteil von NP7 ist auch über dem Gefrierpunkt rigide

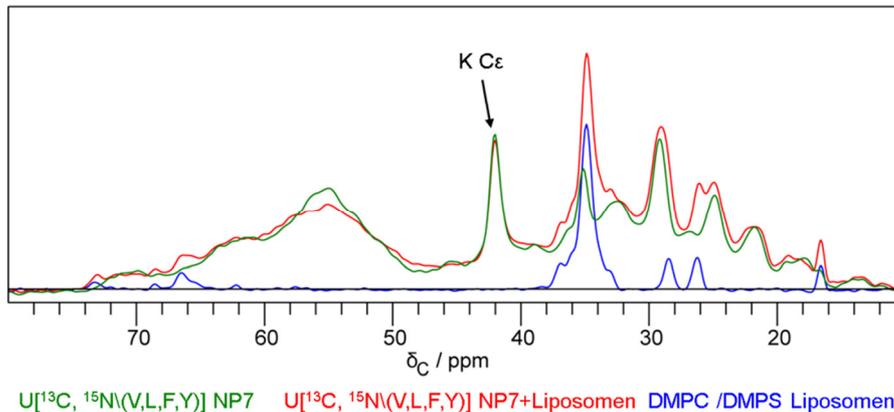


Abb. 37: Mobilität der präzipitierten NP7 Probe im Vergleich zur an Liposomen gebundenen NP7 Probe.

Überlagerung der 1D $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren von U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7 (grün), von U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen (rot) und von Liposomen (blau) bei einer nominalen Proben temperatur von 15 °C. Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

In den 1D $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren bei 15 °C (vgl. Abb. 37) sind viele sich überlappende Proteinsignale sichtbar. Dies deutet darauf hin, dass der Großteil des Proteins eher rigide ist. Das Signal bei ca. 42 ppm ist charakteristisch für die Lysin C ϵ - und die Arginin C δ -Kerne. Da in der NP7-Sequenz jedoch wesentlich mehr Lysine als Arginine vorkommen (27 Lysine und 2 Arginine) ist aufgrund der hohen Intensität des Signals davon auszugehen, dass das Signal hauptsächlich durch die Lysin C ϵ -Kerne geprägt ist. Die hohe Signalintensität der Lysin C ϵ -Kerne in den $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren zeigt, dass ein Großteil der Lysine auch bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt eher rigide ist.

Einige Lysinseitenketten sind vermutlich an der Membraninteraktion beteiligt

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl freies als auch an Liposomen gebundenes NP7 bei einer nominalen Proben temperatur von 15 °C hauptsächlich rigide ist. Der Großteil der Lysinseitenketten ist ebenfalls in beiden Proben rigide. Nur einige Lysinseitenketten sind in dem freien NP7 mobil. Durch die Liposomenbindung nimmt die Mobilität dieser Lysinseitenketten ab. Bei einer nominalen Proben temperatur von -25 °C können dahingegen keine mobilen Anteile in den beiden NP7-Proben detektiert werden. Die Abnahme der Mobilität einiger Lysinseitenketten, durch die Bindung von NP7 an Liposomen deutet auf eine Beteiligung dieser Lysinseitenketten an der Membraninteraktion hin. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die vermutete Interaktion der Helix- $\alpha 1$ (K $_{149}$ - K $_{157}$) des NP7s mit den Liposomen interessant. Diese enthält 5 Lysine.

Die beobachtete Einschränkung der Mobilität einiger Lysinseitenketten wäre durch eine Membraninteraktion der Helix- $\alpha 1$ von NP7 zu erklären. Es wäre jedoch auch möglich, dass andere Lysinseitenketten des Proteins an der Membraninteraktion beteiligt sind, da 20 der 27 Lysine an der elektrostatisch positiv geladenen Oberfläche von NP7 zu finden sind (vgl. Kapitel 4.2.3.1).

4.2.3.6 Temperaturabhängigkeit der NP7 NMR-Spektren

Zur Bestimmung der besten nominalen Proben temperatur der NP7 Proben für die Aufnahme der Festkörper-NMR-Spektren, wurden Spektren der NP7 Proben der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 und der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen und miteinander verglichen.

Signalintensität nimmt mit abnehmender Temperatur zu und Einfrieren der Probe erhöht die Linienbreite der Signale

In Abb. 38 ist die Überlagerung der 1D $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe im nominalen Proben temperaturbereich von $-25\text{ }^\circ\text{C}$ bis $15\text{ }^\circ\text{C}$ gezeigt.

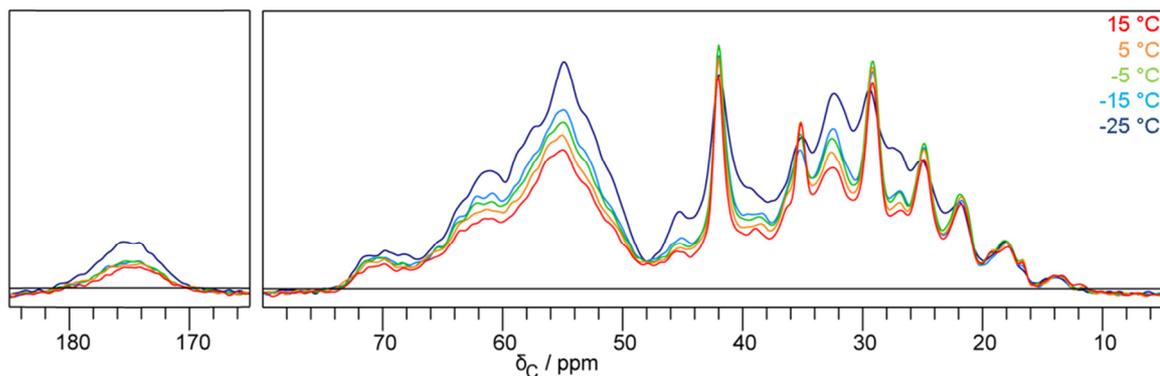


Abb. 38: Temperaturabhängigkeit der 1D $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.

Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und nominalen Proben temperaturen von $15\text{ }^\circ\text{C}$ (rot), $5\text{ }^\circ\text{C}$ (orange), $-5\text{ }^\circ\text{C}$ (grün), $-15\text{ }^\circ\text{C}$ (hellblau) und $-25\text{ }^\circ\text{C}$ (dunkelblau) aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Insgesamt zeigen viele Signale in den $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren eine Zunahme der Signalintensität infolge der Absenkung der nominalen Proben temperatur von $15\text{ }^\circ\text{C}$ auf $-25\text{ }^\circ\text{C}$. In dem Spektrum bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ kommt es jedoch durch das Einfrieren der Probe zu einer deutlich sichtbaren Linienverbreiterung. Die Gesamtsignalintensität für die $\text{C}\alpha$ -Resonanzen aller Aminosäuren (45 - 65 ppm), einiger $\text{C}\beta$ -Resonanzen der Aminosäuren S und T (60 - 72 ppm), I, D und N (38 - 40 ppm) und P, R, K, M und W (31 - 34 ppm) und einiger $\text{C}\gamma$ -Resonanzen von R und I (26 - 28 ppm) ist jedoch trotz der beobachteten Linienverbreiterung in dem Spektrum bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ am höchsten. Die Signalintensitäten einiger ^{13}C -Kerne in den Seitenketten einiger Aminosäuren steigen nur bis zu einer Temperatur von $-5\text{ }^\circ\text{C}$ geringfügig an und nehmen dann durch die Linienverbreiterung bei niedrigeren Temperaturen wieder geringfügig ab. Dies betrifft die K $\text{C}\epsilon$ - (41 - 43 ppm), K $\text{C}\delta$ - (28 - 30 ppm), K $\text{C}\gamma$ - (24 - 26 ppm), T $\text{C}\gamma_2$ - (21 - 23 ppm) und

A C β -Resonanzen (21 - 23 ppm). Ihre Signalintensität wird jedoch wesentlich weniger durch die Temperaturveränderung beeinflusst, als die der C α - und C β -Resonanzen.

Der Vergleich der 1D $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren im nominalen Probentemperaturbereich von -25 °C bis 15 °C wurde auch für die $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe durchgeführt. Die Überlagerung der Spektren ist in Abb. 39 gezeigt.

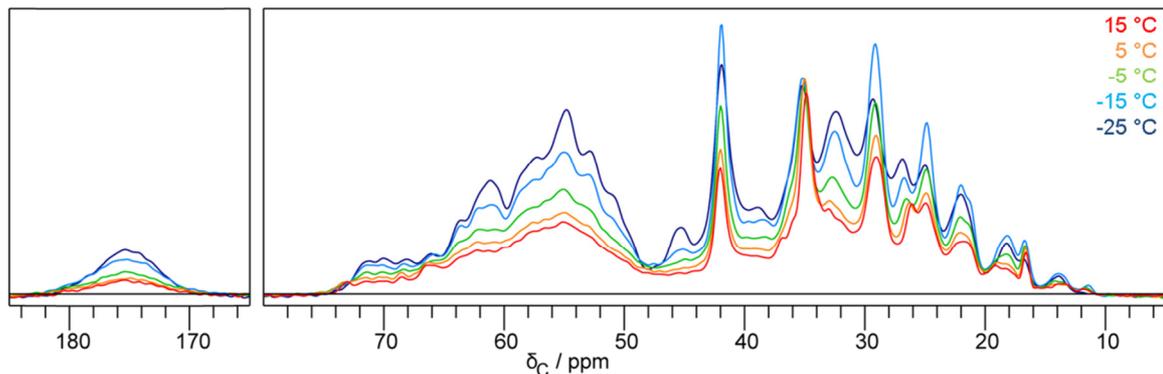


Abb. 39: Temperaturabhängigkeit der 1D $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.

Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und nominalen Probentemperaturen von 15 °C (rot), 5 °C (orange), -5 °C (grün), -15 °C (hellblau) und -25 °C (dunkelblau) aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Durch das Vorhandensein von Liposomen in der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe sind die Signalintensitäten der Resonanzen bei den chemischen Verschiebungen von 35 ppm, 28,5 ppm, 26,5 ppm und 16,5 ppm durch darunterliegende Lipidsignale überlagert (vgl. Abb. 29). Dies wurde bei der Auswertung der Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen berücksichtigt.

Für die $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe zeigt der Temperaturvergleich der Signalintensitäten ein ähnliches Bild wie für die $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe. Die Gesamtsignalintensität für die C α -Resonanzen aller Aminosäuren (45 - 65 ppm), für einige C β -Resonanzen der Aminosäuren S und T (60 - 72 ppm), I, D und N (38 - 40 ppm) und P, R, K, M und W (31 - 34 ppm) und für einige C γ -Resonanzen von R und I (26 - 28 ppm) ist ebenfalls trotz der Linienverbreiterung in dem Spektrum, das bei -25 °C aufgenommen wurde, am höchsten. Die Signalintensitäten für die ^{13}C -Kerne in den Seitenketten einiger Aminosäuren nehmen in dieser Probe durch die Verringerung der Temperatur bis zu einer nominalen Probentemperatur von -15 °C zu und nehmen dann durch die Linienverbreiterung bei niedrigeren Temperaturen wieder ab. Dies betrifft die K C ϵ - (41 - 43 ppm), K C δ - (28 - 30 ppm), K C γ - (24 - 26 ppm), T C γ_2 - (21 - 23 ppm) und A C β - (21 - 23 ppm und 17 - 19 ppm), I C γ_2 -Resonanzen (16 - 17 ppm). Der temperaturabhängige Anstieg dieser Signale ist in dieser Probe jedoch wesentlich stärker ausgeprägt, als in der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe. Zudem ist der Anstieg bis zu einer Temperatur von -15 °C, statt nur bis zu einer Temperatur von -5 °C in der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe, zu beobachten. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass der Gefrierpunkt der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe durch das Vorhandensein der Liposomen herabgesetzt wurde.

Zur Analyse der Temperaturabhängigkeit der Signalintensitäten wurde diese in Abb. 40 für ausgewählte Signale gegen die nominale Proben­temperatur aufgetragen. Es wurden Signale bei chemischen Verschiebungen gewählt, deren Signalintensität nicht oder nur geringfügig von darunterliegenden Lipidsignalen überlagert wird (vgl. Abb. 31).

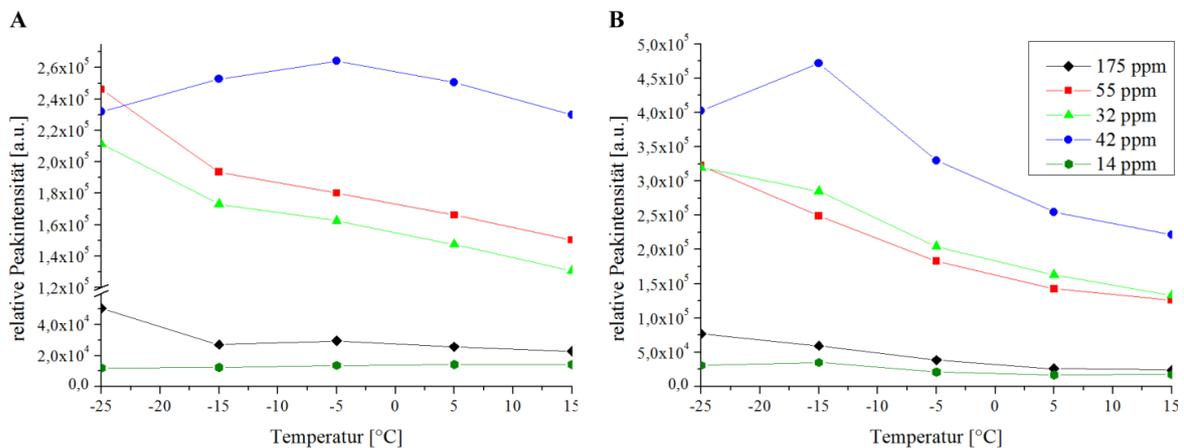


Abb. 40: Temperaturabhängigkeit der Signalintensität der U¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y) NP7 Probe (A) und der U¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y) NP7+Liposomen Probe (B).

Auftragung der Signalintensität der 1D ¹H / ¹³C-CP-Spektren bei 175 ppm (CO), 55 ppm (C α), 42 ppm (K C ϵ), 32 ppm (C β) und 14 ppm (I C δ) gegen die nominale Proben­temperatur. Die zugrundeliegenden 1D ¹H / ¹³C-CP-Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Die relative Signalintensität nimmt für die Signale bei 175 ppm (CO), 55 ppm (C α) und 32 ppm (C β) in beiden Proben mit steigender Temperatur ab. Für das Signal bei 42 ppm (K C ϵ) hingegen erreicht die relative Signalintensität der präzipitierten NP7 Probe bei -5 °C ihr Maximum und nimmt zu höheren sowie zu niedrigeren Temperaturen kontinuierlich ab. Für das an Liposomen gebundene NP7 liegt das Maximum der Signalintensität bei -15 °C. Die Intensität des Signale bei 14 ppm (I C δ) wird durch die Temperaturänderung kaum beeinflusst.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Signalintensitäten der Kohlenstoffkerne des Proteinrückgrats (CO und C α), sowie der angrenzenden Kohlenstoffkerne (C β) im nominalen Proben­temperaturbereich von 15 °C bis -25 °C mit sinkenden Temperaturen zunehmen. Dies gilt dagegen nicht in gleichem Maße für die Kohlenstoffkerne in den längeren Seitenketten.

Aufnahme der mehrdimensionalen NMR-Experimente im Temperaturbereich von -20 °C bis -30 °C

Da für die folgenden 2 D- und 3 D-Experimente ein möglichst hohes Signal-zu-Rausch Verhältnis erwünscht war, wurde die nominale Proben­temperatur gewählt, bei der die höchste Signalintensität erzielt werden konnte. Die Intensität der Signale bei 175 ppm (CO), 55 ppm (C α) und 32 ppm (C β) ist in beiden Proben bei -25 °C am höchsten. Das Signal bei 42 ppm (K C ϵ) weist in den beiden Proben bei -25 °C ebenfalls noch eine hohe Intensität auf. Somit wurden die weiteren Experimente im Bereich einer nominalen Proben­temperatur von -20 °C bis -30 °C aufgenommen.

Einige Korrelationen werden in 2D PDSB-Spektren erst bei niedrigen Temperaturen sichtbar

Zusätzlich zu den bereits diskutierten 1D $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren wurden auch 2D $^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ -Korrelationspektren bei verschiedenen Temperaturen von den $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 und $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Proben aufgenommen und miteinander verglichen, um die Abhängigkeit der Auflösung und der Intensität der Signale von der Temperatur genauer zu analysieren. Abb. 41 zeigt den Vergleich der 2D PDSB-Spektren mit einer Mischzeit von 20 bzw. 30 ms Mischzeit bei einer nominalen Proben temperatur von $-5\text{ }^\circ\text{C}$ im Vergleich zu denen, die bei Temperaturen von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $-25\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen wurden. Darüber hinaus zeigen PDSB-Spektren mit einer Mischzeit von bis zu 80 ms interresiduale Kreuzkorrelationen zwischen ^{13}C -Spins.

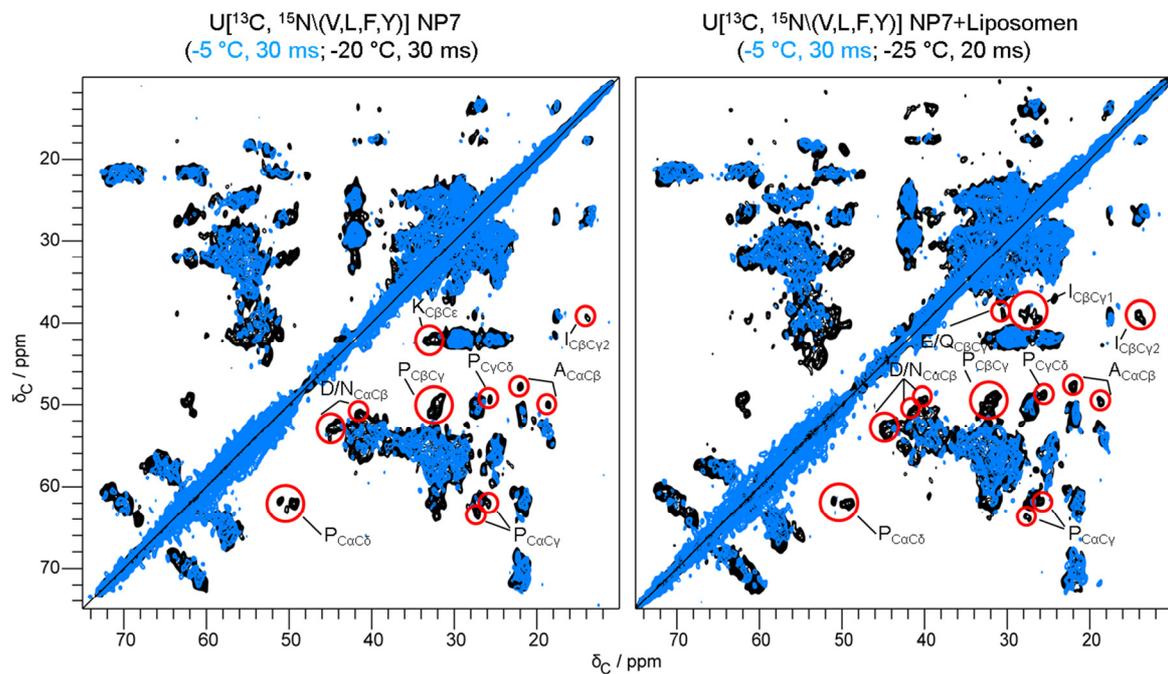


Abb. 41: Vergleich der 2D PDSB-Spektren der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 und $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Proben bei unterschiedlichen nominalen Proben temperaturen. Die Spektren wurden bei nominalen Proben temperaturen von $-5\text{ }^\circ\text{C}$ (blau) und $-20\text{ }^\circ\text{C}$ $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe bzw. $-25\text{ }^\circ\text{C}$ $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe (schwarz). Die PDSB-Spektren wurden mit einer Mischzeit von 30 ms (bzw. 20 ms ($\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$) an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,3 prozessiert. Unterschiede zwischen den Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen wurden rot umrandet.

Die Signale zeigen bei niedrigeren Temperaturen teilweise eine geringere Auflösung. Dies ist besonders im CaCb -Bereich von Threonin zu erkennen. Dies kommt durch die bereits diskutierte Linienverbreiterung bei niedrigen Temperaturen zustande. Allerdings sind bei höheren Temperaturen einige Korrelationen nicht sichtbar. Dies sind zum einen Transfers über mehrere Bindungen und betrifft die Korrelationen P CaCd und K Cbc (Abb. 41: rot umrandete Signale). Transfers über mehrere Bindungen sind in PDSB-Spektren mit kurzer Mischzeit (20 - 30 ms) nicht immer sichtbar. Allerdings sind auch einige Transfers über eine und zwei Bindungen für die Aminosäuretypen A, D/N, E/Q, P und I in den Spektren bei höheren Temperaturen nicht sichtbar (Abb. 41: rot umrandete Signale). Dies ist jedoch

in beiden Proben gleichermaßen festzustellen und kann damit nicht in Zusammenhang mit der NP7 Membraninteraktion gebracht werden. Die geringere Signaldichte in den Spektren bei höheren Temperaturen könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Dipolkopplungen bei höheren Temperaturen stärker ausgemittelt werden und der PDS-Transfer dadurch nicht so effizient ist.

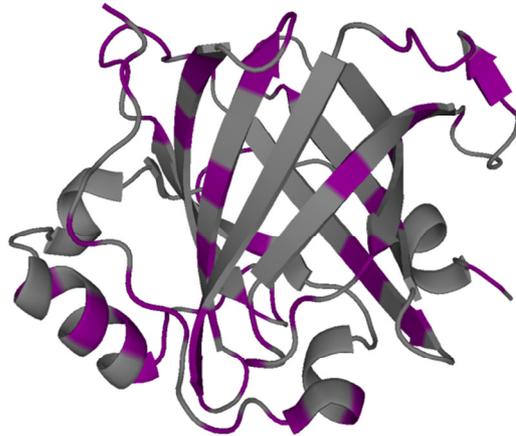


Abb. 42: Lokalisation der Aminosäuretypen in der Kristallstruktur von NP7 (PDB: 4XME) für die einige Transfers über eine und zwei Bindungen in den PDS-Spektren von NP7 bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht sichtbar sind.

Darstellung der Kristallstruktur als Bändermodell. Markierung der Aminosäuren A, D, N, E, Q, P und I (lila).

In der Kristallstruktur ist zu sehen, dass die bei hohen Temperaturen nicht sichtbaren Aminosäuretypen sich nicht in einer bestimmten Region des Proteins häufen, daher können daraus keine strukturellen Rückschlüsse gezogen werden (vgl. Abb. 42).

4.2.4 Zuordnung der NP7-Resonanzen in den Festkörper-NMR-Spektren

Zur genaueren Analyse der strukturellen Einflüsse der Membranbindung von NP7 auf dessen Struktur wurde eine Zuordnung der NMR-Signale in den gemessenen Festkörper-NMR-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7, der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{K,V})]$ NP7 und der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Proben angestrebt. Dazu wurden 2D $^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren, (PDS-Spektren mit Mischzeiten von 5 - 200 ms, DQ / SQ- und DREAM-Spektren), 2D $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$ - und 2D $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren (2D N α -, 2D N α CX-, 2D N α C β -, 2D NCOCX-Spektren), sowie 3D $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren (3D N α CX-, 3D N α C β - und 3D NCOCX-Spektren) verwendet. PDS-Spektren mit Mischzeiten bis zu 80 ms, DQ / SQ- und DREAM-Spektren zeigen interresiduale $^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ -Korrelationen. Sie wurden für die Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen verwendet. N α -, N α CX- und N α C β -Spektren ermöglichen die Zuordnung der ^{15}N -chemischen Verschiebung zu den ^{13}C -chemischen Verschiebungen derselben Aminosäure. PDS-Spektren mit Mischzeiten ab 100 ms zeigen zu den intraresidualen auch interresiduale $^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ -Korrelationen und ermöglichen die Verknüpfung der Aminosäuren untereinander. NCOCX-Spektren ermöglichen die

Zuordnung der ^{15}N -chemischen Verschiebung einer Aminosäure zu den ^{13}C -chemischen Verschiebungen der vorhergehenden Aminosäure und dienen damit ebenfalls zur sequentiellen Verknüpfung der Aminosäuren.

Eine Übersicht über die für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen verwendeten Festkörper-NMR-Spektren ist in Tab. 23 gegeben. Die für die Messung der verschiedenen Spektren verwendeten Parameter sind im Anhang in Kapitel 9.1 aufgeführt.

Tab. 23: Für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen verwendete Festkörper-NMR-Spektren. Anzahl der verwendeten Spektren des jeweiligen Typs für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der verschiedenen NP7 NMR Proben.

	$\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7	$\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{K,V})]$ NP7	$\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen
2D PDSD	7	4	8
2D PDSD-RR	2	1	3
2D DREAM	1	1	0
2D DQ / SQ	3	1	3
2D N α	2	0	1
2D N α CX	2	1	3
2D N α C β	0	1	0
2D NCOCX	3	1	3
3D N α CX	2	1	1
3D N α C β	1	1	0
3D NCOCX	1	1	1

4.2.4.1 Einfluss der Aufnahmeparameter

Die 2D $^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren wiesen Linienbreiten von 0,8 - 1,4 ppm in beiden Dimensionen auf. Die 2D $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren wiesen in der ^{13}C -Dimension eine Linienbreite von 0,5 - 1,0 ppm und in der ^{15}N -Dimension eine Linienbreite von 1,4 - 2,9 ppm auf. Die 3D $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren wiesen in der direkten ^{13}C -Dimension eine Linienbreite von 0,5 - 1,0 ppm, in der indirekten ^{13}C -Dimension eine Linienbreite von 1,1 - 2,4 ppm und in der ^{15}N -Dimension eine Linienbreite von 1,9 - 4,4 ppm auf.

Höhere Feldstärke ermöglicht höhere Auflösung der Signale

Der Vergleich der Spektren, die bei unterschiedlichen Feldstärken aufgenommen wurden zeigt, dass die Auflösung am 800 MHz Spektrometer höher ist als am 600 MHz Spektrometer und dadurch eine stärkere Differenzierung der Signale ermöglicht. Dies ist beispielhaft in einer Vergrößerung des Bereichs der Threonin C α C β -Signale zu sehen. Des Weiteren sind die Korrelationen der ^{13}C -Kerne der Seitenketten mit den CO-Kernen des Proteinrückgrats im Spektrum vom 600 MHz Spektrometer stärker sichtbar als in dem vom 800 MHz Spektrometer (gepunktet eingerahmter Bereich).

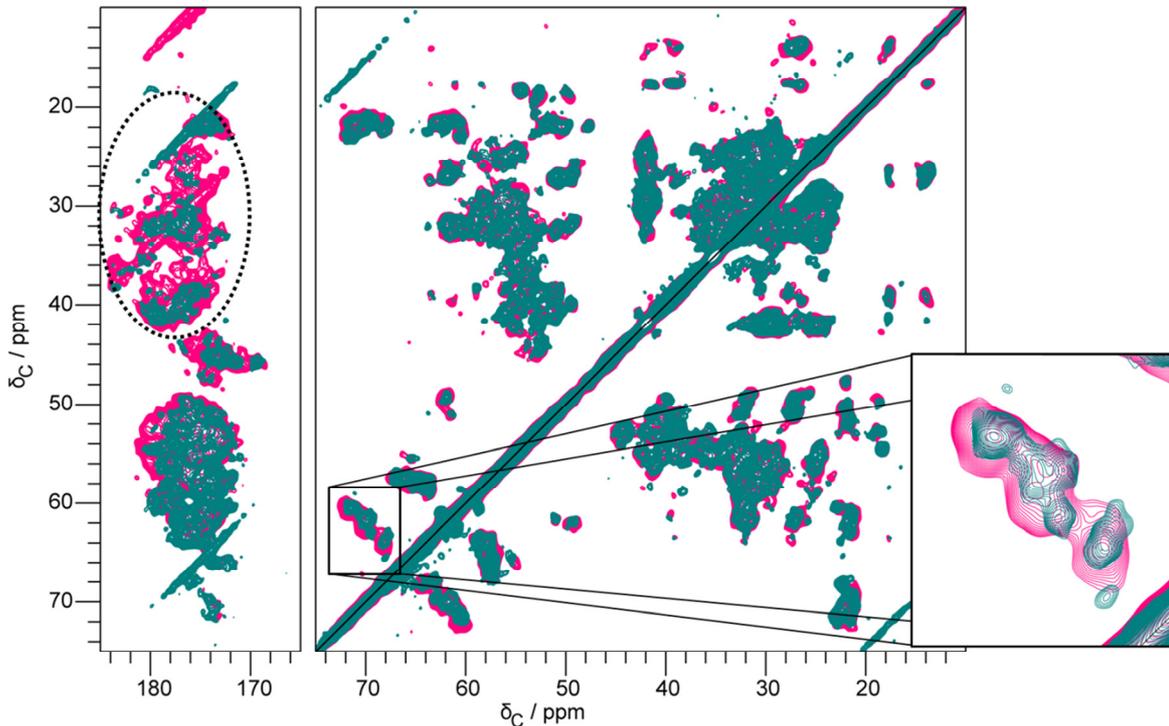


Abb. 43: Vergleich der Spektren bei unterschiedlichen Magnetfeldstärken.

Überlagerung der PDSD-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe mit einer Mischzeit von 15 ms vom 800 MHz Spektrometer (grün) und mit einer Mischzeit von 20 ms vom 600 MHz Spektrometer (pink). Die Spektren wurden mit 176 Scans bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 75 Hz, Linienverbreiterung: 150 Hz, Gaußmaximum: 0,1) prozessiert. Die Korrelationen der ^{13}C -Kerne der Seitenketten mit den CO-Kernen des Proteinrückgrats sind in im Spektrum vom 600 MHz Spektrometer deutlicher ausgeprägt (gepunktet eingerahmter Bereich). Vergleich der Auflösung der Threonin $\text{C}_\alpha\text{C}_\beta$ -Signale (vergrößerter Bereich).

Temperaturabhängige Veränderung der Arginin $\text{C}\zeta$ -Signale

Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der NP7-Proben wurde technisch bedingt in Spektren im Temperaturbereich von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis $-30\text{ }^\circ\text{C}$ vorgenommen. Daher wurden die Spektren auf Veränderungen in diesem Temperaturbereich überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass sich die chemischen Verschiebungen der Arginin $\text{C}\zeta$ -Signale temperaturabhängig unterscheiden und mehr als zwei $\text{C}\zeta$ -Signale (die NP7-Sequenz enthält 2 Arginine) zu finden sind. Dies ist exemplarisch im Vergleich der 2D NCOCX-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe in Abb. 44 gezeigt. Die Signalaufspaltung könnte auf unterschiedliche Protonierungszustände des Arginin $\text{C}\zeta$ zurückzuführen sein.⁸⁵

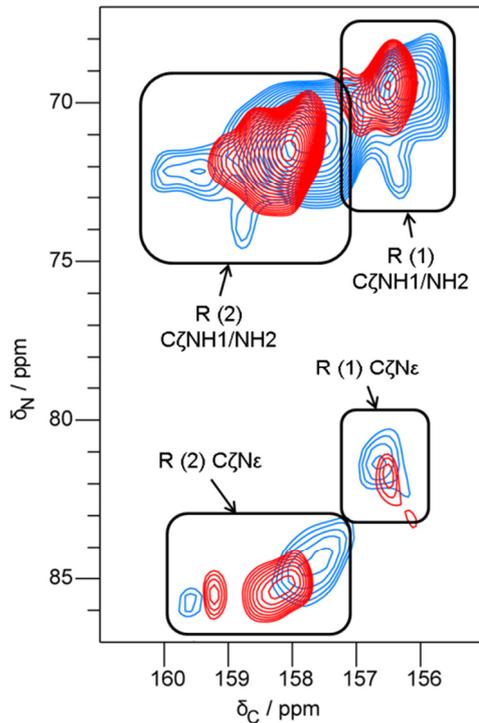


Abb. 44: Arginin Konformationen bei unterschiedlichen Temperaturen.

Überlagerung der 2D NCOX-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe aufgenommen an einem 600 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (blau) und an einem 800 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben temperatur von $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (rot) und einer Rotationsfrequenz von 11 kHz. Die Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Durch die Rotation um die $\text{N}\epsilon / \text{C}\zeta$ -Bindung kommt es zur Ausmittelung der NH_1 - und NH_2 -Resonanzen und zu einer Linienverbreiterung der ^{15}N -chemischen Verschiebungen im Bereich von 68 – 74 ppm in Abb. 44.⁸⁶

Die Signale der anderen Kerne $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$, $\text{C}\gamma$ und $\text{C}\delta$ der beiden Arginine waren in den PDSO und NCOX-Spektren nur teilweise sichtbar. Am besten waren diese in den $\text{NC}\alpha\text{CX}$ -Spektren zu erkennen (Abb. 45), jedoch waren auch hier nicht in jedem Spektrum alle Signale zu sehen. Insgesamt waren die Signale besser bei tieferen Temperaturen zu sehen. Die chemischen Verschiebungen der $\text{C}\alpha$ -, $\text{C}\beta$ -, $\text{C}\gamma$ - und $\text{C}\delta$ -Kerne der beiden Arginine wiesen im Vergleich der aufgenommenen Spektren keine Unterschiede auf, die sich in mehreren Spektren manifestierten. Die mit den gestrichelten Pfeilen markierten Signale konnten nicht noch einmal in anderen Spektren gefunden werden, daher handelt es sich bei diesen Signalen vermutlich um Rauschen und nicht um Signale der Arginine. In Abb. 45 sind die Zuordnungen der Arginin-Seitenkettensignale exemplarisch in der Überlagerung der 2D $\text{NC}\alpha\text{CX}$ -Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gezeigt.

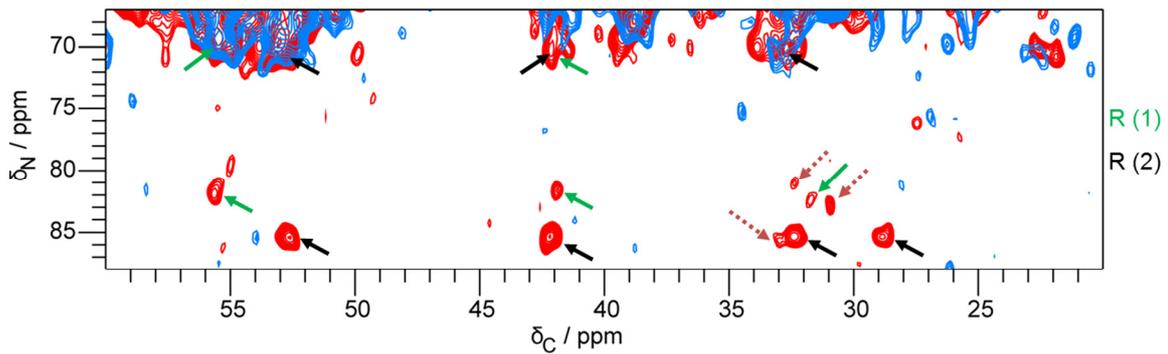


Abb. 45: Arginin Seitenketten bei unterschiedlichen Temperaturen.

Überlagerung der 2D NCαCX-Spektren der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe aufgenommen an einem 600 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben­temperatur von 20 °C (blau) und an einem 800 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben­temperatur von -30 °C (rot) und einer Rotationsfrequenz von 11 kHz. Die Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert. Signale aus beiden in NP7 enthaltenen Arginin-Spinsystemen wurden identifiziert und sind mit grünen (R(1)) und schwarzen (R(2)) Pfeilen gekennzeichnet. Weitere Signale im Bereich der Argininfrequenzen (gestrichelte Pfeile) wurden in keinem der anderen analysierten Spektren wiedergefunden. Daher handelt es sich hierbei vermutlich um Rauschen.

4.2.4.2 Aminosäuretyp-spezifische Resonanz­zuordnung

Zunächst wurde mit Hilfe der in Tab. 23 aufgeführten Spektren die Aminosäuretyp-spezifische Resonanz­zuordnung der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7 Probe, der U[^{13}C , ^{15}N (K,V)] NP7 Probe und der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe unternommen. Die Benennung der zugeordneten Resonanzen erfolgte mit dem Ein-Buchstaben-Code der jeweiligen Aminosäure und einer in Klammern gefassten aufsteigenden Zahl. Somit ist die Benennung des ersten in den gemessenen Spektren identifizierten Serins S (1). In Abb. 46 sind die Bereiche der ^{13}C -Resonanzen der einzelnen Aminosäuren exemplarisch im 2D DQ / SQ-Spektrum der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe dargestellt.

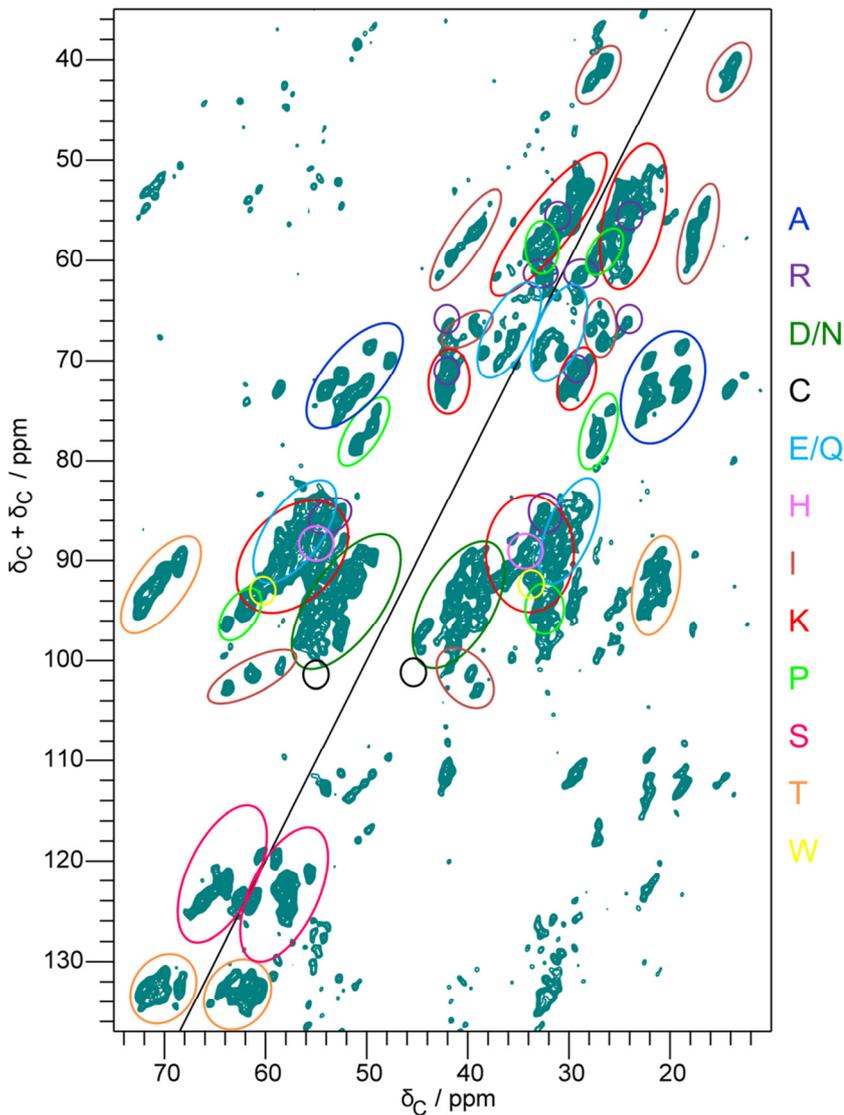


Abb. 46: Bereiche der ^{13}C -Resonanzen der einzelnen Aminosäuren im 2D DQ/SQ-Spektrum der $\text{U}[^{13}\text{C},^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.

Farbige Umrandung der Bereiche in denen die Aminosäuren des jeweiligen Typs zu finden sind. Nicht umrandete Signale sind Seitenbanden oder Artefakte der Messung ohne Aussagekraft über die Probe. Das SPC5-Spektrum wurde an einem 800 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 8 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^\circ\text{C}$ gemessen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 100 Hz, Linienverbreiterung: 200 Hz, Gaußmaximum: 0,1) prozessiert.

In Abb. 46 ist zu sehen, dass die Resonanzen der Aminosäuren Alanin, Serin, Threonin, Isoleucin und Prolin von denen der anderen Aminosäuren unterschieden werden können. Hier war eine hohe Auflösung ein entscheidender Faktor für die Resonanzzuordnung, da die Aminosäuren teilweise sehr ähnliche Kohlenstoffverschiebungen haben. Dies wurde besonders deutlich im Vergleich der Spektren, die am 800 MHz und am 600 MHz Spektrometer gemessen wurden (vgl. Abb. 43).

Teilweise war eine Differenzierung zwischen zwei Aminosäuren des gleichen Typs auch nur durch Zuhilfenahme der Stickstoffverschiebungen möglich. Insgesamt konnten so 12 / 12 Alaninresten, 11 / 13 Serinresten, 10 / 12 Threoninresten, 7 / 7 Isoleucinresten und

4 / 7 Prolinresten Aminosäuretyp-spezifisch zugeordnet werden. Die Zuordnung der Glycinsignale erfolgte mit Hilfe der 2D N α -Spektren, da die C α CO-Resonanzen in den CC-Korrelationsspektren nicht zu unterscheiden waren. Dadurch konnten 10 / 10 Glycinresten identifiziert werden. Die beiden Argininreste konnten anhand der Seitenketten-Stickstoffatome in N α CX- und NCOCX-Spektren identifiziert werden, da ihre Signale in den CC-Korrelationsspektren mit denen der Lysinreste überlappen. Die Identifizierung der aromatischen Aminosäuren Histidin und Tryptophan erfolgte über die aromatischen Signale in CC-Korrelationsspektren, und die Histidinreste konnten zudem über die Stickstoffatome der Seitenketten in NCOCX-Spektren identifiziert werden. Somit konnten 2 / 2 Tryptophanresten und 2 / 3 Histidinresten zugeordnet werden.

Die Länge des Proteins von 186 Aminosäuren inkl. N-terminalem artifiziellem Methionin stellt immer noch eine Herausforderung für die Festkörper-NMR-Spektroskopie dar, da die Spektren durch die größere Linienbreite verglichen mit der Flüssig-NMR-Spektroskopie schlechter aufgelöst sind. Dies führt zu spektralen Überlappungen der Resonanzfrequenzen der Aminosäuren. Somit kommt es trotz reverser Isotopenmarkierung besonders im Bereich der C α C β -Resonanzen zu sehr vielen spektralen Überlappungen, da diese für viele Aminosäuren relativ ähnlich sind. Durch die reverse Isotopenmarkierung der Aminosäuren Valin, Leucin, Phenylalanin und Tyrosin sind noch 139 / 186 Aminosäuren in den NMR-Spektren sichtbar. Durch die reverse Isotopenmarkierung der Aminosäuren Lysin und Valin bleiben noch 146 / 186 Aminosäuren in den NMR-Spektren sichtbar.

Die Zuordnung der Signale der Asparaginsäure- und Asparaginreste gestaltete sich schwierig, da die C γ -Verschiebungen nur für einige Aminosäuren in den CC-Korrelationsspektren sichtbar waren und die C α C β -Korrelationen eine hohe spektrale Überlappung aufwiesen. Zudem ist aufgrund der Ähnlichkeit der chemischen Verschiebungen der Asparaginsäure und des Asparagins ohne eine sequentielle Verknüpfung keine Unterscheidung zwischen diesen Typen möglich. Somit konnten nur 7/24 Spinsystemen den Aminosäuren D bzw. N zugeordnet werden. Ähnlich verhält es sich mit der Zuordnung der Signale der Glutaminsäure- und der Glutaminreste. Hier waren nur die C δ -Verschiebungen für einige Aminosäuren in CC-Korrelationsspektren sichtbar, und die Korrelationen zwischen den C α -, C β - und C γ -Kernen wiesen starke spektrale Überlappungen auf. Des Weiteren konnte in den CC-Korrelationsspektren 1 / 2 Methioninreste aufgrund der charakteristischen C ϵ -Verschiebung zugeordnet werden. Die Cysteine lagen in den untersuchten Proben durch die Ausbildung von 2 Disulfidbrücken in oxidiert Form vor. Hier war es möglich 1 / 4 Cysteinen in den CC-Korrelationsspektren zu identifizieren.

Auf die Zuordnung der Lysinreste wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

4.2.4.3 Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung der Lysinsignale

Da wie in Kapitel 4.2.3.1 erläutert, für die Lysine des NP7s eine bedeutende Rolle in der Membranbindung vermutet wird, war die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der 27 Lysinreste von besonderer Bedeutung. Die Zuordnung einer großen Anzahl an

Resonanzen eines Aminosäuretyps stellt eine Herausforderung dar, da sich insbesondere die Resonanzen der Seitenketten häufig nur geringfügig unterscheiden. Dadurch kommt es zu starken spektralen Überlappungen der Resonanzen der verschiedenen Lysinreste. Die Unterschiede in den Resonanzen der $C\alpha$ - und $C\beta$ -Kerne eines Aminosäuretyps sind hingegen meist etwas größer, da diese stärker durch die Sekundärstrukturelemente, in denen sie sich befinden, beeinflusst werden. Allerdings sind die spektralen Überlappungen zwischen den Resonanzfrequenzen der unterschiedlichen Aminosäuren im Bereich der $C\alpha C\beta$ -Resonanzen besonders groß, da diese häufig nicht so sehr vom Aminosäuretyp abhängig sind. Wie in Abb. 46 zu sehen ist, überlappen die $C\alpha C\beta$ -Resonanzen in den DQ / SQ-Spektren mit denen der Aminosäuren R, H, W, E und Q.

Aminosäuretyp-spezifischen Resonanzzuordnung von sechs Lysinen möglich

Aufgrund der zuvor beschriebenen Herausforderung war es nur möglich 6 / 27 Lysinresten Aminosäuretyp-spezifisch zuzuordnen. In Abb. 47 und Abb. 48 sind die zugeordneten ^{13}C -Resonanzen exemplarisch im 2D DQ / SQ-Spektrum und im 2D PDS-D-Spektrum der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen Probe dargestellt.

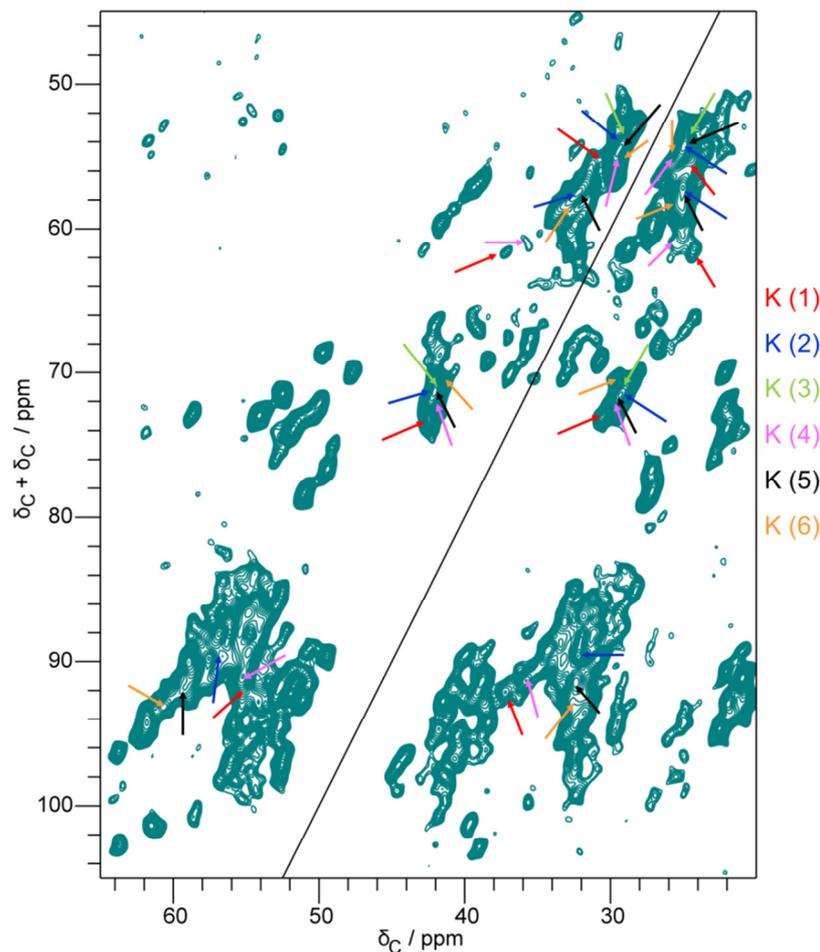


Abb. 47: Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung der Lysin-Resonanzen im 2D DQ / SQ-Spektrum der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen Probe. Farbige Pfeile markieren die Lysinsignale im Spektrum. Das SPC5-Spektrum wurde an einem 800 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 8 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 100 Hz, Linienverbreiterung: 200 Hz, Gaußmaximum: 0,1) prozessiert.

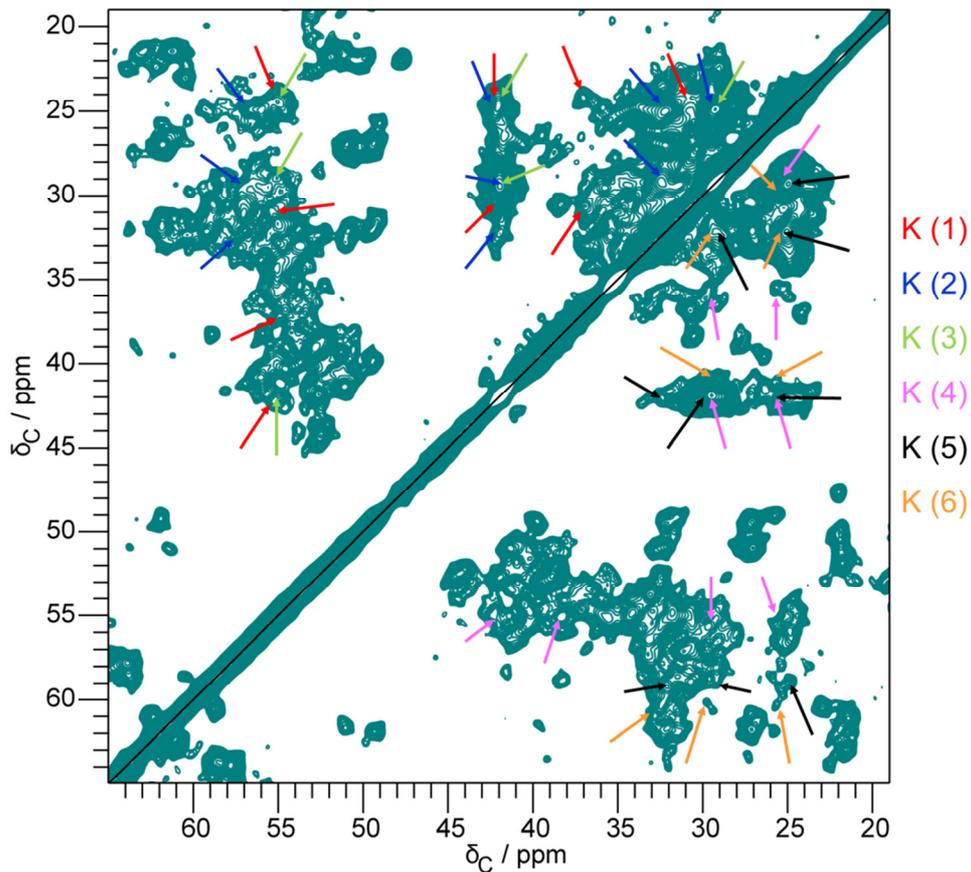


Abb. 48: Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung der Lysin-Resonanzen im 2D PDSO-Spektrum der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.

Farbige Pfeile markieren die Lysin-Signale im Spektrum. Das PDSO-Spektrum wurde mit einer Mischzeit von 15 ms an einem 800 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Probentemperatur von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 75 Hz, Linienverbreiterung: 150 Hz, Gaußmaximum: 0,1) prozessiert.

Auftrennung der Lysinseitenketten in $\text{NC}\alpha\text{CX}$ -Spektren nicht möglich

Um weitere Lysine zu identifizieren, wurde der Versuch unternommen, die Lysin-Signale stärker von den Signalen der anderen Aminosäuren zu separieren. Dazu wurde die Tatsache genutzt, dass im $\text{NC}\alpha\text{CX}$ -Spektrum auch die $\text{N}\zeta$ -Kerne der Lysine angeregt werden, die bei einer Stickstoffverschiebung von ca. 33 ppm detektiert werden können. Da die Stickstoffverschiebungen des Proteinrückgrats im Bereich von 105 - 140 ppm liegen, können die Lysine so isoliert betrachtet werden. Somit wurden $\text{NC}\alpha\text{CX}$ -Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 und der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Proben aufgenommen, in denen die spektrale Weite in der N-Dimension so gewählt wurde, dass die Signale bei der $\text{N}\zeta$ -Verschiebung der Lysine so in das Spektrum hineingefaltet werden, dass sie nicht mit den N-Verschiebungen des Proteinrückgrats überlappen. Abb. 49 zeigt die Ausschnitte der $\text{NC}\alpha\text{CX}$ -Spektren bei der Stickstoffverschiebung des $\text{N}\zeta$ -Kerns der Lysinreste.

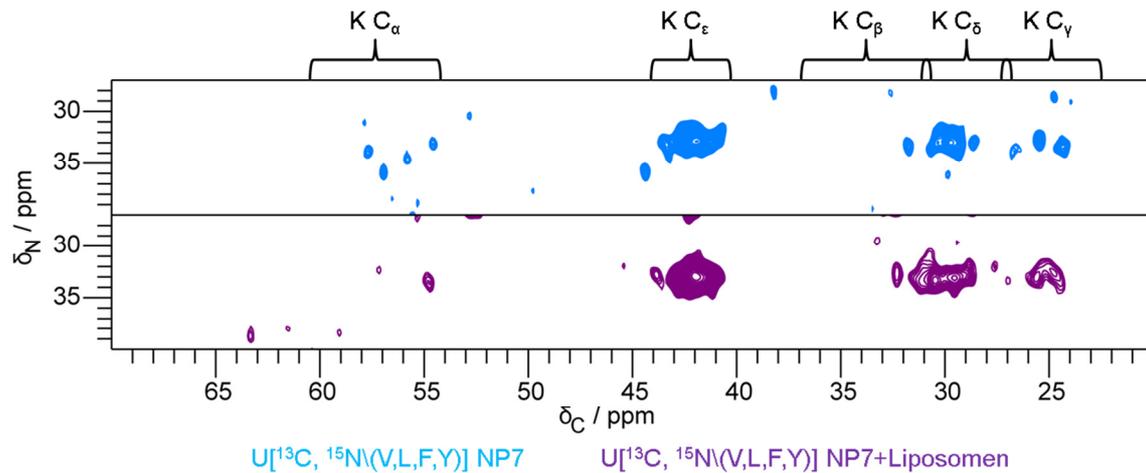


Abb. 49: ^{13}C -Lysin-Resonanzen bei der K N_ζ Stickstoff chemischen Verschiebung in 2D $\text{N C}_\alpha\text{CX}$ -Spektren der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (blau) und $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Proben (lila).

Die Spektren wurden an einem 800 MHz Spektrometer mit einer PDSM-Mischzeit von 50 ms und 3936 Scans (blau) bzw. 3936 Scans (lila) bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von -30°C aufgenommen und mit einer mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,5 prozessiert.

In den $\text{N C}_\alpha\text{CX}$ -Spektren ist zu sehen, dass die chemische Verschiebungen der Lysin N_ζ -, C_γ -, C_δ - und C_ϵ -Kerne sich nur geringfügig unterscheiden und durch die große Anzahl von 27 Lysinreste im Protein stark überlappen. Die chemischen Verschiebungen der K C_α - und C_β -Kerne sind kaum sichtbar. Dies liegt daran, dass für die Detektion dieser Korrelationen ein Magnetisierungstransfer über drei bzw. vier Bindungen erfolgen muss und die PDSM-Mischzeit von 50 ms hierfür zu kurz war.

Auftrennung der Lysinresonanzen in $\text{N}_\zeta\text{C}_\epsilon\text{CX}$ -Spektren ebenfalls nicht möglich

Um die Sichtbarkeit der C_α - und C_β -Resonanzen in NCC -Korrelationsspektren zu erhöhen, wurde ein $\text{N}_\zeta\text{C}_\epsilon\text{CX}$ -Spektrum, mit direkter Anregung der Lysin N_ζ -Resonanz, aufgenommen. Durch die „On-Resonance“ Anregung der N_ζ -Kerne der Lysine wurde eine stärkere Anregung dieser erwartet und daraus folgend eine stärkere Übertragung der Magnetisierung entlang der Aminosäurekette. Außerdem wurde die Länge der Mischzeit auf 90 ms verlängert. So sollte die Sichtbarkeit der Lysin C_α - und C_β -Kerne in dem Spektrum erhöht werden. Die Mischzeit wurde nicht noch länger gewählt, da es bei langen Mischzeiten durch die Relaxation einiger Spins auch einige Signale nicht mehr detektiert werden können. Abb. 50 zeigt die Ausschnitte der $\text{N}_\zeta\text{C}_\epsilon\text{CX}$ -Spektren bei der Stickstoffverschiebung des N_ζ der Lysine.

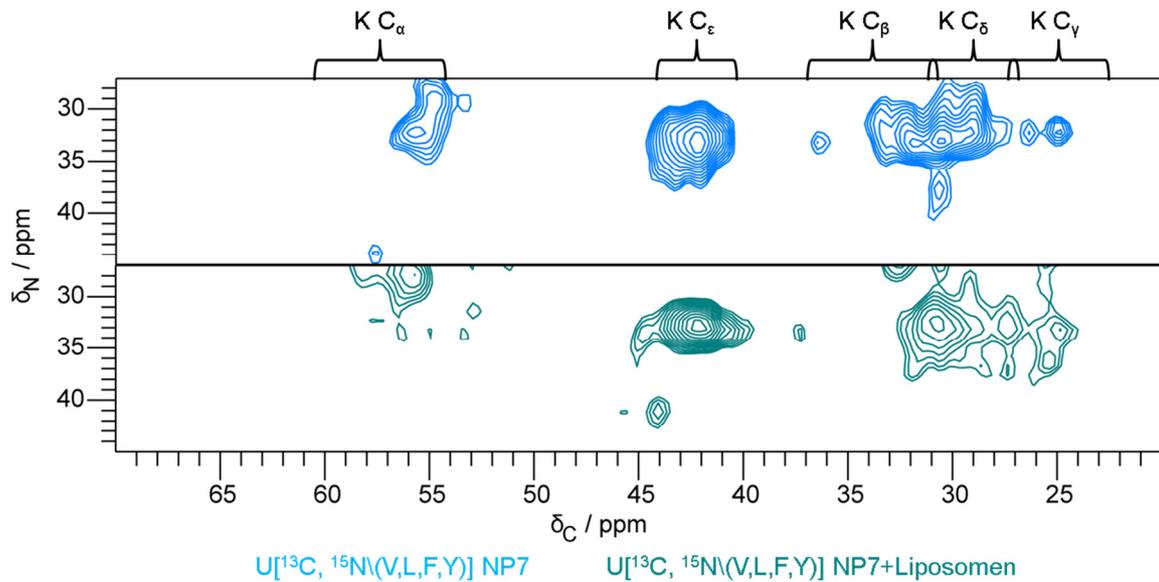


Abb. 50: ^{13}C -Lysin-Resonanzen bei der $K N_{\zeta}$ Stickstoff chemischen Verschiebung in 2D $N_{\zeta}C_{\epsilon}CX$ -Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (blau) und $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Proben (grün).

Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer mit einer DARR-Mischzeit von 90 ms und 2480 Scans (blau) bzw. 2864 Scans (grün) bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen und mit einer mit einer exponentiellen Linienverbreiterung von 150 Hz prozessiert.

Der Vergleich der $NC_{\alpha}CX$ -Spektren mit den $N_{\zeta}C_{\epsilon}CX$ -Spektren zeigt, dass die Auflösung in den $N_{\zeta}C_{\epsilon}CX$ -Spektren wesentlich geringer ist als in den $NC_{\alpha}CX$ -Spektren. Dies liegt zum einen an der geringeren Feldstärke des Spektrometers (600 MHz statt 800 MHz), an dem die $N_{\zeta}C_{\epsilon}CX$ -Spektren aufgenommen wurden, und zum anderen an einem geringeren Signal-zu-Rausch Verhältnis, wodurch eine die Auflösung verringernde exponentielle Prozessierung gewählt werden musste. Somit ermöglichten diese Spektren ebenfalls keine weitere Resonanzzuordnung der Lysine.

4.2.4.4 Sequentielle Resonanzzuordnung

Für die sequentielle Resonanzzuordnung der Aminosäuren in den NP7 Proben wurden zum einen PDS-D-Spektren mit Mischzeiten ab 100 ms verwendet, da diese auch interresiduale CC-Korrelationen zeigen. Zum anderen wurden 2D und 3D $NCOCX$ -Spektren verwendet.

Interresiduale Korrelationen in PDS-D-Spektren

Abb. 51 zeigt die Überlagerung der PDS-D-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe bei Mischzeiten von 15 ms und 100 ms und die im Spektrum mit langer Mischzeit gefundenen interresidualen Korrelationen.

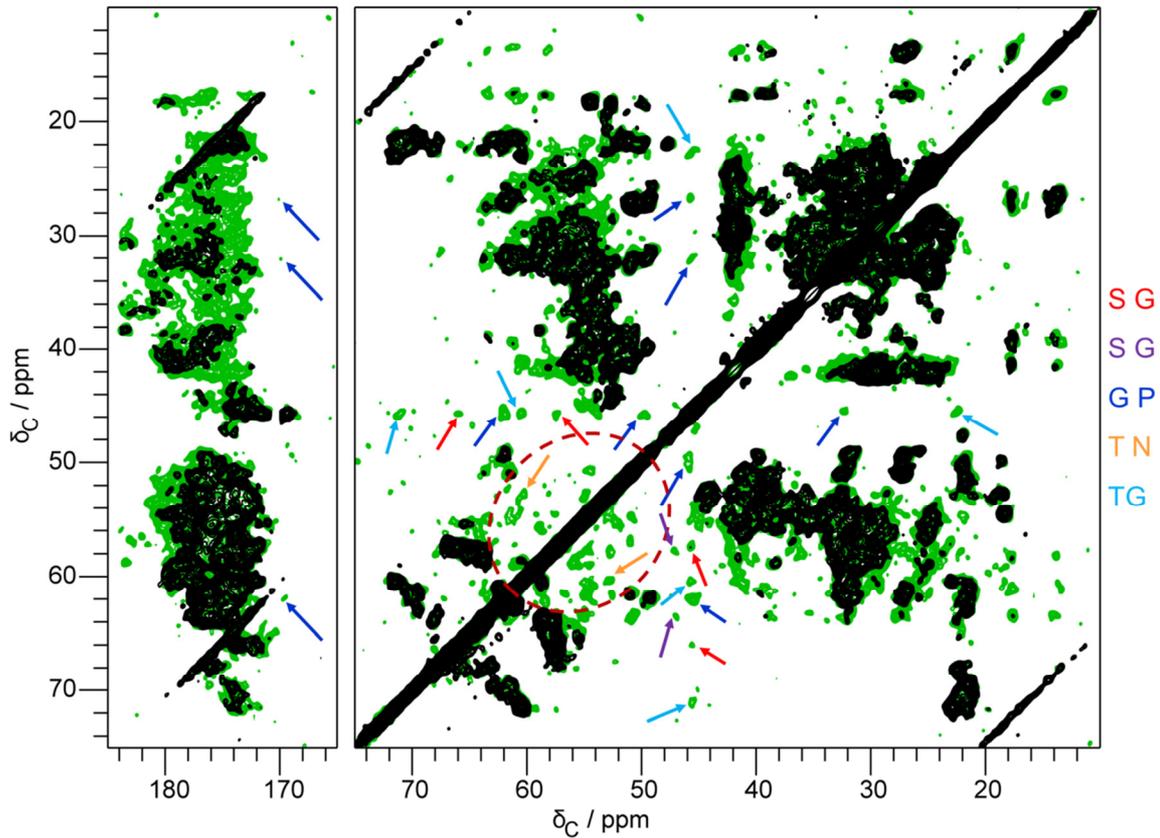


Abb. 51: Interresiduale Kreuzkorrelationen der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe im 2D PDS-D-Spektrum.

Überlagerung der PDS-D-Spektren mit 15 ms (schwarz) und 100 ms (hellgrün) Mischzeit. Farbige Pfeile markieren die zugeordneten interresidualen Kreuzkorrelationen im Spektrum mit der langen Mischzeit. Die identifizierten interresidualen Kreuzkorrelationen wurden mit den Aminosäuretyp-spezifischen Zuordnungen beschriftet. Die gestrichelt eingekreiste Region markiert den Bereich vieler interresidualen $\text{C}_{\alpha(i)}\text{C}_{\alpha(i+1)}$ -Korrelationen. Die PDS-D-Spektrum wurden an einem 800 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 75 Hz, Linienverbreiterung: 150 Hz, Gaußmaximum: 0,1) prozessiert.

Die Signale in dem PDS-D-Spektrum bei langer Mischzeit, die nicht durch Signale aus dem Spektrum mit kurzer Mischzeit überlagert werden, stellen entweder interresiduale Korrelationen oder Korrelationen über mehrere Bindungen dar. In dem durch einen gestrichelte Linie umrandeten Bereich sind viele interresiduale $\text{C}_{\alpha(i)}\text{C}_{\alpha(i+1)}$ -Korrelationen zu finden, allerdings ist die Resonanzzuordnung dieser Korrelationen aufgrund der Ähnlichkeit der C_{α} -chemischen Verschiebungen vieler Aminosäuren in der NP7-Sequenz und der damit einhergehenden starken spektralen Überlappung im Bereich der C_{α} -Verschiebungen kaum möglich. Aufgründdessen konnten in den PDS-D-Spektren hauptsächlich interresiduale Korrelationen mit auffälligen chemischen Verschiebungen zugeordnet werden. Dies sind insbesondere die Korrelationen der Aminosäuren Serin, Threonin, Glycin und Prolin (vgl. Abb. 51).

PDS-D-RR-Spektren zeigen zusätzliche interresiduale Korrelationen

Zur gezielten Detektion der schwach dipolar gekoppelten interresidualen Korrelationen in Gegenwart von stark dipolar gekoppelten intraresidualen Korrelationen wurden zusätzlich

PDS-RR-Spektren bei einer Rotationsfrequenz aufgenommen, die nah an der „Rotational Resonance“ Kondition von $\text{CO}_{(i-1)}\text{C}\alpha_{(i)}$ gewählt wurde, da hierdurch der Magnetisierungsaustausch zwischen diesen beiden Kernen verstärkt wurde. Abb. 52 zeigt die Überlagerung von PDS-RR-Spektren der $\text{U}[\text{}^{13}\text{C}, \text{}^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe bei Mischzeiten von 15 ms und 100 ms und die im Spektrum mit langer Mischzeit gefundenen interresidualen Korrelationen.

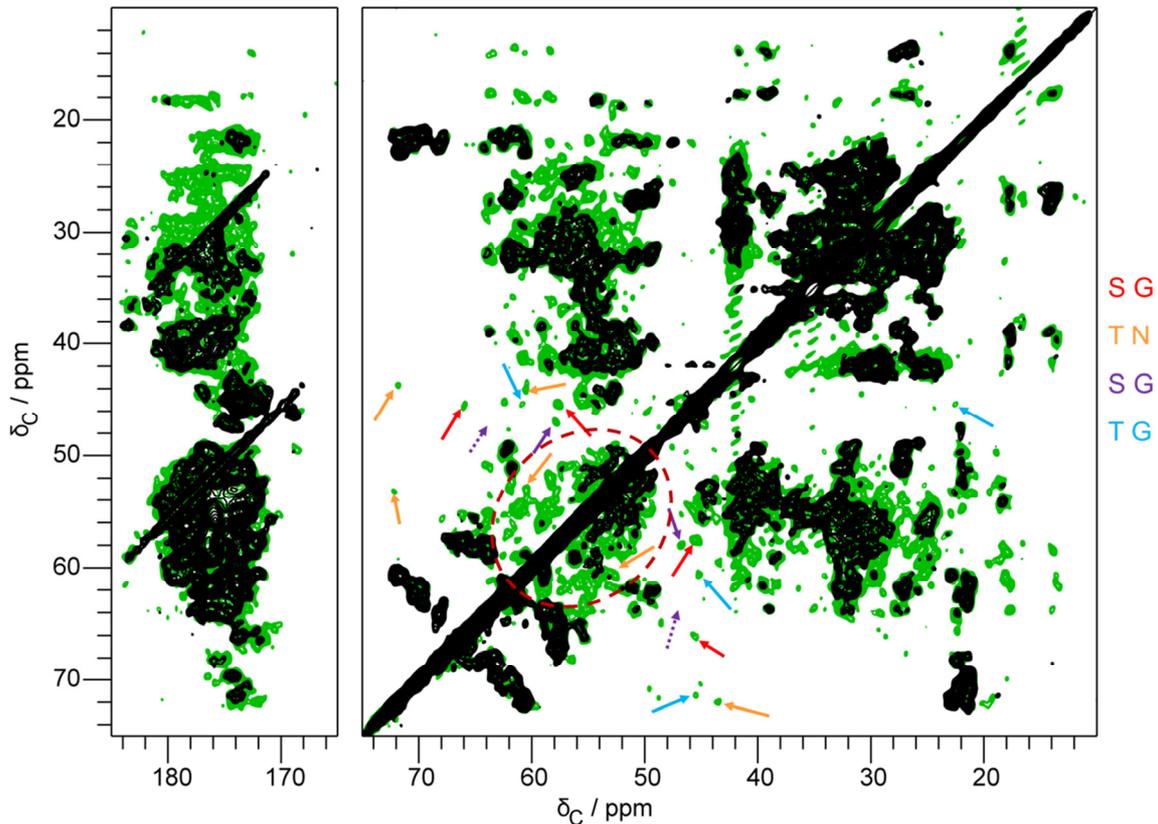


Abb. 52: Interresiduale Kreuzkorrelationen im 2D PDS-RR-Spektrum der $\text{U}[\text{}^{13}\text{C}, \text{}^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.

Überlagerung der PDS-RR-Spektren mit 15 ms (schwarz) und 100 ms (hellgrün) Mischzeit. Farbige Pfeile markieren die interresidualen Kreuzkorrelationen im Spektrum mit der langen Mischzeit. Gepunktete Pfeile markieren Korrelation die erst bei geringerem Konturlevel sichtbar werden. Die identifizierten interresidualen Kreuzkorrelationen wurden mit den Aminosäuretyp-spezifischen Zuordnungen beschriftet. Die gestrichelt eingekreiste Region markiert den Bereich vieler interresidualen $\text{C}\alpha_{(i)}\text{C}\alpha_{(i+1)}$ -Korrelationen. Die PDS-RR-Spektren wurden an einem 800 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 12,5 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 75 Hz, Linienverbreiterung: 150 Hz, Gaußmaximum: 0,1) prozessiert.

Das PDS-RR-Spektrum mit langer Mischzeit in Abb. 52 zeigt im Vergleich zu einem PDS-RR-Spektrum in Abb. 51, das bei einer von der „Rotational Resonance“-Kondition entfernten Rotationsfrequenz aufgenommen wurde, wesentlich mehr interresidualen $\text{C}\alpha_{(i)}\text{C}\alpha_{(i+1)}$ -Korrelationen (gestrichelt umrandeter Bereich in Abb. 52). Allerdings verschwindet die im PDS-RR-Spektrum stark ausgeprägte interresiduale Korrelation zwischen den Aminosäuren Prolin und Glycin im PDS-RR-Spektrum.

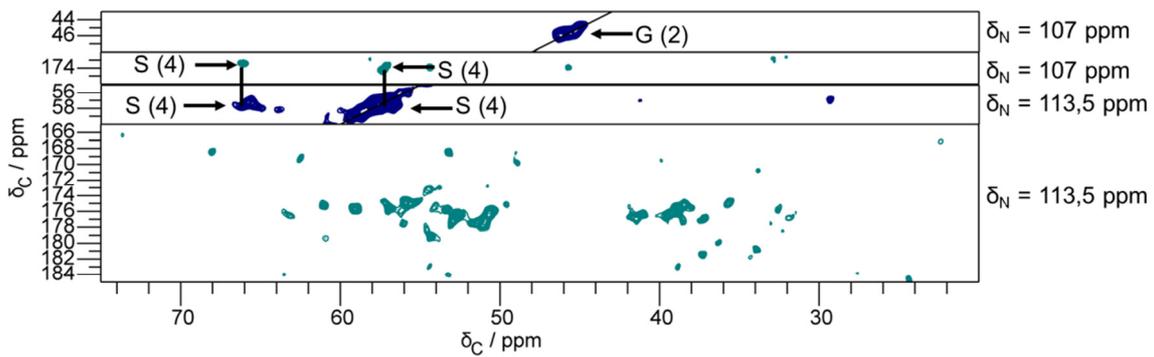


Abb. 54: „Sequential walk“ der S (4) G (2)-Korrelation über ^{15}N -Verschiebungen.

Die blauen Signale gehören zu einem 3D $\text{NC}\alpha\text{CX}$ -Spektrum (DARR-Mischzeit von 70 ms) und die grünen Signale zu einem 3D NCOCX -Spektrum (DARR-Mischzeit von 80 ms) der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe. Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. Für die Prozessierung wurde der FID durch „Forward-Backward Linear Prediction“ um die Hälfte der Originaldatenpunkte verlängert und dann mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,5 prozessiert. Dargestellt ist die 2D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Ebene der 3D Spektren bei der rechts neben den Spektren angegebenen ^{15}N -Verschiebung $\pm 0,5$ ppm. Die identifizierten Signale wurden mit den Aminosäuretyp-spezifischen Zuordnungen beschriftet.

Abb. 54 zeigt die Verknüpfung der Aminosäuren S (4) und G (2) in den CC-Ebenen der NCC-Spektren bei den N-Verschiebungen der jeweiligen Aminosäure.

Verknüpfung von S (4) mit vorhergehender Aminosäure nicht möglich

Aus der Sequenz ist bekannt, dass die vorhergehende Aminosäure von S (4) entweder Phenylalanin oder Glutaminsäure sein müsste (vgl. Abb. 53). Da die Aminosäure Phenylalanin revers isotopenmarkiert ist, wäre hier keine weitere sequentielle Verknüpfung möglich. Für die Aminosäure Glutaminsäure wurde keine eindeutige Zuordnung gefunden. Dies liegt zum einen daran, dass bei der N-Verschiebung von Serin (113,5 ppm) im NCOCX -Spektrum mehrere Signale auftreten, die möglicherweise chemischen Verschiebungen der Glutaminsäure entsprechen könnten (vgl. Abb. 54). Allerdings war aufgrund der spektralen Überlappungen in den PDS - und DQ/SQ -Spektren nur eine Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung von vier Spin-Systemen zu den Aminosäuren E bzw. Q möglich (Aufgrund der ähnlichen chemischen Verschiebungen für die Aminosäuren E und Q ist ohne sequentielle Zuordnung anhand der Spektren keine Differenzierung zwischen den beiden Aminosäuretypen möglich). Des Weiteren sind in den 3D Spektren aufgrund der Anzahl der Transfers nicht immer alle Korrelationen der Aminosäurekette sichtbar. Somit konnte die vorhergehende Aminosäure von S (4) nicht identifiziert werden.

Verknüpfung von G (2) mit nachfolgender Aminosäure nicht eindeutig

Für die sequentielle Verknüpfung in die andere Richtung der Peptidkette wurde die Zuordnung der nachfolgenden Aminosäure von G (2) angestrebt. Aus der Sequenz von NP7 war bekannt, dass dies entweder die Aminosäure Threonin oder Glycin sein müsste (vgl. Abb. 53). Zunächst wurden dazu die möglichen N-Verschiebungen von G (2) im NCOCX -Spektrum bestimmt. Diese sind in Abb. 55 gezeigt.

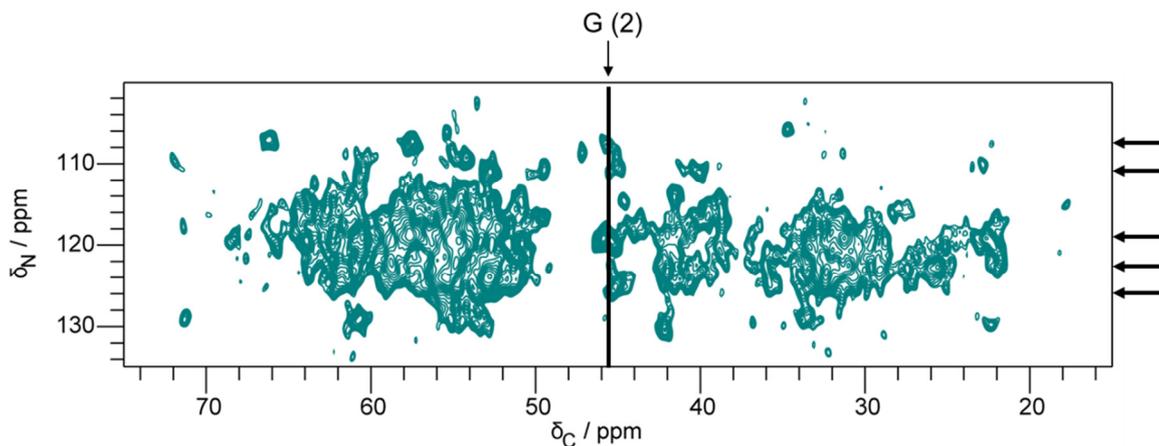


Abb. 55: Mehrere mögliche ^{15}N -Verschiebungen für G (2) verhindern die weitere sequentielle Resonanzzuordnung.

Die Pfeile am rechten Rand des Spektrums markieren die möglichen ^{15}N -Verschiebungen für G (2) im 2D NCOX-Spektrum der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe. Das Spektrum wurde mit einer PDSM-Mischzeit von 70 ms an einem 800 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-30\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Im NCOX-Spektrum sind fünf mögliche N-Verschiebungen für G (2) zu finden. Um die nachfolgende Aminosäure von G (2) zu identifizieren wurde die identifizierten N-Verschiebungen im $\text{NC}\alpha\text{CX}$ -Spektrum markiert (vgl. Abb. 56) und die Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten Glycine und Threonine auf passende N-Verschiebungen überprüft.

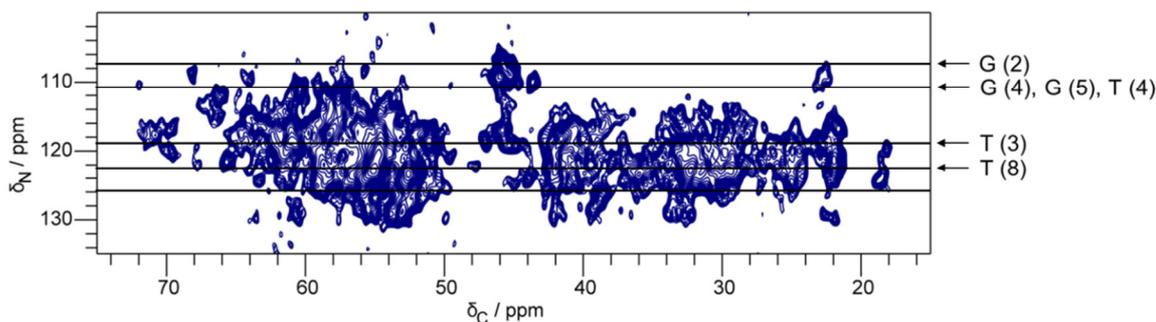


Abb. 56: Mögliche nachfolgende Aminosäuren von G (2).

Markierung der im NCOX-Spektrum gefundenen ^{15}N -Verschiebungen von G (2) im 2D $\text{NC}\alpha\text{CX}$ -Spektrum der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe (horizontale Linien). Rechts neben dem Spektrum sind die jeweiligen Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten Glycine und Threonine mit den dazu passenden ^{15}N -Verschiebungen angegeben. Das Spektrum wurden mit einer PDSM-Mischzeit von 50 ms an einem 800 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-30\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

Es wurden drei Glycine und drei Threonine als mögliche nachfolgende Aminosäuren von G (2) ausgemacht (vgl. Abb. 56).

Vorläufige sequentielle Resonanzzuordnung einiger Aminosäuren von NP7

Am Beispiel der S (4) G (2)-Korrelation werden die Schwierigkeiten der sequentiellen Zuordnung der Aminosäuren in den NP7 Proben deutlich. Aufgrund der Länge des Proteins von 186 Aminosäuren ist die sequentielle Resonanzzuordnung sehr schwierig, da viele Aminosäurepaare in dem Protein nicht einzigartig sind. Somit können anhand von

PDSD-Spektren mit langen Mischzeiten keine eindeutigen sequentiellen Zuordnungen unternommen werden. In den 2D NCC-Spektren ist aufgrund der hohen spektralen Überlappung häufig nur eine Identifizierung von Aminosäuren mit besonders hohen oder niedrigen N- bzw. C-Verschiebungen möglich (vgl. Abb. 55 und Abb. 56). Ein anderer Aspekt ist, dass die sequentielle Zuordnung immer wieder durch die revers isotopenmarkierte Aminosäuren in der Aminosäuresequenz unterbrochen wird (vgl. Abb. 53). In den NCOCX-Spektren sind Resonanzen unter Umständen nicht sichtbar, wenn die nachfolgende Aminosäure revers isotopenmarkiert ist.

Durch das geringe Signal-zu-Rausch Verhältnis und die Linienbreite in den 3D NCC-Spektren war die Zuordnung in den Spektren nicht immer eindeutig möglich. Aus diesem Grund konnte meistens nur eine vorläufige sequentielle Zuordnung der chemischen Verschiebungen zu den Aminosäuren stattfinden. In Tab. 24 sind die vorläufigen sequentiellen Zuordnungen der Aminosäuren von NP7 aufgelistet. Zudem wird angegeben in den Spektren welcher NP7 Proben die Verknüpfung gefunden wurde. Die Benennung der Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten Resonanzen erfolgte mit dem Ein-Buchstaben-Code der jeweiligen Aminosäure und einer in Klammern gefassten zufälligen Zahl. Die chemischen Verschiebungen der jeweiligen Aminosäurereste finden sich in Tab. 27 wieder.

Tab. 24: Vorläufige sequentielle Zuordnungen der Aminosäuren von NP7 in den Spektren der verschiedenen NP7 Proben.

	Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung	Sequenzielle Zuordnung	VLFY	KV	Lipo
SG	S (4)	22 oder 50	✓	✓	✓
	G (2)	23 oder 51			
GP oder PG	G (1, 2, 3, 7 oder 9)	3 oder 75			✓
	P (1 oder 2)	2 oder 76			
NT	N (2)	71 oder 89	✓		✓
	T (3, 4, oder 7)	72 oder 90			
SG	S (3)	22 oder 50			✓
	G (10)	23 oder 51			
TG oder GT	T (3 oder 4)	24, 53, 72 oder 74	✓		✓
	G (1, 2, 3, 7, 8 oder 9)	23, 52, 73 oder 75			
TA	T (3)	85		✓	✓
	A (8)	86			

4.2.4.5 Zusammenfassung der Resonanzzuordnung

Insgesamt konnte in den Spektren der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe 76 der 139 ^{13}C , ^{15}N -markierten Aminosäuren Aminosäuretyp-spezifisch zugeordnet werden. Dies entspricht 55 % der isotopenmarkierten Aminosäuren.

In den Spektren der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7 Probe konnten 72 der 139 ^{13}C , ^{15}N -markierten Aminosäuren Aminosäuretyp-spezifisch zugeordnet werden. Dies entspricht 52 % der isotopenmarkierten Aminosäuren.

In den Spektren der U[^{13}C , ^{15}N (K,V)] NP7 Probe konnten 58 der 146 ^{13}C , ^{15}N -markierten Aminosäuren Aminosäuretyp-spezifisch zugeordnet werden. Dies entspricht 40 %. Allerdings wurden in den Spektren dieser Probe keine Zuordnungsversuche für die in den

anderen Proben revers markierten Aminosäuren Leucin, Phenylalanin und Tyrosin unternommen, da ein Vergleich mit den anderen Proben angestrebt wurde.

Tab. 25 zeigt einen Gesamtüberblick über die Anzahl der erfolgten Resonanzzuordnungen anhand der vorhandenen NP7 Spektren in allen drei untersuchten Proben.

Tab. 25: Übersicht der Aminosäuretyp-spezifischen und vorläufigen sequentiellen Zuordnungen der chemischen Verschiebungen des Proteins NP7 in dieser Arbeit.
Zuordnungen aus Spektren aller drei untersuchten NP7-Proben.

Aminosäure	Anzahl	Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung	Vorläufige sequentielle Zuordnung
A	12	12	1
R	2	2	0
N/D	11/13	7	1
C	4	1	0
Q/E	4/10	4	0
G	10	10	4
H	3	2	0
I	7	7	0
L	15		
K	27	6	0
M	2	1	0
F	10		
P	7	4	1
S	13	11	2
T	12	10	3
W	2	2	0
Y	9		
V	13		

4.2.5 Vergleich der NMR-Daten mit der publizierten NP7 Kristallstruktur

Die Festkörper-NMR-Spektren der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7-Probe wurden mit einer publizierten Kristallstruktur von NP7 verglichen, um die strukturelle Übereinstimmung zu überprüfen. Die Kristallstruktur von NP7 wurde mit gebundenem Nitroxid Liganden bei pH 7,8 aufgenommen (PDB: 4XME).⁵⁰

Große strukturelle Übereinstimmung der NP7 Kristallstruktur mit der Struktur in den NMR-Proben, aber einzelne strukturelle Unterschiede sichtbar

Zum Vergleich der Kristallstruktur mit den NMR Daten von NP7 wurden die chemischen Verschiebungen mit Hilfe des Programms shiftX2 anhand der PDB-Daten der Kristallstruktur vorhergesagt. Diese wurden in Abb. 57 mit einem 2D PDSD-Spektrum der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7 Probe überlagert.

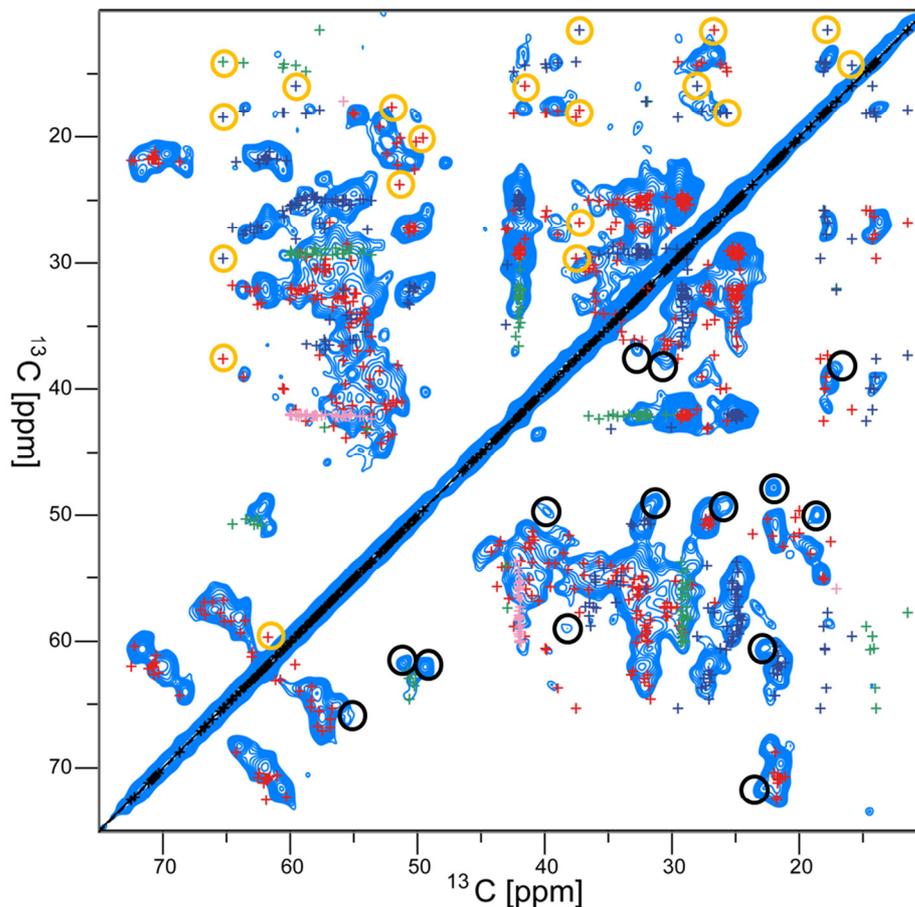


Abb. 57: Vergleich eines 2D PDSM-Spektrums der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7 Probe mit den shiftX2 chemischen Verschiebungsvorhersagen einer NP7 Kristallstruktur.

Das Spektrum (blau) mit einer PDSM Mischzeit von 30 ms wurde an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben­temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 100 Hz, Linienverbreiterung: 200 Hz, Gaußmaximum: 0.1) prozessiert. Die chemischen Verschiebungsvorhersagen (farbige Kreuze) wurden anhand der PDB-Koordinaten einer NP7 Kristallstruktur (PDB: 4XME) mit dem Programm ShiftX2 bestimmt. Die Farbe der Kreuze gibt die den Bindungsabstand der Kerne voneinander an (rot = 1 Bindung, blau = 2 Bindungen, grün = 3 Bindungen, rosa = 4 Bindungen). ShiftX2 Vorhersagen die nicht mit dem Spektrum überlappen wurden mit gelben Kreisen markiert und Signale die nicht mit ShiftX2 Vorhersagen überlappen mit schwarzen Kreisen.

Viele chemische Verschiebungsvorhersagen der NP7 Kristallstruktur (PDB: 4XME) überlagern mit den Signalen des PDSM-Spektrums. Einige Signale der Aminosäuren A, D/N, E, P, S, T und I im Spektrum unterscheiden sich jedoch von den chemischen Verschiebungsvorhersagen für die NP7 Kristallstruktur. Da die sequentielle Zuordnung der Aminosäuren jedoch durch die Überlagerung der Signale in den Spektren nur partiell möglich war, können die Positionen dieser Aminosäuren im Protein nicht angegeben werden. Die chemischen Verschiebungsvorhersagen für die Aminosäuren I₁₀, A₃₇, A₄₆, A₅₇, A₁₁₉, I₁₂₃, I₁₅₁ und S₁₅₉ überlagern nicht mit Signalen des Spektrums. Die Positionen der Signale in der NP7 Kristallstruktur sind in Abb. 58 dargestellt.

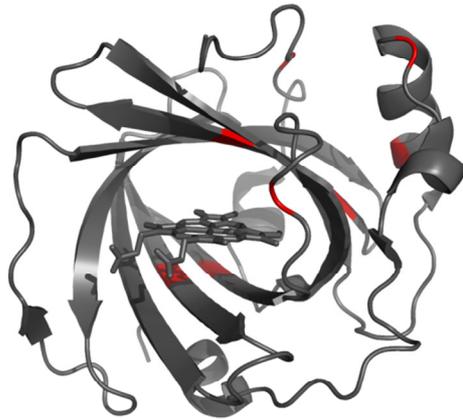


Abb. 58: Abweichungen der chemischen Verschiebungsvorhersagen der NP7 Kristallstruktur von dem PDS-D-Spektrum der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7 Probe.

Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der NP7 Kristallstruktur (PDB: 4XME) (grau). Die Positionen der abweichenden Aminosäuren I₁₀, A₃₇, A₄₆, A₅₇, A₁₁₉, I₁₂₃, I₁₅₁ und S₁₅₉ wurden rot markiert.

Die Positionen der Aminosäuren, deren chemische Verschiebungsvorhersagen nicht mit den Signalen im Spektrum übereinstimmen, sind über das Protein verteilt.

Sekundärstrukturvorhersage einzelner Aminosäuren von NP7 weicht von Kristallstruktur ab

Eine andere Möglichkeit des Vergleichs der Kristallstruktur mit den NMR Daten von NP7 bietet der Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage der in den NMR-Spektren zugeordneten Aminosäuren mit der Sekundärstruktur der Kristallstruktur. In Abb. 59 sind die Sekundärstrukturvorhersagen der in den NMR-Spektren zugeordneten Aminosäuren der verschiedenen NP7 Proben dargestellt. Die sekundäre chemische Verschiebung gibt die Abweichung der experimentell ermittelten C α - und C β -Werte von den „random coil“ chemischen Verschiebungen an.

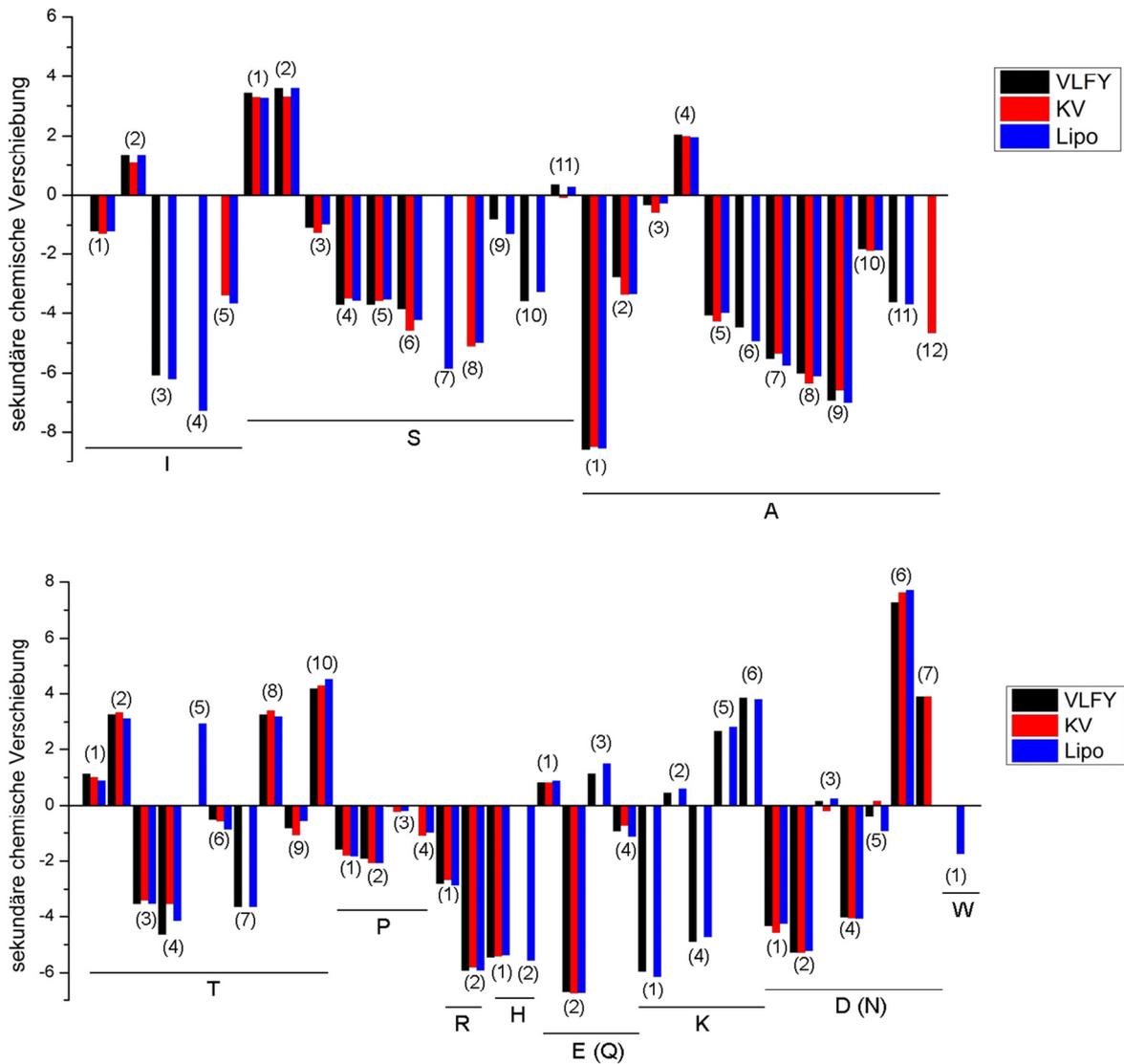


Abb. 59: Sekundäre chemische Verschiebung der Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten chemischen Verschiebungen der $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7 (VLFY), $U[^{13}C, ^{15}N(K,V)]$ NP7 (KV) und $U[^{13}C, ^{15}N(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen (Lipo) Proben.

Als „random coil“ Werte wurden die durchschnittlichen chemischen Verschiebungen aus der BMRB verwendet. Für die als E/Q zugeordneten Aminosäuren wurde die E Referenzwerte und für die als D/N zugeordneten Aminosäuren die D Referenzwerte, da die Differenzierung keine Änderung der Sekundärstrukturvorhersage zur Folge hatte.

Die Werte der sekundären chemischen Verschiebungen der Aminosäuren wurden zur Vorhersage von α -helikalen und β -faltblattartigen Sekundärstrukturelementen verwendet. Aminosäuren mit sekundären chemischen Verschiebungen größer als +1,4 als α -helikale und solche mit sekundären chemischen Verschiebungen kleiner als -1,4 als β -faltblattartige Sekundärstrukturelemente interpretiert. Dazwischenliegende Werte wurden als ungeordnete Bereiche gewertet. Diese Vorhersagen wurden dann mit der Sekundärstruktur der NP7 Kristallstruktur verglichen, um die strukturelle Übereinstimmung zu analysieren.

Tab. 26: Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage anhand der sekundären chemischen Verschiebung aus den Festkörper-NMR-Spektren und der Sekundärstruktur der NP7 Kristallstruktur (PDB: 4XME).

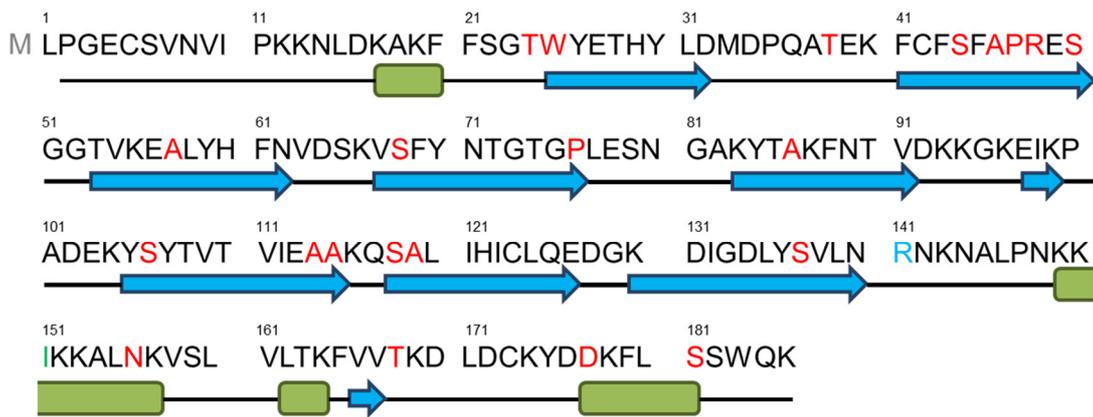
Da anhand der Festkörper-NMR-Spektren keine vollständige Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung aller Aminosäuren des NP7s möglich war, ist die Anzahl der vorhergesagten Sekundärstrukturelemente basierend auf den sekundären chemischen Verschiebungen im Allgemeinen geringer, als in der Kristallstruktur. Höhere Vorhersagen eines Aminosäuretyps in einem Sekundärstrukturelement, als in der Sekundärstruktur der Kristallstruktur vorkommend, wurden rot markiert.

Aminosäure	Anzahl	α -helikal		β -Faltblatt		ungeordnet	
		PDB	NMR	PDB	NMR	PDB	NMR
I	7	1	0	5	3	1	2
S	13	1	2	6	6	6	3
A	12	2	1	6	9	4	1
T	12	1	4	8	3	3	3
P	7	0	0	2	2	5	2
R	2	0	0	1	2	1	0
H	3	0	0	3	2	0	0
E (Q)	14	0	0	7	1	7	3
K	27	9	2	5	2	13	1
D (N)	24	2	2	7	3	15	2
W	2	0	0	1	1	1	0

Die Gegenüberstellung der Sekundärstrukturvorhersage anhand der NMR Daten mit der Sekundärstruktur der Kristallstruktur zeigt, dass mindestens 1 Isoleucin, 1 Serin, 3 Alanine, 3 Threonine und 1 Arginin aufgrund der NMR-Strukturvorhersage die Tendenz aufweisen in der NMR-Probe in einer anderen Sekundärstruktur vorzuliegen. Diese könnten somit in einer Region liegen, in der die NMR-Struktur von der Kristallstruktur abweicht. Da Sekundärstrukturen jedoch erst ab drei Aminosäuren mit derselben Sekundärstrukturvorhersage in Folge ausgebildet werden, kann aufgrund der fehlenden sequenziellen Zuordnung keine exakte Aussage getroffen werden.

NP7 ist vermutlich größtenteils in NMR-Spektren sichtbar

Durch den Vergleich der Sekundärstrukturvorhersagen der Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten Aminosäuren aus den NMR-Spektren mit der Sekundärstruktur der NP7-Kristallstruktur konnten einige Aminosäuren bestimmten Positionen in der NP7-Sequenz zugeordnet werden. Diese Aminosäuren sind in Abb. 60 in der Proteinsequenz von NP7 gekennzeichnet, in der die Sekundärstrukturelemente der Kristallstruktur eingetragen sind.



Identifizierung in den NMR-Spektren: **identifiziert**, nicht identifiziert
 Veränderte Sekundärstruktur in den NMR-Spektren: **β-Faltblatt**

Abb. 60: Zuweisung einiger in den NMR-Spektren Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten Aminosäuren zu bestimmten Positionen in der NP7-Sequenz.

Zuordnung einzelner Aminosäuren zu bestimmten Positionen in der NP7-Sequenz durch Rückschlüsse aus dem Vergleich der Sekundärstrukturvorhersagen der Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten Aminosäuren aus den NMR-Spektren mit der Sekundärstruktur der NP7-Kristallstruktur. Farbige Darstellung der identifizierten und nicht identifizierten Aminosäuren durch den Sekundärstrukturvergleich, sowie veränderter Sekundärstrukturen in der Sequenz von NP7. Darstellung der Sekundärstrukturelemente der NP7-Kristallstruktur (PDB (4XME) in der NP7-Sequenz (β-Faltblatt: blaue Pfeile, α-Helix: grüne Ovale).

Die Zuweisung einiger in den NMR-Spektren Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten Aminosäuren zu bestimmten Positionen in der NP7-Sequenz ermöglicht eine Aussage über die vermutliche Sichtbarkeit einzelner Strukturelemente des Proteins in den NMR-Spektren. Die Verteilung der identifizierten Aminosäuren über die gesamte NP7-Sequenz zeigt, dass tendenziell das gesamte Protein sichtbar sein sollte. Es konnte kein α-helikales Isoleucin in den NMR-Spektren identifiziert werden. Das einzige α-helikale Isoleucin in der Kristallstruktur ist das I₁₅₁ in der Helix-α1, der möglichen Membraninteraktionsstelle. Dies könnte auf eine erhöhte Flexibilität der Aminosäure hinweisen oder auf die Ausbildung einer veränderten Sekundärstruktur in diesem Bereich. Das α-helikale Asparagin N₁₅₆, das sich ebenfalls in der Helix-α1 befindet, konnte dagegen identifiziert werden. Dies spricht gegen die Ausbildung einer veränderten Sekundärstruktur im Bereich der Helix-α1. Für das R₁₄₁, das sich in der Kristallstruktur in einer ungeordneten Sekundärstruktur befindet, wurde aufgrund der chemischen Verschiebung in den NMR-Spektren eine β-faltblattartige Sekundärstrukturvorhersage vorhergesagt. Dies würde keine große strukturelle Änderung der Proteinstruktur bedeuten, da das bestehende β-Faltblatt lediglich um eine Aminosäure verlängert wäre.

A₁₅₄ und N₁₅₆ der Helix-α1 konnten in NMR-Spektren identifiziert werden, I₁₅₁ dagegen nicht

Zur Identifizierung der Aminosäuren der Helix-α1 in den NMR-Spektren der U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7 Probe, die in der Literatur als mutmaßliche Membranbindestelle ausgemacht wurde, wurden die chemischen Verschiebungsvorhersagen der Kristallstruktur von dieser Helix mit den NMR-Spektren

verglichen. Dies ist exemplarisch in der Überlagerung mit dem PDS-D-Spektrum der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe dargestellt (siehe Abb. 61).

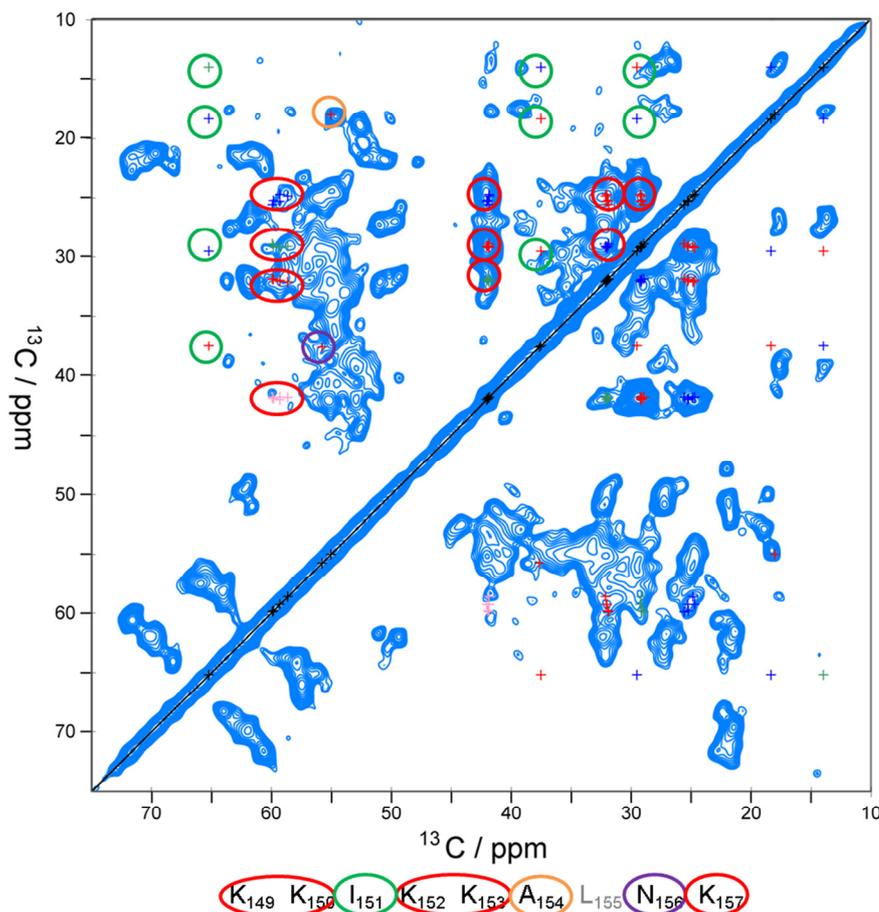


Abb. 61: Vergleich eines 2D PDS-D-Spektrums der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe mit den shiftX2 chemischen Verschiebungsvorhersagen der Helix- $\alpha 1$ einer NP7 Kristallstruktur.

Zuordnung der ShiftX2 Vorhersagen zu den Aminosäuren der Helix- $\alpha 1$ von NP7 durch Umrandung in verschiedenen Farben. Das Spektrum (blau) mit einer PDS-D Mischzeit von 30 ms wurde an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 100 Hz, Linienverbreiterung: 200 Hz, Gaußmaximum: 0.1) prozessiert. Die chemischen Verschiebungsvorhersagen (farbige Kreuze) wurden anhand der PDB-Koordinaten einer NP7 Kristallstruktur (PDB: 4XME) mit dem Programm ShiftX2 bestimmt. Die Farbe der Kreuze gibt die den Bindungsabstand der Kerne voneinander an (rot = 1 Bindung, blau = 2 Bindungen, grün = 3 Bindungen, rosa = 4 Bindungen).

Wie zuvor bereits diskutiert, konnte das α -helikale I_{151} in den NMR-Spektren nicht identifiziert werden. Dies ist auch in der Überlagerung der chemischen Verschiebungsvorhersagen mit den Signalen der NMR-Spektren zu erkennen. K_{149} , K_{150} , K_{152} , K_{153} und K_{157} können aufgrund der geringen spektralen Aufspaltung keine Aminosäuretyp-spezifischen Zuordnungen in den NMR-Spektren zugewiesen werden. Die chemischen Verschiebungsvorhersagen von A_{154} überlagern sich mit den Signalen, die Aminosäuretyp-spezifisch A (4) zugeordnet wurden. Diejenigen von N_{156} entsprechen den Signalen, die Aminosäuretyp-spezifisch D/N (7) zugeordnet wurden. Diese Zuweisungen erleichterten, ungeachtet der unvollständigen sequentiellen Resonanzzuordnung, die

Identifizierung der strukturellen Einflüsse der Membranbindung von NP7 auf die Helix- α 1 in Kapitel 4.2.6.2.

4.2.6 Einfluss der Liposomenbindung auf die NP7 Struktur

Um den Einfluss der Bindung von NP7 an Liposomen auf die Struktur des Proteins zu untersuchen, wurden Festkörper-NMR-Spektren der Probe des freien präzipitierten NP7s und der an Liposomen gebundenen NP7 Probe miteinander verglichen.

4.2.6.1 Liposomenbindung hat keinen Einfluss auf Gesamtfaltung

Abb. 62 zeigt der Vergleich der 2D PDSB-Spektren mit einer Mischzeit von 15 ms der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 und der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.

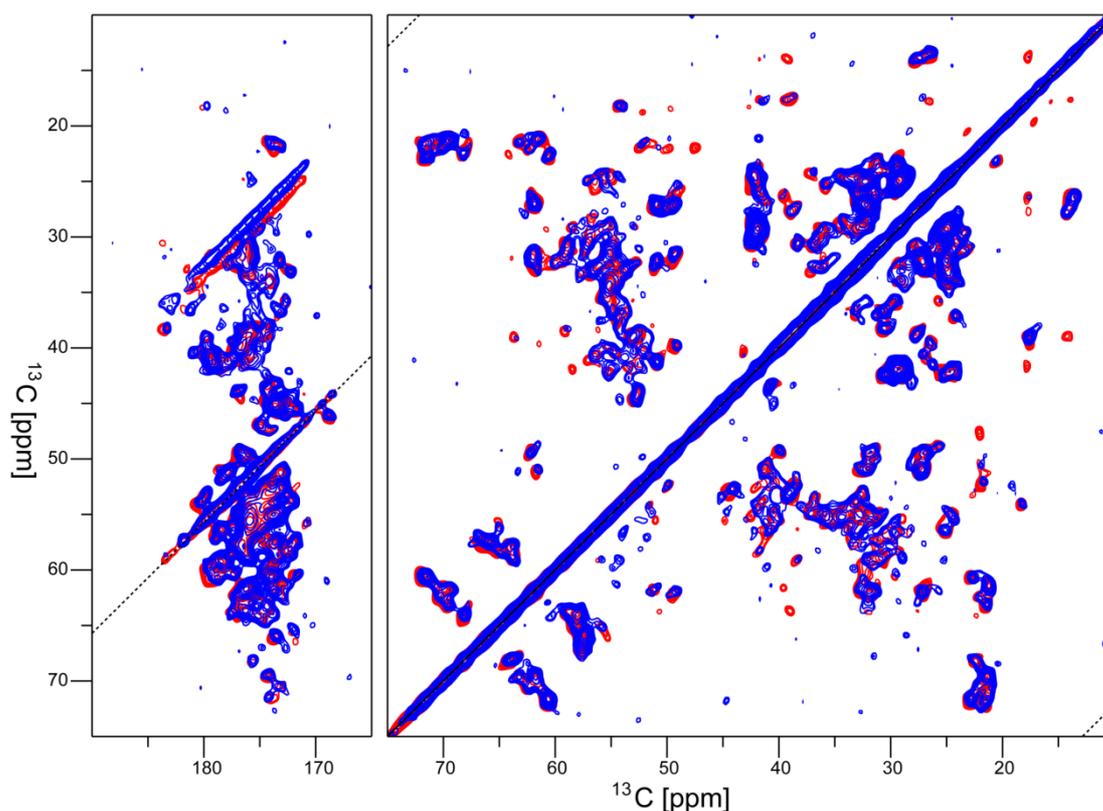


Abb. 62: Vergleich der 2D PDSB-Spektren mit einer Mischzeit von 15 ms von der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (blau) und der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe (rot).

Die Spektren wurden an einem 800 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 12,5 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 150 Hz, Linienverbreiterung: 260 Hz, Gaußmaximum: 0,1) prozessiert.

Der Vergleich der beiden Spektren zeigt, dass die meisten Signale übereinstimmen und somit eine identische chemische Verschiebung aufweisen. Einige Signale, die in einem der Spektren nicht sichtbar sind, werden bei längeren Mischzeiten sichtbar. Dies deutet darauf hin, dass die Membranbindung von NP7 keinen großen Einfluss auf die globale Struktur des Proteins hat.

4.2.6.2 Änderung chemischer Verschiebungen infolge Liposomenbindung

Um geringfügige strukturelle Änderungen durch die Membranbindung zu erkennen, wurden die chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren des an Liposomen gebundenen NP7 in Tab. 27 mit denen des freien, präzipitierten NP7 verglichen. Hierzu erfolgte die Zuordnung der Signale in den Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(V,L,F,Y)]$ NP7 Probe, der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(K,V)]$ NP7 Probe und der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen Probe. Tab. 27 zeigt die Aminosäuretyp-spezifischen Zuordnungen der chemischen Verschiebungen der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen Probe und Abweichungen zu den Proben des freien präzipitierten NP7. Abweichungen wurden als solche markiert, wenn die durchschnittliche chemische Verschiebung für ^{13}C -Kerne um 0,5 ppm und für ^{15}N -Kerne um 1,0 ppm zwischen den verschiedenen Proben verschieden war.

Tab. 27: Zuordnung der Aminosäuren in der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(V,L,F,Y)]$ NP7+Liposomen mit Abweichungen ($> 0,5$ ppm für ^{13}C bzw. > 1 ppm für ^{15}N) von den beiden NP7 Proben ohne Liposomen. Abweichungen von den Zuordnungen des $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(V,L,F,Y)]$ NP7 sind gelb unterlegt, solche von dem $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(K,V)]$ NP7 blau und solche mit Abweichungen von beiden Proben grün.

Aminosäuren	N (i+1)	N	CO	C α	C β	C γ	C γ_2	C δ	C δ_2	C ϵ	C ζ	N ϵ	NH $_1$ /NH $_2$
7/7 I													
I (1)				61,4	39,5	26,4	17,7	13,7					
I (2)	115,1	130,1		63,6	39,1	27,7	17,6	14,0					
I (3)				58,5	41,5	26,5	17,8	13,8					
I (4)				58,3	42,5		18,3	13,9					
I (5)				57,7	38,2	27,1	16,6	11,7					
I (6)					43,0	26,0	18,5	15,1					
I (7)													
11/13 S													
S (1)		112,7		58,8	60,5								
S (2)				61,0	62,5								
S (3)		116,3	176,3	57,9	63,9								
S (4)		112,0	173,7	57,5	66,1								
S (5)		114,3		57,6	66,1								
S (6)				55,8	65,1								
S (7)				55,2	66,1								
S (8)				58,1	68,1								
S (9)		117,6		58,2	64,6								
S (10)		120,9		57,3	65,6								
S (11)				59,0	63,7								
12/12 A													
A (1)		122,0		47,7	22,0								
A (2)		120,4		49,6	18,7								
A (3)		122,7		52,8	18,8								
A (4)	113,8	120,5	179,6	54,4	18,2								
A (5)		121,8		52,0	21,8								
A (6)		116,5		51,3	22,1								
A (7)		119,8		50,4	22,0								
A (8)	116,9	129,3	175,8	50,0	21,9								
A (9)				51,0	23,8								
A (10)				53,2	20,8								
A (11)				53,2	22,7								
A (12)													

4 Ergebnisse und Diskussion

Aminosäuren	N (i+1)	N	CO	C α	C β	C γ	C γ_2	C δ	C δ_2	C ϵ	C ζ	N ϵ	NH ₁ / NH ₂
10/12 T													
T (1)		116,4		63,1	69,7		21,3						
T (2)	119,5	108,8	175,2	64,0	68,3		22,4						
T (3)	129,0	118,9	172,2	60,6	71,6		22,8						
T (4)		110,6		60,4	72,0		22,9						
T (5)				63,3	67,8		21,4						
T (6)	116,3	120,4		61,5	69,8		21,3						
T (7)		116,4		60,6	71,7		21,5						
T (8)		121,8		63,8	68,0		22,5						
T (9)		117,9		62,4	70,4		22,2						
T (10)				65,5	68,4		22,3						
4/7 P													
P (1)				61,9	32,2	27,0		49,5					
P (2)		134,9	175,4	61,8	32,4	27,1		51,0					
P (3)				63,7	32,4	27,2		50,9					
P (4)				61,9	31,4	25,7		49,1					
2/2 R													
R (1)				55,1	31,8	24,3		42,0			156,4	81,5	69,5
R (2)				52,7	32,5	28,6		42,1			158,0	85,4	71,2
2/3 H													
H (1)				55,3	34,4	137,7			118,2	137,1		164,8	
H (2)				55,4	34,7				119,4	138,6		165,5	
4/14 E/Q													
E/Q (1)		125,1		59,0	30,7	38,4			183,4				
E/Q (2)		114,6		53,7	33,0	36,8			181,2				
E/Q (3)				58,3	29,4	36,0			183,5				
E/Q (4)				57,0	30,7	36,7			183,2				
10/10 G													
G (1)		103,0		45,4									
G (2)		107,9		45,6									
G (3)		108,4		45,2									
G (4)	117,8	110,4		43,7									
G (5)		110,2		46,3									
G (6)													
G (7)		113,5		45,7									
G (8)		113,3		45,1									
G (9)		116,8		45,9									
G (10)	108,6	118,0	174,6	47,1									
6/27 K													
K (1)				55,1	37,0	24,4		30,6		42,2			
K (2)		118,4		57,1	32,3	25,0		29,2		41,9			
K (3)		118,4		54,8		24,8		29,2		42,1			
K (4)				55,2	35,7	25,6		29,5		42,1			
K (5)		120,5		59,3	32,2	25,0		29,3		42,1			
K (6)				60,4	32,4	25,6		29,7		41,1			
7/24 D/N													
D/N (1)		121,0		49,4	39,8	176,7							
D/N (2)		119,3		52,8	44,2	176,9							
D/N (3)				53,1	39,1	179,9							
D/N (4)		118,0		51,1	41,3	179,1							
D/N (5)		127,9		51,8	38,9								
D/N (6)		117,1		57,6	36,0								
D/N (7)			178,6	56,0	38,3								
2/2 W													
W (1)				59,8	33,7	109,2							
W (2)					35,4	108,3							
1/4 C													
C (1)		124,0		55,1	45,5								
1/2 M													
M (1)						32,8				18,3			

Wie aus Tab. 27 ersichtlich, treten keine signifikanten Abweichungen in der chemischen Verschiebung der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen zu den beiden Proben des freien präzipitierten NP7 gleichzeitig auf (grün unterlegte Kästchen).

Abweichungen in den ^{15}N chemischen Verschiebungen der NMR-Proben lassen sich hauptsächlich auf geringe Auflösung in der N-Dimension zurückführen

Die gefundenen Abweichungen zu einer der beiden Proben des freien präzipitierten NP7s lassen sich häufig in den Stickstoff-Verschiebungen finden, da die Auflösung der N-Dimension in den gemessenen Spektren häufig nicht so hoch war. Dies ist in Abb. 63 beispielhaft in der Überlagerung der 3D NC α CX-Spektren von U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7 und U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen für die Aminosäure Threonin mit der Aminosäuretyp-spezifischen Zuordnung T (3) gezeigt.

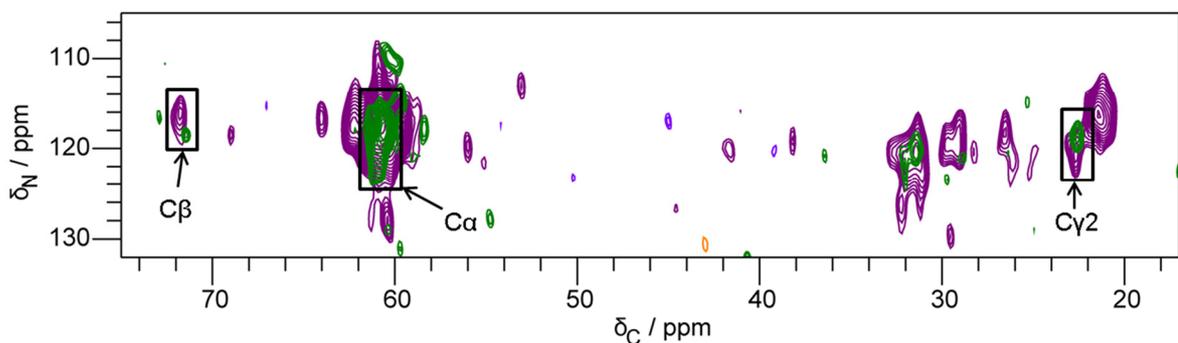


Abb. 63: Zuordnung der Aminosäure T (3) im 3D NC α CX-Spektrum der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7 (grün) und der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen (lila) Probe.

Dargestellt ist die Ebene der 3D NC α CX-Spektren bei ^{13}C von $60,65 \pm 0,15$ ppm. Die Spektren wurden an einem 800 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben temperatur von -30 °C (grün) oder an einem 600 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben temperatur von -20 °C (lila) und einer Rotationsfrequenz von 11 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,5 prozessiert.

Da die Abweichungen der Stickstoffverschiebungen zwischen den Proben höchstens bei 2 ppm liegen, lassen sie sich aufgrund der ^{15}N -Linienbreite von 1,4 – 2,9 ppm in den 2D NCC-Spektren und 1,9 - 4,4 ppm in den 3D NCC-Spektren nicht zwangsläufig auf konformationelle Unterschiede in den verschiedenen Proben zurückführen.

Hauptsignale der Arginin C ζ -Kerne werden durch Liposomenbindung nicht beeinflusst

Die Abweichungen der C ζ -Werte der beiden Arginine kommen durch die temperaturabhängige Veränderung der Arginin C ζ -Signale im Temperaturbereich von -20 bis -30 °C zustande, in dem die Spektren für die Resonanzzuordnung aufgenommen wurden (siehe Kapitel 4.2.4.1). Der Vergleich der Spektren der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7 und der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Proben bei -30 °C zeigt keine signifikanten Unterschiede, die aufgrund der Liposomenbindung zustandekommen. Die Abweichung der Hauptsignale der beiden Arginine liegt in den Spektren bei ca. 0,2 ppm und ist somit geringer als die Linienbreite der Signale. Dies ist in Abb. 64 exemplarisch im Vergleich der 2D NCOCX-Spektren der beiden Proben bei einer nominalen Proben temperatur von -30 °C dargestellt.

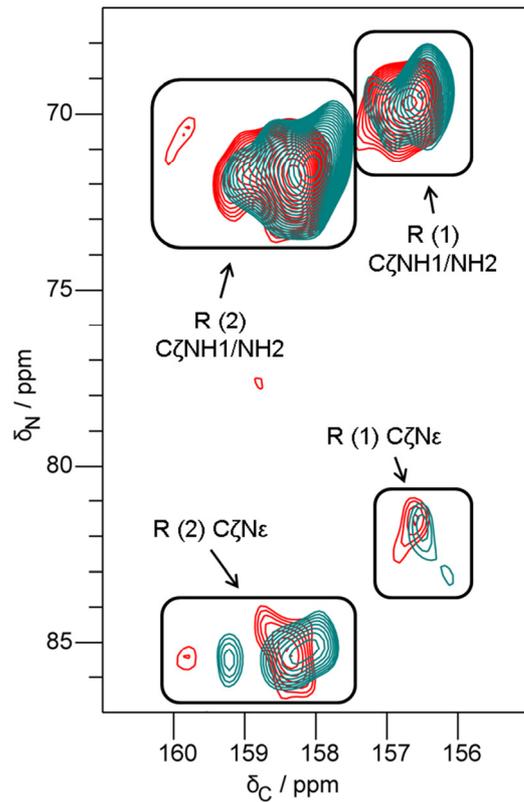


Abb. 64: Arginin C ζ -Konformationen in den Spektren der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7 (rot) und der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe (grün).

Die 2D NCOCA-Spektren wurden an einem 800 MHz Spektrometer bei einer nominalen Proben­temperatur von $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,4 prozessiert.

T₁₆₃ möglicherweise durch Liposomenbindung strukturell beeinflusst

Des Weiteren wurden Unterschiede in der chemischen Verschiebung des Threonins mit der Aminosäuretyp-spezifischen Zuordnung T (5) zu der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7 Probe gefunden. Diese sind in der Überlagerung der 2D ^{13}C / ^{13}C -Korrelationspektren der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7 und der U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe in Abb. 65 zu erkennen.

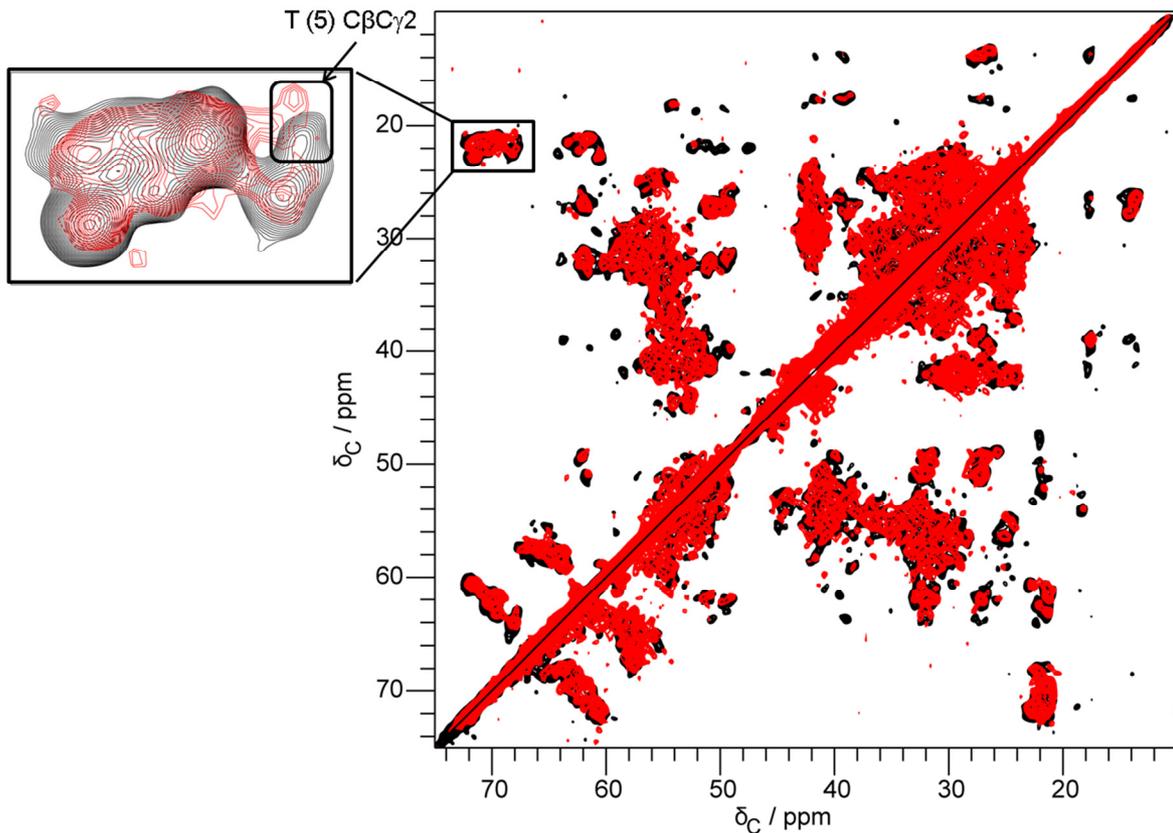


Abb. 65: Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Aminosäure T (5) in den 2D PDS-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (rot) und $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe (schwarz).

Die Spektren wurden mit einer Mischzeit von 15 ms an einem 800 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 12,5 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen und mit einer Kombination aus einer inversen Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Linienverschmälerung: 75 Hz, Linienverbreiterung: 150 Hz, Gaußmaximum: 0,1) prozessiert.

Bei T (5) handelt es sich um ein α -helikales Threonin. In der Kristallstruktur von NP7 gibt es nur ein α -helikales Threonin, das T_{163} . Allerdings wurden in den NMR-Spektren vier α -helikale Threonine identifiziert. Möglicherweise wurden in der NP7-Struktur in den NMR-Proben mehr α -Helices ausgebildet als in den Proben, die für die Kristallisation verwendet wurden. Die Lage des T_{163} in der Kristallstruktur ist in Abb. 66 dargestellt.

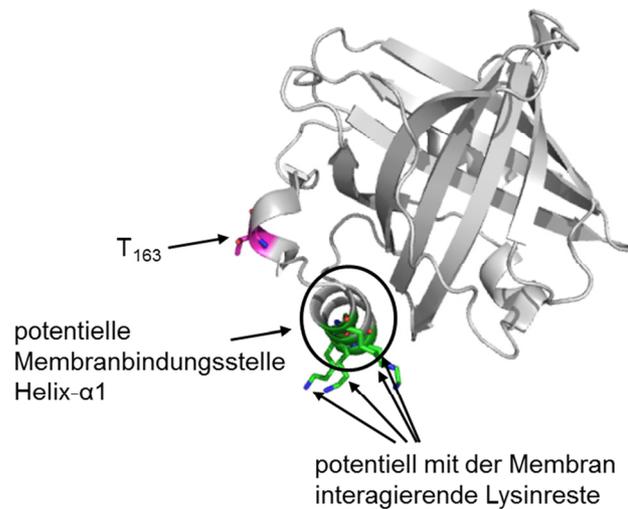


Abb. 66: Position der Aminosäure T₁₆₃ in der Kristallstruktur von NP7.

Darstellung von T₁₆₃ (pink) in der Kristallstruktur von NP7 und Einordnung in den Kontext der Membranbindung von NP7 durch Kennzeichnung der Helix- α 1 und der in ihr befindlichen Lysine (grün).

T₁₆₃ befindet sich an der Oberfläche des Proteins in direkter Nähe zur Helix- α 1 und den potentiell mit der Membran interagierenden Lysinen (vgl. Kapitel 4.2.3.1). Somit würde eine strukturelle Änderung dieses Threonins infolge der Membranbindung, gut zu dem Modell der Membraninteraktion der die Helix- α 1 und der dargestellten Lysine passen.

Chemische Verschiebungen der identifizierten Lysine und der identifizierten Aminosäuren der Helix- α 1 nicht durch Liposomenbindung beeinflusst

In den 6 zugeordneten Lysinseitenketten konnten keine Unterschiede zwischen den Spektren des an Liposomen gebundenen NP7s zu dem freien präzipitierten NP7 festgestellt werden.

Die Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten Aminosäuren A (4) und D/N (7), die basierend auf dem Vergleich der NMR-Spektren mit den chemischen Verschiebungsvorhersagen der Kristallstruktur in Kapitel 4.2.5 als A₁₅₄ und N₁₅₆ der Helix- α 1 identifiziert wurden, weisen ebenfalls keine Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen den Proben auf.

4.2.6.3 Änderung der Signalintensität infolge Liposomenbindung

Um weitere Hinweise auf den strukturellen Einfluss der NP7-Liposomenbindung zu erhalten, wurde zusätzlich noch die Intensität der NP7 Signale in den Spektren der verschiedenen Proben miteinander verglichen.

Signale von S (7) und A (11) in Liposomen-gebundenem NP7 stärker ausgeprägt

Die Signale einiger Aminosäuren sind in den Spektren der verschiedenen Proben unterschiedlich stark ausgeprägt oder gar nicht zu sehen. Die Signale des Serins mit der Aminosäuretyp-spezifischen Zuordnung S (7) und des Alanins mit der Aminosäuretyp-spezifischen Zuordnung A (11) sind in den CC-Korrelationsspektren der U[¹³C, ¹⁵N(V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe wesentlich stärker ausgeprägt als in den

Proben des freien präzipitierten NP7s. Diese nehmen in der an Liposomen gebundenen Probe möglicherweise starrere Konformationen ein. Die chemischen Verschiebungen der beiden Aminosäuren weisen auf eine β -faltblattartige Sekundärstruktur hin. In der Kristallstruktur gibt es jeweils 6 Serinreste und 6 Alaninreste in β -Faltblattstrukturen, daher lassen sie sich keiner Position in NP7 eindeutig zuordnen. Die Signale der Aminosäure D/N (6) sind dagegen in den CC-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{K},\text{V})]$ NP7 Probe wesentlich stärker ausgeprägt. Dies ist exemplarisch in der Überlagerung der PDS-D-Spektren der verschiedenen Proben in Abb. 67 dargestellt.

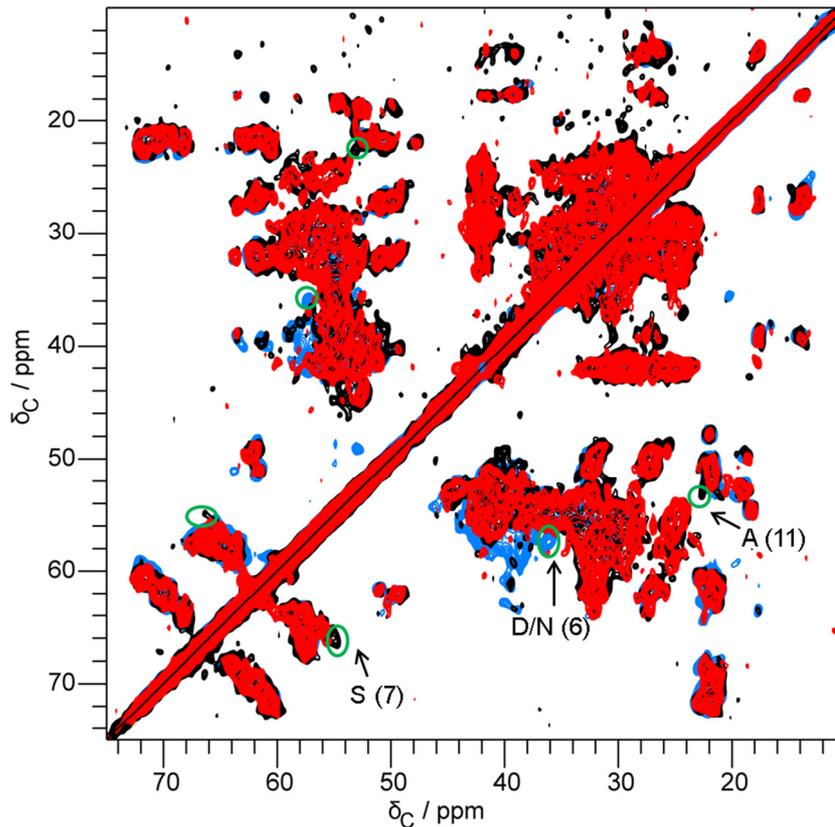


Abb. 67: Kennzeichnung der Signale (grün), die in den 2D PDS-D-Spektren der drei NP7 Proben unterschiedlich stark ausgeprägt sind.

Überlagerung der Spektren von $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V},\text{L},\text{F},\text{Y})]$ NP7 mit einer Mischzeit von 30 ms bei einer nominalen Proben temperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (rot), von $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{K},\text{V})]$ NP7 mit einer Mischzeit von 20 ms bei einer nominalen Proben temperatur von $-30\text{ }^\circ\text{C}$ (blau) und von $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V},\text{L},\text{F},\text{Y})]$ NP7+Liposomen mit einer Mischzeit von 20 ms und einer nominalen Proben temperatur von $-25\text{ }^\circ\text{C}$ (schwarz). Alle Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,3 (rot, schwarz) oder mit einer Kombination aus einer Exponentialfunktion und einer Gaußfunktion (Exponentialfaktor: -150 Hz , Gaußfaktor: 0,2) (blau) prozessiert.

4.2.6.4 Abstandsmessungen zwischen Lipid und NP7 mittels REDOR

Zur Identifizierung der Bereiche des NP7s, die mit der Membran wechselwirken wurden heteronukleare $^{13}\text{C} / ^{31}\text{P}$ -REDOR-Experimente an der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V},\text{L},\text{F},\text{Y})]$ NP7+Liposomen Probe durchgeführt.⁸⁷ Hierbei wird die räumliche Nähe einer Aminosäure des Proteins zu den Lipidkopfgruppen detektiert. Diese wird durch

die Dephasierung der ^{13}C -Signale der Aminosäuren, die über dipolare Kopplungen mit den ^{31}P -Isotopen der Lipidkopfgruppen wechselwirken, detektiert.

REDOR-Simulation zeigt Detektion von $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ -Abständen von bis zu 7 Å Entfernung

Zunächst wurde dazu mit Hilfe des Simulationsprogramms SIMPSON⁸⁸ simuliert, über welche Entfernungen von ^{31}P und ^{13}C zueinander noch eine Dephasierung des REDOR-Signals detektiert werden kann. Dazu wurde zur Vereinfachung ein 2-Spin System angenommen. Das verwendete Skript ist in Kapitel 9.2 gezeigt.

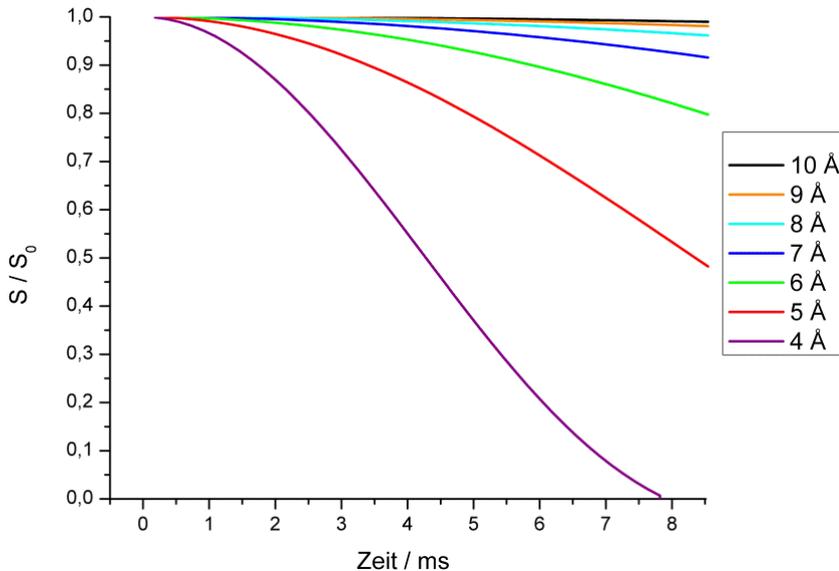


Abb. 68: SIMPSON Simulation der $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ -REDOR-Dephasierung bei unterschiedlichen $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ -Abständen in einem 2-Spin-System an einem 600 MHz NMR-Spektrometer mit einer Rotationsfrequenz von 11 kHz.

Aus der Simulation ist ersichtlich, dass aus dem REDOR-Signal bei einer Dephasierungszeit von ca. 8 ms räumliche $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ -Abstände von $> 7 \text{ \AA}$ nicht mehr detektiert werden können, da die Dephasierung nur sehr gering ausfällt und daher unter experimentellen Bedingungen das Signal-zu-Rausch Verhältnis für die Detektion nicht mehr ausreichend ist. Größere Abstände zwischen den ^{13}C -Kernen der Aminosäuren und den ^{31}P -Kernen der Lipidkopfgruppen werden nicht mehr erfasst. Es findet keine detektierbare Dephasierung des REDOR-Signals statt.

Lysinrest möglicherweise im Abstand von 7 - 8 Å von einer Lipidkopfgruppe

Im Anschluss wurden 1D $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ REDOR-NMR-Messungen der an Liposomen gebundenen NP7 Probe mit REDOR-Dephasierungszeiten von 0 - 8 ms durchgeführt. Das REDOR-Signal ergab sich aus dem Quotienten der Signalintensitäten der Spektren mit und ohne ^{31}P -Pulse. Das so berechnete REDOR-Signal wurde in Abb. 69 gegen die Dephasierungszeit aufgetragen.

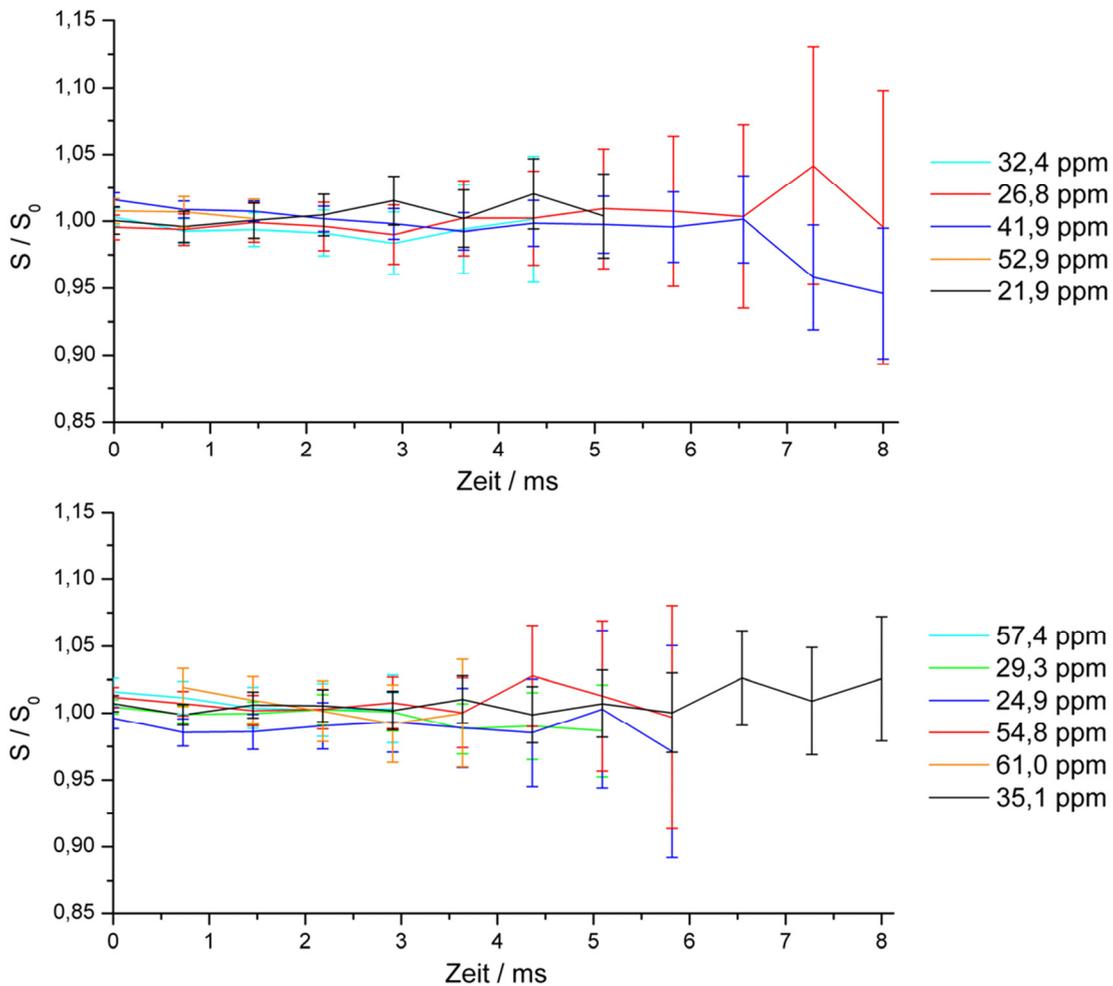


Abb. 69: Auftragung der $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ REDOR-Dephasierung bei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen für die U[^{13}C , ^{15}N (V,L,F,Y)] NP7+Liposomen Probe.

Die zugrundeliegenden 1D ^{13}C REDOR-NMR-Spektren wurden an einem 600 MHz NMR-Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,5 prozessiert. Es wurden jeweils Spektren mit und ohne ^{31}P Pulse bei steigender REDOR-Dephasierungszeit von 0 - 8 ms aufgenommen. Die Signalintensitäten aus den gemessenen Spektren wurden mit dem Programm CCPN bestimmt. Das REDOR-Signal ergab sich aus dem Quotienten der Signalintensitäten der Spektren mit und ohne ^{31}P -Pulse. Das so berechnete REDOR-Signal wurde gegen die Dephasierungszeit aufgetragen. Die Fehlerbalken wurden aus der Abschätzung des Rauschens in den Spektren berechnet.

In Abb. 69 ist zu sehen, dass keine signifikante Abschwächung des REDOR-Signals detektiert werden konnte. Dies kann jedoch auch auf die gewählte Methode zurückgeführt werden, da das NMR Signal durch die langen Echozeiten von bis zu 8 ms zum Teil bereits relaxiert ist und somit das Signal-zu-Rausch Verhältnis mit steigender Echozeit abnimmt (siehe Abb. 70). Dadurch werden die Fehlerbalken mit zunehmender Echozeit größer und die Sensitivität für die Dephasierung des REDOR-Signals nimmt ab. Für das REDOR-Signal bei 41,9 ppm ist allerdings eine tendenzielle Abnahme erkennbar, da das Signal auf $0,95 \pm 0,05$ abfällt. Wie bereits in Kapitel 4.2.3.5 erläutert, ist dieses Signal charakteristisch für die Lysin C ϵ - und die Arginin C δ -Kerne. Aufgrund der wesentlich höheren Anzahl an Lysinen in der NP7 Sequenz (27 Lysine, 2 Arginine) ist davon auszugehen, dass das Signal hauptsächlich durch die Lysin C ϵ -Kerne geprägt wird.

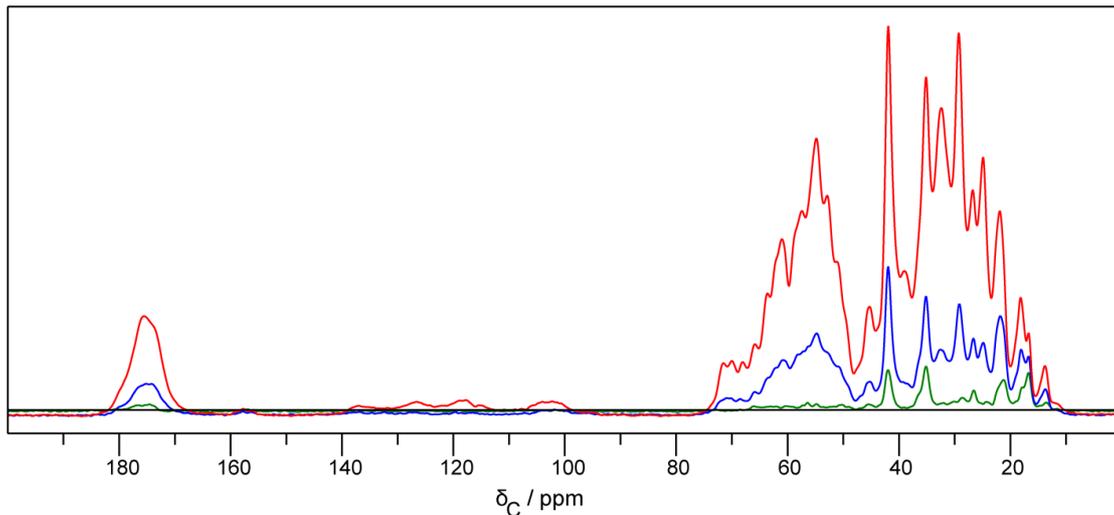


Abb. 70: Überlagerung der $^{13}\text{C} / ^{31}\text{P}$ -REDOR-NMR-Spektren ohne ^{31}P Pulse bei Echozeiten von 0 ms (rot); 3,6 ms (blau) und 8,0 ms (grün).

Die 1D ^{13}C REDOR-Spektren von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe wurden an einem 600 MHz NMR-Spektrometer bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz und einer nominalen Proben temperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,5 prozessiert.

Das Signal-zu-Rausch Verhältnis bezogen auf das Signal bei 41.9 ppm liegt in dem Spektrum ohne Echo (rot) bei 271 : 1 und verringert sich in dem Spektrum mit einer Echozeit von 3,6 ms (blau) auf 101 : 1 und in dem Spektrum mit einer Echozeit von 8,0 ms (grün) auf 28 : 1. Aufgrund der Relaxation der Spins konnte die REDOR-Messung für $^{31}\text{P} / ^{13}\text{C}$ Distanzen von $> 6\text{ \AA}$ nur bedingt angewandt werden.

Eine Abschwächung des REDOR-Signals um 5 % für das Lysin C ϵ -Signal würde bedeuten, dass sich einer oder mehrere Lysinreste in einem Abstand von 7 - 8 \AA zum ^{31}P einer der Lipidkopfgruppen befindet und somit möglicherweise mit der Membran interagiert. Wie in Kapitel 4.2.3.1 diskutiert, könnten 20 der 27 Lysine tendenziell an der Membraninteraktion beteiligt sein.

4.2.6.5 Zusammenfassung der gefundenen Unterschiede

Zusammenfassend wurden in dieser Doktorarbeit die folgenden Erkenntnisse über die Einflüsse der Membranbindung von NP7 auf die NP7-Struktur gewonnen. Der Vergleich der NMR-Spektren von freiem und an Liposomen gebundenem NP7 zeigte, dass die Gesamtfaltung des Proteins durch die Liposomenbindung nicht verändert wird. In INEPT-Spektren oberhalb des Gefrierpunkts des Proteins wurde eine Verringerung der Mobilität einiger Lysinseitenketten durch die Bindung an Liposomen festgestellt. Die chemische Verschiebung eines α -helikalen Threonins war in den NMR-Spektren von freiem und an Liposomen gebundenem NP7 verändert. Es wurde vermutet, dass es sich bei dem α helikalen Threonin möglicherweise um die Aminosäure T₁₆₃ handeln könnte, die sich in einem Strukturelement befindet, das an die Helix- α 1 von NP7 angrenzt. Zudem wurden je ein Alanin und ein Serin in β -faltblattartiger Struktur identifiziert, die in den Spektren des an Liposomen gebundenen NP7s stärker ausgeprägt sind, als in denen des freien NP7s. Es

wurde vermutet, dass die Konformationen, in denen sich diese Aminosäuren befinden, in dem an Liposomen gebundenen NP7 starrer sind, als in dem freien NP7. Sie konnten allerdings nicht sequentiell zugeordnet werden. Aus $^{13}\text{C} / ^{31}\text{P}$ -REDOR-Messungen des an Liposomen gebundenen NP7s ging hervor, dass sich einige Lysinseitenketten möglicherweise im Abstand von 7 – 8 Å zur Membran befinden. Dies könnte auf eine auf eine Interaktion einiger Lysine mit der Membran hindeuten.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit weisen auf die Beteiligung einiger Lysinseitenketten an der Membraninteraktion hin. Es befinden sich 20 der 27 Lysine in der NP7-Sequenz an der elektrostatisch positiv geladenen Oberfläche des Proteins. Die in der Literatur als potentielle Membran-Interaktionsstelle identifizierte Helix- α 1 mit der Sequenz K₁₄₉K₁₅₀I₁₅₁K₁₅₂K₁₅₃A₁₅₄L₁₅₅N₁₅₆K₁₅₇ enthält 5 Lysinreste. Die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegen dieses Modell nicht. Allerdings wurde keine Änderung in den chemischen Verschiebungen der Aminosäuren A₁₅₄ und N₁₅₆, die sich in der Helix- α 1 befinden, durch die Liposomenbindung von NP7 detektiert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass sich die Struktur der Helix- α 1 nicht verändert und nur die positiv geladenen Seitenketten der Lysine in dieser Helix mit den negativ geladenen Lipidkopfgruppen der Membran interagieren. Die Beteiligung der Helix- α 1 an der Membraninteraktion wird durch die vermutete strukturelle Änderung des T₁₆₃ in Folge der Liposomenbindung von NP7 bestärkt, da es sich in einem Strukturelement befindet, dass an die Helix- α 1 von NP7 angrenzt. Die hier diskutierten Ergebnisse sind in Abb. 71 grafisch dargestellt.

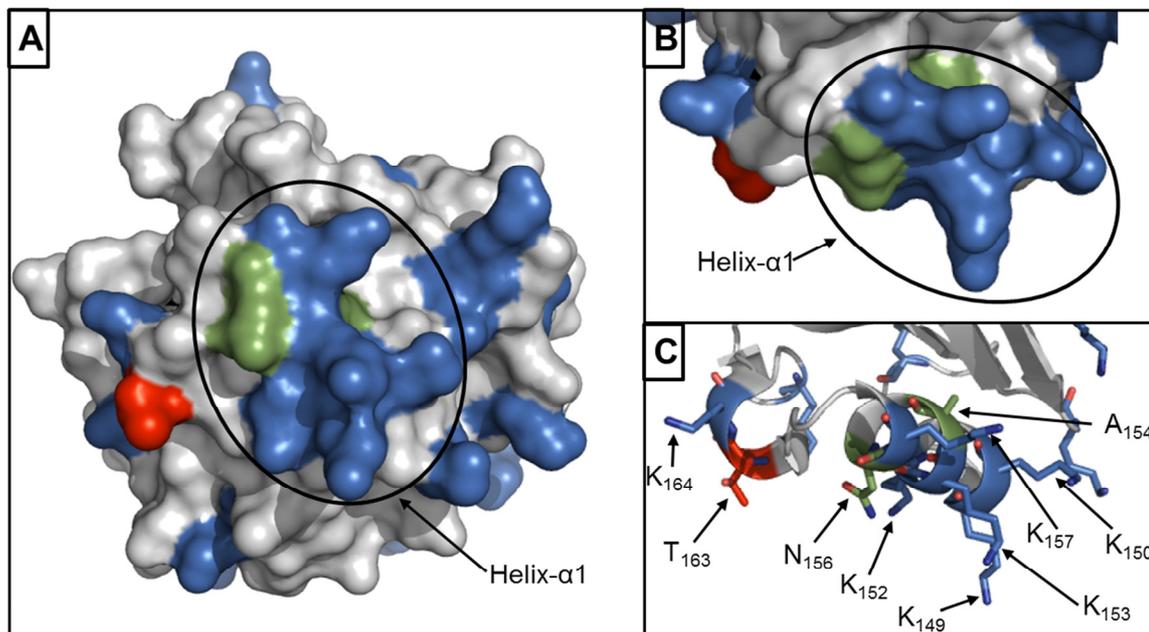


Abb. 71: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Liposomenbindung von NP7.

Kristallstruktur von NP7 (PDB: 4XME) in der Oberflächendarstellung mit Kennzeichnung der Helix- α 1 (A); Ausschnitt der Oberflächendarstellung in anderer Orientierung mit Kennzeichnung der Helix- α 1 (B); gleicher Ausschnitt wie in B in der Bänderdarstellung mit Beschriftung der bedeutenden Aminosäuren (C). Lysine (blau), Threonin 163 (rot), Alanin 154 und Asparagin 156 (grün).

4.2.7 Ausblick

Um mehr über die strukturellen Veränderungen von NP7 infolge der Membranbindung herauszufinden, müssten die spektralen Überlappungen weiter reduziert werden. Dies könnte durch sogenannte segmentelle Isotopenmarkierung⁸⁹ erfolgen, bei der das Protein in mehrere Segmente aufgespalten wird, die individuell exprimiert werden und von denen jeweils nur eines uniform isotopenmarkiert ist. Anschließend würden die Segmente dann durch native chemische Ligation, Protein „transsplicing“ oder „expressed protein ligation“ wieder zusammengefügt. Hierdurch würde auch die Überlappungen der vielen Lysine reduziert, was durch reverse oder Aminosäuretyp-selektive Isotopenmarkierung nicht möglich ist, da hier nur ausgewählte Aminosäuretypen selektiv isotopenmarkiert oder nicht markiert werden können. Hierdurch können die spektralen Überlappungen durch das gehäufte Vorkommen eines Aminosäuretyps in der Sequenz des Proteins nicht vermindert werden. Ein Beispiel für die Anwendung der segmentellen Isotopenmarkierung für die Festkörper-NMR-Untersuchung eines Proteins ist in Schubeis *et al.*⁹⁰ zu finden.

Eine andere Herangehensweise zur Identifizierung der durch die Membraninteraktion beeinflussten Lysine wäre die Herstellung mehrerer Proben mit Aminosäuretyp-selektiver Isotopenmarkierung²⁰ der Lysine und einer der nachfolgenden Aminosäuren. Dadurch könnte in einer Kombination aus NC α CX- und NCOCX-Spektren möglicherweise die Identifizierung einzigartiger Aminosäure-Sequenzpaare erreicht werden. Dies könnte eine sequentielle Resonanzzuordnung der Lysinreste möglich machen.

5 Zusammenfassung

Das Virale Protein U (VpU) ist ein akzessorisches Membranprotein von HIV-1. Infolge der HIV-1 Infektion spielt es eine wichtige Rolle in der Umgehung der Immunantwort des Wirts und unterstützt die Ausbreitung des Virus. Zum genaueren Verständnis dieser Mechanismen ist die strukturelle Untersuchung von VpU von großer Bedeutung. Zur strukturellen Untersuchung von Membranproteinen in naturnaher Umgebung eignen sich insbesondere Festkörper-NMR- und DNP-NMR-Spektroskopie. Um ausreichende Mengen des Proteins für spektroskopische Untersuchung zu generieren, wurde zunächst die Herstellung von VpU optimiert. Dazu wurde ein neues Codon-optimiertes VpU-Konstrukt mit einem kürzeren N-terminalen Überhang kloniert und die Expression in Minimalmedium optimiert. Zudem wurden erste DNP-NMR-Experimente an VpU in Liposomen durchgeführt. Dazu wurde die Probenzusammensetzung bezüglich der Radikal- und der Glycerinkonzentration optimiert und ein erstes 2D Spektrum aufgenommen, das eine hohe Übereinstimmung mit konventionellen Festkörper-NMR-Spektren des Proteins aufwies.

Das 21 kDa große Protein Nitrophorin 7 (NP7) gehört zu einer Klasse von Häm-bindenden Proteinen im Speichel des blutsaugenden Insekts *Rhodnius prolixus*. Es bindet reversibles Nitroxid (NO), welches während der Blutmahlzeit infolge einer pH-Wert-Änderung vom Insektspeichel (pH 5 - 6) zum Blut des Wirtes (pH 7,4) wieder freigesetzt wird. NO wirkt als Vasodilatator und Koagulationsinhibitor. Die Signifikanz von NO in der kardiovaskulären Regulation veranlasste zur Untersuchung der molekularen Mechanismen zur Speicherung und zum Transport von NO in natürlich vorkommenden NO-Transportsystemen, wie den Nitrophorinen. NP7 unterscheidet sich von den anderen Isoformen durch die Möglichkeit an negativ geladene Membranen zu binden. Zudem oligomerisiert es in höheren Konzentrationen. Daher wurde der Einfluss der Membraninteraktion von NP7 auf dessen Struktur mit Hilfe von Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Es wurde reversibel isotopenmarkiertes NP7 hergestellt und an Liposomen gebunden, die bezüglich ihrer Größe, der Lipidkopfgruppe und des Lipid-zu-Protein-Verhältnisses optimiert wurden. In NMR-Spektren konnte eine reverse Isotopenmarkierungseffizienz der NP7 NMR-Proben von 97 - 98 % festgestellt werden. Es war eine Aminosäuretyp-spezifische Resonanzzuordnung von 40 - 55 % der Aminosäuren des Proteins in den verschiedenen NMR-Proben möglich. Zudem wurden einzelne sequentielle Resonanzzuordnungen erhalten. Ein Vergleich mit einer vorhandenen NP7-Kristallstruktur ließ vermuten, dass der Großteil des Proteins in den NMR-Spektren sichtbar ist. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Liposomenbindung des Proteins die Gesamtfaltung des Proteins nicht beeinflusst. Es wurde eine mögliche strukturelle Beeinflussung des Threonins T163 durch die Membranbindung ausgemacht. Es konnte zudem eine Verringerung der Mobilität einiger Lysinseitenketten infolge der Membranbindung nachgewiesen werden. Des Weiteren ließen $^{13}\text{C} / ^{31}\text{P}$ -Abstandsmessungen einen Abstand der Lysin $^{13}\text{C}\epsilon$ -Kerne zu den ^{31}P -Kernen der Lipidkopfgruppen von 7 - 8 Å vermuten. Die Festkörper-NMR-Untersuchungen legen somit eine Beteiligung einiger Lysine an der Membraninteraktion nahe und eine

strukturelle Beeinflussung der Aminosäure T₁₆₃, die sich an der Oberfläche des Proteins in der Nähe der Helix- α 1 befindet. Die Helix- α 1, deren Sequenz 5 Lysinreste beinhaltet, wurde in der Literatur als potentielle Membraninteraktionsstelle ausgemacht. Die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegen dieses Bindungsmodell nicht.

6 Summary

The viral protein U (VpU) is an accessory membrane protein of HIV-1. Following the infection by HIV-1 VpU plays an important role in evading the immune response of the host and supports the viral spread. The structural investigation of VpU is of great importance to understand the underlying mechanisms in depth. Solid-state NMR and DNP-NMR spectroscopy are versatile tools to structurally investigate membrane proteins in nature-like environments. The VpU production needed to be optimized prior to structural studies to yield enough protein. To this account a Codon-optimized VpU-construct with a shortened N terminal overhang was cloned and the expression in minimal medium was optimized. Additionally first DNP-NMR experiments of isotopically labeled VpU inserted into liposomes were performed. The DNP-NMR sample preparation was optimized concerning the radical and glycerol content and a first two-dimensional spectrum was recorded, which was in good agreement with solid-state NMR spectra of the protein recorded previously.

The 21 kDa protein Nitrophorin 7 (NP7) belongs to a class of heme-binding proteins in the saliva of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. It reversibly binds nitroxid (NO), which is released during the blood meal following a pH change from the insect saliva (pH 5 - 6) to the blood (pH 7,4). NO acts as a vasodilator and blood coagulation inhibitor. The significance of NO in cardiovascular regulation led to the aim to investigate the molecular mechanisms of NO storage and transport in naturally occurring NO-transporting systems, like nitrophorins. In contrast to the other isoforms, NP7 can bind to negatively charged membranes. Additionally NP7 oligomerizes at high concentrations. To this end, solid-state NMR spectroscopy was used to investigate the structural changes in NP7 due to its membrane binding. Reverse isotopically labeled NP7 was produced and bound to liposomes, which were optimized concerning their diameter, head group and the lipid to protein ratio. NMR spectra showed a reverse labeling efficiency of 97 - 98 % in the different NMR samples. Amino acid specific resonance assignment could be achieved for 40 - 55 % of the amino acids in the different samples of NP7 and single sequential assignments were obtained. Comparison to an available NP7 crystal structure suggested the visibility of large parts of the protein in NMR spectra. Furthermore it was shown that the overall fold of the protein is not influenced by the membrane interaction. A possible structural change of the amino acid T₁₆₃ and a decreased mobility of some lysine residues due to membrane binding of NP7 were detected. ¹³C / ³¹P-distance measurements supposed a distance of 7 - 8 Å between some lysine Cε-nuclei and the ³¹P-nuclei of the lipid head groups. The solid-state NMR investigations support an involvement of some lysine residues in the membrane interaction and a structural change of the amino acid T₁₆₃ located at the surface of the protein near to the helix-α1. The helix-α1, whose sequence contains 5 lysine residues, was discussed in literature as possible membrane binding site of NP7. The findings in this work do not interfere with this binding model.

7 Literaturverzeichnis

1. Wallin, E. & von Heijne, G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science* **7**, 1029-1038 (1998).
2. Wang, S.L. & Ladizhansky, V. Recent advances in magic angle spinning solid state NMR of membrane proteins. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **82**, 1-26 (2014).
3. Berman, H.M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242 (2000).
4. Hohwy, M., Rienstra, C.M., Jaroniec, C.P. & Griffin, R.G. Fivefold symmetric homonuclear dipolar recoupling in rotating solids: Application to double quantum spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* **110**, 7983-7992 (1999).
5. Nielsen, N.C., Bildsoe, H., Jakobsen, H.J. & Levitt, M.H. Doublequantum homonuclear rotary resonance: Efficient dipolar recovery in magicangle spinning nuclear magnetic resonance. *The Journal of Chemical Physics* **101**, 1805-1812 (1994).
6. Verel, R., Baldus, M., Ernst, M. & Meier, B.H. A homonuclear spin-pair filter for solid-state NMR based on adiabatic-passage techniques. *Chemical Physics Letters* **287**, 421-428 (1998).
7. Verel, R., Ernst, M. & Meier, B.H. Adiabatic dipolar recoupling in solid-state NMR: The DREAM scheme. *Journal of Magnetic Resonance* **150**, 81-99 (2001).
8. Bloembergen, N. On the Interaction of Nuclear Spins in a Crystalline Lattice. *Physica* **15**, 386-426 (1949).
9. Takegoshi, K., Nakamura, S. & Terao, T. C-13-H-1 dipolar-driven C-13-C-13 recoupling without C-13 rf irradiation in nuclear magnetic resonance of rotating solids. *Journal of Chemical Physics* **118**, 2325-2341 (2003).
10. Takegoshi, K., Nakamura, S. & Terao, T. 13C-1H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chemical Physics Letters* **344**, 631-637 (2001).
11. Schütz, A. et al. Protocols for the Sequential Solid-State NMR Spectroscopic Assignment of a Uniformly Labeled 25 kDa Protein: HET-s(1-227). *ChemBioChem* **11**, 1543-1551 (2010).
12. Hong, M. & Schmidt-Rohr, K. Magic-angle-spinning NMR techniques for measuring long-range distances in biological macromolecules. *Accounts of Chemical Research* **46**, 2154-2163 (2013).
13. Overhauser, A.W. Polarization of Nuclei in Metals. *Physical Review* **92**, 411 (1953).
14. Carver, T.R. & Slichter, C.P. Polarization of Nuclear Spins in Metals. *Physical Review* **92**, 212 (1953).
15. Maly, T. et al. Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields. *Journal of Chemical Physics* **128**, 052211 (2008).

16. Song, C.S., Hu, K.N., Joo, C.G., Swager, T.M. & Griffin, R.G. TOTAPOL: A biradical polarizing agent for dynamic nuclear polarization experiments in aqueous media. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 11385-11390 (2006).
17. Ravera, E. et al. Dynamic nuclear polarization of sedimented solutes. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 1641-1644 (2013).
18. Akbey, U. et al. Dynamic nuclear polarization enhanced NMR in the solid-state. *Topics in Current Chemistry* **338**, 181-228 (2013).
19. Hodgkinson, P. *Modern Methods in Solid-State NMR: A Practitioner's Guide*. Royal Society of Chemistry (2017).
20. Verardi, R., Traaseth, N.J., Masterson, L.R., Vostrikov, V.V. & Veglia, G. Isotope Labeling for Solution and Solid-State NMR Spectroscopy of Membrane Proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **992**, 35-62 (2012).
21. Vuister, G.W., Kim, S.J., Wu, C. & Bax, A. 2d and 3d Nmr-Study of Phenylalanine Residues in Proteins by Reverse Isotopic Labeling. *Journal of the American Chemical Society* **116**, 9206-9210 (1994).
22. Heise, H. et al. Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length alpha-synuclein fibrils studied by solid-state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15871-15876 (2005).
23. Singer, S.J. & Nicolson, G.L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).
24. Engelman, D.M. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**, 578-580 (2005).
25. Kusumi, A. et al. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: High-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **34**, 351-378 (2005).
26. Horton, H.R., Moran, L.A., Scrimgeour, K.G., Perry, M.D. & Rawn, J.D. *Biochemie*. Pearson Studium (2008).
27. Boujard, D., Anselme, B., Cullin, C. & Raguénès-Nicol, C. *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*. Springer Spektrum (2014).
28. Maxfield, F.R. & Tabas, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**, 612-621 (2005).
29. van Meer, G., Voelker, D.R. & Feigenson, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 112-124 (2008).
30. Marsh, D. *Handbook of Lipid Bilayers*. CRC Press (2013).
31. Zhang, R.F. et al. Characterizing the structure of lipodisq nanoparticles for membrane protein spectroscopic studies. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1848**, 329-333 (2015).
32. Zhou, H.X. & Cross, T.A. Influences of Membrane Mimetic Environments on Membrane Protein Structures. *Annual Review of Biophysics* **42**, 361-392 (2013).
33. Akbarzadeh, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* **8**, 102 (2013).

34. Warschawski, D.E. et al. Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1808**, 1957-1974 (2011).
35. Deeks, S.G., Overbaugh, J., Phillips, A. & Buchbinder, S. HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers* **1**, 15035 (2015).
36. Freed, E.O. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 484-496 (2015).
37. Roy, N., Pacini, G., Berlioz-Torrent, C. & Janvier, K. Mechanisms underlying HIV-1 Vpu-mediated viral egress. *Frontiers in Microbiology* **5**, 177 (2014).
38. Zhang, H., Lin, E.C., Das, B.B., Tian, Y. & Opella, S.J. Structural determination of virus protein U from HIV-1 by NMR in membrane environments. *Biochimica et Biophysica Acta* **1848**, 3007-3018 (2015).
39. Shah, A.H. et al. Degranulation of Natural Killer Cells Following Interaction with HIV-1-Infected Cells Is Hindered by Downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell Host & Microbe* **8**, 397-409 (2010).
40. Ramirez, P.W. et al. Downmodulation of CCR7 by HIV-1 Vpu Results in Impaired Migration and Chemotactic Signaling within CD4(+) T Cells. *Cell Reports* **7**, 2019-2030 (2014).
41. Knipp, M. et al. Spectroscopic and functional characterization of nitrophorin 7 from the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* reveals an important role of its isoform-specific N-terminus for proper protein function. *Biochemistry* **46**, 13254-68 (2007).
42. Oliveira, A. et al. Kinetics and computational studies of ligand migration in nitrophorin 7 and its Delta1-3 mutant. *Biochimica et Biophysica Acta* **1834**, 1711-1721 (2013).
43. Knipp, M., Zhang, H.J., Berry, R.E. & Walker, F.A. Overexpression in *Escherichia coli* and functional reconstitution of the liposome binding ferriheme protein nitrophorin 7 from the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus*. *Protein Expression and Purification* **54**, 183-191 (2007).
44. Auerbach, H. et al. Nitric oxide heme interactions in nitrophorin 7 investigated by nuclear inelastic scattering. *Hyperfine Interactions* **226**, 439-443 (2014).
45. He, C. & Knipp, M. Formation of nitric oxide from nitrite by the ferriheme b protein nitrophorin 7. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 12042-3 (2009).
46. Koshland, D.E. The Molecule of the Year. *Science* **258**, 1861-1861 (1992).
47. Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. The Obligatory Role of Endothelial-Cells in the Relaxation of Arterial Smooth-Muscle by Acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376 (1980).
48. Ignarro, L.J. et al. Nitric-Oxide and Cyclic-Gmp Formation Upon Electrical-Field Stimulation Cause Relaxation of Corpus Cavernosum Smooth-Muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **170**, 843-850 (1990).
49. Schmidt, H.H., Warner, T.D., Ishii, K., Sheng, H. & Murad, F. Insulin-Secretion from Pancreatic B-Cells Caused by L-Arginine Derived Nitrogen-Oxides. *Science* **255**, 721-723 (1992).

50. Knipp, M. et al. Structure and dynamics of the membrane attaching nitric oxide transporter nitrophorin 7 [version 2; referees: 2 approved, 1 approved with reservations]. *F1000Research* **4**, 45 (2015).
51. Abbruzzetti, S. et al. Heterogeneous kinetics of the carbon monoxide association and dissociation reaction to nitrophorin 4 and 7 coincide with structural heterogeneity of the gate-loop. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 9986-98 (2012).
52. Ogata, H. & Knipp, M. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the membrane-binding haemprotein nitrophorin 7 from *Rhodnius prolixus*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* **68**, 37-40 (2012).
53. Yang, F. et al. H-1 and C-13 NMR spectroscopic studies of the ferriheme resonances of three low-spin complexes of wild-type nitrophorin 2 and nitrophorin 2(V24E) as a function of pH. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **14**, 1077-1095 (2009).
54. Yang, F., Zhang, H. & Knipp, M. A one-residue switch reverses the orientation of a heme b cofactor. Investigations of the ferriheme NO transporters nitrophorin 2 and 7 from the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus*. *Biochemistry* **48**, 235-41 (2009).
55. Knipp, M. & He, C.M. Nitrophorins: Nitrite Disproportionation Reaction and Other Novel Functionalities of Insect Heme-based Nitric Oxide Transport Proteins. *IUBMB Life* **63**, 304-312 (2011).
56. Andersen, J.F., Gudderra, N.P., Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G. & Ribeiro, J.M. Recognition of anionic phospholipid membranes by an antihemostatic protein from a blood-feeding insect. *Biochemistry* **43**, 6987-94 (2004).
57. Varghese, S. et al. Expression, purification, and solid-state NMR characterization of the membrane binding heme protein nitrophorin 7 in two electronic spin States. *Biochemistry* **52**, 7031-40 (2013).
58. Miroux, B. & Walker, J.E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology* **260**, 289-98 (1996).
59. Wittlich, M., Wiesehan, K., Koenig, B.W. & Willbold, D. Expression, purification, and membrane reconstitution of a CD4 fragment comprising the transmembrane and cytoplasmic domains of the receptor. *Protein Expression and Purification* **55**, 198-207 (2007).
60. Wittlich, M. Dissertation: Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433). *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* (2008).
61. Hartmann, S.R. & Hahn, E.L. Nuclear Double Resonance in Rotating Frame. *Physical Review* **128**, 2042-& (1962).
62. Stevens, T.J. et al. A software framework for analysing solid-state MAS NMR data. *Journal of Biomolecular Nmr* **51**, 437-447 (2011).
63. Heise, H., Kohler, F.H. & Xie, X.L. Solid-state NMR spectroscopy of paramagnetic metallocenes. *Journal of Magnetic Resonance* **150**, 198-206 (2001).

64. Fung, B.M., Khitrin, A.K. & Ermolaev, K. An improved broadband decoupling sequence for liquid crystals and solids. *Journal of Magnetic Resonance* **142**, 97-101 (2000).
65. Elena, B., Lesage, A., Steuernagel, S., Bockmann, A. & Emsley, L. Proton to carbon-13 INEPT in solid-state NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 17296-302 (2005).
66. Torchia, D.A. Measurement of Proton-Enhanced C-13 T1 Values by a Method Which Suppresses Artifacts. *Journal of Magnetic Resonance* **30**, 613-616 (1978).
67. Becker, E.D., Ferretti, J.A., Gupta, R.K. & Weiss, G.H. Choice of Optimal Parameters for Measurement of Spin-Lattice Relaxation-Times . II. Comparison of Saturation Recovery, Inversion Recovery, and Fast Inversion Recovery Experiments. *Journal of Magnetic Resonance* **37**, 381-394 (1980).
68. Carr, H.Y. & Purcell, E.M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Physical Review* **94**, 630-638 (1954).
69. Seidel, K. et al. Protein solid-state NMR resonance assignments from (C-13, C-13) correlation spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**, 5090-5093 (2004).
70. Baldus, M., Petkova, A.T., Herzfeld, J. & Griffin, R.G. Cross polarization in the tilted frame: assignment and spectral simplification in heteronuclear spin systems. *Molecular Physics* **95**, 1197-1207 (1998).
71. Delaglio, F. et al. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular Nmr* **6**, 277-293 (1995).
72. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
73. Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A. & Baker, N.A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research* **32**, W665-W667 (2004).
74. Dolinsky, T.J. et al. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Research* **35**, W522-W525 (2007).
75. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10037-10041 (2001).
76. Han, B., Liu, Y.F., Ginzinger, S.W. & Wishart, D.S. SHIFTX2: significantly improved protein chemical shift prediction. *Journal of Biomolecular Nmr* **50**, 43-57 (2011).
77. Kohno, T., Kusunoki, H., Sato, K. & Wakamatsu, K. A new general method for the biosynthesis of stable isotope-enriched peptides using a decahistidine-tagged ubiquitin fusion system. *Journal of Biomolecular Nmr* **12**, 109-121 (1998).
78. Yanischperron, C., Vieira, J. & Messing, J. Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains - Nucleotide-Sequences of the M13mp18 and Puc19 Vectors. *Gene* **33**, 103-119 (1985).

79. Chen, D. & Texada, E.D. Low-usage codons and rare codons of Escherichia coli. *Gene Therapy and Molecular Biology* **10**, 1-12 (2006).
80. Do, H.Q. et al. Full-length Vpu and human CD4(372-433) in phospholipid bilayers as seen by magic angle spinning NMR. *Biological Chemistry* **394**, 1453-1463 (2013).
81. Do, H.Q. Dissertation: Solid-State NMR Spectroscopy of HIV-1 Vpu and Human CD4 in Lipid Bilayers. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* (2013).
82. Lange, S. et al. The effect of biradical concentration on the performance of DNP-MAS-NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **216**, 209-212 (2012).
83. Ni, Q.Z. et al. Peptide and Protein Dynamics and Low-Temperature/DNP Magic Angle Spinning NMR. *J Phys Chem B* (2017).
84. Varghese, S. Dissertation: Magic-Angle-Spinning Solid-state NMR Studies of the Membrane Binding Heme Protein Nitrophorin 7 (NP7) from *Rhodnius prolixus*. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* (2013).
85. Platzer, G., Okon, M. & McIntosh, L.P. pH-dependent random coil (1)H, (13)C, and (15)N chemical shifts of the ionizable amino acids: a guide for protein pK_a measurements. *Journal of Biomolecular NMR* **60**, 109-129 (2014).
86. Kanamori, K. & Roberts, J.D. A N-15 Nmr-Study of the Barriers to Isomerization About Guanidinium and Guanidino Carbon Nitrogen Bonds in L-Arginine. *Journal of the American Chemical Society* **105**, 4698-4701 (1983).
87. Su, Y.C., Doherty, T., Waring, A.J., Puchala, P. & Hong, M. Roles of Arginine and Lysine Residues in the Translocation of a Cell-Penetrating Peptide from C-13, P-31, and F-19 Solid-State NMR. *Biochemistry* **48**, 4587-4595 (2009).
88. Bak, M., Rasmussen, J.T. & Nielsen, N.C. SIMPSON: a general simulation program for solid-state NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* **147**, 296-330 (2000).
89. Muralidharan, V. & Muir, T.W. Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins. *Nature Methods* **3**, 429-438 (2006).
90. Schubeis, T., Luhrs, T. & Ritter, C. Unambiguous assignment of short- and long-range structural restraints by solid-state NMR spectroscopy with segmental isotope labeling. *ChemBioChem* **16**, 51-54 (2015).

8 Danksagung

Prof. Dr. Henrike Heise danke ich für die interessante Themenstellung und die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Insbesondere möchte ich ihr für ihre Betreuung und die Unterstützung während der gesamten Zeit danken.

PD Dr. Bernd König möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine hervorragende Betreuung und seine hilfreichen Ratschläge im VpU-Projekt danken.

Der Graduiertenschule BioStruct danke ich für die finanzielle Unterstützung im ersten Jahr meiner Promotion und für den fachlichen Austausch mit anderen Stipendiaten.

Unserem Kooperationspartner im NP7-Projekt Dr. Markus Knipp danke ich für die Ermöglichung des Forschungsaufenthalts am MPI Mülheim und für die Einführung in die Herstellung des Proteins NP7 und Dr. Elena Decaneto für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre während dieser Zeit.

Unseren Kooperationspartnern im VpU-Projekt Dr. Thomas Drepper und Katrin Pünder danke für die angenehme Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Hoa Quyn Do und Dr. Claas Roes dafür, dass sie mir mit Rat und Tat beim Einstieg in das Thema zur Seite standen.

Dr. Silke Hoffmann möchte ich für ihre Unterstützung bei dem Design des neuen VpU-Konstrukts bedanken.

Bei Dr. Yu-Fu Hung, Dr. Olga Valda, Dr. Alexandra Boeske und Dr. Max Michel möchte ich mich für ihre Hilfe bei Fragen im Labor bedanken.

Dr. Rudolf Hartmann danke ich für seine verlässliche Hilfe bei technischen Problemen mit den NMR-Spektrometern.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen jetzigen und ehemaligen Arbeitskollegen Anna König, Baran Uluca, Franziska Weirich, Daniel Schölzel, Dr. Timo Piechatzek, Dr. Sabu Varghese und Dr. Santhosh Ayalur Karunakaran für die angenehme gemeinsame Arbeitsatmosphäre, für die vielen anregenden fachlichen Diskussionen und die privaten Unternehmungen bedanken. Es hat Spaß gemacht mit euch zusammen zu arbeiten.

Meine Eltern und meinen Geschwistern danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind und mich unterstützen.

Ganz besonders danke ich Christian Hermes für die vielen aufbauenden Worte und Taten, seine Zuversicht und für seinen Beistand auch in schwierigen Zeiten. Danke, dass du immer an mich geglaubt hast, ohne dich hätte ich es wahrscheinlich nicht geschafft.

Zuletzt möchte ich allen danken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben und bisher nicht erwähnt wurden.

9 Anhang

9.1 Experimentelle Details der verwendeten NMR-Spektren

9.1.1 U[¹³C, ¹⁵N] VpU-1 in POPC Liposomen

Spektrum	1D ¹³ C-CP	1D ¹³ C-CP	1D ¹³ C-CP	1D ¹³ C-CP	PDS
Mischzeit / ms					100
Mikrowellenanregung	an	an	an	aus	an
VT Gastemperatur / °C	100	100	100	100	100
MAS / kHz	8	8	8	8	8
¹ H Frequenz / MHz	400	400	400	400	600
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP
Carrier / ppm	80	80	80	80	100
t ₁ -Inkrement	1011	1011	1011	1011	1024
t ₁ spektrale Weite / kHz	30	30	30	30	40
t ₂ -Inkrement					128
t ₂ spektrale Weite / kHz					40
Anzahl der Scans	32	32	32	32	32

9.1.2 U[¹³C, ¹⁵N](V,L,F,Y) NP7 Probe

Spektrum	1D ¹³ C-CP	1D ¹³ C INEPT				
VT Gastemperatur / °C	15	5	-5	-15	-25	15
MAS / kHz	11	11	11	11	11	11
¹ H Frequenz / MHz	600	600	600	600	600	600
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	
Carrier / ppm	75	75	75	75	75	75
Länge des 1. Transfers / µs	250	250	250	250	250	
t ₁ -Inkrement	455	455	455	455	455	455
t ₁ spektrale Weite / kHz	37,65	37,65	37,65	37,65	37,65	37,65
Anzahl der Scans	512	512	512	512	512	512
Dauer / d	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Spektrum	1D ¹³ C INEPT	1D ¹³ C Direktanregun g	T ₂ Array ¹³ C α	T ₂ Array ¹³ CO	T ₂ Array ¹⁵ N	T ₁ Array ¹ H
VT Gastemperatur / °C	-25	-25	-25	-25	-25	-25
MAS / kHz	11	11	10	10	10	10
¹ H Frequenz / MHz	600	600	600	600	600	600
Transfer 1			HC-CP	HC-CP	HN-CP	HC-CP
Carrier / ppm	75	75	55	175	115	55
Länge des 1. Transfers / μ s			250	900	300	250
t ₁ -Inkremente	455	455	938	938	163	938
t ₁ spektrale Weite / kHz	37,65	37,65	78,1	78,1	13,6	78,1
Anzahl der Scans	512	512	128	128	128	64
Dauer / d	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Spektrum	T ₁ Array ¹³ C α	T ₁ Array ¹³ CO	T ₁ Array ¹⁵ N	2D PDS	2D PDS	2D PDS
Mischzeit / ms				30	10	150
VT Gastemperatur / °C	-25	-25	-25	-20	-20	-20
MAS / kHz	10	10	10	11	11	11
¹ H Frequenz / MHz	600	600	600	600	600	600
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HN-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP
Carrier / ppm	55	175	115	80	80	80
Länge des 1. Transfers / μ s	250	900	300	250	250	250
t ₁ -Inkremente	938	938	163	455	455	455
t ₁ spektrale Weite / kHz	78,1	78,1	13,6	37,65	37,65	37,65
t ₂ -Inkremente				226	276	276
t ₂ spektrale Weite / kHz				36	36	36
Anzahl der Scans	64	64	64	176	224	224
Dauer / d	<1	<1	<1	2	3	3

Spektrum	2D PDS	2D PDS	2D PDS-RR	2D PDS-RR	2D PDS	2D PDS
Mischzeit / ms	60	200	15	100	80	60
VT Gastemperatur / °C	-20	-20	-25	-25	-20	-20
MAS / kHz	11	11	12,5	12,5	11	11
¹ H Frequenz / MHz	600	600	800	800	600	600
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP
Carrier / ppm	80	80	80	80	80	80
Länge des 1. Transfers / µs	250	250	200	200	300	250
t ₁ -Inkrement	455	455	1000	1000	455	452
t ₁ spektrale Weite / kHz	37,65	37,65	82,8	82,8	37,9	37,7
t ₂ -Inkrement	276	161	350	350	276	276
t ₂ spektrale Weite / kHz	36	36	42	42	36	36
Anzahl der Scans	224	392	176	160	224	208
Dauer / d	3	4	3	3	3	3

Spektrum	2D PDS	2D DREAM	2D SPC ₅	2D HORROR	2D SPC ₅ (Cα)	2D NCα
Mischzeit / ms	30					
VT Gastemperatur / °C	-5	-30	-30	-30	-25	-30
MAS / kHz	11	22	8	21	8	18
¹ H Frequenz / MHz	600	600	600	600	800	800
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HN-CP
Carrier / ppm	80	57	72	45	72	110
Länge des 1. Transfers / µs	250	200	300	100	300	800
Transfer 2						NCα specific-CP
Carrier / ppm						55
Länge des 2. Transfers / µs						3500
t ₁ -Inkrement	932	751	551	751	1250	1563
t ₁ spektrale Weite / kHz	77,7	62,5	45,9	62,5	104,2	103,4
t ₂ -Inkrement	288	180	140	85	288	28
t ₂ spektrale Weite / kHz	36	18	36	21	48	5,3
Anzahl der Scans	208	656	432	944	368	512
Dauer / d	3	6	3	4	5	<1

Spektrum	2D NC α	2D NC α CX	2D NC α CX	3D NC α CB DREAM	3D NC α CX	3D NC α CX DARR
Mischzeit / ms		20	50		50	70
VT Gastemperatur / °C	-30	-25	-30	-30	-30	-20
MAS / kHz	11	11	11	22	11	11
¹ H Frequenz / MHz	800	600	800	600	800	600
Transfer 1	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP
Carrier / ppm	115	110	115	115	115	115
Länge des 1. Transfers / μ s	900	400	900	400	900	300
Transfer 2	NC α specific-CP					
Carrier / ppm	55	55	55	57	55	55
Länge des 2. Transfers / μ s	3000	1500	3000	1400	3000	2000
t ₁ -Inkrement	1000	1174	1000	1174	833	932
t ₁ spektrale Weite / kHz	82,8	77,7	82,8	77,7	82,8	77,7
t ₂ -Inkrement	38	20	38	8	19	13
t ₂ spektrale Weite / kHz	4,8	3,8	4,8	2,2	4,6	2,7
t ₃ -Inkrement				10	24	17
t ₃ spektrale Weite / kHz				4,5	5,8	4,35
Anzahl der Scans	744	4944	3936	1360	384	704
Dauer / d	1	5	8	11	22	16

Spektrum	2D NCOCX DARR	2D NCOCX	2D NCOCX DARR	3D NCOCX DARR	2D N ζ C ϵ CX	2D N ζ C ϵ CX DARR
Mischzeit / ms	80	60	50	80	150	90
VT Gastemperatur / °C	-25	-30	-30	-20	-30	-25
MAS / kHz	22	11	11	11	11	11
¹ H Frequenz / MHz	600	600	800	600	600	600
Transfer 1	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP
Carrier / ppm	120	120	115	115	35	33
Länge des 1. Transfers / μ s	200	700	1000	600	400	400
Transfer 2	NCO specific- CP	NCO specific- CP	NCO specific- CP	NCO specific- CP	NC ϵ specific- CP	NC ϵ specific- CP
Carrier / ppm	180	177	175	175	42	42
Länge des 2. Transfers / μ s	1300	3200	3000	1400	2800	2500
t ₁ -Inkrement	751	932	1429	1066	1165,5	938
t ₁ spektrale Weite / kHz	62,167	77,7	118	88,8	77,7	78,1
t ₂ -Inkrement	16	29	38	12	8	55
t ₂ spektrale Weite / kHz	2,4	3,6	4,8	2,4	12,6	6,9
t ₃ -Inkrement				13		
t ₃ spektrale Weite / kHz				3,3		
Anzahl der Scans	12656	13152	6336	1264	4448	2480
Dauer / d	10	19	12	20	3	6

9.1.3 U[¹³C, ¹⁵N](V,L,F,Y) NP7+Liposomen Probe

Spektrum	1D ¹³ C-CP	1D ¹³ C INEPT				
Mischzeit / ms						
VT Gastemperatur / °C	15	5	-5	-15	-25	15
MAS / kHz	11	11	11	11	11	11
¹ H Frequenz / MHz	600	600	600	600	600	600
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	
Carrier / ppm	75	75	75	75	75	75
Länge des 1. Transfers / μ s	250	250	250	250	250	
t ₁ -Inkrement	455	455	455	455	455	455
t ₁ spektrale Weite / kHz	37,65	37,65	37,65	37,65	37,65	37,65
Anzahl der Scans	512	512	512	512	512	512
Dauer / d	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Spektrum	1D ¹³ C INEPT	1D ¹³ C Direktanregun g	T ₁ Array ¹⁵ N	T ₁ Array ¹ H	T ₁ Array ¹³ CO	T ₁ Array ¹³ C α
VT Gastemperatur / °C	-25	-25	-25	-25	-25	-25
MAS / kHz	11	11	10	10	10	10
¹ H Frequenz / MHz	600	600	600	600	600	600
Transfer 1			HN-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP
Carrier / ppm	75	75	115	55	175	55
Länge des 1. Transfers / μ s			300	250	900	250
t ₁ -Inkremente	455	455	163	938	938	938
t ₁ spektrale Weite / kHz	37,65	37,65	13,6	78,1	78,1	78,1
Anzahl der Scans	512	512	64	64	64	64
Dauer / d	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Spektrum	T ₂ Array ¹⁵ N	T ₂ Array ¹³ CO	T ₂ Array ¹³ C α	2D PDS	2D PDS	2D PDS
Mischzeit / ms				50	100	20
VT Gastemperatur / °C	-25	-25	-25	-25	-25	-25
MAS / kHz	10	10	10	11	11	11
¹ H Frequenz / MHz	600	600	600	600	600	600
Transfer 1	HN-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP
Carrier / ppm	115	175	55	80	80	80
Länge des 1. Transfers / μ s	300	900	250	250	250	250
t ₁ -Inkremente	163	938	938	938	938	938
t ₁ spektrale Weite / kHz	13,6	78,1	78,1	77,7	77,7	77,7
t ₂ -Inkremente				288	288	288
t ₂ spektrale Weite / kHz				36	36	36
Anzahl der Scans	256	128	128	224	208	176
Dauer / d	<1	<1	<1	3	3	3

Spektrum	2D PDS	2D PDS	2D PDS-RR	2D PDS-RR	2D PDS-RR	2D PDS
Mischzeit / ms	100	150	15	100	5	15
VT Gastemperatur / °C	-25	-20	-25	-25	-25	-25
MAS / kHz	11	11	12,5	12,5	12,5	11
¹ H Frequenz / MHz	600	600	800	800	800	800
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP
Carrier / ppm	80	80	80	80	80	80
Länge des 1. Transfers / µs	250	250	200	200	200	200
t ₁ -Inkrement	938	533	1250	1250	1250	1241
t ₁ spektrale Weite / kHz	77,7	44,4	103,4	103,4	103,4	103,4
t ₂ -Inkrement	288	288	350	333	290	350
t ₂ spektrale Weite / kHz	36	36	42	42	42	42
Anzahl der Scans	176	176	176	160	128	176
Dauer / d	3	3	3	3	2	3

Spektrum	2D PDS	2D PDS	2D SPC ₅ (Cα)	2D SPC ₅ (CO)	2D SPC ₅ (Cα)	2D NCA
Mischzeit / ms	100	30				
VT Gastemperatur / °C	-25	-5	-20	-20	-25	-30
MAS / kHz	11	11	8	8	8	11
¹ H Frequenz / MHz	800	600	600	600	800	800
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HN-CP
Carrier / ppm	80	80	72	72	72	115
Länge des 1. Transfers / µs	200	250	300	1000	300	1000
Transfer 2						NCA specific-CP
Carrier / ppm						55
Länge des 2. Transfers / µs						2800
t ₁ -Inkrement	1241	932	536	883	1250	994
t ₁ spektrale Weite / kHz	103,4	77,7	44,4	73,1	104,2	82,8
t ₂ -Inkrement	350	288	240	240	288	38
t ₂ spektrale Weite / kHz	42	36	40	40	48	4,8
Anzahl der Scans	176	208	416	256	352	992
Dauer / d	3	3	5	3	5	1

Spektrum	2D NC α CX DARR	2D NC α CX DARR	2D NC α CX	3D NC α CX DARR	2D NCOCX DARR	2D NCOCX DARR
Mischzeit / ms	70	70	50	70	50	80
VT Gastemperatur / °C	-20	-20	-30	-20	-20	-20
MAS / kHz	11	11	11	11	11	11
¹ H Frequenz / MHz	600	600	800	600	600	600
Transfer 1	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP
Carrier / ppm	115	115	115	115	115	115
Länge des 1. Transfers / μ s	300	400	1000	300	300	300
Transfer 2	NC α specific- CP	NC α specific- CP	NC α specific- CP	NC α specific- CP	NCO specific-CP	NCO specific-CP
Carrier / ppm	55	55	55	55	175	175
Länge des 2. Transfers / μ s	1600	2600	2800	1600	3250	3250
t ₁ -Inkrement	932	932	994	932	1066	1066
t ₁ spektrale Weite / kHz	77,7	77,7	82,8	77,7	88,8	88,8
t ₂ -Inkrement	29	29	38	13	29	29
t ₂ spektrale Weite / kHz	3,6	3,6	4,8	2,7	3,6	3,6
t ₃ -Inkrement				17		
t ₃ spektrale Weite / kHz				4,35		
Anzahl der Scans	1056	4768	2912	624	3184	4256
Dauer / d	1,5	7	5,5	14	4,5	6

Spektrum	2D NCOCX	3D NCOCX DARR	2D NζCεCX DARR	1D ³¹ P / ¹³ C REDOR
Mischzeit / ms	70	80	90	
VT Gastemperatur / °C	-30	-20	-25	-20
MAS / kHz	11	11	11	11
¹ H Frequenz / MHz	800	600	600	600
Transfer 1	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HC-CP
Carrier / ppm	115	115	33	42
Länge des 1. Transfers / μs	1000	300	400	300
Transfer 2	NCO specific- CP	NCO specific- CP	NCE specific-CP	
Carrier / ppm	175	175	42	
Länge des 2. Transfers / μs	2500	3250	2500	
t ₁ -Inkrement	1241	1072	938	638
t ₁ spektrale Weite / kHz	103,4	88,8	78,1	56,8
t ₂ -Inkrement	38	12	41	
t ₂ spektrale Weite / kHz	4,8	2,4	6,9	
t ₃ -Inkrement		13		
t ₃ spektrale Weite / kHz		3,3		
Anzahl der Scans	4384	880	2864	7000
Dauer / d	7	14	6	4

9.1.4 DMPC / DMPS Liposomen Probe

Spektrum	1D ¹³ C- CP	1D ¹³ C- CP	1D ¹³ C INEPT	1D ¹³ C INEPT	1D ¹³ C Direkt- anregung	1D ¹³ C Direkt- anregung	2D PDSO
Mischzeit / ms							50
VT Gastemperatur / °C	15	-25	15	-25	15	-25	-25
MAS / kHz	11	11	11	11	11	11	11
¹ H Frequenz / MHz	600	600	600	600	600	600	600
Transfer 1	HC-CP	HC-CP					HC-CP
Carrier / ppm	75	75	75	75	75	75	80
Länge des 1. Transfers / μs	250	250					250
t ₁ -Inkrement	452	452	452	452	452	452	938
t ₁ spektrale Weite / kHz	37,65	37,65	37,65	37,65	37,65	37,65	77,7
t ₂ -Inkrement							210
t ₂ spektrale Weite / kHz							36
Anzahl der Scans	512	512	512	512	512	512	80
Dauer / d	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1

9.1.5 U[^{13}C , ^{15}N (K,V)] NP7 Probe

Die Spektren wurden bereits vor dieser Doktorarbeit aufgenommen. Details zu den Spektren sind in der Doktorarbeit von Varghese⁸⁴ zu finden.

Spektrum	2D PDS	2D PDS- RR	2D PDS	2D PDS	2D PDS	2D DREAM	2D SPC ₅
Mischzeit / ms	100	100	100	20	150		
VT Gastemperatur / °C	m40	-30	-30	-30	-30	-30	-30
MAS / kHz	11	12,5	11	11	11	15	8
^1H Frequenz / MHz	600	800	600	600	s600	600	600
Anzahl der Scans	512	256	256	256	600	256	600

Spektrum	2D NC α CX	2D NC α CB DREAM	3D NC α CB DREAM	3D NC α CX	2D NCOX	3D NCOX
Mischzeit / ms	100			50	100	
VT Gastemperatur / °C	-30	-30	-30	-30	-30	-30
MAS / kHz	11	15	15	11	11	11
^1H Frequenz / MHz	800	800	600	600	800	800
Anzahl der Scans	2304	2864		250	3072	

9.2 SIMPSON Skript

```

spinsys {
  channels 13C 31P
  nuclei   13C 31P
  dipole   1 2 -12240.9 0 0 0
  shift    1 0p 0p 0 0 0 0
}

source ../util.tcl

par {
  proton_frequency 600e6
  spin_rate        11000
  sw               spin_rate/2.0
  np               32
  crystal_file     rep320
  gamma_angles    18
  start_operator   I1x
  detect_operator  I1p
  verbose          1101
  variable rf      20800
}

proc pulseseq {} {
  global par

  maxdt 1.0

  set t180 [expr 0.5e6/$par(rf)]
  set tr2  [expr 0.5e6/$par(spin_rate)-$t180]

  reset
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) y
  store 1

  reset
  acq
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t180 $par(rf) x 0 x
  prop 1
  store 2
  acq

  for {set i 2} {$i < $par(np)} {incr i} {
    reset
    prop 1
    prop 2
    prop 1
    store 2
    acq
  }
}

proc main {} {
  global par

  set f [fsimpson]
  set fidname [Fsave $f $par(name) -xreim]
  puts "Saved files: $fidname"
}

```

Abb. 72: Skript für die in Kapitel 4.2.6.4 beschriebene REDOR-Simulation mit Hilfe des Programms SIMPSON.

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformeln und Hauptphasenübergangstemperaturen (T_U) in Überschusswasser der in dieser Arbeit verwendeten Lipide. ³⁰	5
Abb. 2: A: Kristallstruktur von NP7 mit dem Liganden NO bei pH 7,8 (PDB: 4XME). B: Mögliche Häm <i>b</i> Orientierungen in der NP7 Bindetasche.....	8
Abb. 3: Elektrostatische Oberfläche von NP7 und Verteilung der Lysine im Protein mit Markierung der potentiellen Membranbindungsstelle.....	10
Abb. 4: Schematischer Aufbau des VpU-1-Konstrukts zur Herstellung von VpU-1.....	30
Abb. 5: Testexpression von Ubi-VpU-1.....	30
Abb. 6: Klonierungsschritte des vorhandenen VpU-1-Konstrukts. ^{59,60,77}	31
Abb. 7: Mutationen im Bereich des lac Operators im VpU-1-Konstrukt.....	32
Abb. 8: Analyse der im VpU-1-Konstrukt enthaltenen Codons.....	32
Abb. 9: Insert zur Klonierung des neuen VpU-2-Konstrukts.....	33
Abb. 10: Auftrennung des Verdaus von pET41b und pMAT_Ubi-fVpU auf einem Agarosegel.....	33
Abb. 11: Testexpression der verschiedenen VpU-Konstrukte in verschiedenen Zelltypen.	34
Abb. 12: Fraktionierung der Testexpressionspellets der VpU-Proteine.....	36
Abb. 13: Vergleich der Testexpression von Ubi-VpU-2 in LB- und TB-Medium.	37
Abb. 14: Vergleich der Expression von Ubi-VpU-1 und Ubi-VpU-2 in verschiedenen <i>E. coli</i> Zelltypen in TB- und M9-Medium.....	38
Abb. 15: Expression von Ubi-VpU-2 in präparativem Maßstab.	39
Abb. 16: Expressionslevel der His-PreScission.	39
Abb. 17: Reinigung der His-PreScission.....	40
Abb. 18: Reinigung von VpU-1 und VpU-2.	41
Abb. 19: Signalverstärkung durch DNP in den 1D ¹³ C-Spektren des ¹³ C-, ¹⁵ N-markierten VpU-1 in POPC-Liposomen.....	42
Abb. 20: Vergleich der 1D ¹ H / ¹³ C-CP-MAS-DNP-NMR-Spektren von ¹³ C, ¹⁵ N-markiertem VpU-1 in POPC-Liposomen bei unterschiedlicher Probenzusammensetzung.	43
Abb. 21: Vergleich des DNP-NMR 2D ¹³ C / ¹³ C-Korrelationsspektrums von ¹³ C-, ¹⁵ N-markiertem VpU-1 in POPC-Liposomen (schwarz) mit einem Festkörper-NMR 2D ¹³ C / ¹³ C-Korrelationsspektrums derselben Probe (rot).....	44
Abb. 22: Vergleich der Expression von NP7 in M9-Medium hergestellt nach zwei unterschiedlichen Rezepturen (A: Varghese <i>et al.</i> ⁵⁷ , B: unser Labor).	46
Abb. 23: Reinigung von NP7.	48

Abb. 24: Erhöhung der Reinheit von NP7 durch Optimierung des Größenausschlusschromatographieschrittes.....	48
Abb. 25: UV-Vis Absorptionsspektren von NP7 nach unterschiedlichen Schritten der Reinigung.....	50
Abb. 26: A: Rotes NP7-Liposomen-Pellet. B: Dünnschichtchromatogramm der NP7-Liposomen Proben nach der Ultrazentrifugation.....	51
Abb. 27: Lage der basischen Aminosäuren auf der elektrostatisch positiv geladenen Oberfläche von NP7.....	54
Abb. 28: Exemplarische Darstellung der für die Bestimmung der reversen Isotopenmarkierungseffizienz ausgewählten Valin- und Alaninsignale im 2D $^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ DQ / SQ-Spektrum der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.....	56
Abb. 29: Signale in 1D ^{13}C -Spektrern von DMPC / DMPS-Liposomen.....	57
Abb. 30: Keine $^{13}\text{C} / ^{13}\text{C}$ Korrelationen sichtbar im 2D PDS-D-Spektrum von DMPC / DMPS-Liposomen.....	58
Abb. 31: Ausgewählte chemische Verschiebungen für ^{13}C und ^{15}N für die Bestimmung der Relaxationszeiten.....	60
Abb. 32: T_1 -Relaxationskurven für ^{13}C und ^{15}N von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.....	61
Abb. 33: T_1 -Relaxationskurven für ^1H von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.....	63
Abb. 34: T_2 -Relaxationskurven für ^{13}C und ^{15}N von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.....	65
Abb. 35: Mobilität der präzipitierten NP7 Probe im Vergleich zur an Liposomen gebundenen NP7 Probe.....	67
Abb. 36: Mobilität der präzipitierten NP7 Probe im Vergleich zur an Liposomen gebundenen NP7 Probe.....	67
Abb. 37: Mobilität der präzipitierten NP7 Probe im Vergleich zur an Liposomen gebundenen NP7 Probe.....	68
Abb. 38: Temperaturabhängigkeit der 1D $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.....	69
Abb. 39: Temperaturabhängigkeit der 1D $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -CP-Spektren der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.....	70
Abb. 40: Temperaturabhängig der Signalintensität der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe (A) und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe (B).....	71

Abb. 41: Vergleich der 2D PDS-D-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 und $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Proben bei unterschiedlichen nominalen Probentemperaturen.....	72
Abb. 42: Lokalisation der Aminosäuretypen in der Kristallstruktur von NP7 (PDB: 4XME) für die einige Transfers über eine und zwei Bindungen in den PDS-D-Spektren von NP7 bei $-5\text{ }^\circ\text{C}$ nicht sichtbar sind.	73
Abb. 43: Vergleich der Spektren bei unterschiedlichen Magnetfeldstärken.....	75
Abb. 44: Arginin Konformationen bei unterschiedlichen Temperaturen.....	76
Abb. 45: Arginin Seitenketten bei unterschiedlichen Temperaturen.	77
Abb. 46: Bereiche der ^{13}C -Resonanzen der einzelnen Aminosäuren im 2D DQ / SQ-Spektrum der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.	78
Abb. 47: Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung der Lysin-Resonanzen im 2D DQ / SQ-Spektrum der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe. Farbige Pfeile markieren die Lysinsignale im Spektrum.....	80
Abb. 48: Aminosäuretyp-spezifische Zuordnung der Lysin-Resonanzen im 2D PDS-D-Spektrum der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.	81
Abb. 49: ^{13}C -Lysin-Resonanzen bei der $K\text{ N}_\zeta$ Stickstoff chemischen Verschiebung in 2D $\text{N C}_\alpha\text{CX}$ -Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (blau) und $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Proben (lila).....	82
Abb. 50: ^{13}C -Lysin-Resonanzen bei der $K\text{ N}_\zeta$ Stickstoff chemischen Verschiebung in 2D $\text{N}_\zeta\text{C}_\beta\text{CX}$ -Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (blau) und $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Proben (grün).....	83
Abb. 51: Interresiduale Kreuzkorrelationen der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe im 2D PDS-D-Spektrum.....	84
Abb. 52: Interresiduale Kreuzkorrelationen im 2D PDS-D-RR-Spektrum der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.....	85
Abb. 53: Mögliche sequentielle Resonanzzuordnungen der interresidualen Kreuzkorrelationen aus den PDS-D-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe mit langer Mischzeit.....	86
Abb. 54: „Sequential walk“ der S (4) G (2)-Korrelation über ^{15}N -Verschiebungen.....	87
Abb. 55: Mehrere mögliche ^{15}N -Verschiebungen für G (2) verhindern die weitere sequentielle Resonanzzuordnung.	88
Abb. 56: Mögliche nachfolgende Aminosäuren von G (2).	88
Abb. 57: Vergleich eines 2D PDS-D-Spektrums der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe mit den shiftX2 chemischen Verschiebungsvorhersagen einer NP7 Kristallstruktur.....	91
Abb. 58: Abweichungen der chemischen Verschiebungsvorhersagen der NP7 Kristallstruktur von dem PDS-D-Spektrum der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.....	92

Abb. 59: Sekundäre chemische Verschiebung der Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten chemischen Verschiebungen der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (VLFY), $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{K,V})]$ NP7 (KV) und $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen (Lipo) Proben.	93
Abb. 60: Zuweisung einiger in den NMR-Spektren Aminosäuretyp-spezifisch zugeordneten Aminosäuren zu bestimmten Positionen in der NP7-Sequenz.....	95
Abb. 61: Vergleich eines 2D PDS-D-Spektrums der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe mit den shiftX2 chemischen Verschiebungsvorhersagen der Helix- α 1 einer NP7 Kristallstruktur.....	96
Abb. 62: Vergleich der 2D PDS-D-Spektren mit einer Mischzeit von 15 ms von der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (blau) und der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe (rot).....	97
Abb. 63: Zuordnung der Aminosäure T (3) im 3D $\text{NC}\alpha\text{CX}$ -Spektrum der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (grün) und der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen (lila) Probe.....	100
Abb. 64: Arginin $\text{C}\zeta$ -Konformationen in den Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (rot) und der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe (grün).....	101
Abb. 65: Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Aminosäure T (5) in den 2D PDS-D-Spektren der $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 (rot) und $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe (schwarz).....	102
Abb. 66: Position der Aminosäure T_{163} in der Kristallstruktur von NP7.....	103
Abb. 67: Kennzeichnung der Signale (grün), die in den 2D PDS-D-Spektren der drei NP7 Proben unterschiedlich stark ausgeprägt sind.....	104
Abb. 68: SIMPSON Simulation der $^{13}\text{C} / ^{31}\text{P}$ -REDOR-Dephasierung bei unterschiedlichen $^{13}\text{C} / ^{31}\text{P}$ -Abständen in einem 2-Spin-System an einem 600 MHz NMR-Spektrometer mit einer Rotationsfrequenz von 11 kHz.....	105
Abb. 69: Auftragung der $^{13}\text{C} / ^{31}\text{P}$ REDOR-Dephasierung bei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen für die $U[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe.	106
Abb. 70: Überlagerung der $^{13}\text{C} / ^{31}\text{P}$ -REDOR-NMR-Spektren ohne ^{31}P Pulse bei Echozeiten von 0 ms (rot); 3,6 ms (blau) und 8,0 ms (grün).....	107
Abb. 71: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Liposomenbindung von NP7.....	108
Abb. 72: Skript für die in Kapitel 4.2.6.4 beschriebene REDOR-Simulation mit Hilfe des Programms SIMPSON.....	130

9.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Genotyp und Referenz der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme	12
Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien.	13
Tab. 3: Liste der verwendeten Plasmide.....	13
Tab. 4: Komponenten für die SDS-PAGE.....	14
Tab. 5: Puffer für den Western Blot.	15
Tab. 6: Komponenten für die Agarose-Gelelektrophorese.....	15
Tab. 7: Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.	16
Tab. 8: Puffer zur Expression und Reinigung der PreScission Protease.	17
Tab. 9: Puffer zur Expression und Reinigung von VpU.....	21
Tab. 10: Für die Fraktionierung des Zellpellets der VpU Expression verwendete Puffer. .	21
Tab. 11: Puffer zur Herstellung von VpU-1 enthaltenden POPC-Liposomen.	22
Tab. 12: DNP-Probenzusammensetzung	22
Tab. 13: Für die Expression und Reinigung von NP7 verwendete Puffer.	24
Tab. 14: Für die Herstellung von Liposomen verwendete Puffer.	25
Tab. 15: Für die Dünnschichtchromatographie verwendete Lösungen.....	25
Tab. 16: Quantifizierung der Expressionsbanden im Western Blot der VpU-Expression mit verschiedenen Konstrukten in verschiedenen <i>E. coli</i> Zelltypen.....	35
Tab. 17: NP7-Liposomen Bindungstest 1: Optimierung der Liposomengröße.....	51
Tab. 18: NP7-Liposomen Bindungstest 2: Optimierung des Lipid-zu-NP7 Verhältnisses. 52	
Tab. 19: NP7-Liposomen Bindungstest 3: Auswahl der Lipidkopfgruppe und Erhöhung des Größenmaßstabs	52
Tab. 20: T_1 -Relaxationszeiten für ^{13}C und ^{15}N von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.	62
Tab. 21: T_1 -Relaxationszeiten für ^1H von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.....	63
Tab. 22: T_2 -Relaxationszeiten für ^{13}C und ^{15}N von der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7+Liposomen Probe und der $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ NP7 Probe.	66
Tab. 23: Für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen verwendete Festkörper-NMR-Spektren.	74
Tab. 24: Vorläufige sequentielle Zuordnungen der Aminosäuren von NP7 in den Spektren der verschiedenen NP7 Proben.....	89

Tab. 25: Übersicht der Aminosäuretyp-spezifischen und vorläufigen sequentiellen Zuordnungen der chemischen Verschiebungen des Proteins NP7 in dieser Arbeit.	90
Tab. 26: Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage anhand der sekundären chemischen Verschiebung aus den Festkörper-NMR-Spektren und der Sekundärstruktur der NP7 Kristallstruktur (PDB: 4XME).	94
Tab. 27: Zuordnung der Aminosäuren in der U[^{13}C , ^{15}N](V,L,F,Y) NP7+Liposomen mit Abweichungen ($> 0,5$ ppm für ^{13}C bzw. > 1 ppm für ^{15}N) von den beiden NP7 Proben ohne Liposomen.	98

9.5 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ort, Datum

Unterschrift