

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

---

**Rekombinante Herstellung, Reinigung und  
Charakterisierung der  
metallbindenden Eigenschaften des  
*Lassa-Z-Proteins***

Inauguraldissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**-Aus der Medizinischen Fakultät-**

vorgelegt von  
Amber Chaudhry  
aus Karachi/Pakistan

Lübeck 2007

1. Berichterstatter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. L. Schmidt

2. Berichterstatter: Herr Priv.-Doz. Dr. med Jan Rupp

**Tag der mündlichen Prüfung: 10. 09. 2007**

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10. 09. 2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
-Dekan der Medizinischen Fakultät-

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1	Virale hämorrhagische Fieber-Erkrankungen .....	6
1.2	Arenaviren .....	10
1.2.1	Das Z Protein .....	13
1.2.2	Epidemiologie der Arenaviren .....	14
1.2.3	Klinische Daten der Arenavireninfektion .....	16
1.3	Das Lassa Virus .....	17
1.4	Das Lymphozytäre Choriomeningitisvirus .....	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1	Anzucht und Aufarbeitung der Bakterienkulturen im analytischen Maßstab ....	21
2.2	Expressionsbedingungen .....	22
2.3	Rekombinante Expression im präparativen Maßstab .....	22
2.4	Metall-Affinitätschromatographie .....	23
2.5	Gelfiltrationschromatographie .....	23
2.5.1	Superdex S200 High Resolution .....	24
2.5.2	Sephacryl S300 High Resolution .....	25
2.5.3	Superose 6 High Resolution .....	25
2.6	Konzentrieren von Proteinlösungen .....	26
2.7	Dialyse .....	26
2.8	Diskontinuierliches Laemmli-Gel (SDS-Gel) .....	26
2.9	Proteinbestimmung .....	27
2.10	Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) .....	27
2.11	Mößbauerspektrometrie .....	28
2.11.1	Prinzip der Mößbauerspektrometrie .....	28
2.11.2	Interpretation der Mößbauerspektren .....	30
2.11.3	Proteinpräparation für die Mößbauerspektrometrie .....	31
2.11.4	Herstellung der Eisen-57-Lösung für die Mößbauerspektrometrie .....	31
2.12	Protonen Induced X-ray Emissions-(PIXE) Spektroskopie .....	32
2.12.1	Prinzip der Protonen Induced X-ray Emissionsspektroskopie .....	32
2.12.2	Proteinpräparation für die PIXE-Versuche .....	33

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1	Optimierung der Wachstumsbedingungen der <i>E. coli</i> -Kulturen .....	34
3.2	Metall-Affinitätschromatographie .....	37
3.3	Entsalzung der aufkonzentrierten Proteine .....	39
3.4	Superdex S200 High Resolution Chromatographie .....	39
3.5	Reinheitskontrolle des Proteins nach der Chromatographie .....	40
3.6	Bestimmung des Molekulargewichtes .....	41
3.6.1	Analytische Gelfiltrationschromatographie über Superdex S200 HR und Superose 6 .....	41
3.6.2	Analytische Chromatographie über Sephacryl S300 HR .....	43
3.7	Auswirkungen der verschiedenen Metallionenzusätze .....	44
3.7.1	Beobachtungen .....	44
3.7.2	Auswirkungen der verschiedenen Metallionenzusätze auf den Oligomerisierungsgrad des Lassa-Z-Proteins .....	47
3.7.3	Proteinmenge und die Metallbesetzung-Ergebnisse der AAS .....	58
3.7.4	Zusammenfassung der Auswirkungen der verschiedenen Metallionenzusätze ...	60
3.8	Mößbauerspektrometrie .....	61
3.8.1	Vorversuche zur Mößbauerspektrometrie .....	61
3.8.2	Auswertung der Mößbauerspektren .....	61
3.9	Auswertung der PIXE-Versuche .....	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>69</b>
4.1	Eigenschaften des Lassa-Z-Proteins .....	69
4.2	Ausblick .....	71
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>74</b>
6.1	Puffer .....	74
6.2	Lösungen und Färbelösungen für die SDS-PAGE .....	74
6.3	Medien .....	75
6.4	Geräte, Chemikalien, Proteine und Enzyme, Säulen .....	76

<b>7</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>87</b>

## 1 Einleitung

Viren sind durch ihre „semivitale“ Stellung unter den Lebewesen einerseits und durch ihre Krankheit-verursachenden Eigenschaften andererseits sowohl interessante als auch notwendige Studienobjekte.

Obwohl durch die Entdeckung der Antibiotika und gezielte und konsequente Durchführung der Immunisierung die Zahl der Infektionskrankheiten vor allem in den Industriestaaten drastisch zurückgegangen ist, stellen sie weltweit immer noch eine der häufigsten Todesursachen dar, sodass die Forschung sich weiterhin mit den Mikroorganismen befassen muss. Im Gegensatz zu einer Fülle von Antibiotika gegen bakterielle Infektionen, gibt es relativ wenige Virustatika, die bei einem fulminanten Krankheitsverlauf oft nur eingeschränkt wirken.

Lassa Fieber kommt weitgehend endemisch in Westafrika vor. Der Schweregrad der Erkrankung und die zunehmende Globalisierung verlangen jedoch eine intensivere Auseinandersetzung mit diesem Erreger. Dabei bietet das weniger pathogene und auch in Europa und Nordamerika vorkommende Lymphozytäre Choriomeningitisvirus (LCMV) eine hervorragende Grundlage, um die Basisaspekte der Zell- und Molekularbiologie der Arenaviren zu verstehen.

Ziel dieser Arbeit war die molekulare Charakterisierung der Z Proteine eines dieser Viren.

### 1.1 Virale hämorrhagische Fieber-Erkrankungen

Die von hämorrhagischen Viren beim Menschen ausgelösten Infektionen werden unter dem Begriff hämorrhagische Fiebererkrankungen gefasst, obgleich es bei den Patienten zwar immer zu Fieber, aber nicht zwangsläufig zu Blutungen kommt. Wenn doch, dann treten diese während der Verschlechterung des Allgemeinzustandes im Laufe der Fieberperiode auf. Die äußerlich sichtbaren Blutungen manifestieren sich in der Haut als Petechien (punktförmiger Blutaustritt aus feinsten geplatzten Gefäßen) als Ecchymosen (kleinfleckige Blutungen) oder als Purpura (dunkelrote Hautflecke). In schwersten Fällen stirbt der Patient an inneren Blutungen oder an Multiorganversagen (Bernard, 1997).

Der Ausdruck „hämorrhagisches Fieber“ (HF) wurde erstmals in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts durch russische und japanische Wissenschaftler beschrieben, als im mandschurisch-russisch-koreanischen Grenzgebiet eine akute fieberhafte Erkrankung

ausbrach, die mit Hämorrhagien einherging. Seitdem wurde der Begriff auch auf andere weltweit vorkommende virale Infektionen übertragen, die Fieber mit Hämorrhagien auslösen. Zur Zeit sind 14 verschiedene Viren bekannt, die HF verursachen. Sie werden in vier Virusfamilien unterteilt: Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae und Flaviviridae. Es sind bekapselte einzelsträngige RNA Viren, die vorwiegend durch Insekten oder Nagetiere auf die Menschen übertragen werden. Einen Überblick gibt Tabelle 1.1.

**Tabelle 1.1 Hämorrhagisches Fieber (HF) verursachende Viren [nach Bernard, 1997; Chen und Cosgriff, 2000].**

Familie, Virus	Erkrankung	Verteilung	Reservoir	Übertragung
<b>Arenaviridae</b>				
Lassa	Lassa Fieber	West Afrika	Nagetiere	Aerosole aus
Junin	Argentinisches HF	Argentinien	Nagetiere	Nagetierexkrementen und
Machupo	Bolivisches HF	Bolivien	Nagetiere	Körperflüssigkeiten,
Guanarito	Venezuelisches HF	Venezuela	Nagetiere	direkter Kontakt mit
Sabia	Brasilisches HF	Brasilien	Nagetiere	Körperflüssigkeiten
<b>Bunyaviridae</b>				
Rift Valley Fieber	Rift Valley Fieber	Subsahara, Nildelta	Wild- und Haustiere	Moskitos, Kontakt mit Kadavern, Zecken,
Krim-Kongo-Fieber	Hämorrhagisches Krim-Kongofieber	Afrika, Asien, Krim	Hasen, Vögel, Zecken, Haustiere	direkter Kontakt mit infizierten Tieren, nosocomial und
Hantaviren	mit renalen Syndromen mit pulmonalen Syndromen	Asien, West- u. Zentraleuropa Nord- und Südamerika	Nagetiere	wie bei Arenaviren
<b>Filoviridae</b>				
Marburg	Marburg HF	Subsahara	Unbekannt	Mensch zu Mensch und
Ebola	Ebola HF	Subsahara	Unbekannt	nosocomial
<b>Flaviviridae</b>				
Gelbfieber	Gelbfieber	Tropenamerika, Subsahara	Affen	Moskitos
Dengue	Dengue Fieber	Asien, Afrika, Amerika	Affen, Menschen	Moskitos
Kyansur Fieber	Kyansur Fieber	Indien	Affen, Nagetiere	Zecken
Omsk	Omsk HF	Russland	Nagetiere	Zecken

Virale hämorrhagische Fieber (VHF) beginnen meistens plötzlich mit Bradykardie, und Allgemeinsymptomen wie Unwohlsein, Abgeschlagenheit und Muskelschmerzen. Extreme Hypotension und Schocksymptomatik komplizieren den Verlauf. Hämorrhagien können dabei harmlos bis lebensbedrohlich sein. Oft wird die Erkrankung von schwerer Leberschädigung begleitet, wobei in einigen Fällen auch ein Nierenversagen im Vordergrund stehen kann. Bei allen Formen des VHF kommen sowohl Thrombozytopenien als auch Hämokonzentrationen vor. Hämorrhagisches Fieber (HF) verursachende Viren verändern die Hämostase auf zwei verschiedene Art und Weisen. Zum einen beeinträchtigen sie direkt die Funktion der für die Hämostase wichtigen Endothelzellen und der Thrombozyten, zum anderen beeinflussen sie diese indirekt über immunologische und entzündliche Pathomechanismen. Beide Mechanismen können zur Zellschädigung bis hin zum Zelltod führen.

Das Zusammenspiel von Hämostase, Immunantwort und Entzündungsreaktion ist sehr komplex. Einerseits regulieren Immun- und Entzündungsmediatoren die Hämostase, andererseits steigern Gerinnungsfaktoren die Entzündungsreaktion und modulieren die Immunantwort. Daher ist es unmöglich diese Reaktionen streng von einander zu trennen.

Betrachtet man den Hämorrhagiemechanismus der viralen hämorrhagischen Fieber, so spielen hier die Thrombozyten, die disseminierte intravasale Gerinnung (DIG), die Intaktheit des Endothels, und das Vorhandensein der Gerinnungsfaktoren (das wiederum von der hepatischen Funktion abhängig ist) die entscheidende Rolle (Chen und Cosgriff, 2000).

### **Thrombozyten**

Bei viralen Infektionen wird oft eine Thrombozytopenie beobachtet und bei viralem hämorrhagischem Fieber ist sie fast immer präsent. Ursache hierfür kann sowohl ein vermehrter Abbau als auch eine reduzierte Produktion sein. In schweren Fällen kann eine Thrombozytopenie auch zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG) führen. Neben einer Thrombozytopenie kann gleichzeitig auch eine Thrombozytendysfunktion vorliegen. Diese scheint beim Lassa Fieber eine besondere Rolle zu spielen. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass mit dem Pichinde Virus (ein nicht humanpathogenes Arenavirus) infizierte Meerschweinchen Megakaryozyten (kernhaltige Vorläuferzellen der Thrombozyten) aufweisen, die das Virus enthalten (Chen und Cosgriff, 2000).

Die Thrombozyten, von mit Lassa Virus infizierten Patienten, weisen eine herabgesetzte Kapazität für Aggregation als Antwort auf ADP, Kollagen und Natriumarachidonat auf. Eine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion geht mit einer signifikanten

Verschlechterung der Erkrankung einher und ist bis zu 80 % bei den Patienten mit Lassa Fieber vorzufinden, die Hämorrhagien aufweisen, dagegen ist sie nur zu 16 % bei Patienten vorzufinden, die keinerlei Blutungen aufweisen (Chen und Cosgriff, 2000).

### **Gerinnungsfaktoren**

Ein Abfall der Gerinnungsfaktoren kann ebenfalls auf einen erhöhten Verbrauch oder auf eine herabgesetzte Synthese zurückzuführen sein. Ein vermehrter Verbrauch kommt durch die disseminierte intravasale Gerinnung (DIG) zustande, wobei einer herabgesetzten Synthese meist eine Leberdysfunktion zugrunde liegt. Bei HF mit letalem Ausgang wird oft eine prominente Lebernekrose beobachtet. Im Gegensatz hierzu wird beim Lassa Fieber weder im Menschen noch in Tierexperimenten eine DIG vorgefunden. Die Gerinnungswerte sind dabei normal oder nur gering beeinträchtigt (Chen und Cosgriff, 2000).

### **Vaskulopathie**

In einigen HF kommt es durch eine Endothelschädigung des vaskulären Systems zu einer Undichtigkeit der Gefäße und zu einem Verlust der Hämostase. Es wird auch von Kapillardilatation und interstitiellem Ödem berichtet. Beim Lassa Fieber ist jedoch kaum eine vaskuläre Schädigung zu beobachten, obwohl der Flüssigkeitsaustritt in serösen Höhlen auf eine vaskuläre Dysfunktion hinweist. Bei Rhesusaffen mit Lassa Virus Infektionen mit letalem Ausgang waren die pathologischen Läsionen relativ mild, sodass der Tod nicht mit den morphologischen Veränderungen erklärt werden konnte (Chen und Cosgriff, 2000).

*In vitro* wurde eine Infektion von Endothelzellen durch eine Reihe der HF-auslösenden Viren beobachtet, so auch durch das Lassa Virus. Diese Beobachtung allein ist jedoch nicht ausreichend um eine Vaskulopathie zu erklären, da es viele Viren gibt, die ebenfalls im Endothel gefunden werden, jedoch keine Hämorrhagien auslösen, wie z. B. HSV, CMV und Adenoviren (Chen und Cosgriff, 2000).

Einen Überblick über die verschiedenen Mechanismen einer Hämorrhagie bei VHF gibt Tabelle 1.2.

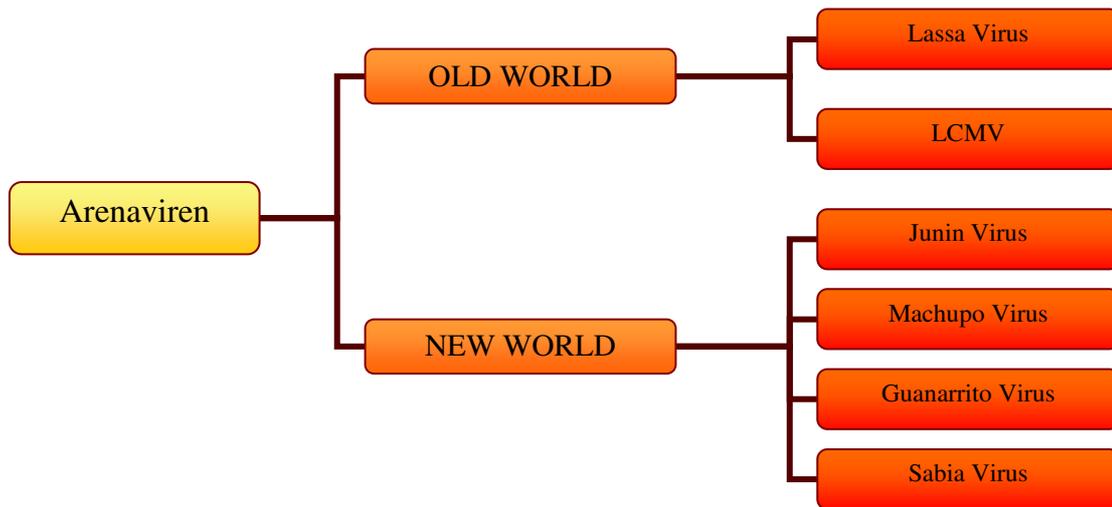
**Tabelle 1. 2 Hämorrhagiemechanismen verschiedener viraler hämorrhagischer Fieber [nach Chen und Cosgriff , 2000].**

Virus	Thrombozytopenie	Thrombozyten-dysfunktion	Mangel an Gerinnungsfaktoren	Disseminierte intravasale Gerinnung	Endothel-schädigung	hepatische Dysfunktion
<b>Arenaviridae</b>						
Lassa	+	+	-	-	+	-
Junin	+	+	-	(-)	+	-
Machupo	+	k. A.	k. A.	k. A.	+	k. A.
Guanarito	+	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Sabia	+	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<b>Bunyaviridae</b>						
Rift Valley	+	k. A.	+	(+)	+	++
Krim-Kongo-Fieber	+	k. A.	+	+	+	+
Hantaviren	+	+	+	+	+	-
<b>Filoviridae</b>						
Marburg	+	k. A.	+	+	+	+
Ebola	+	+	+	+	+	+
<b>Flaviviridae</b>						
Gelbfieber	+	k. A.	+	(+)	k. A.	++
Dengue	+	+	+	+	+	k. A.
Kyasanur F.	+	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Omsk	+	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.

+: wurde beobachtet; -: wurde nicht beobachtet; (:): trifft begrenzt zu; k. A.: keine Angaben

## 1. 2 Arenaviren

Die Familie der Arenaviren wird in zwei Gruppen, „Old World“ und „New World“, unterteilt. Unter den Old World Arenaviren sind LCMV (Europa, Amerika), Lassavirus (Westafrika) und unter den New World Arenaviren sind Junivirus (Argentinien), Machupovirus (Bolivien), Guanarivirus (Venezuela) und Sabiavirus (Brasilien) menschenpathogen (s. Abbildung 1.1)



**Abbildung 1. 1: Systematik der menschenpathogenen Arenaviren**

Alle Arenaviren sind sphärisch bis pleomorph und 50-300 nm (im Mittel: 110-130 nm) groß. Sie bestehen aus einer von der Plasmamembran abgeleiteten Lipidhülle mit „Spikes“, die eine im Ultradünnschnitt granuliert erscheinende Innenstruktur umschließt. Diese Granula, welche als Wirtszellribosomen angesehen werden, haben der Virusfamilie den Namen (lat. *arenosus* = sandig) gegeben. Die Wirtszellribosomen selbst scheinen jedoch bei den Viren keine funktionelle Rolle zu spielen (Kayser et al., 2001; [www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch057.htm](http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch057.htm), 04. 12. 2005; [www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/arena.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/arena.htm), 04. 12. 2005).

Das Virion enthält zwei von einer Lipidhülle umgebene helikale Kapside, die die ringförmige L-RNA („long“) und die S-RNA („short“) umhüllen. Dabei weisen die Arenaviren eine Ambisense-Struktur auf, d. h. ein RNA Abschnitt kodiert sowohl als ein Negativstrang (3`-5`) als auch als Positivstrang (5`-3`). Die L-RNA kodiert für die „große Polymerase“ (LP) und für das Z-Protein (MG ca. 11 kDa), während die S-RNA die genetische Information für die Strukturproteine (GP1, GP2 und NP) enthält. Das L-Protein stellt eine RNA-abhängige RNA Polymerase dar und hat ein MG von ca. 200 kDa. Die Kapsomeren beider Strukturen bestehen aus dem N-Protein (MG ca. 60 kDa). Auf der Hülle befinden sich 2 Glykoproteine: GP1 (MG ca. 44 kDa) und GP2 (MG ca. 75 kDa), die aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein GPC entstehen. Die GPs bilden „Spikes“ auf der Membranhülle der Viren und interagieren mit den Rezeptoren der Wirtszellen. Diese Interaktion ist wichtig für die Viruspenetration. Das NP ist das häufigste vorkommende Protein im Virus und in den von Arenavirus infizierten Wirtszellen. Es ist für die Bildung

des Nukleokapsids zuständig (Cornu et al., 2004; Schmitz, 2004). Auf die Funktion des Z Proteins wird in einem eigenen Unterpunkt näher eingegangen (s. u.). Die Struktur eines Arenavirus ist in der Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

## Arenavirus

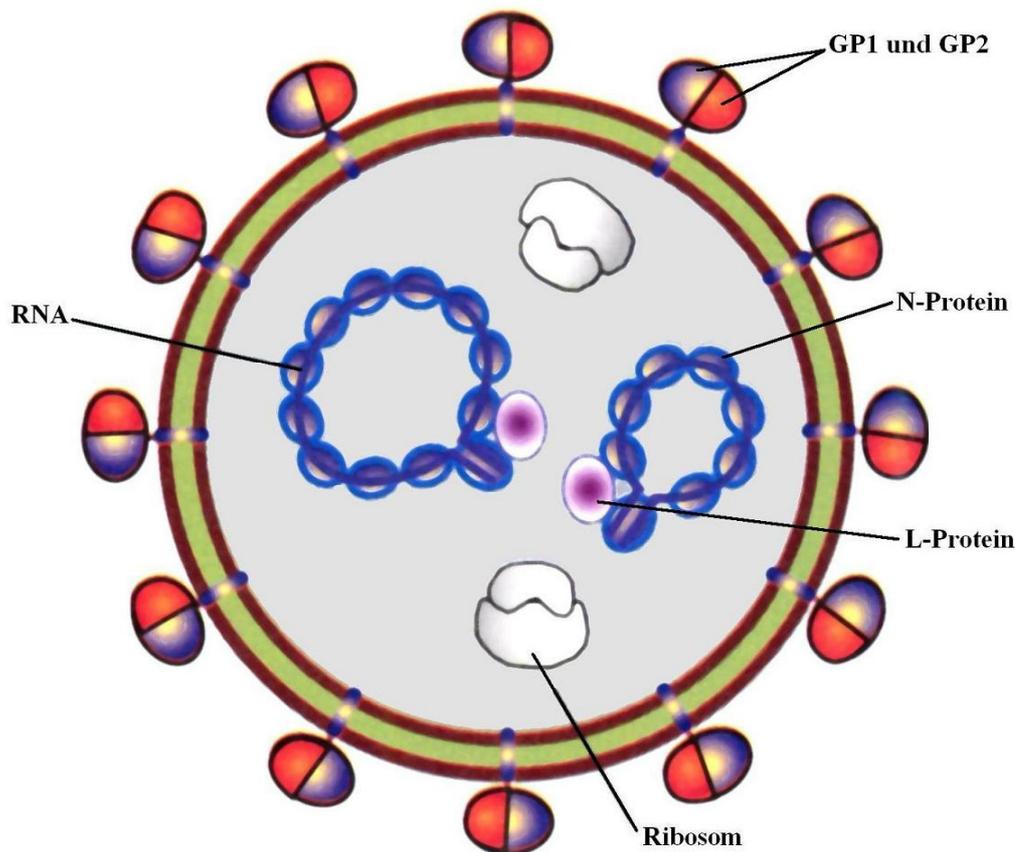


Abbildung 1. 2: Schematische Darstellung eines Arenavirus [modifiziert nach Bernard, 1997]

Jedes Virus ist mit einer oder mit einigen engverwandten Nagetierarten assoziiert, welche ihr natürliches Reservoir darstellen, von dem aus sie die Menschen infizieren können. Die New World Viren haben dabei ihr Reservoir in den New World Nagern (Familie: *Muridae*, Subfamilie: *Sigmodontinae*) und die Old World Viren haben ihr Reservoir in den Old World Nagern (Familie: *Muridae*, Subfamilie: *Murinae*).

Die Viren vermehren sich im Zytoplasma verschiedener Gewebekulturzellen von Nagern, Menschen und Affen und erreichen hohe Infektionstiter. Es bilden sich jedoch auch in großer Zahl nicht infektiöse interferierende Partikel aus (Schmitz, 2004; [www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/arena.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/arena.htm), 04. 12. 2005).

### 1. 2. 1 Das Z Protein

Da sich diese Arbeit hauptsächlich mit den Metall-bindenden Eigenschaften des Z Proteins beschäftigt, soll an dieser Stelle näher auf dieses eingegangen werden.

Das Z Protein hat ein Molekulargewicht von ca. 11 kDa. Es besteht je nach Virusspezies aus 90 bis 103 Aminosäureresten und enthält eine Ringfinger-Signatur. Dieses Sequenz-Motif kommt auch in zahlreichen anderen Proteinen vor, u. a. im Promyelozytenleukämie (PML) Protein, einem Onkoprotein (Borden et al., 1998).

Das PML Protein ist ein Kernprotein und wird in etlichen Säugertierzellen gefunden. Es reguliert das Zellwachstum, indem es die Teilung supprimiert und gegebenenfalls die Apoptose einleitet. Seine Funktion ist bei einigen Erkrankungen wie z. B. der Promyelozytenleukämie und einigen viralen Infektionen (HSV-1, CMV, EBV) beeinträchtigt. Das PML Protein ist in besonders hoher Konzentration in den retikuloendothelialen Zellen vertreten (Flenghi et al, 1995), welche durch Arenaviren am häufigsten infiziert werden (Borden et al., 1998).

Bei einer LCMV Infektion bindet das Z Protein direkt an das hauptsächlich nuklär vorkommende PML Protein und bewirkt den Transfer ins Zytoplasma. Dies scheint unter anderem die Apoptose der infizierten Zelle zu verhindern und eine Chronifizierung einer LCMV Infektion zu begünstigen (Kentsis et al., 2001).

Außerdem interagiert das LCMV-Z-Protein mit der nuklären Fraktion des ribosomalen Proteins P0 und mit dem eukaryotischen Translations Initiations Faktor eIF4E und supprimiert die Translation. Auch das PML Protein inhibiert die Translation durch eine Bindung ans eIF4E (Kentsis et al., 2001). Somit besitzt das Z Protein Eigenschaften, die die Funktion des PML Proteins sowohl hemmen, als auch selbst imitieren.

Das Z Protein des Tacaribe Virus' wird in der initialen Phase einer Infektion auch für die RNA Synthese und Genomreplikation benötigt (Garcin et al., 1993). Im Gegensatz dazu wird das Z Protein des LCMV' nicht für die RNA-Replikation und Transkription des LCMV-Genoms benötigt. Hier wirkt das Z Protein dosisabhängig eher inhibitorisch auf die Transkription und Replikation (Cornu und Torre, 2001; Perez et al., 2003).

Auf diese Tatsachen aufbauend wurden Experimente durchgeführt bei denen sich herausstellte, dass Zellen mit Replikations-defizientem rekombinanten Adenoviren Z Protein (rAd-Z) resistent gegen LCMV und Lassa Virus Infektionen waren. Diese „Z Protein-induzierte“ Resistenz war nicht auf eine Blockade der Penetration, sondern auf eine starke Inhibition der viralen Polymerase durch das Z Protein zurückzuführen (Cornu et al., 2004). D. h. die GP abhängige Penetration in die Wirtszellen blieb unbeeinflusst. Es

wurden jedoch sowohl die Transkription als auch die Replikation stark unterdrückt, was eine drastische Reduktion der infektiösen Viruspartikeln hatte. Diese neuen Kenntnisse eröffnen neue Wege in der antiviralen Therapie der humanpathogenen Arenaviren.

Die Tatsache, dass die Arenaviren kernhaltige Zellen für die Replikation benötigen, obwohl sie selbst im Zytoplasma (Banerjee et al., 1976) repliziert werden, macht das PML Protein zu einem Angriffspunkt als Ersatz für die nukläre Komponente. Die Umverteilung des PML Proteins ins Zytoplasma wirkt oft antiapoptotisch, ein Mechanismus, welcher die nichtzytopathologische Natur der Arenaviren erklärt (Borden et al., 1998).

Eine weiterte Hypothese ist, dass die Arenaviren den Ringfinger des Z Proteins als eine molekulare Mimikrie des PML Proteins verwenden, um den Wirtszellmechanismus auf die virale Replikation umzustellen. Die direkte Interaktion zwischen PML Protein und Z Protein der Arenaviren könnte auch essentiell für die Virulenz sein und könnte somit einen viel versprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung von Medikamenten gegen Arenavirusinfektionen darstellen. Darüber hinaus könnte die Interaktion zwischen PML Protein und Z Protein auch gewisse Pathomechanismen sowohl einer Arenavirusinfektion, als auch der akuten Promyelozytenleukämie erklären (Borden et al., 1998).

Zusätzlich zu den regulatorischen Eigenschaften werden dem Z Protein strukturelle Funktion für den Aufbau der Viruspartikel zugeschrieben. Einigen Experimenten nach ist das in Abwesenheit anderer viraler Komponente exprimierte Lassa-Z-Protein stark membranassoziiert, ebenso wie Matrixproteine anderer RNA-Viren mit einer Lipidhülle. Außerdem ist die Synthese von Z Protein allein ohne andere Virusproteine ausreichend, um lipidumhüllte „Virus-ähnliche“ Partikel zu produzieren, wobei hier die zwei so genannten „late domains“ nahe am C Terminus des Proteins die entscheidende Rolle spielen. Somit scheint dem Z Protein auch eine entscheidende Funktion bei der Freisetzung der viralen Partikel aus der Wirtszelle zu zukommen (Strecker et al., 2003).

### **1. 2. 2 Epidemiologie der Arenaviren**

Bei den Old World Arenaviren wird die Infektion unter den Nagern sowohl horizontal als auch vertikal übertragen, sodass die Infektion von Generation zu Generation weiter getragen wird. Bei den New World Arenaviren kommt nur eine horizontale Übertragung vor, sodass zu einer bestimmten Zeit immer nur ein Teil der Nager infiziert ist. Das spiegelt sich auch im zyklischen Auftreten der durch diese Viren hervorgerufenen

Infektionen bei den Menschen wider ([www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch057.htm](http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch057.htm), 04. 12. 2005).

Bei der Arenavirusinfektion der Nager *in utero* entwickelt sich eine Viruspersistenz ohne deutliche klinische Symptome, während bei erwachsenen Mäusen mit kompetentem Immunsystem schwere Krankheitssymptome und eine Elimination des Virus beobachtet werden. Ein Transfer von Immunzellen (T-Zellen) kann auch bei einem neonatal infizierten, immuntoleranten Tier zu Krankheit und Viruselimination führen (Schmitz, 2004).

Eine Übertragung der Viren auf den Menschen erfolgt meistens über einen direkten oder indirekten (z. B. kontaminierte Nahrungsmittel) Kontakt mit den Exkrementen oder Urin der infizierten Nager. Eine Infektion kann aber auch durch eine Inhalation der, über Urin und Speichel abgegebenen Viruspartikeln aus der Luft (aerogene Transmission) erfolgen (s. Abbildung 1.3).

Im Gegensatz zu den meisten Arenaviren, die nur über Nagetiere die Menschen infizieren, können Lassa und Machupoviren auch direkt von Mensch zu Mensch übertragen werden. Deshalb sind bei der Behandlung der mit diesen Viren infizierten Patienten besondere Sicherheitsvorkehrungen unerlässlich ([www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/arena.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/arena.htm), 04. 12. 2005).

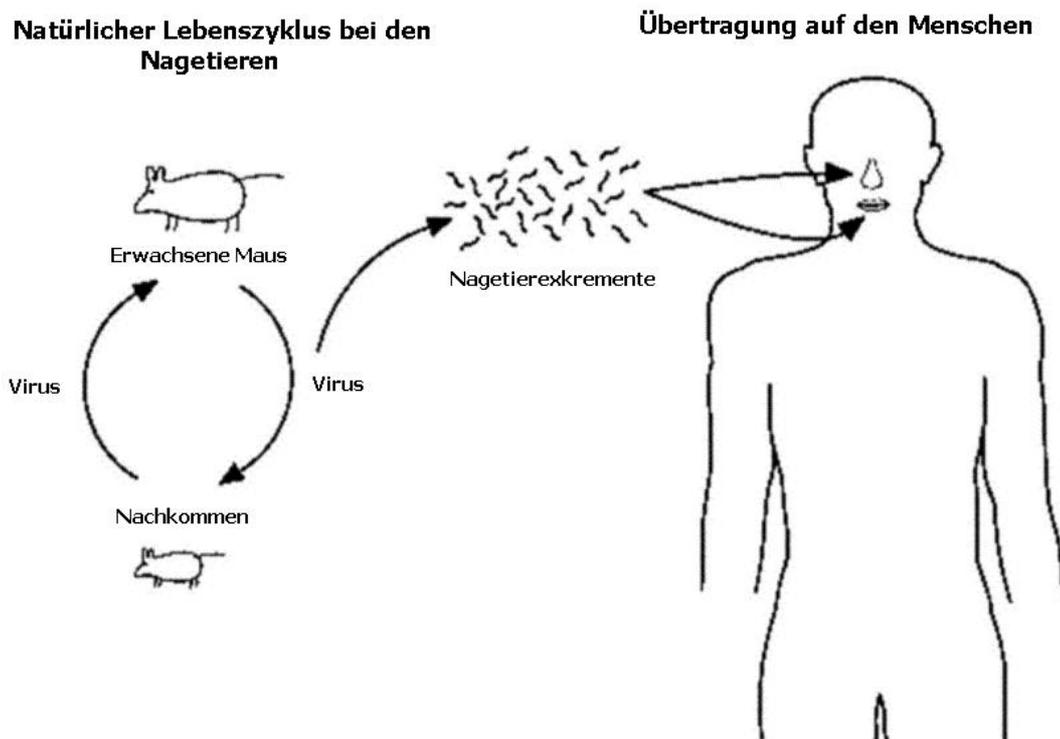


Abbildung 1. 3: Übertragung der Arenaviren auf den Menschen [modifiziert nach [www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch057.htm](http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch057.htm) (04. 12. 2005)]

### 1. 2. 3 Klinische Daten der Arenavireninfektion

#### Erkrankung

Eine Infektion mit Arenaviren kann harmlos (LCMV) bis letal (Lassa-, Junin- und Machupovirus) verlaufen. Nach Ansteckung kommt es nach einer Inkubationszeit von ca. 1-2 Wochen zu einem grippeartigen Krankheitsbild mit hohem Fieber, Kopfschmerzen, Halsschmerzen und gastrointestinalen Symptomen. Gegen Ende der ersten Krankheitswoche können sich Organmanifestationen z. B. am Gehirn, Myokard und Niere entwickeln. Oft bildet sich ein Ödem im Gesicht und in der Halsregion aus, welches zu einer Ateminsuffizienz führen kann. Fast immer besteht eine Hepatitis mit hohen Leberwerten. Je höher diese sind, desto schlechter ist die Prognose. Im Verlauf der Erkrankung kann sich auch eine Enzephalitis entwickeln (Schmitz, 2004).

In schweren Fällen kommt es zum hämorrhagischen Fieber mit petechialen Blutungen in der Haut und in dem gastrointestinalen Trakt. Durch Schock und Herz-Kreislauf-Versagen kommt es bei bis zu 10 % der Patienten mit Lassa Fieber zum Tod, wenn keine spezifische Therapie eingeleitet wird (Kayser et al., 2001; Schmitz, 2004).

#### Diagnostik

Die Arenaviren können gut in Gewebekulturen vermehrt werden. Lassa- und Juninvirus lassen sich auf Verozellen aus dem Plasma/Serum akut Erkrankter anzüchten. Zur Identifizierung des Lassa Virus stehen auch monoklonale Antikörper zur Verfügung. Schneller und zuverlässiger lässt sich das Virus im Serum oder Urin von Patienten mit der RT-PCR nachweisen. Die RT-PCR eignet sich zusammen mit Fluoreszenzsignalmessung auch zur Bestimmung der Viruslast. Jedoch gelingt der Nachweis der viralen RNA schon bevor die Antikörper mit der indirekten Immunfluoreszenz nachweisbar sind. Diese treten meist ca. eine Woche nach Krankheitsbeginn auf. Zur Antikörperbestimmung gibt es mittlerweile ein Dot-Blot-Verfahren mit gentechnisch hergestellten Lassa-Proteinen (Schmitz, 2004).

#### Therapie

Die Vermehrung des Lassavirus' kann beim Patienten durch Gabe von Ribavirin reduziert werden. Eine antivirale Therapie sollte jedoch nur bei Patienten mit hoher Virämie und möglichst in den ersten Krankheitstagen eingeleitet werden. Dadurch kann die Mortalität gesenkt werden (Schmitz, 2004).

## **Prävention**

Zur Prävention steht bislang nur ein Impfstoff für das argentinische hämorrhagische Fieber zur Verfügung. Beim Lassa Virus ließen rekombinante Impfstoffe bei tierexperimentellen Prüfungen eine Schutzwirkung erkennen. Prophylaktische Gaben von Ribavirin für besonders exponierte Personen werden beim Lassa Virus empfohlen (Schmitz, 2004).

### **1.3 Das Lassa Virus**

Das Lassa Virus wurde im Jahre 1969 in West Afrika entdeckt, als zwei Missionsschwestern an einer damals unbekanntem Erkrankung starben. Später wurde das Virus durch Wissenschaftler in Amerika identifiziert und nach dem Ort (Lassa/Nigeria) seines ersten Auftretens benannt.

In endemischen Gebieten verursacht das Lassa Virus eine signifikante Morbidität und Mortalität. Während eine Infektion bis zu 80 % inapparent bis symptomarm verläuft, kann sie bei 20 % der Infizierten zu einem schweren Multiorganversagen führen. Der letale Ausgang bei Lassa Fieber scheint durch eine mangelnde oder eine verspätete zelluläre Immunantwort bedingt zu sein. Eine humorale Immunantwort scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen, da meist keine ausreichenden Mengen an Antikörpern produziert werden die für eine effektive Immunantwort nötig wären (Chen und Cosgriff, 2000; [www.m-ww.de/krankheiten/tropenkrankheiten/lassa.htm](http://www.m-ww.de/krankheiten/tropenkrankheiten/lassa.htm), 23. 03. 2004).

In einigen epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass das Hauptrisiko beim Lassa Virus der Kontakt der afrikanischen Bevölkerung mit dem Blut der Nager (Zubereitung von Ratten als Proteinquelle) darstellt. In Endemiegebieten weisen bis zu 50 % der Untersuchten Antikörper auf. Die Seroprävalenz ist eng an das Vorkommen infizierter Nager gebunden. Reinfektionen sind relativ häufig, zeigen aber keine klinische Symptomatik. Neuere Schätzungen gehen beim Lassa Fieber in den Endemiegebieten von ca. 100.000 Erkrankungen mit ca. 5.000 Todesfällen pro Jahr aus (Schmitz, 2004).

Die Abbildung 1.4 zeigt die Ausbreitung des Lassa Fiebers und die Seropositivität unter den Menschen in Westafrika im Jahre 2003 (Richmond und Baglolle, 2003).



Abbildung 1. 4:  
Ausbreitung des Lassa  
Fiebers und die  
Seropositivität unter  
den Menschen in  
Westafrika im Jahre  
2003 [Richmond und  
Baglolle, 2003]

### Klinischer Verlauf

Die Inkubationszeit des Lassa Fiebers liegt zwischen einer und drei Wochen. Meistens liegt sie jedoch zwischen sieben und zwölf Tagen.

Die Infektion ist im Anfangsstadium klinisch nicht von einem gewöhnlichen grippalen Infekt zu unterscheiden. Die Erkrankung beginnt meist recht unspezifisch mit steigendem Fieber um 39 °C mit Spitzen von 40-41 °C. Bei etwa der Hälfte der Patienten werden Muskel- und Gelenkschmerzen, bevorzugt im Bereich der Lendenwirbelsäule, beobachtet. Am dritten bis vierten Tag tritt ein trockener Husten mit heftigsten Halsschmerzen auf, gefolgt von starken Kopf- und Brustschmerzen. Etwa zwei Drittel der Erkrankten haben Bauchkrämpfe, die mit Erbrechen einhergehen. In schweren Fällen können eine hämorrhagische Bindehautentzündung sowie Schwellungen im Gesicht und Nackenbereich auftreten, die als ein ungünstiges Zeichen für die Prognose zu werten sind. Bei ca. 20 % der Patienten ist eine Perikardentzündung zu erwarten. Meist liegt eine Hypotension vor, die durch ein Blutkreislaufversagen kompliziert werden kann. Weitere Komplikationen sind Nierenversagen, Enzephalitis und schwere Hämorrhagien (s. Tabelle 1.3).

Ob es zu einer Genesung des Kranken kommt oder die Infektion letal endet, entscheidet sich meist zwischen der zweiten und dritten Krankheitswoche. Die Prognose lässt sich nur schwer anhand der Virämie und bestimmten Laborparametern abschätzen.

Bei schwangeren Frauen stellt Lassa Fieber sowohl für die betroffene Frau als auch für die Frucht ein großes Risiko dar. Bei mehr als 80 % der Patientinnen kommt es zum Abort. Sowohl ein Abort als auch eine spontane Geburt verbessern signifikant die

Überlebenschance bei der Mutter (Chen und Cosgriff, 2000; Richmond und Baglole, 2003; [www.m-ww.de/krankheiten/tropenkrankheiten/lassa.htm](http://www.m-ww.de/krankheiten/tropenkrankheiten/lassa.htm), 23. 03. 2004).

**Tabelle: 1. 3 Klinische Einteilung des Lassa Fiebers [nach Richmond und Baglole, 2003]**

Stadium	Symptome
I (1-3 Tag)	Allgemeine Schwäche, Abgeschlagenheit, konstantes hohes Fieber über 39 °C mit Spitzen von 40-41 °C
II (4-7 Tag)	Halschmerzen mit weißlichen Belägen auf der Schleimhaut (häufiges Zeichen), Kopf-, Rücken-, Bauchschmerzen, retrosternale Schmerzen, Konjunktivitis, Nausea und Erbrechen, Diarrhoe, produktiver Husten, Hypotonie (Systole < 100 mmHg), Proteinurie, Anämie
III (nach 7 Tagen)	Gesichtsödem, Krampfanfälle, Schleimhautblutungen (Mund, Nase), interne Blutungen, Desorientierung bis Somnolenz
IV (nach 14 Tagen)	Koma, Tod

#### 1. 4 Das Lymphozytäre Choriomeningitisvirus

Das Lymphozytäre Choriomeningitisvirus (LCMV) wurde als erster Vertreter der Arenavirusfamilie im Jahre 1933 während einer epidemischen Studie von St. Louis Enzephalitis entdeckt. Obwohl nicht der Auslöser dieser Epidemie, konnte LCMV als Agens einer aseptischen Meningitis identifiziert werden ([www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/arena.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/arena.htm), 04. 12. 2004).

Das natürliche Reservoir des LCMV' ist die Hausmaus, *Mus musculus*. Die Infektion der Nager verläuft chronisch, wobei das Virus im Blut nachweisbar bleibt und ständig mit Exkrementen ausgeschieden wird. Chronisch infizierte Mäuse können die Infektion vertikal auf ihre Nachkommenschaft übertragen, welche ihrerseits selbst chronische Träger des LCMV' werden.

Wie bei allen Arenavirus Arten infiziert sich der Mensch durch Inhalation der mit dem Urin, Faeces oder Speichel ausgeschiedenen Partikel, durch kontaminierte Lebensmittel oder direkt durch den Kontakt des Blutes mit offenen Wunden. Eine Mensch-zu-Mensch-Infektion kommt nicht vor, außer bei einer vertikalen Übertragung des Fetus durch die infizierte Mutter ([www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/lcmv.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/lcmv.htm), 04. 12. 2005).

## **Klinischer Verlauf**

Die Inkubationszeit einer LCMV Infektion beträgt in der Regel 8-13 Tage. Klassischerweise folgt danach ein charakteristischer, biphasischer Krankheitsverlauf. Die initiale Phase dauert etwa eine Woche und kann mit Fieber, Anorexie, Nausea, Erbrechen, Muskel- und Kopfschmerzen einhergehen, wobei nicht alle Symptome vorkommen müssen. Daneben kommt es zu einer Leukozytopenie und Thrombozytopenie. Die Leberwerte können leicht erhöht sein.

Nach einer kurzen Remissionsphase von einigen Tagen, beginnt die zweite Krankheitsphase, mit meningitischen (Fieber, Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit) und enzephalitischen (Blutkreislaufstörungen, Bewusstseinsstörungen, sensorische und/oder motorische Ausfälle) Zeichen. Im Liquor kommt es zu einem Protein- und Leukozytenanstieg, wobei der Glukosegehalt sinkt. Es kann auch zu einem akuten intrakraniellen Druckanstieg aufgrund eines Hydrozephalus kommen. In einigen Fällen wurde von Myelitis und Myokarditis berichtet.

Die beiden Manifestationsphasen sind auf eine initiale Immunantwort durch die natürlichen Killerzellen und anschließend durch die zytotoxischen T-Helfer-Zellen zurückzuführen.

Trotz der zum Teil sehr ausgeprägten Symptome kommt es in der Regel zu einer vollständigen Remission. Jedoch lässt sich, wie bei allen Erkrankungen des ZNS, besonders mit Enzephalitiden, ein temporärer oder permanenter neurologischer Schaden nie ganz ausschließen.

Eine congenitale Infektion verläuft in der Regel gravierender als eine erworbene. So kann eine Infektion in der frühen Fetalperiode zu bleibenden Entwicklungsstörungen führen. Auch wurde in einigen Fällen von zentraler Taubheit berichtet.

Obwohl die Infektion in ihrem natürlichen Wirt chronisch verläuft, wurde bei den Menschen keine Persistenz des Virus beobachtet. Eine LCMV Infektion verläuft meist nicht letal. Die allgemeine Mortalität wird nur gering eingeschätzt, wogegen eine congenitale Infektion auch häufig letal enden kann (Chen und Cosgriff, 2000; [www.emedicine.com/ped/byname/lymphocytic-choriomeningitis-virus.htm](http://www.emedicine.com/ped/byname/lymphocytic-choriomeningitis-virus.htm), 30. 01. 2004; [www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/lcmv.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/lcmv.htm), 04. 12. 2005).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Anzucht und Aufarbeitung der Bakterienkulturen im analytischen Maßstab**

#### **Starterkulturen**

Es wurden neun Starterkulturen mit jeweils 3 ml LB-Nährmedium (mit 100 µg/ml Carbenicillin und 25 µg/ml Kanamycin), mit jeweils vier verschiedenen Lassa Z Klonen und LCMV Klonen beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Probe, welche Bakterien ohne das Expressionsplasmid enthielt, diente als Negativkontrolle.

#### **Expressionskulturen**

Am nächsten Tag wurden 10 ml LB-Nährmedium (mit 100 µg/ml Carbenicillin und 25 µg/ml Kanamycin) jeweils 5%ig mit der Starterkultur beimpft. Die Kulturen wurden für ca. 2,5 h inkubiert bis sie eine OD von 0,7 bei 546 nm erreichten. Anschließend wurde die Expression der Z-Gene mit 1 mM IPTG induziert und für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert.

In weiteren Versuchsreihen wurden die IPTG-Konzentrationen, und die Inkubationszeit variiert. Da es sich hier um zinkbindende Proteine handelt, wurden den Expressionskulturen auch verschiedene Zinkkonzentrationen hinzugegeben, um mögliche Effekte auf das Wachstum, die Produktion und die Löslichkeit der Proteine zu untersuchen.

#### **Ernte und Aufreinigung**

Die Zellen wurden bei 5.000 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml TE 50:1 Puffer (50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 1 mM EDTA) suspendiert und wieder bei 5.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zum Aufschließen der Zellen in 1 ml TE 50:1 Puffer suspendiert und über Nacht bei -20 °C eingefroren.

#### **Zellaufschluss**

Nach dem Auftauen wurden die Zellen auf Eis gelagert. Alle weiteren Arbeitsschritte fanden bei 4 °C statt. Die Proben wurden jeweils für 5 x 15 s mit 5 s Pause mit Ultraschall beschallt (Branson Sonifier Cell Disruptor B15, output control: 6, duty cycle 50 %). Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend bei 4 °C für 1 h bei 13.000 U/min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 500 µl TE 50:1 Puffer suspendiert. Jeweils 10 µl Proben der Überstände und der suspendierten Pellets wurden auf SDS-Gel analysiert.

## 2.2 Expressionsbedingungen

Um die möglichen Effekte der Zinkkonzentrationen im Kulturmedium auf die Synthese, Metallbeladung und Löslichkeit des Proteins zu untersuchen, wurden den Kulturen bei der Induktion Zinkchlorid in Konzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM zugegeben. Des Weiteren wurden die Auswirkungen von Kobalt (0,5 mM  $\text{CoSO}_4$ ) alleine und bei gleichzeitiger Zugabe von Zink (0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$ ) untersucht. Weitere Kulturen wurden mit 0,3 mM Eisen ( $\text{FeSO}_4$ ) und ohne Zusätze angesetzt.

In späteren Versuchen wurde auf einer EDTA-Zugabe zum Resuspensionspuffer verzichtet, um zu verhindern, dass EDTA auch das gebundene Metall aus dem Protein herauslöst. Da der Tris-Puffer ebenfalls Eisenionen aus dem Protein herauslösen kann, wurde für die Präparationen mit Eisenzusätzen stattdessen der MOPS Puffer (25 mM, pH: 7,5/NaOH) verwendet.

## 2.3 Rekombinante Expression im präparativen Maßstab

Für die Expressionskulturen im präparativen Maßstab wurden 1 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane gefüllt mit 500 ml LB-Medium verwendet. Die Antibiotikakonzentrationen betragen jeweils: Carbenicillin 100  $\mu\text{g/ml}$  und Kanamycin 25  $\mu\text{g/ml}$ .

Die Lassa Z Expressionskulturen wurden nach dem Erreichen einer optischen Dichte von 0,7 bei 546 nm für 5 h (s. u.) die LCMV Expressionskulturen für 3 h in Anwesenheit von IPTG inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 5.000 g für 20 min zentrifugiert, und die Pellets über Nacht bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen aufgetaut, in ca. 30 ml TE 50:1 Puffer suspendiert und zum Zellaufschluss für 5 min im Eisbad für jeweils 45 s mit 15 s Pause beschallt.

Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile für 1 h bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  mit 18.000 rpm abzentrifugiert (Sorvall RC-5B Zentrifuge mit SS34-Rotor). Die Pellets wurden verworfen, dem Cytosol  $\text{MgSO}_4$  bis zu einer Endkonzentration von 3 mM zugegeben und mit Benzonase (8,5 U/ml) für 1 h bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert, um die restlichen RNA und DNA im Cytosol abzubauen. Danach wurde das Cytosol erneut für 15 min bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und 18.000 rpm zentrifugiert.

## 2.4 Metall-Affinitätschromatographie

Es wurde eine HT5-Ni-NTA-Säule (5 ml Säulenvolumen) verwendet. Das Säulenmaterial enthält metallbindende, mit Nickelionen beladene, Liganden. Das Zielprotein enthält 6xHis-Tag, welcher an die Nickelionen an der Säule bindet. Die nicht mit dem 6xHis-Tag versehenen Proteine werden nicht oder nur schwach an die Säule gebunden. Nachdem die Probe auf die Säule aufgetragen worden ist, wird die Säule mit Puffer gewaschen und mit einem Imidazolgradienten im Laufpuffer eluiert. Da das Imidazol auch eine Affinität zu den am Säulenmaterial gebundenen Nickelionen besitzt, wird das auf Grund des His-Tags auf der Säule gebundene Protein kompetitiv aus seiner Bindung verdrängt. Das auf diese Weise gereinigte Protein kann mit Hilfe des SDS-Gels auf seine „Reinheit“ geprüft werden.

### Vorgehensweise

Als Laufpuffer wurde  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  25 mM, Imidazol 10 mM, NaCl 300 mM mit einem pH-Wert von 8,0 (NaOH) verwendet. Bevor die Probe auf die Säule aufgetragen wurde, wurden  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Imidazol und NaCl zugegeben, um die Konzentrationen dieser Substanzen in der Probe denen des Laufpuffers anzugleichen. Anfänglich wurde mit einem 1. Gradienten von 10 mM bis 80 mM Imidazol in 100 ml und einem 2. Gradienten von 80 mM bis 800 mM Imidazol in 20 ml Laufpuffer eluiert. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 2 ml/min.

Für die weiteren Versuche wurde ein kombinierter Imidazolgradienten verwendet: von 10 mM bis 60 mM in 40 ml, von 60 mM bis 300 mM in 30 ml und von 300 mM bis 800 mM in 20 ml Puffer. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur, die Proben wurden jedoch sofort nach der Trennung auf Eis oder bei 4 °C kühl gelagert oder bei -20 °C eingefroren. Die Metall-Affinitätschromatographie stellte bei allen Proteinreinigungen den ersten Schritt dar.

## 2.5 Gelfiltrationschromatographie

Hierbei werden die Moleküle nach ihrer Masse und Form getrennt. Die Proteine permeieren durch ein poröses Trennmaterial, dessen Hohlräume eine vergleichbare Größe wie die Proteinmoleküle besitzen. Große Proteine dringen nur in wenigen Hohlräumen ein und wandern auf kürzerem Weg weiter. Dagegen werden kleinere Moleküle vom

Trennmaterial länger zurückgehalten. Das Elutionsvolumen verhält sich somit umgekehrt proportional zur Größe (Molekulargewicht) der Proteine.

### **2. 5. 1 Superdex S200 High Resolution**

Hierbei handelt es sich um eine Dextran- und Agarosematrix. Nach den Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences) liegt der optimale Trennbereich zwischen  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Da. Bei einer Ionenkonzentration zwischen 0,15 M und 1,5 M ist eine unspezifische Bindung des Proteins zur Gelmatrix vernachlässigbar klein. Obwohl nicht sehr präzise, kann anhand der Chromatographie auf der Superdex S200 HR-Säule ein grober Eindruck über die molekulare Größe gewonnen werden.

#### **Vorgehensweise**

Es wurden Superdex S200 HR-Säulen mit Volumina von 120 ml und 24 ml verwendet. Der Laufpuffer enthielt Tris 25 mM, NaCl 100 mM und EDTA 0,5 mM bei einem pH-Wert von 8,0 (HCl). Da wir annahmen, dass das EDTA eventuell die proteingebundenen Metallionen herauslösen könnte, wurde in späteren Versuchen auf den Zusatz von EDTA verzichtet. Die Durchflussgeschwindigkeit war 0,5 ml/min bei einem Druck von 4-6 bar und die Fraktionengröße betrug 0,5 ml/Fraktion. Das Probenvolumen betrug 5 % des Bettvolumens der Säule. Bei kleinerem Probenvolumen wurde das Volumendefizit mit entsprechender Menge Laufpuffer ausgeglichen. Bevor die Proben auf die Säule aufgetragen wurden, wurden sie für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um eventuell ausgefallenes Protein zu entfernen. Die Trennung erfolgte stets bei Raumtemperatur.

#### **Eichung der Superdex S200 (24ml)**

Für die Eichung wurden Apoferritin (443 kDa), ADH (150 kDa), BSA (68 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa) verwendet. Es wurden jeweils 100µl Proteinlösung auf 500µl Gesamtvolumen mit dem Laufpuffer (Tris 25 mM; NaCl 100 mM; EDTA 0,5 mM; pH 8,0/HCl) verdünnt und aufgetragen.

### 2. 5. 2 Sephacryl S300 High Resolution

Hierbei handelt es sich um eine Gelmatrix aus einer Vernetzung von Kopolymeren aus Allyl-Dextran und N,N-Methylenbisacrylamide. Die hydrophile Natur des Mediums sorgt dafür, dass eine unspezifische Adsorption möglichst gering gehalten wird. Die Säule zeigt die besten Trenneigenschaften bei Molekulargewichten zwischen  $1 \times 10^4$  und  $1,5 \times 10^6$  Da.

#### Vorgehensweise

Bei dieser Säule wurde ein Probenvolumen von 1 ml gewählt, was einem Anteil von 3,2 % (v/v) des Bettvolumens der Säule entsprach. Die Flussrate betrug während der Auftrennung 0,7 ml/min. Es wurden 7 ml/Fraktion aufgefangen. Als Laufpuffer diente wiederum Tris 25 mM; NaCl 100 mM; EDTA 0,5 mM mit einem pH-Wert von 8,0 (HCl). Die Auftrennung fand bei 4 °C über Nacht (ca. 15 h) statt.

### 2. 5. 3 Superose 6 High Resolution

Superose ist eine großporig vernetzte Agarosematrix. Mit dieser Säule lassen sich Moleküle von einer Größe zwischen  $5 \times 10^3$  und  $5 \times 10^6$  Da trennen. Das Probenvolumen soll dabei 0,5-4 % des Säulenvolumens betragen. Unter normalen Chromatographiebedingungen ist eine unspezifische Interaktion zwischen den Proteinen und der Säule vernachlässigbar klein, wenn man einen ionischen Puffer zwischen 0,15 M und 1,5 M benutzt. Eine geringe hydrophobe Interaktion des Säulenmaterials mit hydrophoben und aromatischen Peptiden und Membran- und Lipoproteinen wurde beschrieben. Da es sich beim Lassa-Z-Protein um ein lösliches Protein handelt, sind derartige Artefakte nicht zu erwarten.

#### Vorgehensweise

Auch der hier verwendete Laufpuffer war Tris 25 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,5 mM bei einem pH-Wert von 8,0 (HCl). Alle Proben wurden zuvor auf der Superdex S200 HR-Säule vorgereinigt und anschließend aufkonzentriert. Das Säulenvolumen war 24 ml und das Probenvolumen 500 µl. Die Proben wurden möglichst ohne zu verdünnen auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min mit einer Fraktionsgröße von 1 ml bei einem Druck von 3-4 bar. Vor dem Auftrag wurden die Proben jeweils für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Alle Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt.

## 2. 6 Konzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden durch Ultrafiltration mit einer Amicon-Membranfiltrationszelle unter Verwendung von Membranen mit einer molekularen Ausschlussgröße von 3.000 Da konzentriert.

## 2. 7 Dialyse

Einige Proben wurden dialysiert, um die gebundenen Metallionen zu entfernen. Der Dialysepuffer enthielt Tris 25 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM und DTT 5 mM, pH 8,0/HCl. Ein Ansatz wurde gegen einen Dialysepuffer mit 1 mM Zink dialysiert (Tris 25 mM, NaCl 100 mM, Zink 1 mM, EDTA 0,5 mM und DTT 5 mM, pH 8,0/HCl), um dessen Auswirkung auf das Protein zu analysieren. Es wurde jeweils 2-3 ml Proteinlösung (ca. 1-2 mg Protein) gegen 1 l Puffer dialysiert. Die Dialyse wurde bei +4 °C für mindestens 2-3 Tage durchgeführt.

## 2. 8 Diskontinuierliches Laemmli-Gel (SDS-Gel)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, sodass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke mit der der bekannten Proteine (Marker).

### Vorgehensweise

Die hier verwendeten Trenngele wiesen eine Acrylamidkonzentration von 15 % (T) und einen Bisacrylamidanteil von 2,7 % (C) auf. Das gegossene Trenngel wurde vorsichtig mit Wasser überschichtet und zur Polymerisation für 45-60 min stehengelassen. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und erneut für 30-45 min stehengelassen. Das

Probenvolumen betrug 10 µl. Zu jeder Probe wurden 5 µl Probenpuffer zugesetzt. Nach 5 min Inkubation bei 95 °C und anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1-2 min wurden die Proben aufgetragen. Als Marker diente der „Protein Molecular Weight Marker“ der Firma Fermentas. Als Anoden- und Kathodenpuffer wurde Tris 25 mM, Glycin 192 mM, 0,1 % SDS, pH 8,3 verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 150-200 V und einer Stromstärke von 20 mA. Bei zwei simultan laufenden Gelen wurde die Stromstärke verdoppelt. Nach Beendigung der Trennung wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue in Essigsäure 10 %, Methanol 50 % gefärbt und mit einer Lösung von Essigsäure 10 %, Methanol 40 % entfärbt.

## **2.9 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung wurde photometrisch nach der Methode nach Bradford durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine colorimetrische Proteinbestimmung, die auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine beruht.

### **Vorgehensweise**

Die Eichgerade wurde mit BSA als Standard erstellt. Sowohl für die Eichgerade als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Für jede Probe wurden möglichst drei verschiedene Verdünnungen verwendet. Nach Zugabe der gebrauchsfertigen Reagenzien und sorgfältiger Mischung dieser mit dem Vortex-Schüttler wurden die Proben für 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Extinktionen bei 750 nm gemessen wurden.

## **2.10 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)**

Die Atomabsorptionsspektroskopie ist eine gebräuchliche Methode zur quantitativen Bestimmung von Metallen und Halbmetallen in wässriger Lösung. Das Wasser wird zunächst in einem Argon-Strom verdunstet. Anschließend wird das organische Material in der Probe verascht. Danach wird bei hoher Temperatur der Rückstand „atomisiert“, d. h. in ein Plasma überführt. Wie bei der Photometrie wird Licht geeigneter Wellenlänge eingestrahlt, welches von dem im Plasma befindlichen Atomen des zu bestimmenden Elements absorbiert wird. Die Lichtschwächung ist proportional zur Konzentration des

Elements. Die quantitative Bestimmung erfolgt mit Kalibrierlösungen bekannter Konzentrationen des Zielementes.

### **Vorgehensweise**

Es wurde standardgemäß eine Eichgerade mit bekannten Metallkonzentrationen erstellt. Die Proben wurden so weit verdünnt, bis die gemessene Konzentration im mittleren Bereich der Eichkurve zu liegen kam. Es wurden stets mehrere Messungen der jeweiligen Proben durchgeführt, um die Messfehler möglichst gering zu halten. Anschließend wurden die gemessenen Werte gemittelt und auf die Ausgangskonzentration hochgerechnet.

## **2. 11 Mößbauerspektrometrie**

### **2. 11. 1 Prinzip der Mößbauerspektrometrie**

Seit der Entdeckung der rückstoßfreien Kernresonanzabsorption von Gamma-Strahlen hat sich die Mößbauerspektroskopie zu einer wichtigen Untersuchungsmethode in der Festkörperphysik und -chemie entwickelt.

Obwohl eine ganze Reihe von Elementen Isotope besitzen, die den Mößbauereffekt zeigen, kommen für die praktische Anwendung nur wenige in Betracht. Die für die Festkörperchemie wichtigsten Isotope sind:  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{119}\text{Sn}$ ,  $^{121}\text{Sb}$  und  $^{151}\text{Eu}$ , wobei für  $^{57}\text{Fe}$  besonders günstige Verhältnisse vorliegen.

Zur Charakterisierung von Eisenzentren in Proteinen bietet die Mößbauerspektroskopie die Möglichkeit sowohl die elektrischen wie auch die dynamischen Eigenschaften des Metallzentrums zu studieren. Mößbauerspektroskopie ist eine Kernspektroskopie. Die Energie des Kernübergangs des Isotops  $^{57}\text{Fe}$  vom Grundzustand zum ersten angeregten Zustand beträgt 14,4 keV. Durch die Hyperfeinwechselwirkung des Eisenkerns mit der Elektronenhülle wird dieser Energieunterschied beeinflusst. Der Eisenkern wird also wie in der NMR (= Nuclear Magnetic Resonanz) als Sonde für Veränderungen in die Elektronenhülle benutzt. Betrachtet man einen freien Eisenkern, der ein Gamma-Quant aussendet so steht dem Gamma-Quant nicht die ganze Energie durch den Übergang vom angeregten Kernzustand in den Grundzustand zur Verfügung, da neben der Energieerhaltung auch die Impulserhaltung erfüllt sein muss. Der Eisenkern erleidet also einen Rückstoß und damit wird ein Teil der Energie in kinetische Energie des Kerns umgewandelt. Dieser Vorgang ist mit dem Abschuss einer Kanone vergleichbar. Hier dient

eine Lafette dazu, den Rückstoß der Kanone aufzunehmen. Wenn das ausgesendete Gamma-Quant nun auf einen anderen Eisenkern trifft, so kann es nicht absorbiert werden, da die Energie des Gamma-Quants kleiner ist als die zum Übergang benötigte Energie. Es findet also keine Resonanzabsorption statt.

Ist das Eisenatom und damit auch der Eisenkern aber in einem Gitter eingebaut, so wird der gesamte Rückstoß von der Umgebung des Eisenatoms aufgenommen, die Rückstoßenergie ist nahezu null. Trifft das Gamma-Quant nun auf einen Eisenkern, der sich ebenfalls in einem Gitter befindet, so findet Resonanzabsorption statt. Dieser Effekt wird Mößbauereffekt genannt.

Ein Eisenatom in einem Protein ist bei Raumtemperatur relativ schwach gebunden, so dass kein Mößbauereffekt auftreten kann. Aus diesem Grund werden biologische Proben standardmäßig bei Temperaturen von 77 K oder weniger untersucht.

Um ein Spektrum aufzunehmen, muss die Energie der Gamma-Quanten variiert werden können. Dies wird dadurch erreicht, dass die Quelle auf einer Art Lautsprecherantrieb montiert wird, der sich hin und her bewegt. Durch den Dopplereffekt erhöht sich nun die Energie des Gamma-Quants, wenn der Antrieb sich zur Probe hin bewegt und erniedrigt sich dementsprechend, wenn die Quelle von der Probe weg bewegt wird. Aus diesem Grund wird auf der Abszisse eines Mößbauerspektrums die Geschwindigkeit der Quelle aufgetragen ([www.physik.uni-luebeck.de/~paulsen/biophysik/6-MB.PDF](http://www.physik.uni-luebeck.de/~paulsen/biophysik/6-MB.PDF); 08. 02. 2006).

### **Weitere Parameter der Mößbauerspektroskopie**

Die Isomerieverschiebung:

Die physikalische Ursache für die Beobachtung einer Isomerieverschiebung ist die elektrische Monopolwechselwirkung zwischen Kern und Elektronenhülle. Diese bietet insbesondere die Möglichkeit, Oxidationszustände von Eisenzentren in Biomolekülen zu bestimmen.

Die Quadrupolaufspaltung:

Der Grund für die Quadrupolaufspaltung liegt in der elektrischen Quadrupolwechselwirkung zwischen Kern und Elektronenhülle. Der Grundzustand des Eisenkernes wird dabei nicht beeinflusst. Der angeregte Kernzustand allerdings spaltet sich in Anwesenheit eines Gradienten des elektrischen Feldes am Kernort in zwei Energiezustände auf. Der Energieunterschied ist die Quadrupolaufspaltung.

Der elektrische Feldgradient setzt sich aus mehreren Beiträgen zusammen: Der Beitrag der umgebenden Liganden (auch Gitterbeitrag genannt) enthält Information über die

Geometrie des Eisenbindungsplatzes. Der elektrische Beitrag setzt sich aus Valenzanteil und einen kovalenten Anteil der Elektronenhülle zusammen.

Das magnetische Hyperfeinfeld:

Wenn der Eisenkern ein magnetisches Feld verspürt, werden die Energieniveaus von Grundzustand und angeregtem Zustand aufgespalten. Dabei spaltet sich der Grundzustand des Eisenkernes in zwei Zustände und der angeregte Zustand in vier Zustände auf. Insgesamt gibt es also sechs erlaubte Übergänge und damit sechs Linien im Mößbauerspektrum ([www.physik.uni-luebeck.de/~paulsen/biophysik/6-MB.PDF](http://www.physik.uni-luebeck.de/~paulsen/biophysik/6-MB.PDF); 08. 02. 2006).

Zusammenfassung:

Im Vorangehenden wurden nur die wichtigsten Messparameter der Mößbauerspektroskopie vorgestellt. Doch können je nach Art der Fragestellung auch Form und Breite der Linie, Resonanzintensität, Effekt eines externen Magnetfeldes, Winkelfeldes, Winkelabhängigkeit der Spektren bei Einkristallen und Temperatur- und Druckabhängigkeit all dieser Parameter wichtige Informationen liefern. Zur Aufklärung von Oxidationszahlen, lokaler Bindungssymmetrie und magnetischer Struktur in vielen kristallinen und amorphen Festkörpern spielt die Mößbauerspektroskopie eine wichtige Rolle.

### **2. 11. 2 Interpretation der Mößbauerspektren**

Die Interpretation von komplexen Mößbauerspektren erfolgt mit Hilfe von verschiedenen Computerprogrammen. Hierbei wird das experimentell erhaltene Spektrum in Subspektren zerlegt, die aufgrund ihrer charakteristischen Parameter einzelnen Metallzentren zugeordnet werden können. Durch die Anpassung der Parameter der Subspektren wird versucht, das experimentell erhaltene Spektrum möglichst genau zu simulieren. Im Verlauf dieser Vorgehensweise können auch nicht direkt aus dem experimentellen Spektrum abgeleitete Informationen, wie z. B. die aus der Sequenz eines Proteins vorhergesagte Zahl und Art der Metallbindungsstellen berücksichtigt werden.

Da sich das Mößbauerspektrum eines Metallzentrums in vorhersagbarer Weise verändert, wenn die Messbedingungen (z.B. Temperatur, oder Stärke eines externen Magnetfeldes),

oder der Oxidationszustand des Metallzentrums verändert werden, kann auf diese Weise die Interpretation eines Mößbauerspektrums überprüft werden.

Die in dieser Arbeit gezeigten Mößbauerspektren wurden von Herrn Dipl. Phys. Lars H. Böttger am Institut für Physik der Universität zu Lübeck gemessen und interpretiert.

### **2. 11. 3 Proteinpräparation für die Mößbauerspektrometrie**

Für die Mößbauerexperimente wurden die Expressionsbedingungen leicht verändert. Die Kulturen wurden in einem halbkonzentrierten YT-Nährmedium statt LB-Medium inkubiert, welche mit einer 2%igen Starterkultur beimpft (10 ml/500 ml) wurden. Bei der Induktion wurden 0,25 mM Eisen-57 zugesetzt.

Auch hier wurde im Waschpuffer auf einen EDTA-Zusatz verzichtet und statt den Tris ein MOPS Puffer (25 mM, pH: 7,5/NaOH) verwendet. Die weiteren Versuchsbedingungen blieben gleich.

### **2. 11. 4 Herstellung der Eisen-57-Lösung für die Mößbauerspektrometrie**

85 mg Eisen-57-Blech wurde in 2,7 ml halbkonzentrierter Salzsäure in einem 50 ml großen Erlenmeyerkolben für ungefähr 3 h geköchelt, bis das Eisenblech ganz aufgelöst war. Anschließend wurden zwei Mal 2,7 ml Wasser zugegeben und fast zur Trockene eingedampft. Abschließend wurden 54 ml Wasser zugesetzt und die Lösung mit einer Spatelspitze Ascorbinsäure reduziert. Nach dieser Prozedur liegt der pH-Wert normalerweise zwischen 4-5. Liegt er niedriger, wird er mit NaOH auf 4-5 eingestellt.

## 2. 12 Proton Induced X-ray Emissions-(PIXE) Spektroskopie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die PIXE-Spektroskopie zur Analyse des Metallgehalts des Lassa-Z-Proteins eingesetzt. Da simultan auch der Schwefelgehalt der Probe bestimmt werden kann, erlaubt die PIXE-Spektroskopie (sofern die Proteinsequenz bekannt ist) die direkte Bestimmung des Proteins zum Metallverhältnis.

Da im Gegensatz zur Atomabsorptionsspektroskopie auf eine separate (fehlerbehaftete) Proteinkonzentrationsbestimmung verzichtet werden kann, liefert die PIXE-Spektroskopie besonders genaue Ergebnisse.

### 2. 12. 1 Prinzip der Proton Induced X-ray Emissionsspektroskopie

Hierbei werden durch den von der Protonenmikrosonde erzeugten Protonenmikrostrahl Elektronen aus der inneren Schale eines Atoms herausgelöst. „Fällt“ ein Elektron von einer weiter außen liegenden Schale in die freigewordene Stelle der inneren Schale (energetisch günstiger Zustand), so entsteht ein Röntgenquant, dessen Energie der Energiedifferenz der Schalen entspricht. Das Röntgenquant ist somit charakteristisch für die Energiedifferenz und damit für das Element, in dem es erzeugt wurde.

Der Nachweis der Röntgenquanten erfolgt mit Si(Li)-Halbleiterdetektoren. Die zu untersuchenden Proben können mit dem fokussierten Protonenmikrostrahl abgetastet werden, so dass es möglich ist, Elementverteilungen und -konzentrationen orts aufgelöst zu bestimmen und darzustellen.

Die PIXE-Analytik zeichnet sich durch folgende Charakteristika aus:

- 1) Es können geringe Probenmengen ( $10^{-3}$  g bis  $10^{-10}$  g) analysiert werden
- 2) Alle Elemente mit Ordnungszahlen  $Z > 13$  (schwerer als Aluminium) werden gleichzeitig erfasst, d. h. sie werden nicht „übersehen“, auch wenn man nicht explizit nach ihnen sucht. Eine Aussage über die chemische Bindungsform der Elemente ist im Allgemeinen jedoch nicht möglich.
- 3) Es werden alle Elemente zwischen der Oberfläche und der Reichweite der Protonen in der Probe (abhängig von der Flächendichte etwa  $10\ \mu\text{m} - 30\ \mu\text{m}$ ) nachgewiesen.
- 4) Die Nachweisgrenze liegt (je nach Element und Art der Probe) bei etwa  $10^{-15}$  g bzw. bei Konzentrationen von einigen ppm (= parts per million =  $\mu\text{g/g}$ ).

- 5) Es ist kein nasschemischer Aufschluss der Proben nötig, wodurch sich die Gefahr der Kontamination verringert.
- 6) Die Proben werden i. allg. auf einen dünnen organischen Trägerfilm, der auf einen Aluminiumrahmen gespannt ist, aufgebracht. Da die Analyse im Hochvakuum ( $10^{-6}$  mbar) durchgeführt wird, müssen wasserhaltige (z. B. organische) Proben zunächst getrocknet (z. B. Gefriertrocknung) werden.
- 7) Die Analysemethode ist zerstörungsfrei.

([www.physnet.uni-hamburg.de/home/vms/group\\_u/ueberuns.htm](http://www.physnet.uni-hamburg.de/home/vms/group_u/ueberuns.htm), 29. 11. 2005)

## **2. 12. 2 Proteinpräparation für die PIXE-Versuche**

Auch für die PIXE-Untersuchungen wurde mit leicht veränderten Expressionsbedingungen gearbeitet. Die Kulturen wurden in einem halbkonzentrierten YT-Nährmedium statt LB-Medium inkubiert, welches 2%ig (10 ml/500 ml) mit der Starterkultur beimpft wurde. Zu Beginn der Induktion wurde 0,1 mM Zink zugesetzt. Die Säulenlaufpuffer und die eluierten Fraktionen wurden stets mit Stickstoff begast, um Metallverluste durch Oxidation zu verhindern.

Für die PIXE Messungen ist es wichtig, dass die Proben möglichst frei von Schwefel und Chlorid sind. So wurden die pH-Einstellungen bei der Pufferherstellung mit Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) an Stelle von Salzsäure ( $\text{HCl}$ ) vorgenommen. Die weiteren Versuchsbedingungen wurden beibehalten.

Die Proben für die PIXE-Versuche wurden freundlicherweise von Frau Doris Mutschall vorbereitet und die eigentlichen Messungen von Herrn Wolfram Meyer-Klaucke durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Optimierung der Wachstumsbedingungen der *E. coli*-Kulturen

Die Analyse der löslichen Fraktionen der Expressionsklone zeigte eine zusätzliche, im Cytosol der Negativkontrolle nicht erkennbare Proteinbande (s. Abbildung 3.1).

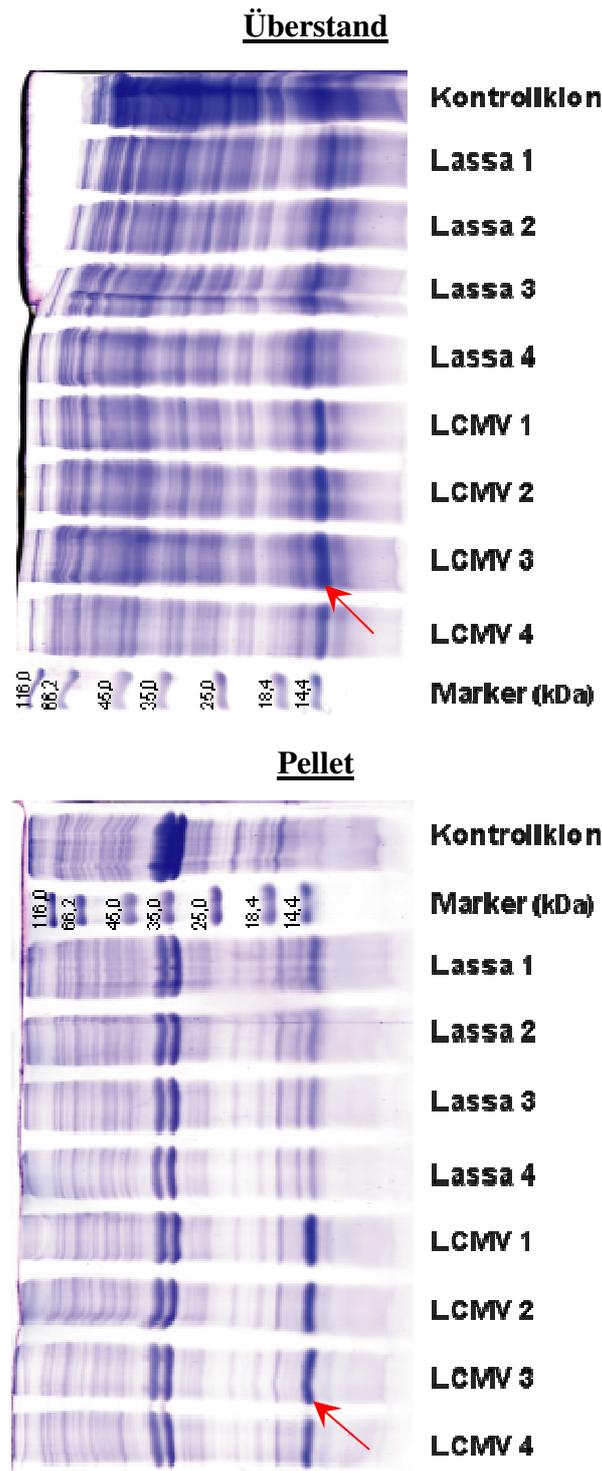


Abbildung 3. 1:

SDS-PAGE-Analyse der löslichen (Überstand) und der unlöslichen Proteinfractionen (Pellet) der Lassa Z und LCMV Z Expressionsklone.

Die Fraktionen der Expressionsklone zeigen eine zusätzliche in der Negativkontrolle nicht erkennbare Proteinbande, deren Größe unter 14,4 kDa liegt (s. Pfeile).

Die Banden sind in den Überständen deutlicher ausgeprägt als in den Pellets. Im Vergleich zum LCMV scheint das Lassa-Z-Protein fast ausschließlich in löslicher Form vorzuliegen.

Das Molekulargewicht dieses Proteins liegt unterhalb von 14,4 kDa und entspricht dem erwarteten Wert für das Lassa Z bzw. LCMV-Z-Protein, welches ca. 11,9 kDa schwer ist. Diese zusätzlichen Banden sind bei den Proben der Lassa Z Expressionsklone in der löslichen Fraktion sehr viel deutlicher erkennbar, als in den Proben der unlöslichen Fraktionen. Daraus lässt sich schließen, dass das Lassa-Z-Protein überwiegend in löslicher Form synthetisiert wird.

Auch die Proben der LCMV Expressionsklone lassen eine zusätzliche Bande erkennen. Vergleicht man die Lassa Z und LCMV-Z-Proteine untereinander, so ist relativ zu Lassa Z mehr LCMV Z in den unlöslichen Fraktionen vorzufinden. Dies weist auf eine schlechtere Löslichkeit oder einen größeren Anteil an fehlgefaltetem Protein hin (s. Abbildung 3.1).

Für alle weiteren Versuche wurde bei Lassa Z der Klon 4 und bei LCMV Z der Klon 3 verwendet, da diese jeweils die stärkere Bandenintensität des Zielproteins aufwiesen.

### **IPTG-Konzentration**

Um die optimale IPTG-Konzentration herauszufinden wurden bei der Induktion IPTG-Endkonzentrationen von 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM und 2 mM getestet. Da die Expressionen auf dem SDS-Kontroll-Gel keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen IPTG-Konzentrationen zeigten, (lediglich ohne IPTG wurde erwartungsgemäß kein Protein synthetisiert) wurde für alle weiteren Versuche die Standardkonzentration von 1 mM verwendet.

### **Zinkkonzentration**

Um die optimale Zinkkonzentration zu ermitteln wurde mit 1 mM IPTG induziert. Zum Zeitpunkt der Induktion wurde zusätzlich Zink in Endkonzentrationen von 0,025 mM, 0,05 mM, 0,1 mM und 0,5 mM zugegeben. Beim Lassa-Z-Protein zeigten sich keine Unterschiede in der Intensität der Banden auf dem SDS-Gel (s. Abbildung 3.2), trotzdem lässt sich jedoch ein Effekt auf die Besetzung des Proteins mit Zink nicht ausschließen. Ein weiterer Befund ist, dass die unlöslichen Fraktionen kein Lassa-Z-Protein mehr enthielten. D. h. nach der Zinkzugabe liegt das Protein ausschließlich in löslicher Form vor (s. Abbildungen 3.2 und 3.3).

Für das LCMV-Z-Protein ist die stärkste Bande in der löslichen Fraktion bei einer Zn-Konzentration von 0,1 mM zu beobachten. Die Proben zeigen sowohl bei größerer als auch kleinerer Zinkkonzentration eine geringere Intensität der Banden (s. Abbildung 3.2).

## Zinkkonzentration

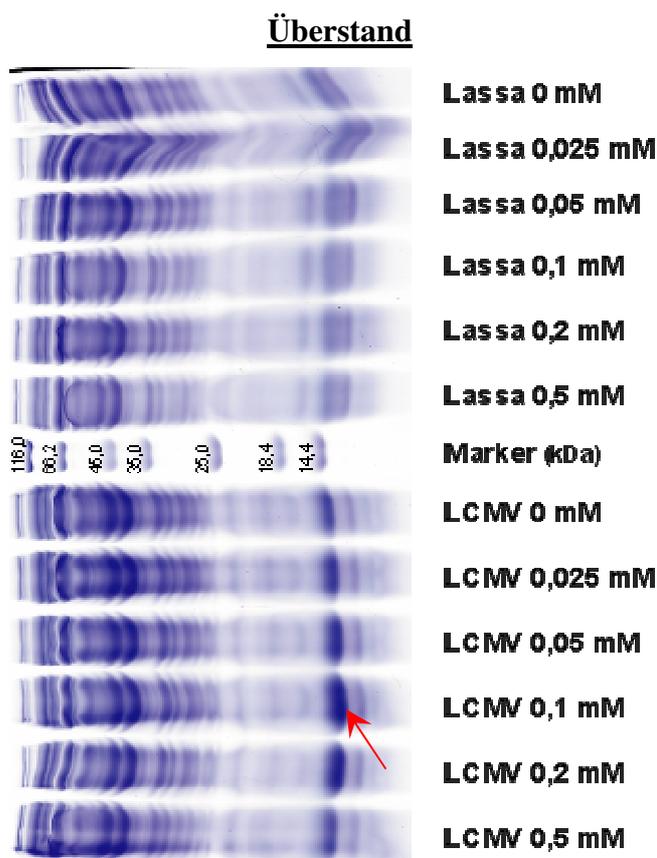


Abbildung 3. 2:

Einfluss der Zinkkonzentration im Medium auf die Synthese der löslichen Formen der Lassa Z und LCMV-Z-Proteine.

Das Lassa-Z-Protein zeigt keinen Unterschied in der Intensität der Banden. In weiteren Versuchen zeigte sich jedoch, dass zu hohe Zinkkonzentrationen sich negativ auf das Bakterienwachstum und somit auf die Proteinausbeute wirkten.

Im Falle des LCMV-Z-Proteins ist die stärkste Bande in der löslichen Fraktion bei einer Zn-Konzentration von 0,1 mM zu erkennen (s. Pfeil, im Original Bande deutlicher ausgeprägt). Die Proben zeigen sowohl bei größerer als auch kleinerer Zn-Konzentration eine geringere Intensität der Banden.

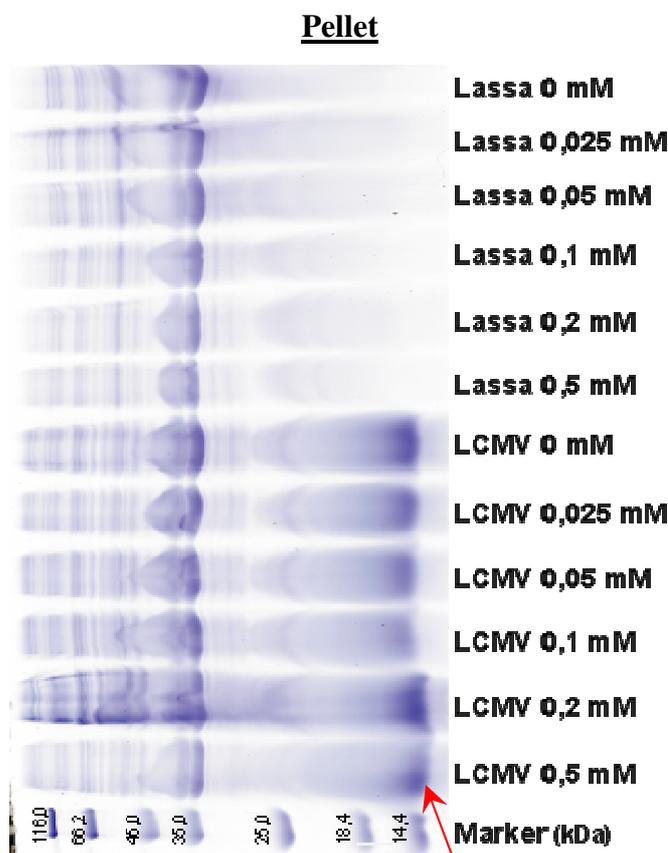


Abbildung 3. 3:

Einfluss der Zinkkonzentration im Medium auf die Synthese der unlöslichen Formen der Lassa Z und LCMV-Z-Proteine.

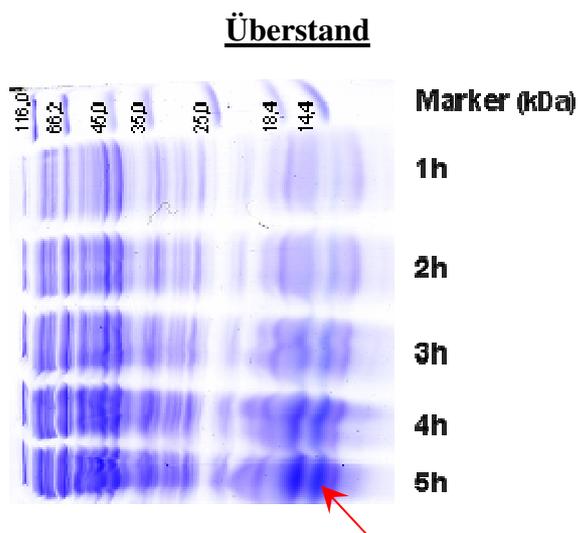
In den unlöslichen Fraktionen der Lassa Z Expressionsklone sind keine Lassa-Z-Proteinbanden zu erkennen, was für eine gute Löslichkeit des Lassa-Z-Proteins spricht.

Für das LCMV-Z-Protein zeigen sich auch in den unlöslichen Fraktionen deutliche Proteinbanden (s. Pfeil), wobei die Intensität der Bande in der Fraktion aus der in Anwesenheit von 0,1 mM Zink induzierten Kultur deutlich schwächer ist.

## Inkubationszeit

Für Lassa Z zeigte sich eine deutlich vermehrte Proteinausbeute bei einer Inkubationszeit von 5 h (s. Abbildung 3.4). Deshalb wurde für alle weiteren Versuche mit dem Lassa Z Klon eine Inkubationszeit von 5 h verwendet. Bei dem LCMV Z Klon erwies sich eine Inkubationszeit von 3 h ausreichend.

### Inkubationszeit des Lassaklons



**Abbildung 3. 4:**

**Synthese des Lassa-Z-Proteins in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach IPTG-Zugabe. Analysiert wurden die löslichen Proteinfractionen aus der Expressionskultur.**

**Das Lassa-Z-Protein zeigt bei einer Inkubationszeit von 5 h die ausgeprägteste Proteinbande (s. Pfeil).**

## 3. 2 Metall-Affinitätschromatographie

Für die erste Trennung wurden zwei Imidazolgradienten, von 10 mM bis 80 mM und von 80 mM bis 800 mM verwendet. Durch beide Gradienten wurde Protein von der Säule eluiert, wobei der zweite Proteinpeak „doppelgipflig“ war. Auf dem SDS-Gel zeigte sich, dass mit dem ersten Gradienten Verunreinigungen eluierten. Der mit dem zweiten Gradienten eluierte Doppelpick enthielt das Lassa-Z-Protein. Für weitere Versuche wurde deshalb der zweite Gradient nochmals unterteilt, da wir im zweiten Peak zwei übereinander gelagerte Komponenten vermuteten, was sich später auch bestätigte.

Beim LCMV wurde stets der oben beschriebene dreiphasige Gradient verwendet. Die Trennung entsprach der des Lassa-Z-Proteins.

Beim ersten Peak handelt es sich um Proteine, die unspezifisch an die Ni-Säule binden. Bei den anderen beiden Peaks des Z Proteins könnte es sich um zwei verschiedene Modifikationen handeln.

Im Folgenden wird der erste Z-proteinhaltige Peak als „low affinity“ Peak und der zweite als „high affinity“ Peak bezeichnet.

## UV-VIS-Spektroskopie der Fraktionen der HT5-Ni-NTA-Säule

Die UV-VIS-Spektren der Fraktionen wurden im Bereich zwischen 200 nm und 900 nm gemessen. Der „high affinity“ Peak wies, neben einer Absorption bei ca. 280 nm, stets zusätzlich eine Absorption bei ca. 420 nm und bei genügend großer Proteinkonzentration sogar eine Absorption bei ca. 320 nm auf. Wir nahmen daher an, dass der „high affinity“ Peak entweder mit eisenhaltigen Proteinen (z. B. Cytochrom aus den Bakterienzellen) kontaminiert ist, oder selbst Eisen bindet und dadurch eine andere Konformation aufweist. Der „low affinity“ Peak wies meist nur eine Absorption bei ca. 280 nm auf. Bei großer Proteinkonzentration waren auch in manchen Spektren des „low affinity“ Peaks eine geringe Absorption bei 420 nm und 320 nm erkennbar. Hier wurden die beiden Peaks wahrscheinlich durch Erschöpfung der Trennkapazität der Säule nicht vollständig voneinander getrennt.

Die Spektren der Ultrafiltrate zeigten, dass im Verlauf der Konzentrierung kein Protein durch die Ultrafiltrationsmembran durchgelaufen war (s. Abbildung 3.5).

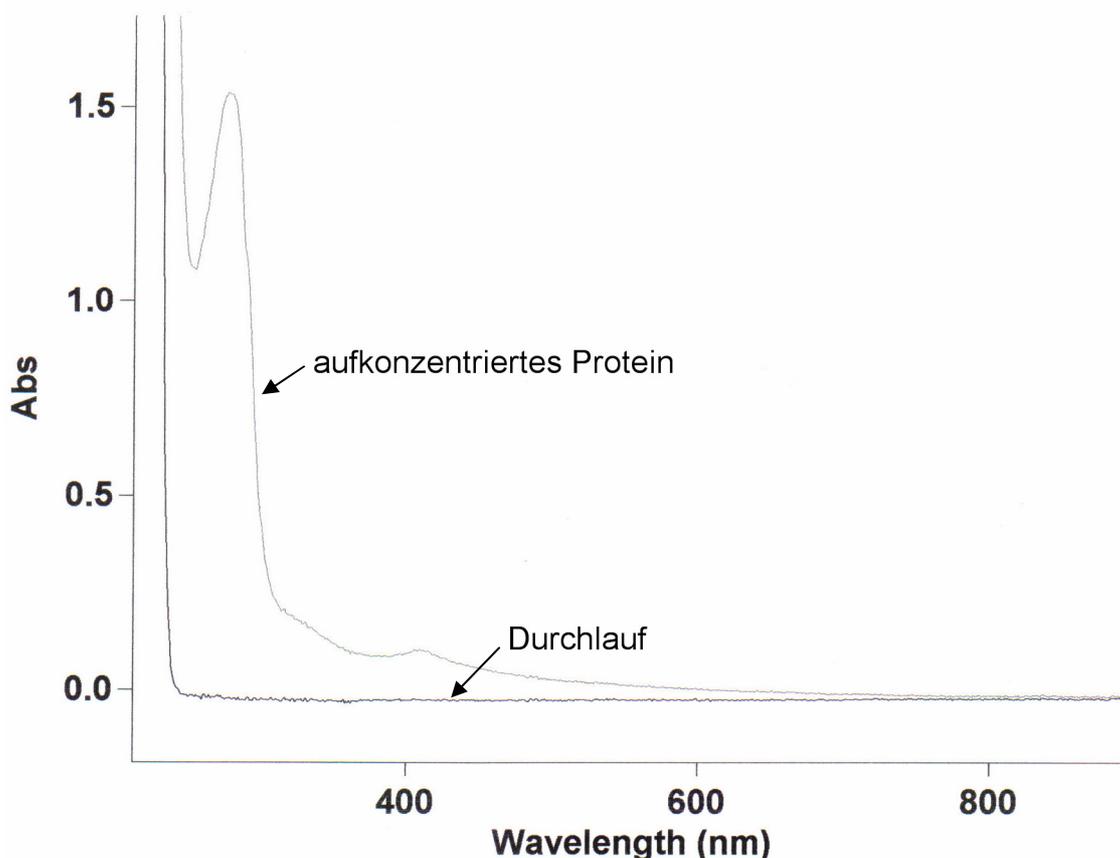


Abbildung 3.5: Spektrum des aufkonzentrierten Proteins der „high affinity“ Form und des Ultrafiltrates nach dem Konzentrieren durch Ultrafiltration. Man erkennt, dass das Filtrat kein Protein enthält.

### 3.3 Entsalzung der aufkonzentrierten Proteine

Die Proteine wurden aufkonzentriert und zum Entsalzen zunächst ein Aliquot vorsichtig im Tris Puffer verdünnt, dabei fiel das LCMV-Z-Protein aus. Das aufkonzentrierte LCMV-Z-Protein lies sich unerklärlicherweise auch in dem Ausgangspuffer ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ) nur schlecht verdünnen und fiel größtenteils aus, wobei dies vor allem für das Protein des „high affinity“ Peaks zu beobachten war. Daraufhin wurde die Löslichkeit des Lassa-Z-Proteins in verschiedenen Puffern untersucht. Dabei zeigte sich die beste Löslichkeit in 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH: 7,5/HCl) und 25 mM Tricine (pH: 7,5/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

Aufgrund des besseren Löslichkeitsverhaltens konzentrierten sich alle weiteren Versuche auf das Lassa-Z-Protein.

### 3.4 Superdex S200 High Resolution Chromatographie

Die beiden proteinhaltigen Fraktionen aus der Ni-Säule wurden jeweils auf die 120 ml Superdex Säule aufgetragen. Die aufgefangenen Fraktionen konnten aufgrund der geringen Absorption nicht einzeln im Spektrometer gemessen werden. Deshalb wurden die Fraktionen aufkonzentriert und im Spektrometer vermessen. Dabei zeigte die „low affinity“ Form keine zusätzliche Absorption bei 420 nm. Die „high affinity“ Form zeigte zwar eine geringe, jedoch eindeutige zusätzliche Absorption bei 420 nm. Daraufhin wurde die „high affinity“ Form erneut aufkonzentriert und mit Hilfe der 24 ml Superdex Säule analysiert. Das Elutionsprofil zeigte vier verschiedene Peaks, wobei es sich bei den letzten drei nicht um das Lassa-Z-Protein handeln konnte, da das Elutionsvolumen einem deutlich kleineren Molekulargewicht als 11,9 kDa (Molekulargewicht des Lassa-Z-Proteins) entsprach. Die durchgeführte SDS Elektrophorese zeigte keinerlei Proteinbanden, da hierfür die Proteinkonzentration zu gering gewesen ist. In der Spektrometrie zeigte sich der „420 nm Peak“ nicht in den Fraktionen, in welchen wir das Lassa-Z-Protein vermuteten. Zu diesem Zeitpunkt nahmen wir an das es sich hierbei vermutlich um ein Cytochrom handelt, welches auf der Säule von dem Lassa-Z-Protein getrennt wurde. Die weiteren Versuche zeigten jedoch, dass das Lassa-Z-Protein selbst in der Lage ist, Eisen zu binden. Es ließ sich trotzdem zunächst nicht ganz ausschließen, dass die Proben zusätzlich auch mit Cytochrom kontaminiert waren.

Bei weiteren Versuchen wurde die 24 ml Superdex S200 HR-Säule verwendet. Es zeigten sich jeweils vier, gut voneinander abgrenzbare und reproduzierbare Peaks, wobei nur der

erste Peak proteinhaltig war und auch die höchste Absorption aufwies. Bei den anderen handelte es sich wahrscheinlich um Imidazol und weiteren Salze, welche von der Ni-Säule noch in den Proben enthalten waren.

### 3.5 Reinheitskontrolle des Proteins nach der Chromatographie

Die Abbildungen 3.6 und 3.7 zeigen den Reinigungsgrad des Proteins nach der jeweiligen Gelfiltrationschromatographie. Die Metall-Affinitätschromatographie zeigt noch geringe Kontamination mit anderen bakteriellen Proteinen (s. Abbildung 3.6). Nach der Reinigung über die Superdex Säule liegt das Lassa-Z-Protein in reiner Form vor (s. Abbildung 3.7).

#### Metall-Affinitätssäule

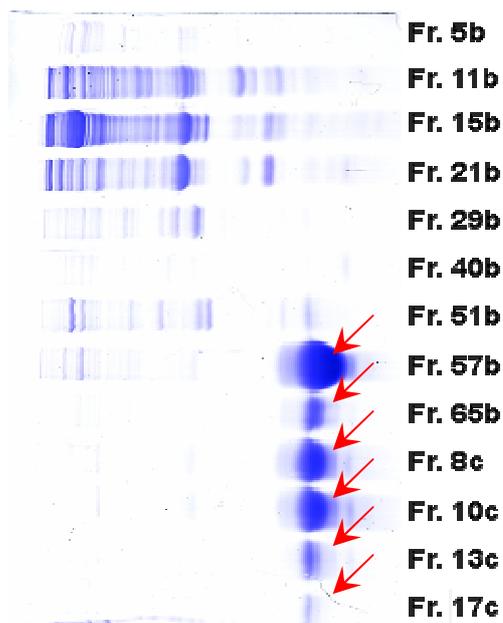


Abbildung 3. 6:

Aufreinigung des Lassa-Z-Proteins auf der Metall-Affinitätssäule. Fraktionen 5b bis 29b enthielten unspezifisch an der Nickelsäule gebundene Proteine, die während des ersten (10 mM bis 60 mM Imidazol) Gradienten eluierten. Die Fraktionen 57b und 65b stellen die Fraktionen des „low affinity“ Pools die Fraktionen 8c bis 17c die des „high affinity“ Pools dar.

Die Pfeile kennzeichnen das Lassa-Z-Protein.

### Superdex 200 HR-Säule

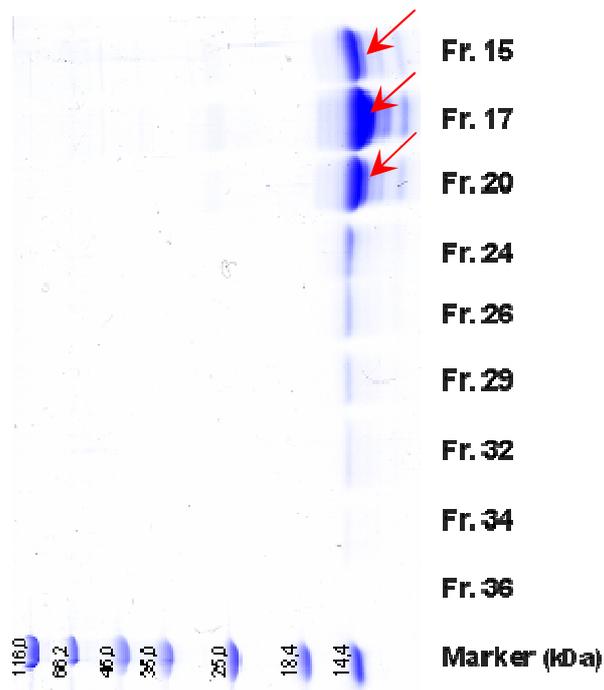


Abbildung 3. 7:

Reinigung des Lassa-Z-Proteins auf der Superdex 200 HR-Säule. Fraktionen 15-20 stellen das Protein des Peaks dar. Die Fraktionen 24-32 zeigen geringe Restmengen des Lassa-Z-Proteins, die außerhalb des Hauptpeaks eluierten.

Die Pfeile kennzeichnen das Lassa-Z-Protein.

Nach der Reinigung über die Superdex Säule liegt das Lassa-Z-Protein in reiner Form vor.

## 3. 6 Bestimmung des Molekulargewichtes

### 3. 6. 1 Analytische Gelfiltrationschromatographie über Superdex S200 HR und Superose 6

Die ersten Versuche ergaben ein errechnetes Molekulargewicht von 139 kDa für die „low affinity“ Form und 266 kDa für die „high affinity“ Form. Da das Lassa-Z-Protein ein Molekulargewicht von ca. 11,9 kDa hat, ließ sich daraus schließen, dass es sich hierbei um Oligomere aus 12 bzw. 22 Untereinheiten handelte. Für genauere Ermittlung der Molekulargewichte wurde die Superose 6-Säule (s. u.) verwendet. Die Abbildungen 3.8 und 3.9 zeigen die Eichgeraden der jeweiligen Säulen.

### Eichgerade der Superdex S200 HR-Säule

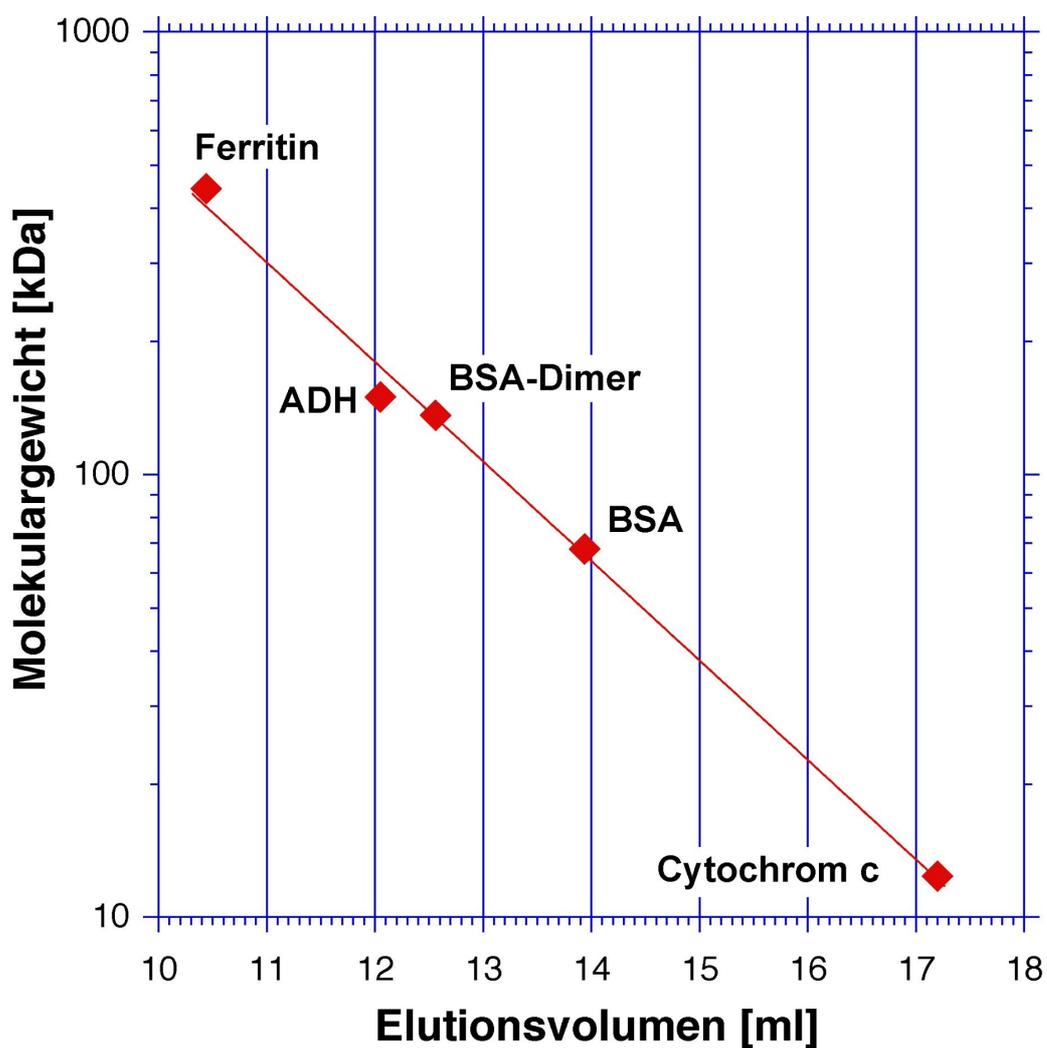


Abbildung 3. 8: Eichgerade der Superdex S200 HR-Säule. Die Eichung wurde mit Ferritin (443 kDa), ADH (150 kDa), BSA-Dimer (136 kDa), BSA (68 kDa), und Cytochrom C (12,4 kDa) durchgeführt. Die Messwerte weichen nur geringfügig von der Bestgeraden ab.

## Eichgerade der Superose 6 Säule

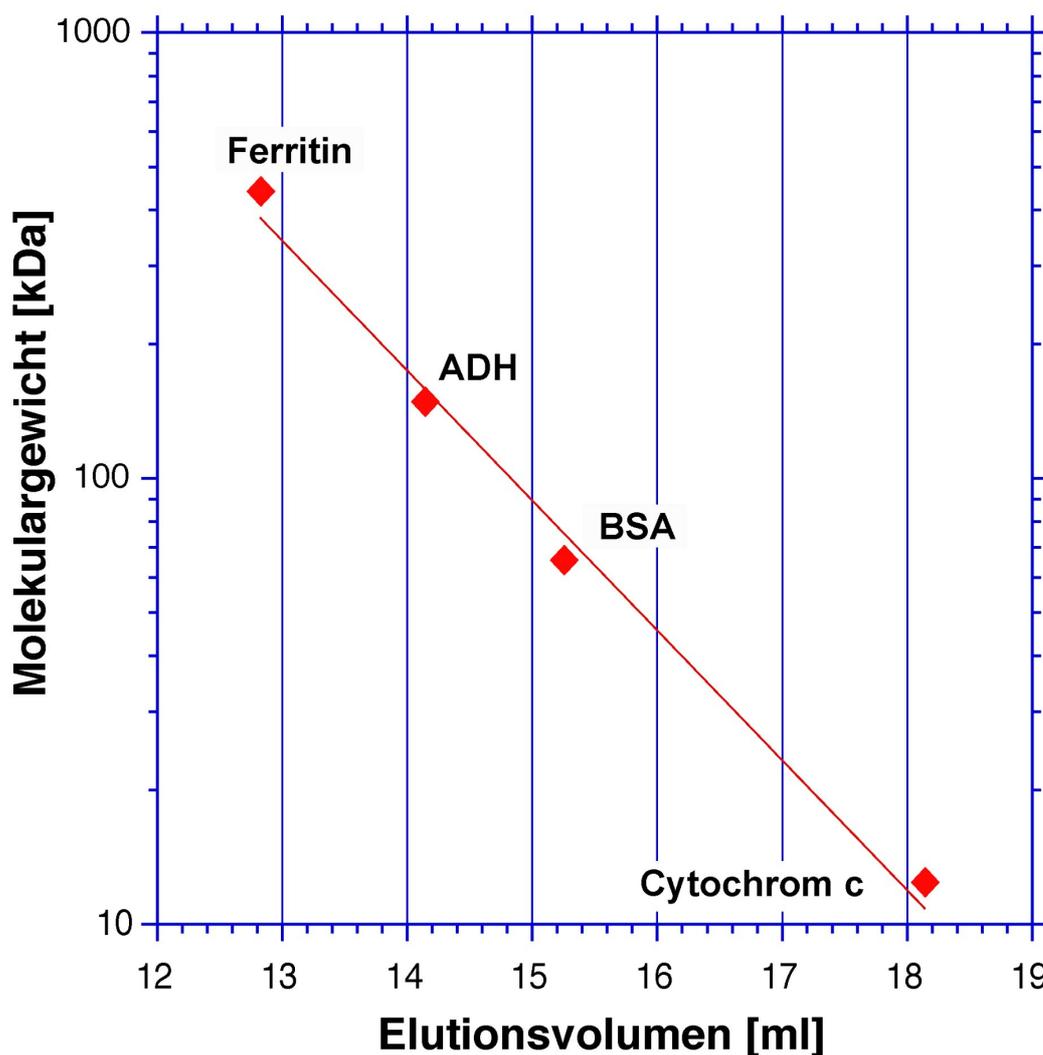


Abbildung 3.9: Eichgerade der Superose 6 Säule. Die Eichung wurde mit Ferritin (443 kDa), ADH (150 kDa), BSA (68 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa) durchgeführt. Auch hier weichen die Messwerte nur geringfügig von der Bestgeraden ab.

### 3. 6. 2 Analytische Chromatographie über Sephacryl S300 HR

Die ersten Ergebnisse der Trennung der Superdex S200 HR-Säule zeigten, dass das Lassa-Z-Protein zu Oligomeren aggregiert. Da nach den ersten Versuchen der Trennbereich der Sephacryl S300 HR-Säule besser geeignet schien, wurde zunächst diese Säule zur genaueren Analyse verwendet. Die „low affinity“ Fraktionen von der Ni-NTA-Säule wurden auf der Sephacryl-Säule getrennt. Das Protein eluierte über einen weiten Bereich verteilt, ohne erkennbare Peaks. Aufgrund des sehr geringen Proteingehalts konnten keine aussagekräftigen Spektren der einzelnen Fraktionen gemessen werden. Daher wurde der

gesamte Elutionsbereich in drei Fraktionen unterteilt, aufkonzentriert und anschließend mit Hilfe der SDS-Elektrophorese und des Spektrometers analysiert. Dabei wies nur der erste Bereich das Lassa-Z-Protein auf.

Zusammenfassend ließ sich zu diesem Zeitpunkt sagen, dass das Lassa-Z-Protein zwar zu Oligomerisierung neigt, diese Oligomere jedoch entweder (zumindest unter diesen Versuchsbedingungen) nicht stabil sind, oder der Oligomerisierungsgrad sehr variabel ist.

### **3.7 Auswirkungen der verschiedenen Metallionenzusätze**

Zunächst wurden Kulturen ohne Zusatz von Metallionen, mit 0,5 mM Kobalt, und mit Zinkkonzentrationen von 0,5 mM und 1 mM angesetzt. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Versuche, wurde anschließend das Protein aus Kulturen mit Eisenzusatz (0,3 mM), gleichzeitigem Zusatz von Kobalt (0,5 mM) und Zink (0,1 mM), und dem alleinigen Zinkzusatz (0,1 mM) untersucht.

Für eine zweite Versuchsreihe wurde keine Trennung durch die Gelfiltrationschromatographie auf der Superose 6 Säule durchgeführt, um durch eine verkürzte Präparation dem Verlust von Metall aus dem Protein vorzubeugen.

#### **3.7.1 Beobachtungen**

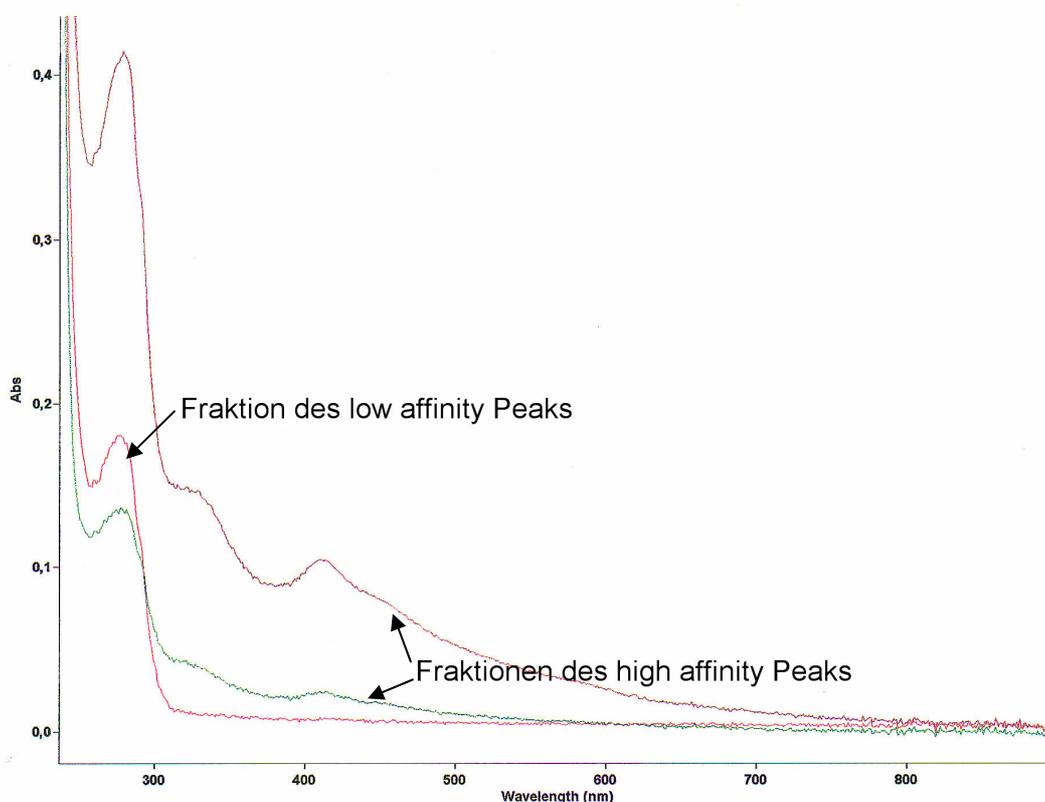
Nach der Zentrifugation wiesen die Zellpellets unterschiedliche Farben auf. Das Pellet aus der Kultur mit Kobaltzusatz war grün, mit Co/Zn grün-gelb gefärbt. Die Farbe des Pellets ohne Zusatz war braun und die des Zellpellets aus der Kultur mit Eisenzusatz rötlichbraun und deutlich dunkler als ohne Metallzusatz. Das Pellet aus der Kultur mit Zusatz von 0,1 mM Zink war heller braun als ohne Zusatz und die Farbe des Pellets des 1 mM Zinkansatzes war in der Intensität noch weniger ausgeprägt als die mit 0,5 mM Zink. Mit zunehmender Zinkkonzentration zeigten also die Pellets eine Abnahme in der Farbintensität.

Während das Cytosol aus der Kultur ohne Zusätze auf die HT5-Ni-NTA-Säule aufgetragen wurde, bildete sich ein dunkler, rotbrauner Bereich auf der Säule, der sich während des letzten Drittels des Imidazolgradienten (300-800 mM) wieder löste. Die „high affinity“ Form wies eine deutlich höhere Proteinmenge als die „low affinity“ Form auf.

Bei Zusatz von Kobalt enthielten beide Formen etwa gleich viel Protein. Die „low affinity“ Form war farblos die „high affinity“ Form zeigte eine leichte rötlich-braune Farbe.

Bei Zusätzen von Zink enthielt die „low affinity“ Form im Vergleich zu der „high affinity“ Form deutlich mehr Protein, jedoch nahm die Gesamtmenge des Proteins mit zunehmender Zinkkonzentration ab.

Diese Ergebnisse legten vorerst nahe, dass das Protein ohne weitere Zusätze gut Eisen einbauen kann. Bei Zinkzugabe wird dieses bevorzugt eingebaut und das Eisen verdrängt. Die UV/Vis Spektren dieser Proteinfraktionen zeigten, dass die „low affinity“ Form „eisenfrei“ und die „high affinity“ Form „eisenhaltig“ war (s. Abbildung 3.10).

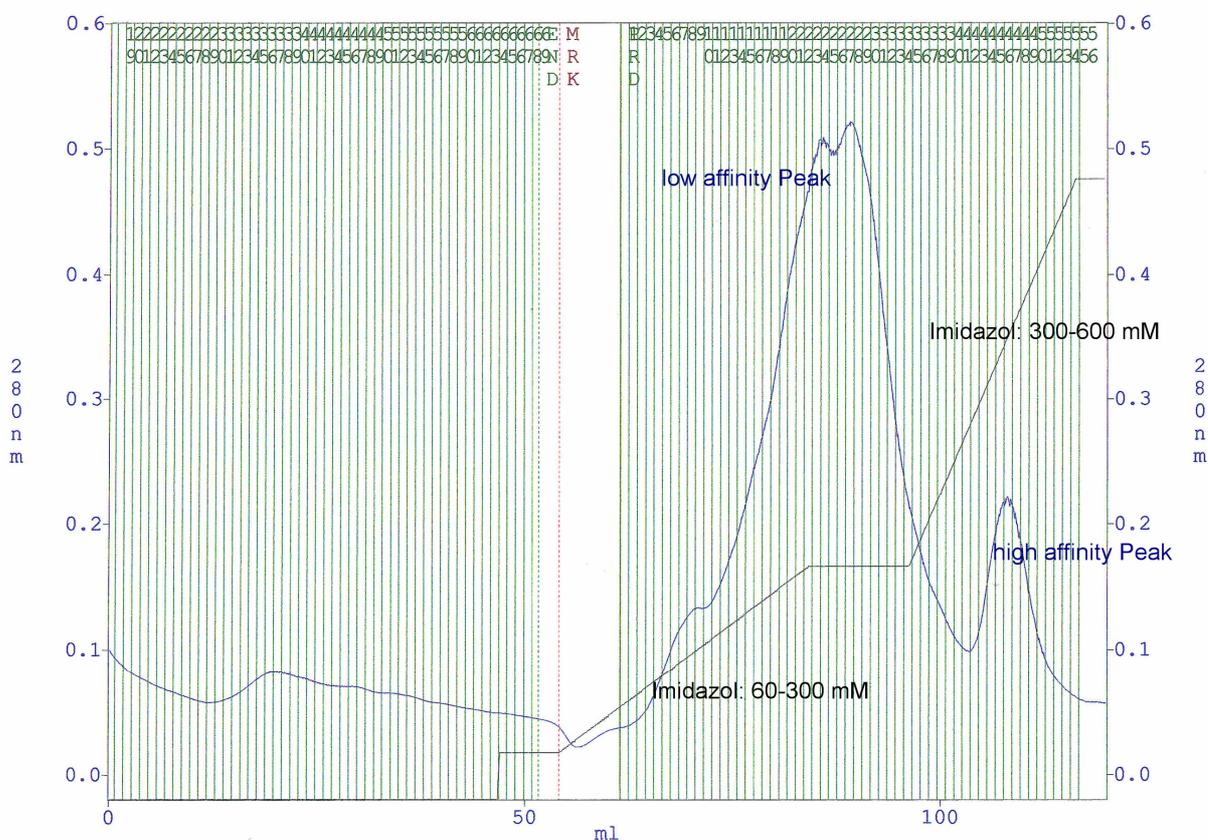


**Abbildung 3. 10:** Vergleich der Lassa Z Fraktionen aus der Kultur mit 0,1 mM Zinkzusatz nach der Reinigung auf der Ni-NTA-Säule. Die „low affinity“ Form zeigt nur den Proteinpeak bei einer Wellenlänge von ca. 280 nm. Die Fraktionen des „high affinity“ Peaks zeigen zusätzliche Absorption bei ca. 410 nm und eine Schulter bei ca. 330 nm, die typisch für eisenhaltige Proteine sind (Chr. Schmidt, persönliche Mitteilung).

Die Analyse der Proteinfraktionen mit Hilfe der SDS-PAGE zeigte, dass die einzelnen Proteinfraktionen in sehr reiner Form vorlagen, so dass die zusätzliche Absorptionsbanden im UV/Vis Spektren nicht durch eine Kontamination erklärt werden können.

Ein Vergleich der Spektren der „high affinity“ Form ließ vermuten, dass das Eisen in Anwesenheit von Kobalt weniger gut eingebaut wird. Die Z Proteinfraktionen aus Kulturen mit Zusatz von unterschiedlichen Zinkkonzentrationen wiesen diesbezüglich untereinander keine Unterschiede auf.

Da stets der „high affinity“ Peak der Ni-Säule das eisenhaltige Z Protein enthielt, wurde bei der Aufarbeitung des Cytosols der Kultur mit Eisenzusatz ein entsprechend größerer Anteil des Proteins in dieser Fraktion erwartet. Wider Erwarten fand sich aber hier die größere Proteinmenge im „low affinity“ Peak, der zusätzlich noch „zweigipflig“ war (s. Abbildung 3.11). Spätere Experimente zeigten, dass es sich bei dieser „Zweigipfligkeit“ um einen Artefakt handelte, und diese auf eine Überladung der Säule zurückzuführen war. Auch die weiteren analytischen Schritte zeigten, dass es sich hier um eine einheitliche Proteinfraktion handelte, da dieser Peak für weitere Analysen in Fraktionen unterteilt wurde, welche jedoch keine Unterschiede untereinander aufwiesen. Die Spektren der Fraktionen zeigten bei beiden Peaks eine zusätzliche Absorption bei ca. 420 nm und 330 nm, die das Vorhandensein von Eisenionen (auch in der „low affinity“ Form!) im Protein belegte.



**Abbildung 3.11: Elutionsprofil der Ni-NTA-Säule des Proteins aus einer Kultur mit Eisenzusatz (0,3 mM). Wider Erwarten findet sich die größere Proteinmenge in der „low affinity“ Form und nicht in der „eisenhaltigen high affinity“ Form.**

Bei gleichzeitigem Zusatz von Kobalt und Zink war im Verlauf der Metall-Affinitätschromatographie keine der „high affinity“ Form entsprechende Proteinfraction detektierbar. Der „low affinity“ Peak zeigte jedoch eine Schulter. Die Spektren dieser Fraktionen wiesen eine zusätzliche Absorption bei ca. 420 nm auf, sodass man auch hier nicht von einem „eisenfreien“ Protein ausgehen kann (s. Abbildung 3.12).

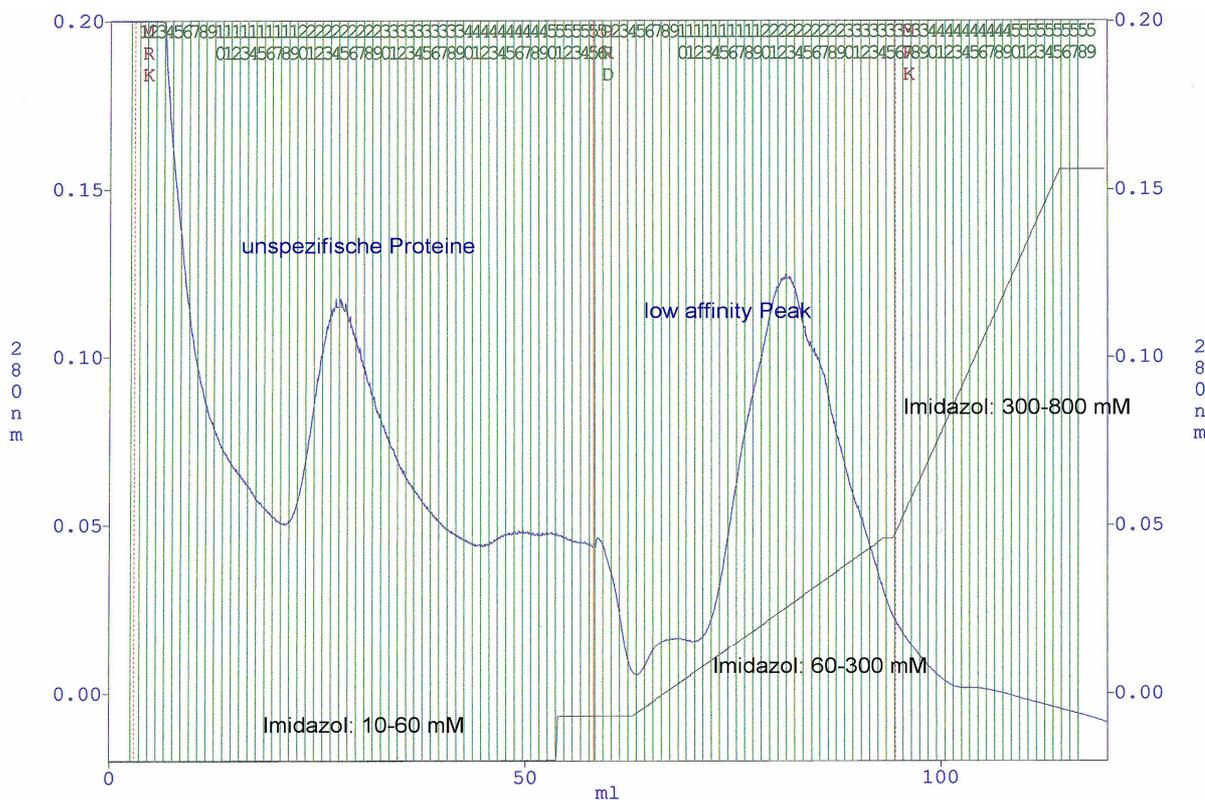
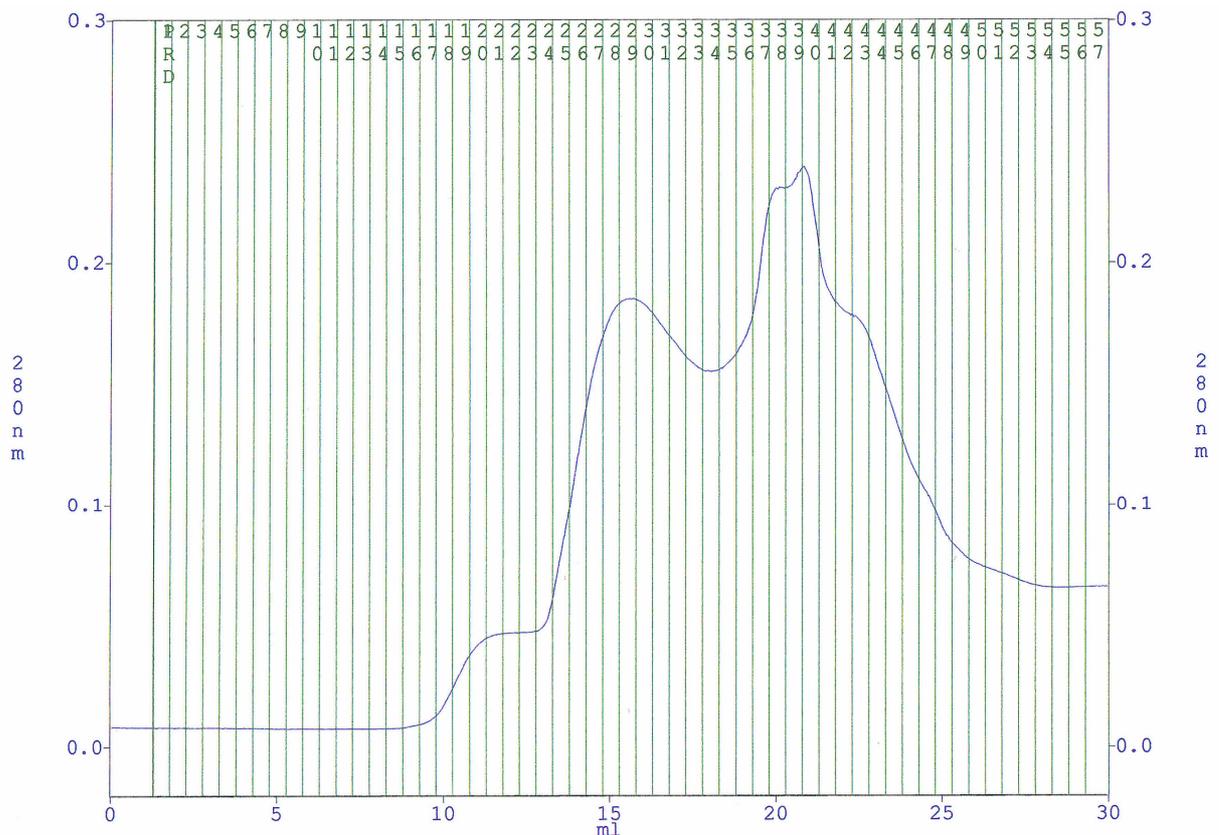


Abbildung 3.12: Elutionsprofil des Proteins aus einer Kultur mit Co/Zn-Zusatz auf der Ni-NTA-Säule. Ein der „high affinity“ Form entsprechender Peak ist nicht erkennbar.

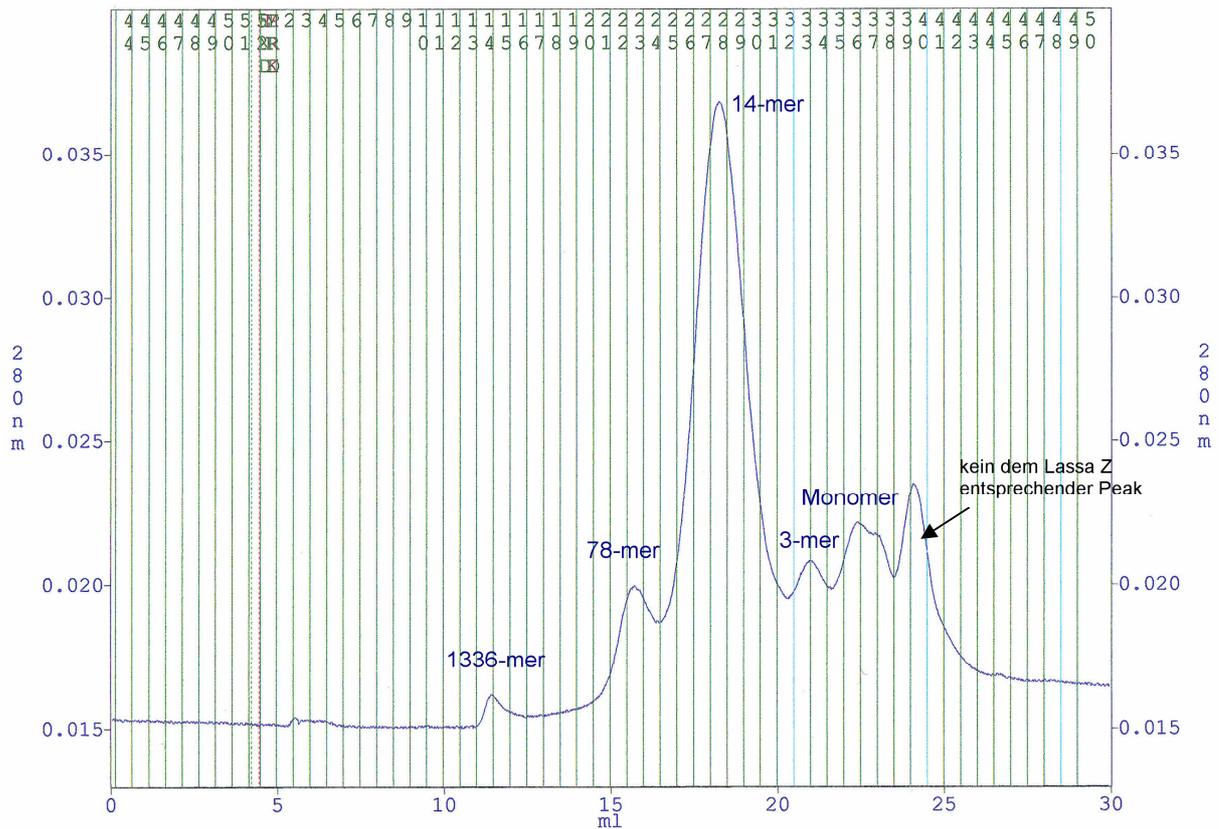
### 3.7.2 Auswirkungen der verschiedenen Metallionenzusätze auf den Oligomerisierungsgrad des Lassa-Z-Proteins

Im Verlauf der Chromatographie über die Superdex S200 HR-Säule zeigte das Protein der „low affinity“ Form aus Zellen, die ohne Metallzusatz angezogen wurden, ein Elutionsverhalten, das auf das Vorliegen des Proteins in verschiedenen oligomeren Formen schließen lässt (s. Abbildung 3.13). Für die genauere Analyse der Molekülgröße wurde eine Superose 6-Säule verwendet. Auch hier eluierte das Protein der „low affinity“ Form aus der Kultur ohne Metallzusatz reproduzierbar über einen großen Bereich mit bis zu sechs erkennbaren Peaks (s. Abbildung 3.14). Zwei Proben dieses Proteins wurden mit

jeweils 10 mM EDTA oder 0,5 mM Zinklösung für 10 min inkubiert und erneut auf der Superose 6-Säule analysiert. Es zeigten sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede in der Größenverteilung. Anhand des Elutionsvolumens ließen sich Formen von einem Monomer bis zu einem Polymer von über 1000 Untereinheiten vermuten, wobei das Protein bevorzugt Oligomere aus 14 bis 17 Untereinheiten bildete (s. Abbildung 3.15 und 3.16). In jedem Fall wurde die Anwesenheit und Reinheit des Lassa-Z-Proteins in den individuellen Fraktionen mit Hilfe einer SDS-PAGE Analyse überprüft.

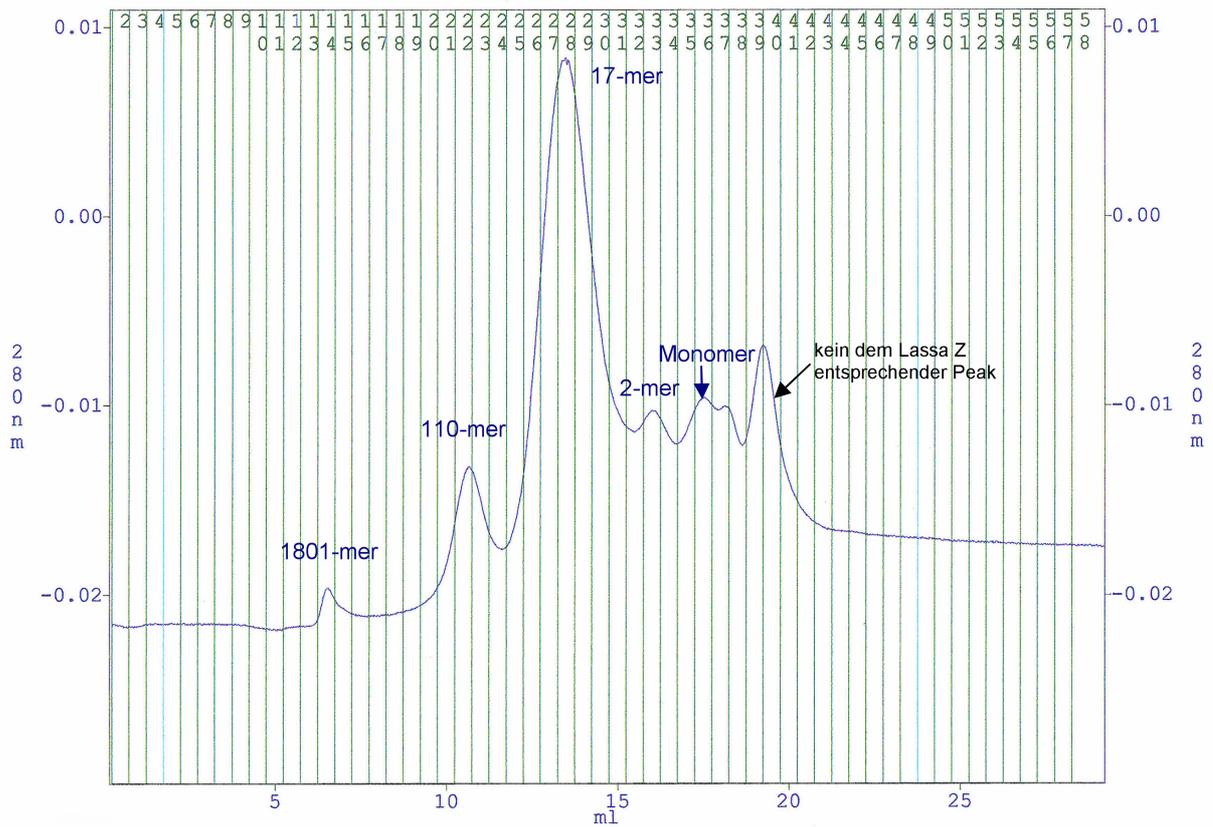


**Abbildung 3.13:** Elutionsprofil des Lassa-Z-Proteins der „low affinity“ Form aus einer Kultur ohne Metallzusatz von der Superdex S200 HR-Säule. Aufgetragen ist die Absorption bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen. Das breite, mehrgipfelige Profil spricht für das Vorliegen von Formen mit unterschiedlichen Oligomierungsgraden.

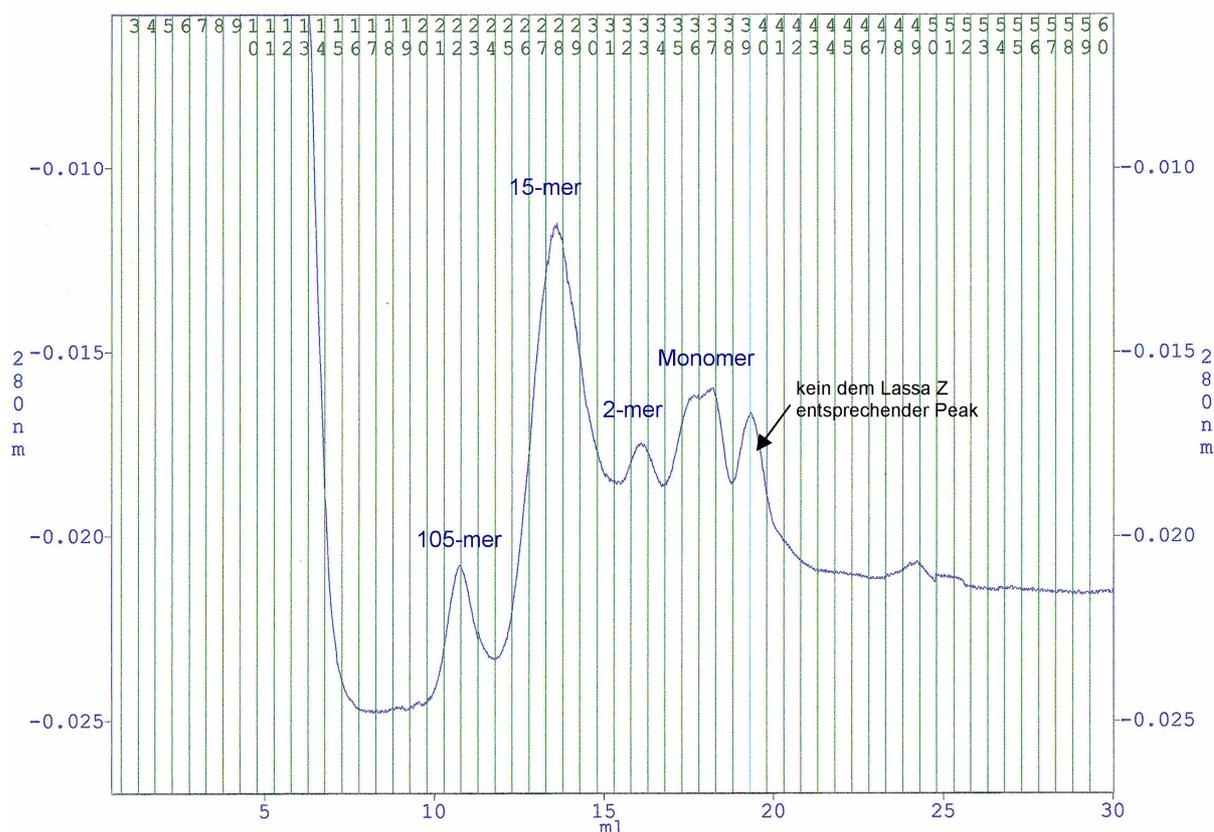


**Abbildung 3. 14:** Elutionsprofil des Lassa-Z-Proteins der „low affinity“ Form aus einer Kultur ohne Metallzusatz von der Superose 6-Säule. Aufgetragen ist die Absorption bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen.

Es lassen sich sechs verschiedene Peaks mit Molekulargewichten entsprechend einem Monomer bis zu einem Polymer von über 1000 Untereinheiten erkennen. Überwiegend liegt das Protein jedoch als 14-mer vor. Der letzte Peak weist ein Molekulargewicht auf, das unterhalb des Lassa-Z-Proteins liegt.



**Abbildung 3.15:** Das Elutionsprofil der „low affinity“ Form aus Zellen ohne Metallzusatz nach 10-minütiger Inkubation mit 0,5 mM Zinklösung von der Superose 6-Säule. Man erkennt sechs verschiedene Peaks. Die Molekülgrößen weichen, unter Berücksichtigung der experimentellen Genauigkeit, mit einem Monomer, 2-mer, 17-mer, 110-mer und einem Polymer von über 1000 Untereinheiten, nur unwesentlich von den Molekülgrößen des Verlaufs ohne Inkubation (vgl. Abbildung 3.14) ab. Das Protein liegt überwiegend als 17-mer vor. Der letzte Peak weist auch hier ein Molekulargewicht auf, das unterhalb des Lassa-Z-Proteins liegt.

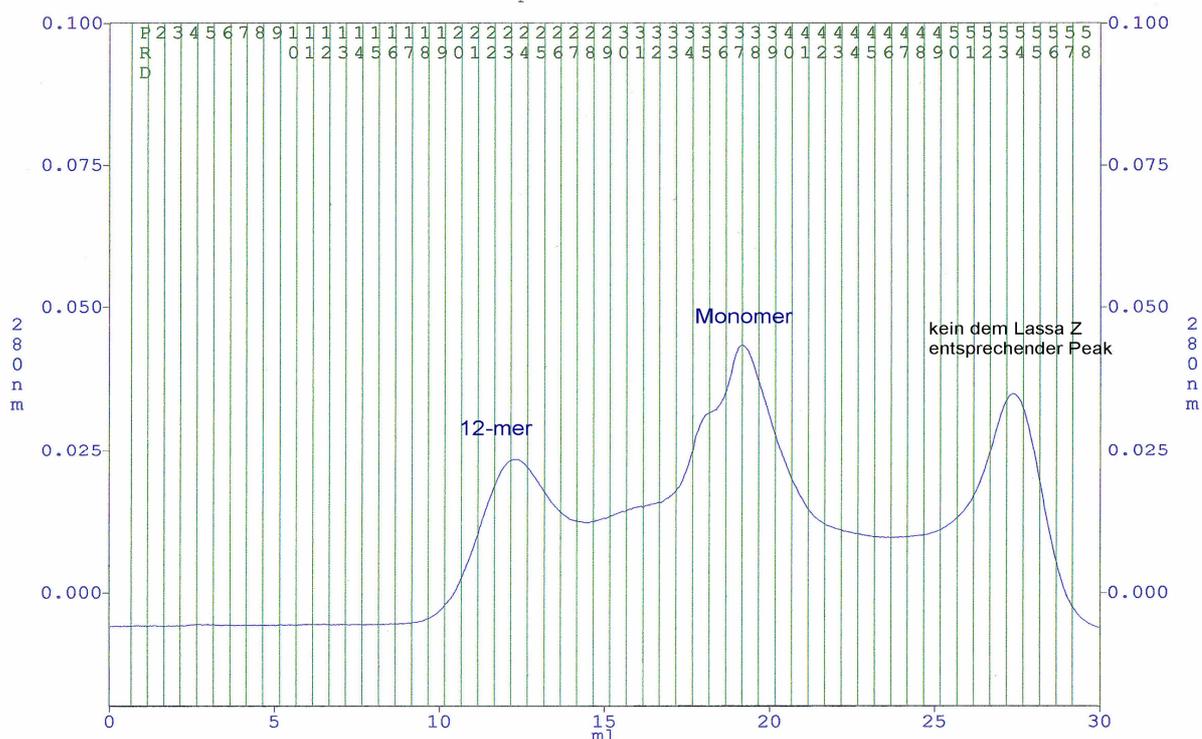


**Abbildung 3.16:** Das Elutionsprofil der „low affinity“ Form aus Zellen ohne Metallzusatz nach 10-minütiger Inkubation mit 10 mM EDTA von der Superose 6-Säule. Man erkennt fünf verschiedene Peaks. Die Molekülgrößen variieren zwischen einem Monomer, 2-mer, 15-mer und 105-mer und weichen somit nur unwesentlich von dem Molekülgrößen der Verläufe ohne Inkubation oder mit Zinkinkubation (vgl. Abbildungen 3.14 und 3.15). Überwiegend liegt das Protein hier als 15-mer vor. Es fehlt lediglich der Peak mit Polymeren über 1000 Untereinheiten. Der letzte Peak weist auch hier ein Molekulargewicht auf, das unterhalb des Lassa-Z-Proteins liegt.

Die sehr hohe Absorption in den Fraktionen 1-13 ist auf ein Artefakt aus dem Durchflussphotometer zurückzuführen. Diese Fraktionen enthielten kein Protein.

Auch die „low affinity“ Form des Proteins aus Kulturen mit Co/Zn-Zusatz enthielt ein Oligomerenmisch. Das Protein dieser Fraktionen wurde zunächst für 2 Tage gegen einen Puffer mit EDTA dialysiert (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA und 5 mM DTT, pH 8,0/HCl). Anschließend wurde einer Hälfte ein Puffer mit 1mM Zink zugesetzt (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EDTA und 5 mM DTT, pH 8,0/HCl). Beide Ansätze wurden anschließend für weitere 2 Tage bei 4 °C inkubiert. Die Hauptkomponente des ohne Zinkzusatz dialysierten Proteins bildete ein Oligomer mit einer errechneten Größe die ca. 12 Untereinheiten entsprach (s. Abbildung 3.17).





**Abbildung 3. 18:** Das Elutionsprofil der Fraktionen der „low affinity“ Form aus Kulturen mit Co/Zn-Zusatz nach Dialyse in Anwesenheit von 1 mM Zink von der Superdex S200 HR-Säule. Das Protein liegt hier als ein 12-mer und als ein Monomer vor. Der letzte Peak weist ein Molekulargewicht auf, welches unterhalb dessen des Lassa-Z-Proteins liegt.

Das Protein der „low affinity“ Form aus einer Kultur mit einer reduzierten Zinkkonzentration von 0,1 mM zeigte auf der Superdex S200 HR-Säule wiederholt ein Profil, das sich über einen großen Molekulargewichtsbereich erstreckte. Es wies jedoch ein eindeutiges Maximum in einem Bereich auf, welches vorwiegend auf das Vorliegen von Monomeren hindeutete (s. Abbildung 3.19). Die Fraktionen dieses Bereichs wurden aufkonzentriert und gegen einen Puffer, der 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT enthielt (pH: 8,0/HCl), dialysiert. Die erneute Chromatographie des dialysierten Proteins eluierte reproduzierbar mit einem Volumen von ca. 12,5 ml, und entsprach dem Vorliegen von Polymeren von 12 Untereinheiten (s. Abbildung 3.20). Es zeigt sich als eindeutig, dass sich der Oligomerisierungsgrad des Proteins in Abhängigkeit vom gebundenen Metall verändert.

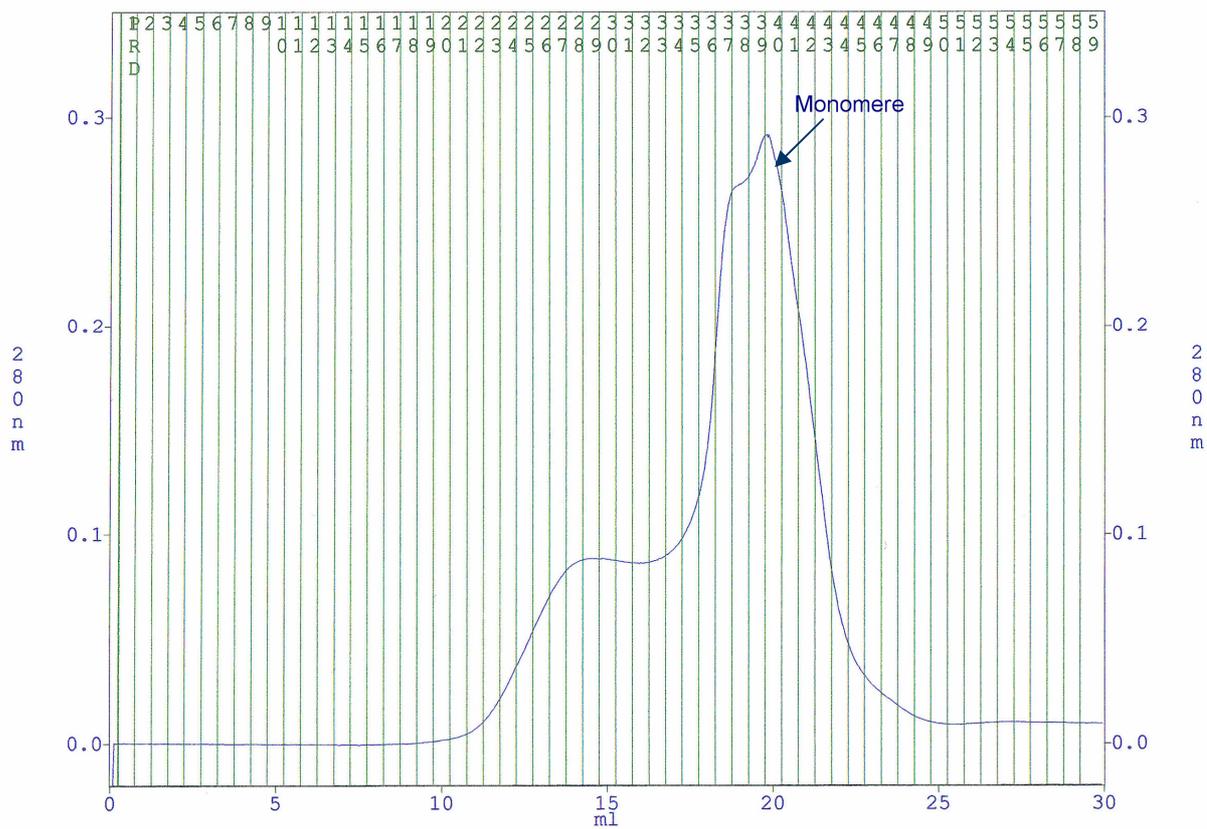
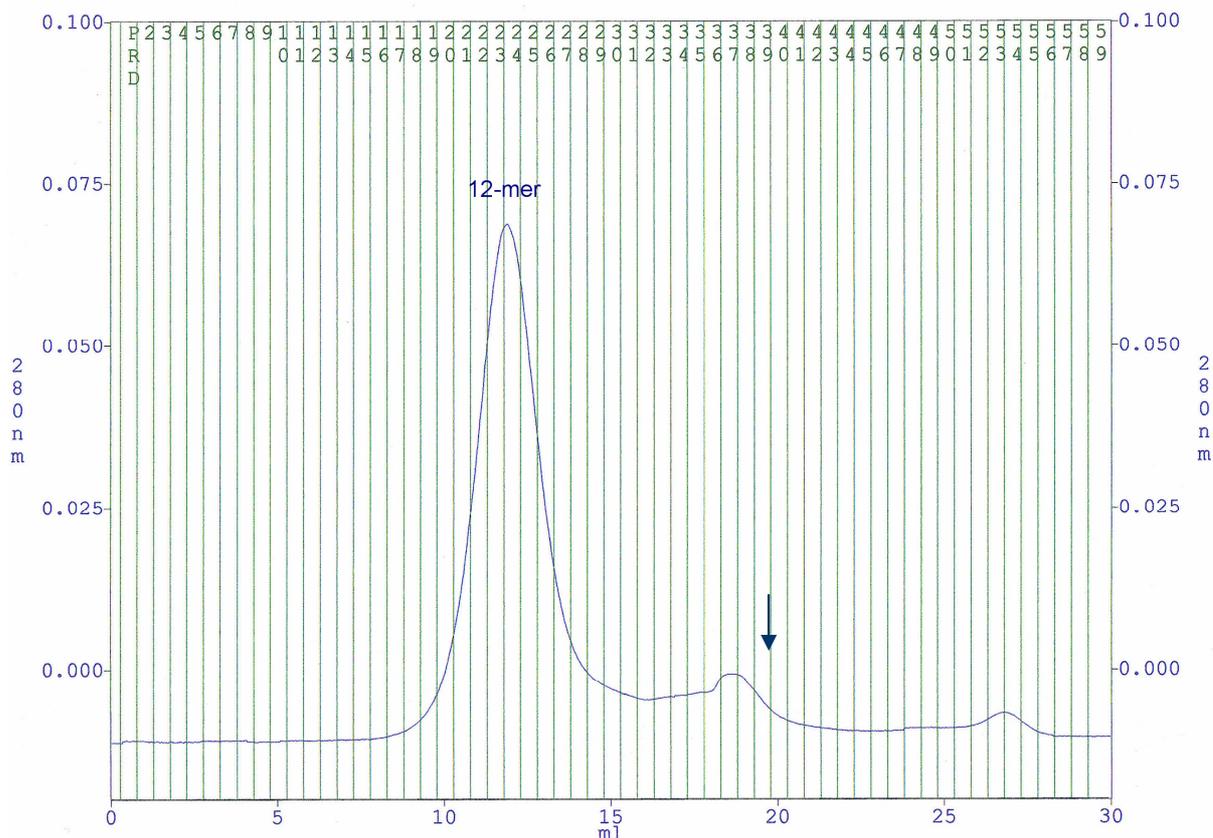


Abbildung 3. 19: Das Elutionsprofil der Fraktionen der „low affinity“ Form aus mit  $0,1 \text{ mM}$  Zinkzusatz angezogenen Zellen von der Superdex S200 HR-Säule. Obwohl sich das Profil über einen großen Bereich erstreckt, ist ein eindeutiges Maximum entsprechend einer vorwiegend monomeren Form zu vermerken.



**Abbildung 3. 20:** Das Elutionsprofil der Fraktionen der „low affinity“ Form aus mit  $0,1 \text{ mM}$  Zinkzusatz angezogenen Zellen von der Superdex S200 HR-Säule nach Dialyse gegen  $25 \text{ mM}$  Tris,  $100 \text{ mM}$  NaCl,  $10 \text{ mM}$  EDTA und  $5 \text{ mM}$  DTT (pH 8,0/HCl). Das Profil weist auf das Vorliegen von Oligomeren bestehend aus 12 Untereinheiten hin. Der Pfeil markiert das zu erwartende Elutionsvolumen des Monomers.

Alle „high affinity“ Formen wiesen auf der Superdex S200 HR-Säule unabhängig von dem jeweiligen Ionenzusatz ein relativ gut definiertes Elutionsprofil auf, das einen Molekulargewichtsbereich um ca.  $200 \text{ kDa}$  aufwies. Daraus ließ sich die Oligomerengröße auf einen Bereich zwischen 10- und 24-mer eingrenzen, mit einem Median entsprechend einem 12-mer. Die genauere Trennung auf der Superose zeigte hier jeweils einen gut definierten Peak, der es erlaubte die Oligomerengröße zwischen 12 bis 14 Untereinheiten einzugrenzen. Im Falle der Kultur mit ausschließlichem Kobaltzusatz traf dies auch auf die „low affinity“ Form zu. Beispielhaft sind einige Elutionsprofile abgebildet (s. Abbildung 3.21 bis 3.24).

Zusammenfassend lässt sich herleiten, dass die „low affinity“ Form des Proteins bei Zusatz von Zink bevorzugt in monomerer Form vorliegt, bei Zusatz anderer Metalle wurden bevorzugt stabile 12-mere gebildet. Hat das Protein kein Metall gebunden, neigt es zu höhergradiger Polymerisierung, wobei auch hier die bevorzugte Form ca. einem 12-mer

entspricht. Durch erschöpfende Dialyse gegen EDTA lässt sich das Protein in ein „metallfreies“ 12-mer überführen.

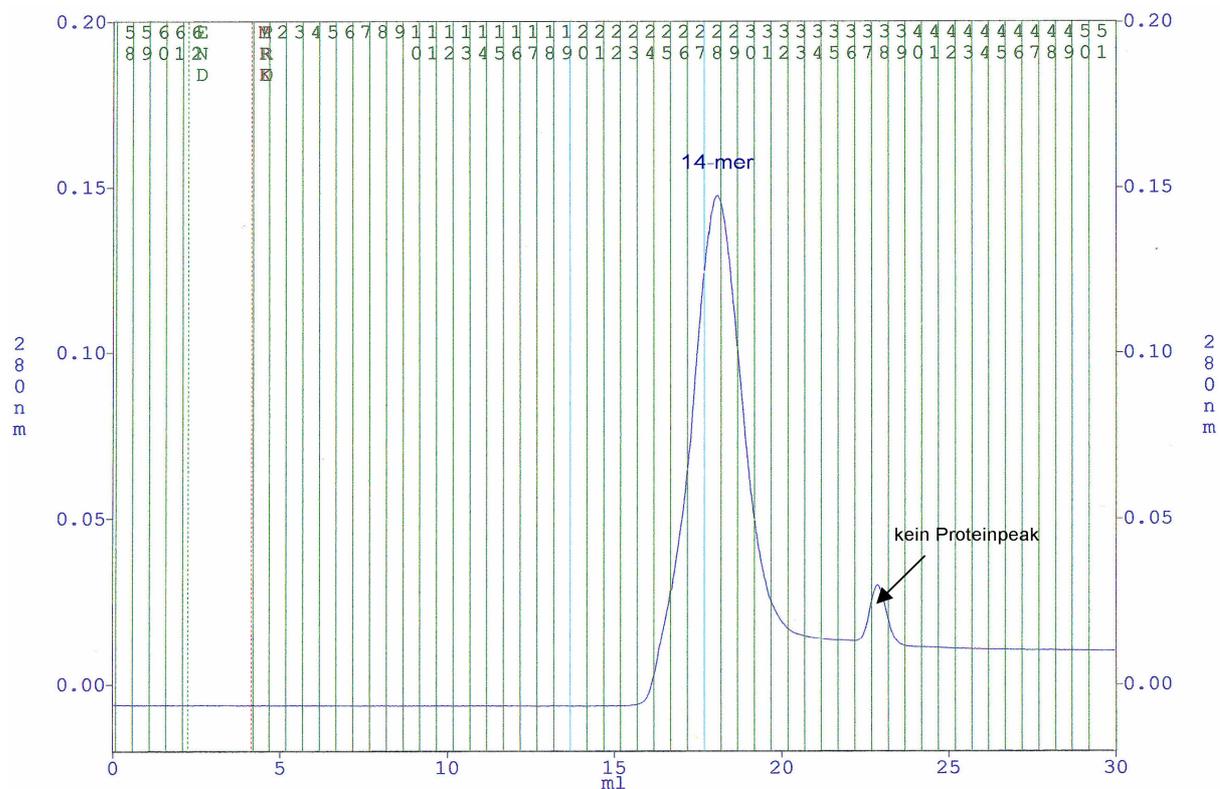
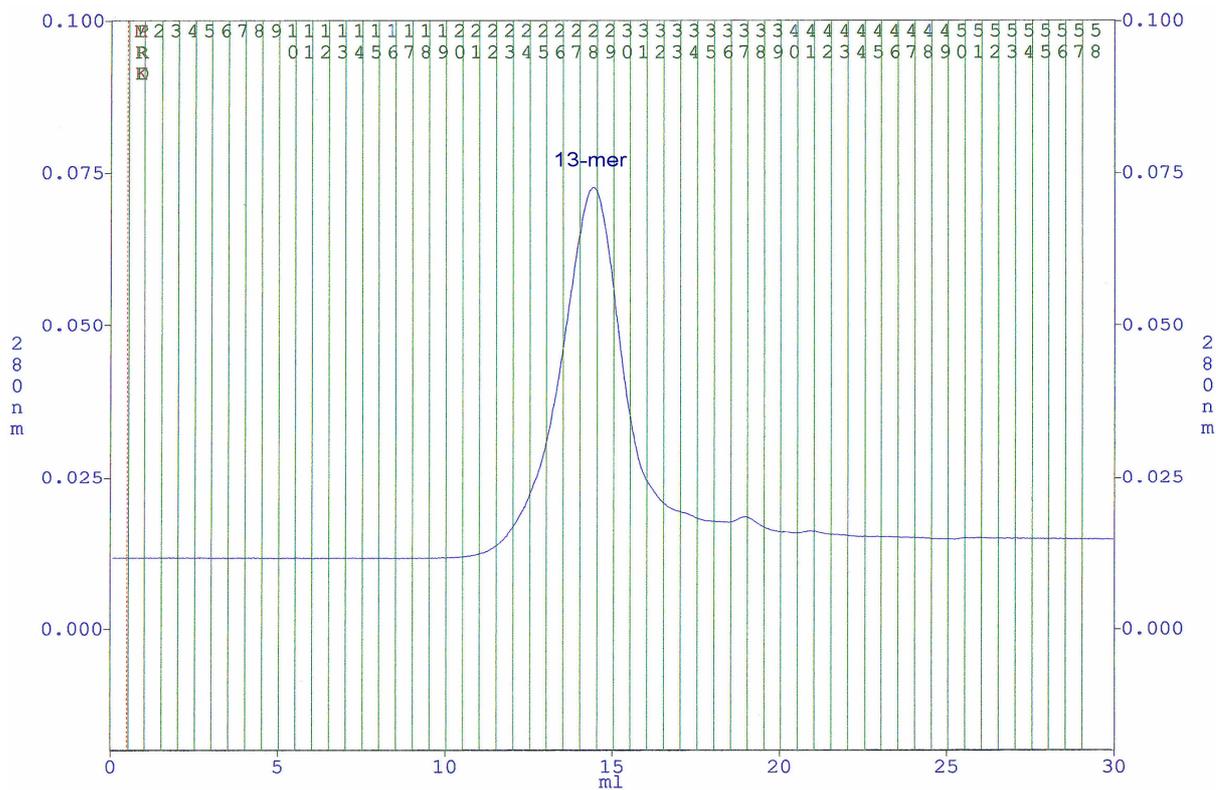
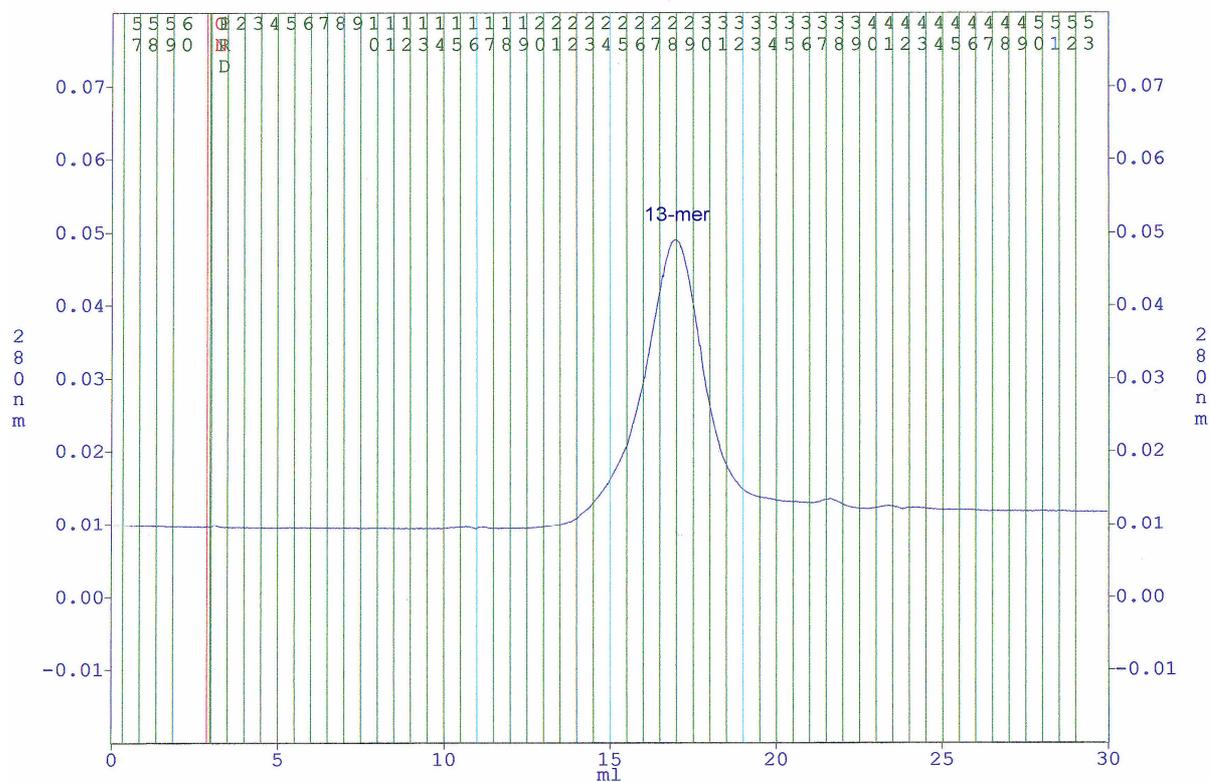


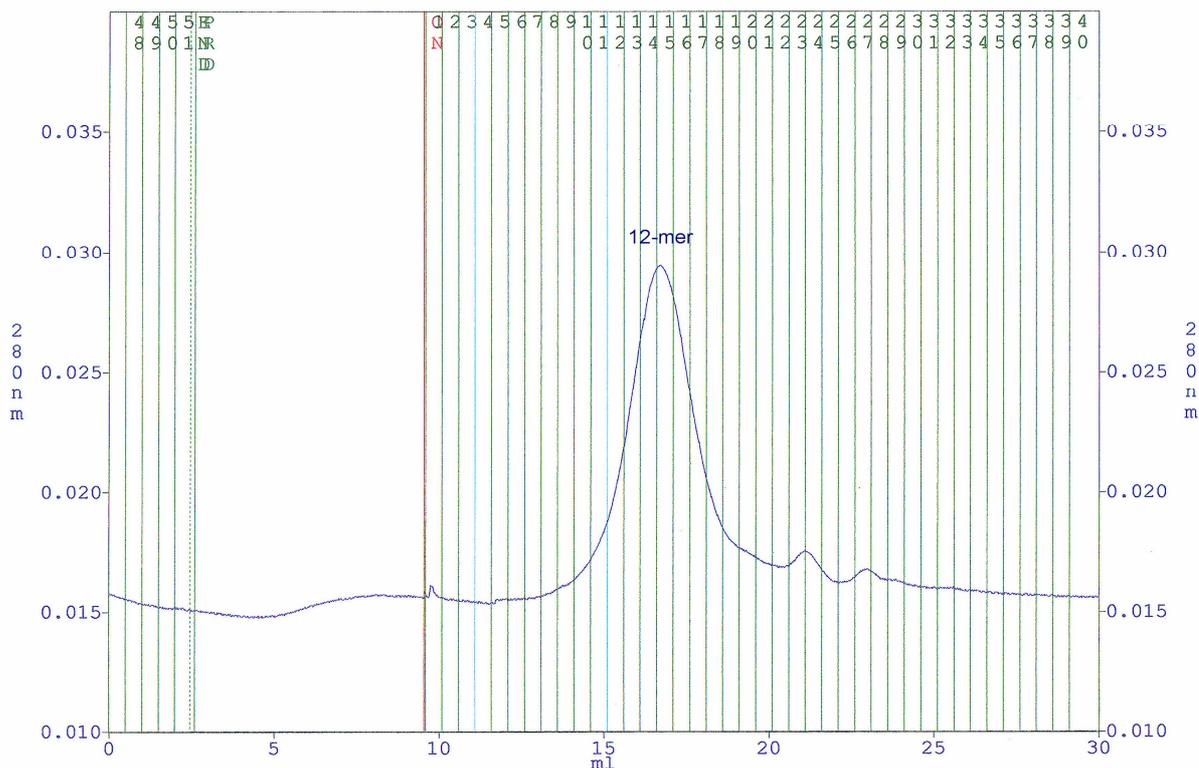
Abbildung 3. 21: Das Elutionsprofil der Fraktionen der „high affinity“ Form aus *ohne Metallzusatz* angezogenen Zellen von der Superose 6 Säule. Das Lassa-Z-Protein liegt hier als ein 14-mer vor.



**Abbildung 3. 22:** Das Elutionsprofil der Fraktionen der „low affinity“ Form aus mit 0,5 mM Co-Zusatz angezogenen Zellen von der Superose 6 Säule. Das Lassa-Z-Protein liegt hier als ein 13-mer vor.



**Abbildung 3. 23:** Das Elutionsprofil der Fraktionen der „high affinity“ Form aus mit 0,5 mM Co-Zusatz angezogenen Zellen von der Superose 6 Säule. Das Lassa-Z-Protein liegt hier als ein 13-mer vor.



**Abbildung 3. 24:** Das Elutionsprofil der Fraktionen der „high affinity“ Form aus mit 0,5 mM Zn-Zusatz angezogenen Zellen von der Superose 6 Säule. Das Lassa-Z-Protein liegt hier als ein 12-mer vor.

### 3. 7. 3 Proteinmenge und die Metallbesetzung-Ergebnisse der AAS

Die Proteinbestimmung zeigte, dass in den Kulturen ohne Metallzusatz insgesamt mehr Lassa-Z-Protein (bis zu 9 mg/l Kultur) produziert wurde als in kobalt- oder zinksupplementierten Kulturen. Dabei war die Ausbeute bei Zinkzugabe mit ca. 0,3 mg/l Kultur am geringsten.

Die Metallbestimmung mit der AAS zeigte, dass die Lassa-Z-Proteinfractionen aus den Kulturen ohne Metallzusatz den höchsten Metallgehalt sowohl an Zink als auch an Eisen aufwiesen. Erwartungsgemäß war in den Fraktionen der „low affinity“ Form ein deutlich höherer Zink-, in der „high affinity“ Form ein höherer Eisengehalt vorzufinden. Trotz des hohen Eisengehaltes in der „high affinity“ Form war die Eisenbesetzung mit ca. 0,1 Fe-Ionen/Monomer gering (da insgesamt höhere Proteinausbeute!). Obwohl kein Zink zugesetzt wurde, war hier die Zinkbesetzung der „low affinity“ Form mit 0,34 Zinkionen pro Monomer zunächst am höchsten, sodass man von einer größeren Affinität des Proteins zu Zinkionen ausgehen kann. Im Hinblick darauf, dass das Protein zwei Zinkbindungsstellen hat, war der errechnete Wert dennoch insgesamt zu klein.

Kobalt war erwartungsgemäß nur in Proteinpräparationen aus kobaltsupplementierten Kulturen nachweisbar. In diesem Fall enthielt das Protein keine nachweisbaren Eisenmengen. Andererseits wurde aber auch Kobalt selbst nicht bevorzugt eingebaut. Die Konzentration von Co-Ionen/Monomer war mit 0,03-0,06 vernachlässigbar klein. Auch hier zeigte sich ein bevorzugter Einbau des Zinks in das Protein. Das Bindungsverhältnis war mit ca. 0,25 Zn-Ionen/Monomer etwas schlechter als im Protein aus nicht metallsupplementierten Kulturen.

Zusammenfassend lies sich erkennen, dass Kobalt zwar selbst kaum in das Protein eingebaut wurde, jedoch den Einbau von Eisen verhinderte. Außerdem war die Proteinausbeute höher als aus Kulturen mit Zinkzusatz.

Die Fraktionen der „low affinity“ Form aus Kulturen mit Eisenzusatz zeigten eine Zinkbesetzung von ca. 0,5 Zn/Monomer, wogegen die Eisenbesetzung mit 0,7 etwas höher lag. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Protein eine höhere Affinität zum Zink als zu anderen Metallionen aufweist, aber keine absolute Spezifität für Zink zeigt. Aufgrund der zu geringen Proteinausbeute der „high affinity“ Form konnte hier keine verlässliche Protein- und Metallbestimmung durchgeführt werden.

Obwohl die Proteinfractionen aus Kulturen mit Zinkzusatz Zink enthielten, war zunächst nur eine sehr geringe Zinkbesetzung mit ca. 0,16 Zn/Monomer nachweisbar. Das Protein aus Kulturen mit höherem Zinkzusatz erwies sich zunächst wider Erwarten als zinkfrei.

Zusammenfassend wirkte sich der Zinkzusatz sowohl auf das „Bakterienwachstum“, als auch auf die gewonnene Proteinmenge und Zinkbesetzung negativ aus. Das geringere Bakterienwachstum und die daraus folgende geringere Proteinausbeute lassen sich damit erklären, dass Zinkionen toxisch auf die Bakterien wirken. Bei den einzelnen Zwischenschritten der Reinigung ging auch immer ein Teil des Proteins durch Präzipitation verloren. Dieser Effekt war bevorzugt bei den Proben aus den Kulturen mit Zinkzusatz zu beobachten. Wir vermuteten daher, dass das Protein zwar bevorzugt Zink einbaut, diese Form jedoch nicht stabil ist und deshalb im Verlauf der Reinigung leicht verloren geht. Deshalb wurde bei weiteren Versuchen darauf geachtet, das Protein zwischen den einzelnen analytischen Schritten nicht einzufrieren und möglichst schnell weiter zu verarbeiten.

Wie oben schon erwähnt zeigte die „low affinity“ Form des Proteins aus Kulturen mit 0,1 mM Zinkansatz auf der Superdex S200 HR-Säule ein Profil, das sich über einen großen Bereich erstreckte, jedoch ein eindeutiges Maximum in einem Bereich aufwies, der auf das Vorliegen von Monomeren hinwies (s. Abbildung 3.19). Für eine genauere Metallanalyse wurde dieser „low affinity“ Peak des Zinkansatzes in zwei Hälften unterteilt. Die erste

Hälfte, mit „höheren Molekulargewichten“ wies eine Zinkbesetzung von ca. 1,4 Zn/Monomer auf. Die zweite Hälfte mit geringerem Molekulargewicht (Monomeren) wies hingegen eine Zinkbesetzung von 2,2 Zn/Monomer auf. Da für das Lassa-Z-Protein zwei Zinkbindungsstellen vorhergesagt wurden, entspricht das einer Besetzung von 100 %. Die Eisenbesetzung war in diesen Proben mit 0,012 bzw. 0,02 vernachlässigbar klein. Zusammenfassend zeigt sich, dass das Protein bei einem ausreichenden Zinkangebot bevorzugt dieses Ion einbaut.

Die „high affinity“ Form des 0,1 mM Zn-Ansatzes zeigte bei einer insgesamt höheren Proteinausbeute eine Zink und Eisenbesetzung, die mit 0,12 Zn/Monomer und 0,17 Fe/Monomer fast in Verhältnis 1:1 standen, die insgesamt jedoch gering war.

### 3. 7. 4 Zusammenfassung der Auswirkungen der verschiedenen Metallionenzusätze

**Tabelle: 3. 1 Zusammenfassung der Auswirkungen der verschiedenen Metallzusätze**

	Kein Zusatz	Eisenzusatz	Zinkzusatz	Kobaltzusatz
Bakterienwachstum	gut	sehr gut	mit zunehmender Konzentration schlechter	gut
Proteinausbeute	++	++	+/-	+
Eisengehalt	+	+	+/-	-
Eisen/Monomer	+/-	+/-	+/-	-
Zinkgehalt	+	+	+	+
Zink/Monomer	+/-	+/-	++	+/-
Kobaltgehalt	-	-	-	-
Kobalt/Monomer	-	-	-	-
Molekülkonfiguration und Eigenschaften	12-mer stabil	12-mer stabil	Monomer nicht stabil	12-mer stabil
Modifikationen	l.a.F. < h.a.F.	l.a.F. >> h.a.F.	l.a.F. >> h.a.F.	l.a.F. = h.a.F.

l.a.F. = „low affinity“ Form; h.a.F. = „high affinity“ Form

## 3. 8 Mößbauerspektrometrie

### 3. 8. 1 Vorversuche zur Mößbauerspektrometrie

Bevor die Versuche mit Eisen-57-Isotop durchgeführt wurden, wurden Vorversuche mit  $^{56}\text{Fe}$  durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Bindung von Eisen an das Lassa-Z-Protein nicht stabil war. Die Oxidation des Proteins durch Sauerstoff führte zu einem im Verlauf der Reinigung zunehmenden Eisenverlust. Die Präparation der  $^{57}\text{Fe}$ -substituierten Proben erfolgte daher unter sauerstoffreduzierten Bedingungen: Alle Lösungen wurden mit Stickstoff begast und das Protein wurde nur unter einem Stickstoffstrom gehandhabt.

### 3. 8. 2 Auswertung der Mößbauerspektren

Abbildung 3.25 zeigt, das Mößbauerspektrum des eisenhaltigen Lassa-Z-Proteins. Die beiden Zentren A und B zeigen spektroskopische Parameter wie sie für jeweils ein  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion in einer Umgebung von vier Schwefelliganden bzw. drei Schwefelliganden und einem Imidazol-Stickstoffatom der Seitenkette eines Histidinrestes zu erwarten sind. Die beiden Zentren liegen in einem Verhältnis von 1:1 vor. Dieses bestätigt die an Hand der Primärstruktur des Proteins vorhergesagten zwei Metallbindungsstellen.

Eine genauere Analyse des experimentellen Spektrums zeigt die Anwesenheit einer niedrig konzentrierten, dritten Komponente (grüne Linie), bei der es sich um „freie“  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen handelt. Dies passt sehr gut zu der Beobachtung, dass die Eisenform des Lassa-Z-Proteins oxidationsempfindlich ist.

## Lassa Z Protein oxidiert, T = 85 K

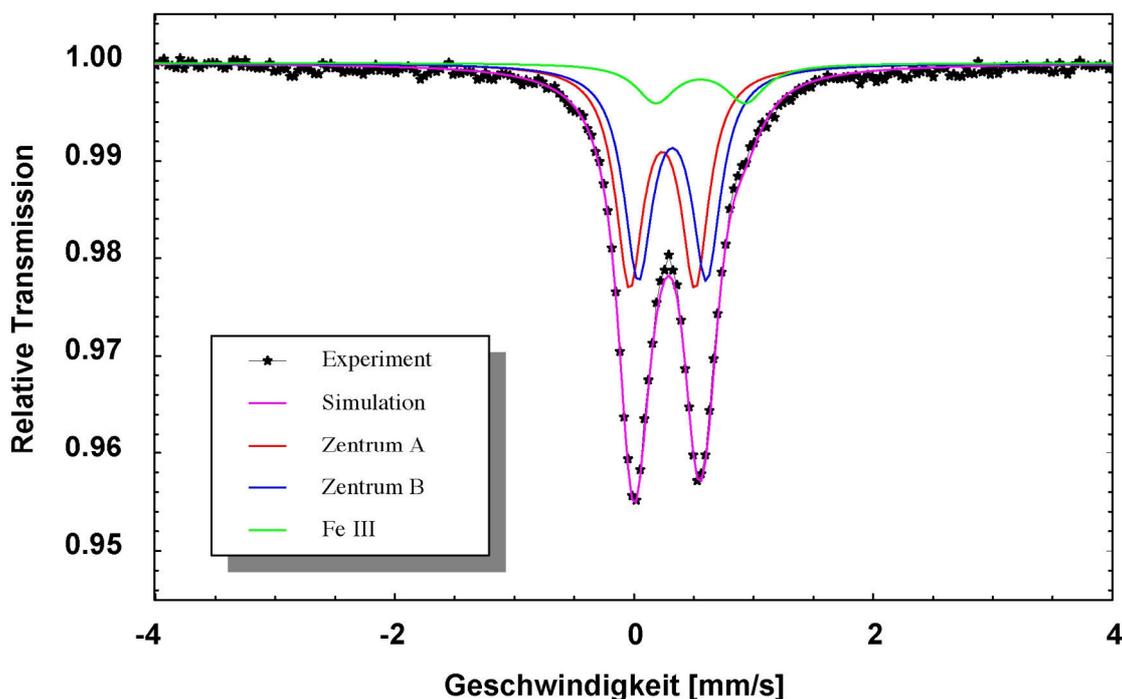


Abbildung 3. 25: Mößbauerspektrum des  $^{57}\text{Fe}$ -substituierten Lassa-Z-Proteins. Das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 85K gemessen.

Die Sternchen geben die experimentellen Zählraten an, und die magenta Linie repräsentiert die Simulation des gesamten Spektrums. Die rote und die blaue Linie zeigt jeweils die Simulationen für ein proteingebundenes Eisenzentrum. Die beiden Zentren A und B zeigen spektroskopische Parameter wie sie für jeweils ein  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion in einer Umgebung von vier Schwefelliganden bzw. drei Schwefelliganden und einem Imidazol-Stickstoffatom der Seitenkette eines Histidinrestes zu erwarten sind. Die beiden Zentren wurden mit einem Verhältnis von 1:1 simuliert. Die grüne Linie wurde mit Parametern für nicht proteingebundenes  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen simuliert. Die experimentellen Daten stimmen gut mit der Simulation überein und bestätigen die an Hand der Primärstruktur des Proteins vorhergesagten Metallbindungsstellen.

In der Abbildung 3.26 wird das in Anwesenheit eines externen Magnetfeldes gemessene Mößbauerspektrum des Lassa-Z-Proteins gezeigt. Unter diesen Versuchsbedingungen würde man für beide Zentren A und B aufgrund zwei gebundener Eisenatome die Überlagerung von zwei entsprechenden Mößbauerspektren, d. h. bis zu zwölf Linien erwarten. Wider Erwarten ergab das Experiment mit dem Lassa-Z-Protein ein völlig anderes Spektrum. Das erhaltene Spektrum ist nicht im Detail interpretierbar, deutet aber darauf hin, dass beide Eisenionen im Lassa-Z-Protein nicht unabhängig voneinander vorliegen, sondern sich in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, oder durch einen gemeinsamen Bindungspartner elektronisch gekoppelt sind. Beide Schlussfolgerungen sind

nicht ohne weitere Zusatzannahmen mit dem in Abbildung 3.28 gezeigten Homologiemodell des Proteins vereinbar. Es wäre jedoch denkbar, dass es im Zuge der Oligomerisierung des Proteins zu einer Annäherung der Metallzentren kommt.

### Lassa Z Protein oxidiert, T = 4.2 K, B = 7 T senkrecht

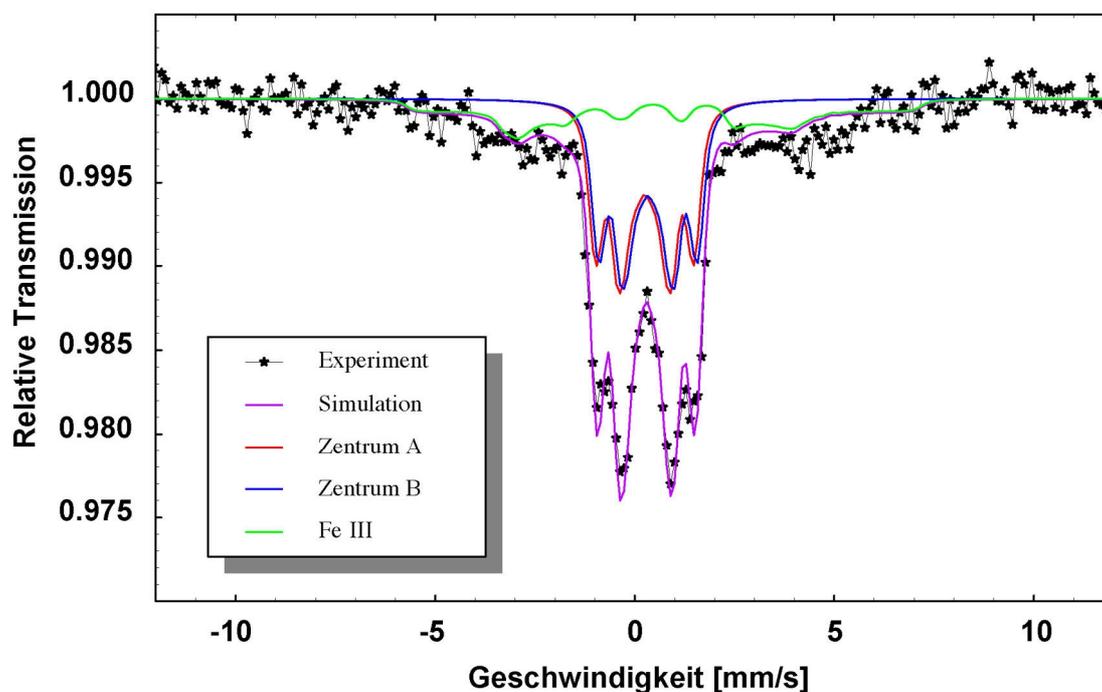


Abbildung 3.26: Mößbauerspektrum des Lassa-Z-Proteins in Anwesenheit eines externen Magnetfeldes. Das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 4,2 K gemessen. Das externe Magnetfeld hatte eine Stärke von 7 T. Die Sternchen geben die experimentellen Zählraten an, und die magenta Linie repräsentiert die Simulation des gesamten Spektrums. Die rote und die blaue Linie simulieren jeweils ein proteingebundenes Eisenzentrum unter Berücksichtigung einer elektronischen Kopplung der beiden Zentren. Die grüne Linie repräsentiert nicht proteingebundenes Fe<sup>3+</sup>.

Unter diesen Versuchsbedingungen würde man aufgrund zwei gebundener Eisenatome die Überlagerung von zwei Einzelspektren, d. h. bis zu zwölf Linien, erwarten. Das erhaltene Spektrum spricht jedoch dafür, dass beide Eisenionen im Lassa-Z-Protein nicht unabhängig voneinander vorliegen, sondern sich in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, oder durch einen gemeinsamen Bindungspartner elektronisch gekoppelt sind. Auch eine durch die Oligomerisierung bewirkte Annäherung der Eisenzentren kann hierbei eine Rolle spielen.

Abbildung 3.27 zeigt das Spektrum einer mit (ca. 5 mM) Natriumdithionit reduzierten Probe. Mit dieser Versuchsanordnung sollte versucht werden, die Bindungsstellen im reduzierten Zustand des Proteins zu charakterisieren.

Das Spektrum lässt sich mit vier Komponenten simulieren: Bei den Zentren A und B handelt es sich um die gleichen Komponenten wie in den beiden ersten Spektren. Das bedeutet, dass das Eisen in dieser Probe nicht vollständig reduziert wurde. Dies lässt sich damit erklären, dass die Probe zwar in einem Stickstoffstrom, aber nicht in einer "Glove Box" (d.h. einer geschlossenen, Sauerstoff-freien Kammer) reduziert wurden. Die größte Komponente ist "Fe II". Hier handelt es sich um Eisen, welches während, oder unmittelbar nach der Reduktion vom Protein abdissoziiert ist. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass Eisen zumindest an eine der Bindungsstellen im Z Protein nur im oxidierten Zustand binden kann. Die vierte Komponente "reduziertes Zentrum" zeigt spektroskopische Parameter wie sie für ein reduziertes Rubredoxin typisch sind. Das Auftreten dieser Komponente zeigt, dass zumindest eines der beiden Eisenzentren im Lassa-Z-Protein kurzfristig im reduzierten Zustand stabil ist. Es ist zu vermuten, dass es sich hierbei um das Rubredoxin-ähnliche Zentrum mit den vier Schwefelliganden handelt, da auch die Rubredoxine in der Lage sind  $\text{Fe}^{2+}$  stabil zu binden. Andererseits sind (soweit uns bekannt ist) keine Redoxproteine bekannt, die ein Eisenion in einer Umgebung aus drei Schwefelliganden und einem Imidazol-Stickstoffatom enthalten. Versuche ein solches Zentrum durch Mutagenese-Experimente aus dem Rubredoxin von *Pyrococcus abyssii* herzustellen ergaben nur Proteine die nicht mehr in der Lage waren Eisen stabil zu binden (Chr. Schmidt, persönliche Mitteilung).

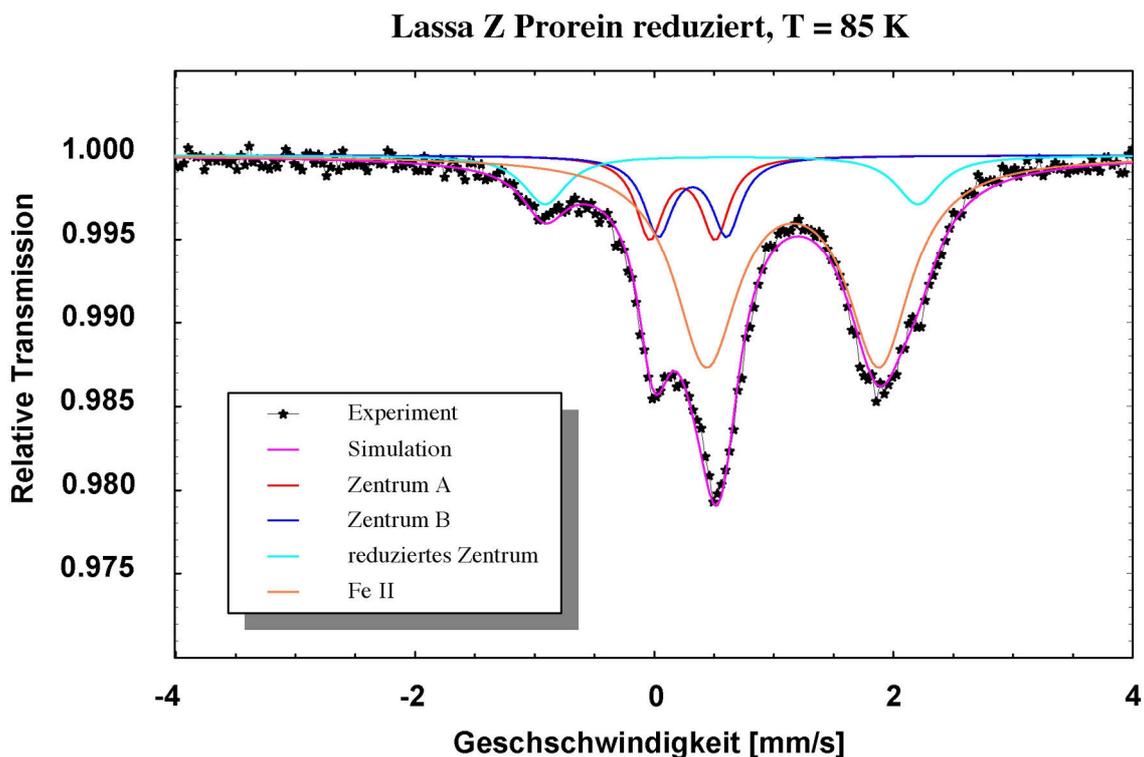
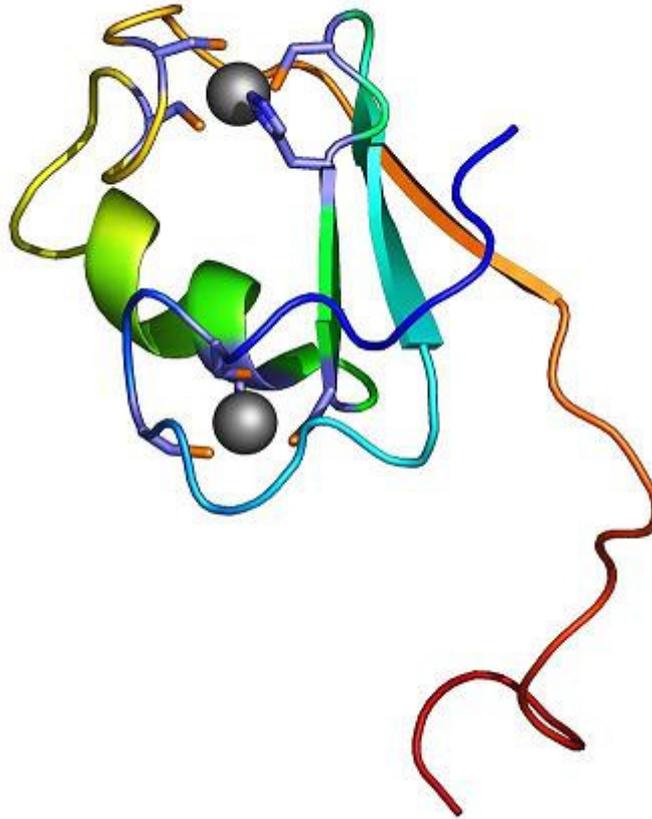


Abbildung 3. 27: Mößbauerspektrum des reduzierten  $^{57}\text{Fe}$ -substituierten Lassa-Z-Proteins. Das Protein wurde mit Dithionit (ca. 5mM) reduziert und das Spektrum bei einer Temperatur von 85K gemessen.

Die Sternchen geben die experimentellen Zählraten an, und die magenta Linie repräsentiert die Simulation des gesamten Spektrums. Die rote und die blaue Linie zeigt jeweils die Simulationen je eines oxidierten, proteingebundenen Eisenzentrums. Die türkisfarbene Linie zeigt die Simulation eines reduzierten, proteingebundenen Eisenzentrums. Die braune Linie repräsentiert freies  $\text{Fe}^{2+}$ , welches während, oder unmittelbar nach der Reduktion vom Protein abdissoziiert ist.

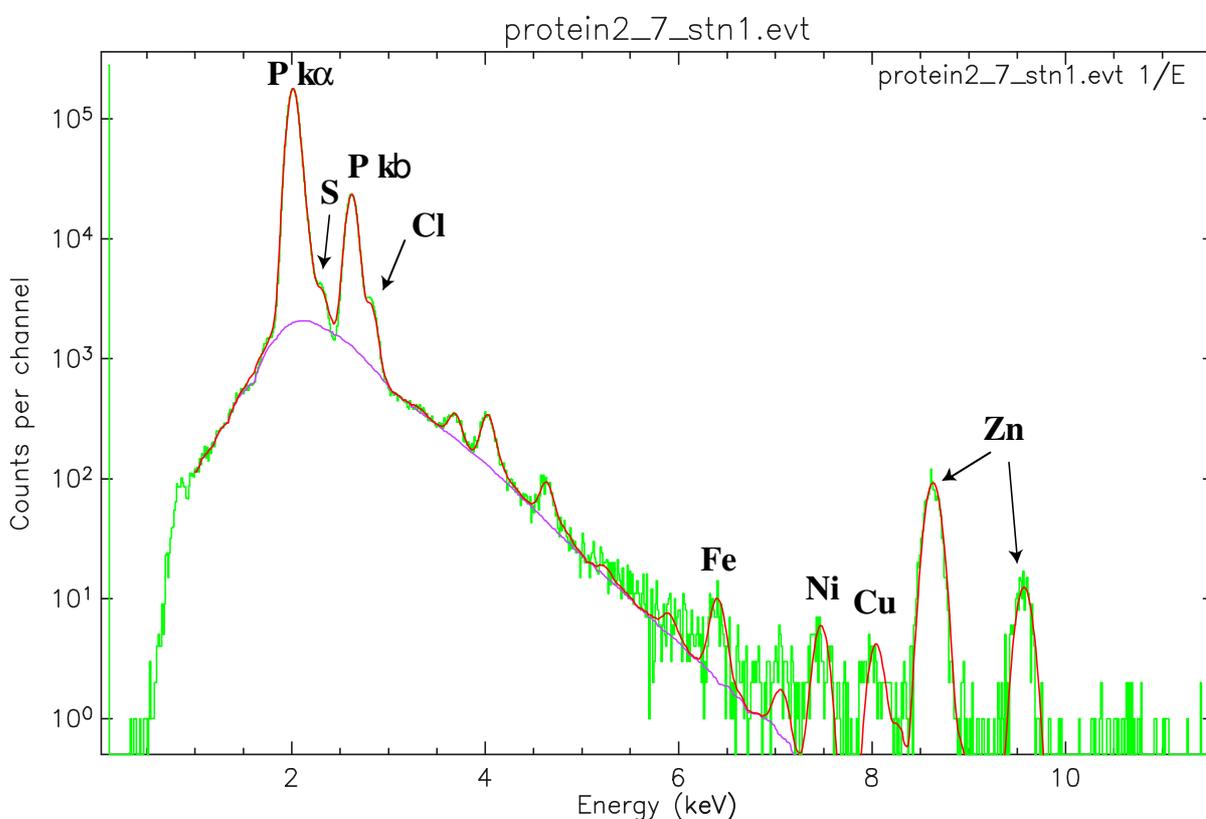


**Abbildung 3. 28: Struktur des Pferde-Herpes Z Proteins als Modell für das Lassa-Z-Protein. Der N-Terminus ist blau, der C-Terminus ist rot dargestellt. Zwischen den beiden Termini kann man den Peptidkettenverlauf gut verfolgen. Die beiden Metallionen weisen einen Abstand von 1,42 nm auf und unterliegen keiner gegenseitigen Wechselwirkung.**

Zusammenfassend kann man feststellen, dass wir damit die beiden aus der Sequenz des Z Proteins vorhergesagten Metallbindungsstellen experimentell bestätigt haben. Hinweise auf eine dritte Metallbindungsstelle, auf deren Existenz die PIXE-Messungen hindeuten (s. u.), sind in den Mößbauerspektren nicht zu finden. Das bedeutet, dass diese potentielle dritte Metallbindungsstelle im Gegensatz zu den beiden anderen Bindungsstellen keine nennenswerte Affinität zu Eisen aufweist.

### 3.9 Auswertung der PIXE-Versuche

Für die Proteinpräparation wurden die Bakterienkulturen in einem halbkonzentrierten YT-Nährmedium inkubiert, welches 2%ig (10 ml/500 ml) mit der Starterkultur beimpft wurde. Zu Beginn der Induktion wurde 0,1 mM Zink zugesetzt. Die Säulenlaufpuffer und die eluierten Fraktionen wurden stets mit Stickstoff begast, um Metallverluste durch Oxidation zu verhindern. Da für die PIXE Messungen die Proben möglichst schwefel- und chloridfrei sein müssen, wurde die pH-Einstellung bei der Pufferherstellung mit Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) anstelle von Salzsäure ( $\text{HCl}$ ) vorgenommen.



**Abbildung 3. 29: Röntgenfluoreszenz-Spektrum des Lassa-Z-Proteins (Probe 4 aus Tabelle 3.2); Das experimentell gemessene Spektrum ist in grüner Farbe dargestellt, die Simulation der Spektralanteile der einzelnen Elemente ist in „rot“ eingezeichnet. Die relative Häufigkeit der einzelnen Elemente wird durch die Integration der Spektralanteile bestimmt.**

Tabelle 3. 2 Zusammenfassung der Ergebnisse der PIXE-Analysen

	Probe 1 (h. A. F.)	Probe 2 (l. A. F.)	Probe 3 (h. A. F.)	Probe 4 (l. A. F.)
Proteinkonzentration	3.6 mg / ml	2.9 mg / ml	1.5 mg / ml	3.3 mg / ml
Fehler	+/- 20 %	+/- 20 %	+/- 100 %	+/- 20 %
Zn / Protein	0.8	2.9	0.5	3.0
Fe / Protein	0.5	< 0.1	0.6	0.1
Ni / Protein	0.1	< 0.1	< 0.2	≈ 0.1
Cu / Protein	0.2	< 0.1	0.3	0.1
Anmerkung			Proteinkonzentraion zu gering	
Summe Metall / Protein	1.6	3.2	1.6	3.1

l.a.F. = „low affinity“ Form; h.a.F. = „high affinity“ Form

Die Ergebnisse der PIXE-Analysen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die „low affinity“ Formen zeigen eine Zinkbesetzung von 3 mit einer vernachlässigbar kleinen Besetzung von anderen Metallen. Wie aus der Primärstruktur des Lassa-Z-Proteins bekannt, besitzt das Protein jedoch nur zwei Metallbindungsstellen. Die Ergebnisse der PIXE-Versuche scheinen dafür zu sprechen, dass es hier auch die Tertiär- oder gar die Quartärstruktur einen signifikanten Beitrag zur Zinkbindung/-besetzung leisten. Der Widerspruch zu den Ergebnissen aus der AAS (hier nur eine maximale Zinkbesetzung von 2 Monomeren/Protein!) könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich der mittels AAS bestimmte Metallgehalt aus dem Quotienten zweier fehlerbehafteter Größen (Proteinkonzentration und Metallkonzentration) errechnet, während die PIXE-Analyse in einer Messung direkt das Protein (gemessen anhand der Röntgenfluoreszenz des Schwefels-Metall-Verhältnis) bestimmt.

Generell ergab die PIXE-Analyse höhere Metall/Protein Verhältnisse als die AAS-Bestimmung. Beide Methoden zeigen aber übereinstimmend, dass die „low affinity“ Form des Lassa-Z-Proteins eine hohe Metallbesetzung mit fast ausschließlich Zink aufweist, während die „high affinity“ Form insgesamt eine geringere Metallbesetzung mit einem signifikanten Eisenanteil aufweist (vgl. Abschnitt 3.7.3 und 3.7.4)

Die Ergebnisse der Probe 3 waren aufgrund der zu geringen Proteinkonzentration nicht zuverlässig auswertbar.

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Eigenschaften des Lassa-Z-Proteins

Wie in der Tabelle 3.1 zusammengefasst zeigen die Versuchsergebnisse, dass das Lassa-Z-Protein in zwei verschiedene Modifikationen vorliegen kann. Es weist keine absolute Spezifität für Zink auf und bindet auch bei Zinkzusatz das ubiquitär vorkommende Eisen. Lassa Z scheint jedoch eine höhere Affinität zu Zink aufzuweisen, da auch das Protein aus den Kulturen ohne Zinkzusatz deutlich mehr Zink als andere Metalle bindet. Die Metallionen sind jedoch nicht sehr stabil gebunden und gehen teilweise im Verlauf der Aufreinigung/Lagerung verloren. Abhängig von dem jeweiligen Metalleinbau liegt das Protein als Monomer, 12-mer, oder sogar als ein höheres Polymer vor. Das zinkhaltige Protein erwies sich als besonders instabil und fiel im Vergleich zu den mit anderen Metallen beladenen Formen bevorzugt aus.

Auch von anderen Arbeitsgruppen wurden zahlreiche Untersuchungen an den Z Proteinen der Arenaviren durchgeführt (vgl. Absatz 1.2.1). In keiner der bisher publizierten Arbeiten wurde jedoch darauf eingegangen unter welchen Bedingungen genau das Z Protein für die Experimente gewonnen wurde. Der Oligomerisationsgrad, sowie die Art und Menge der gebundenen Metallionen wurden bei den bisher beschriebenen Untersuchungen nicht berücksichtigt. Die erstaunliche Vielfalt der dem Z Protein zugeschriebenen Funktionen könnte zumindest teilweise darauf zurückzuführen sein, dass das Z Protein in den beschriebenen Experimenten in Formen vorlag, die möglicherweise *in vivo* nicht vorkommen.

Andererseits muss man auch bedenken, dass die Genome der Arenaviren nur vier verschiedene Proteine kodieren, die alle, für die Existenz und Weiterverbreitung der Arenaviren nötigen Funktionen erfüllen müssen. Insofern ist eine Multifunktionalität der Virenproteine durchaus zu erwarten.

Metallfreies Protein bzw. metallgebundenes Protein (außer Zink) liegt bevorzugt als ein 12-mer vor, unabhängig davon, ob das Protein auf der Ni-NTA-Säule in „low“ oder „high affinity“ Form eluierte. Die beiden Modifikationen können demnach nicht nur durch die unterschiedliche Metallbesetzung erklärt werden. Es scheint hier auch die Faltung des Proteins eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese Tatsache müsste bei der Kristallographie zur Aufklärung der Proteinstruktur berücksichtigt werden.

In Absatz 1.2.1 wurde ausführlich auf den Zusammenhang zwischen dem Z Protein und dem PML Protein eingegangen. Obwohl das Z Protein nur zwei zinkbindende Zentren aufweist, zeigen die PIXE-Experimente, dass das Protein drei statt der zwei, nach der Primärstruktur des Proteins erwarteten, Zinkionen bindet. Auch von dem PML-Protein weiß man, dass es drei Cystein-reiche Zinkbindungsstellen aufweist (Borden et al., 1998), und damit drei Zinkionen bindet. Die Ähnlichkeit in der Funktion der beiden Proteine könnte unter anderem auch durch die Anordnung der Zinkionen bedingt sein.

Obwohl viele Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Proteinen gefunden worden sind, weisen sie auch Unterschiede auf. Die Tatsache, dass das Lassa-Z-Protein nur zwei typische Zinkbindungsstellen besitzt, manche Versuchsergebnisse für zwei gebundene Zinkionen (AAS/Mößbauerspektroskopie) andere aber auf drei gebundene Zinkionen (PIXE-Analyse) hinweisen, könnte ebenfalls dazu beitragen, die Vielfalt der dem Z Protein zugesprochenen Eigenschaften zu erklären.

Besonders zu berücksichtigen ist hierbei, dass die Sequenz des Proteins keine Hinweise auf eine dritte Metallbindungsstelle gibt, so dass diese Bindungsstelle möglicherweise erst durch die Oligomerisierung des Proteins entsteht. Die Tatsache, dass sich mit Hilfe der Mößbauerspektroskopie nur 2 der 3 Metallbindungsstellen nachweisen lassen, deutet ebenfalls darauf hin, dass sich die dritte Metallbindungsstelle von der beiden aus der Sequenz vorhergesagten unterscheidet. Offensichtlich bindet an dieser Position Zink, aber keine nennenswerten Eisenmengen. Diese Bindungsstelle könnte z. B. wie bei der Carboxypeptidase A ausschließlich von Histidin und Glutamatresten, sowie von Gruppen des Peptidrückgrads gebildet werden (Rees et al., 1983).

Zusätzlich ist stets zu bedenken, dass es sich bei den bisher beschriebenen Experimenten meist um Versuche handelte, die mit dem isolierten oder überproduzierten Protein durchgeführt wurden. Wie sich das Z Protein in physiologischer Konzentration oder zusammen mit anderen viralen Proteinen verhält, bedarf anderer Versuchsanordnungen. Auch hinsichtlich dieser Überlegungen gewinnt die dritte Metallbindungsstelle des Z Proteins an Bedeutung. Es ist denkbar, dass hier auch andere Ionen als Zink gebunden werden können. So könnte z. B. die reversible Bindung von Kalzium dazu beitragen die verschiedenen Funktionen des Z Proteins zu regulieren.

Erste Erkenntnisse hierzu könnten durch *in vitro* Bindungsstudien am gereinigten Z Protein gewonnen werden. Zur Bestätigung der physiologischen Relevanz wären jedoch *in vivo* Untersuchungen an Lassa Virus infizierten, oder Z Protein produzierenden Zelllinien nötig.

---

## 4.2 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich das isolierte Lassa-Z-Protein *in vitro* untersucht. Betrachtet man die publizierten *in vivo* Befunde (Tabelle 1.2), so fällt auf, dass bei einer Lassa Virus Infektion, abgesehen von einer Endothelschädigung, nur Thrombozytendysfunktion und Thrombozytopenie vorliegen. Es kommt nicht zu einer Disseminierten Intravasalen Gerinnung oder zu einem Mangel an Gerinnungsfaktoren. Man könnte sich hier überlegen, ob nicht die Megakaryozyten, die Vorläuferzellen der Thrombozyten, bevorzugt infiziert werden. Bis jetzt wurde die Funktion des Lassa-Z-Proteins vor allem in Zusammenhang mit PML-haltigen und u. a. retikuloendothelialen Zellen untersucht. Ein weiterer denkbarer Experimentenansatz wäre, die Wirkung des Z Proteins auf die Megakaryozyten zu untersuchen.

Die Möglichkeit das Lassa-Z-Protein in einer stabilen, einheitlichen Modifikation mit definierter Metallbesetzung zu gewinnen ist eine grundlegende Voraussetzung für die Kristallisation und nachfolgend für die Aufklärung der Struktur dieses Proteins. Erst die Struktur erlaubt das molekulare Verständnis der Wechselwirkungen des Z Proteins mit anderen zellulären Komponenten und die rationale Entwicklung von therapeutisch wirksamen Inhibitoren dieser Interaktionen.

## 5 Zusammenfassung

Das Lassa-Z-Protein ist besser löslich als das LCMV-Z-Protein. Aus diesem Grunde wurden die Versuche in dieser Arbeit weitgehend mit dem rekombinanten Lassa-Z-Protein durchgeführt. Beide Proteine liegen in zwei verschiedene Modifikationen vor, die an Hand des Elutionsverhaltens auf der Metallaffinitätschromatographie unterschieden werden können. Eine dieser Formen ist vorwiegend „eisenfrei“ die andere „eisenhaltig“. Die Entstehung der beiden Modifikationen ist nicht allein durch den unterschiedlichen Eisengehalt zu erklären. Auch bei Zugabe von anderen Metallen zum Kulturmedium eluierte das Protein meist in zwei verschiedene Formen, sodass hier zwei unterschiedliche Faltungsstrukturen des Proteins denkbar sind.

Die verschiedenen Metallzusätze haben sowohl Einfluss auf das Bakterienwachstum als auch auf die Metallbesetzung des Z Proteins. So hat die zunehmende Zinkkonzentration einen negativen Einfluss auf das Bakterienwachstum. Als optimale Zinkkonzentration erwies sich in unseren Versuchen 0,1 mM bei einer Inkubationszeit von 5 h. Obwohl das Protein eine höhere Affinität zum Zink als zu anderen Metallionen aufweist, zeigt es keine absolute Spezifität. Das zinkbeladene Protein ist bei tiefen Temperaturen instabil und fällt aus. Eisenbeladenes Protein ist oxidationsanfällig. Die oxidierte Form präzipitiert ebenfalls.

Bei hoher Zinkbeladung ( $>1/\text{Monomer}$ ) liegt das Z Protein bevorzugt als Monomer vor. Mit anderen Metallen bildet es bevorzugt stabile 12-mere. Hat das Protein kein Metall gebunden, neigt es zur höhergradigen Oligomerisierung, wobei auch hier die bevorzugte Form ca. einem 12-mer entspricht.

Kobalt selbst wird kaum in das Protein eingebaut, verhindert aber den Einbau von Eisen. Außerdem ist die Proteinausbeute höher als aus Kulturen mit Zinkzusatz. Bei einem gleichzeitigen Zink- und Kobaltzusatz bildete es ein Oligomeregemisch, sodass diese Bedingungen nicht zur Gewinnung höherer Mengen des zinkgebundenen Proteins mit einem einheitlichen Oligomerisierungsgrad geeignet waren.

Die Mößbauerspektroskopie zeigt, dass beide Eisenionen im Lassa-Z-Protein nicht isoliert voneinander liegen, sondern miteinander in Wechselwirkung stehen. Diese Interaktion beider Metallbindungsstellen kann alleine durch die Ergebnisse der Mößbauerversuche nicht näher erklärt werden. Es ist jedoch denkbar, dass es im Zuge der Oligomerisierung des Proteins zu dieser Wechselwirkung der Metallzentren kommt.

Die Metallbestimmung mit Hilfe der Protonen Induced X-ray Emissionsspektroskopie zeigte, dass die „low affinity“ Form eine Zinkbesetzung von 3 Atomen/Monomer mit einer vernachlässigbar kleinen Besetzung von anderen Ionen aufweist. Da die Primärstruktur des Lassa-Z-Proteins nur zwei Metallbindungsstellen aufweist, scheint auch bei der Metallbesetzung die Oligomerisation eine Rolle zu spielen. Da die dritte Metallbindungsstelle nicht in der Mößbauerspektroskopie zu beobachten war, weist sie keine nennenswerte Affinität zu Eisenionen auf.

Durch die in dieser Arbeit erstmals erfolgte Charakterisierung der Metall-abhängigen Oligomersierung des Lassa-Z-Proteins konnten die Voraussetzungen für erfolgsversprechende Kristallisationsversuche geschaffen werden.

## 6. Anhang

### 6.1 Puffer

Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE nach Laemmli pro 1 l:

3 g Tris (pH: 8,3)  
14,4 g Glycin  
1 g SDS

Probenpuffer für SDS-PAGE (3x konz.):

0,5 ml dest. H<sub>2</sub>O  
1,5 ml Tris 0,5 M (pH: 6,8)  
2,4 ml Glycerin 100 %  
2,4 ml SDS 10 %  
0,6 ml β-Mercaptoethanol  
0,6 ml 0,27 % Bromphenolblau in Ethanol

TE-Puffer:

1 mM EDTA  
10 mM Tris (HCl)  
pH 7,5

### 6.2 Lösungen und Färbelösungen für die SDS-PAGE

Coomassie Brilliant Blue R-Färbelösung

0,1 (w/v) % Coomassie Brilliant Blue R  
40 (v/v) % Methanol  
10 (v/v) % Essigsäure

Entfärber

40 (v/v) % Methanol  
10 (v/v) % Essigsäure

---

### 6.3 Medien

LB-Agarplatten (pro 0,5 l):

5 g Trypton  
2,5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
7,5 g Agar  
pH 7,0  
ad 500 ml mit dest. H<sub>2</sub>O

LB-Medium (pro 0,5 l):

5 g Trypton  
2,5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
pH 7,0  
ad 500 ml mit dest. H<sub>2</sub>O

YT-Medium pro 1 l:

9 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
pH 7,5  
ad 1 l mit dest. H<sub>2</sub>O

#### 6. 4 Geräte, Chemikalien, Proteine und Enzyme, Säulen

Geräte	Firmen
Amicon Centrifugal Filter Devices	Millipore
Autoklaven	Sterico, Varioklav 500 E
Chromatographie: BioCAD Sprint	PerSeptive Biosystems
Duran Flaschen	Schott
Eismaschine	Scotsman AF 20
Elektrophoresekammern	Hoefler
Heizblock	Eppendorf Thermomixer 5436, Techne Dri-Block DB-3
Inkubatoren	Hereaus, Bachofer, GFL 3032
Kühlzentrifugen	Sorvall RC-5B Zentrifuge mit SS34-Rotor
	Sorvall RC-3B Zentrifuge
Laborzentrifuge	Biofuge 13, Hereaus, Sigma 3-18 K
Magnetrührer	Heidolph MR 2002
Membranfiltrationszelle	Millipore
pH-Meter	Schott Titrator TR 156
Photometer	Amersham Ultrospec 3100 pro
Pipetten	Ependorfpipetten, Labsystems Finnpietten
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Startstedt
Spannungsversorger	Desaga Sesatronic 3000/200, LKB Typ 2197
Spektrometer Cary 50	Varian
Ultraschall-Zellhomogenisator	Branson Sonifer Cell Disruptor B 15
UV-Transluminator	Biostep
Vortexer	Heidolph
Waage	Mettler Toledo PB 3002, Sartorius 1265 MP

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Acrylamid-Lösung (29,2 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	Roth
Agar	Gerbu
Agarose	Serva
Ascorbinsäure	Merk
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Bromphenolblau	Merck
Carbimicillin	Gerbu
DTT	Gerbu
EDTA	Gerbu
Eisen 57	Physikalische Messtechnik EDV-Beratung Karl-Heinz Finder
Eisensulfat ( $\text{FeSO}_4$ )	Merk
Ethanol	Roth
Glycerin	Merck
Hefeextrakt	Becton, Dickinson und Co.
Imidazol	Merck
IPTG	Fluka
Kanamycin	Gerbu
Kobaltsulfat ( $\text{CoSO}_4$ )	Merck
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Merck
MOPS-Puffer	Gerbu
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Merck
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Merck
Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )	J. T. Baker
Nickelchlorid-Hexahydrat ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Merk
Puffer (A B, S für die Proteinbestimmung)	Bio-Rad
Salzsäure ( $\text{HCl}$ )	Merck
SDS	Serva
Tris	Gerbu
Trypton	Difco
Zinkchlorid ( $\text{ZnCl}_2$ )	Riedel-de Haën

Alle nicht einzeln genannten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich bezogen

<b>Proteine und Enzyme</b>	<b>Firma</b>
ADH	Serva
Apoferritin	Serva
Benzonase	Merk
BSA	Serva
Cytochrom C	Boehringer
Katalase	Serva
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas

<b>Säulen</b>	<b>Firma</b>
HiTrap <sup>TM</sup> Desalting (5 ml)	Amersham Biosciences
Ni-NTA-Säule (5 ml)	Amersham Biosciences
Sephacryl S 300 HR (320 ml)	Pharmacia Biotech
Superdex <sup>TM</sup> -200 (120 ml; 24 ml)	Pharmacia Biotech
Superose 6 HR (24 ml)	Pharmacia Biotech

## 7. Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CMV	Cytomegalie Virus
DIG	Disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Ebstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GP	Glycoprotein
GPC	glycoprotein precursor
HF	Hämorrhagisches Fieber
His-Tag	Histidin-Tag
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
LB	Luria-Bertoni
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitisvirus
L-RNA	long-RNA
MG	Molekulargewicht
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz
NP	nucleoprotein/nucleocapsid protein
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaktion
PIXE	Protonen induzierte Röntgenfluoreszenz
PML	Promyelozytenleukämie
ppm	parts per million
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S-RNA	short-RNA

---

---

TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
VHF	Virales Hämorrhagisches Fieber
YT	Yeast-Tryptone (Hefe-Trypton-Medium)

---

## 8 Literatur

Banerjee S N, Buchmeier M, Rawis W E: Requirement of a cell nucleus for the replication of an arenavirus. *Intervirology* 6, 190-196 (1976)

Bernard L G: Neue Seuchen durch hämorrhagische Viren. *Spektrum der Wissenschaft, Dossier: Seuchen* 3, 58-65 (1997)

Borden K L B, Dwyer E J C, Salvato M S: An Arenavirus RING (Zinc-Binding) Protein Binds the Oncoprotein Promyelocyte Leukemia Protein (PML) and Relocates PML Nuclear Bodies to the Cytoplasm. *Journal of Virology* 72, 758-766 (1998)

Chen J P, Cosgriff T M: Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. In *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 11, 461-483 (2000)

Cornu T I und Torre J C: RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replikation of an LCMV S-segment minigenome. *Journal of Virology* 75, 9415-9426 (2001)

Cornu T I, Feldmann H, Torre J C: Cells Expressing the RING Finger Z Protein Are Resistant to Arenavirus Infection. *Journal of Virology* 78, 2979-2983 (2004)

Flengi L, Fagioli M, Tomassoni L, Pileri S, Gambacorta M, Pacini R, Griganani F, Casini T, Ferrucci P F, Martelli M F, Pelicci PG, Falini B: Characterization of a New Monoclonal Antibody (PG-M3) Directed Against the Aminoterminal Portion of the PML gene product: Immunocytochemical Evidence for High Expression of PML on Activated Macrophages, Endothelial Cells, and Epithelia. *Blood* 85, 1871-1880 (1995)

Garcin D, Rochat S und Kolakofsky : The Tacaribe arenavirus small zinc finger protein is required for both mRNA synthesis and genome replication. *Journal of Virology* 67, 807-812 (1993)

Kayser F H, Bienz K A Eckert J, Zinkernagel R M: *Medizinische Mikrobiologie*, 10 Aufl., S. 483-484, Thieme Verlag, Stuttgart, 2001

Kentsis A, Dwyer E C, Perez J M, Sharma M, Chen A, Pan Z Q, Borden K L B: The RING Domains of the Promyelocytic Leukemia Protein PML and the Arenaviral Protein Z Repress Translation by Directly Inhibiting Translation Initiation Factor eIF4E. *JMB* 312, 609-623 (2001)

Perez M, Craven R C, Torre J C: The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: Implications for antiviral strategies. *PNAS* 100, 12978-12983 (2003)

Rees D C, Lewis M, Lipscomb W N: Refined crystal structure of carboxypeptidase A at 1.54 Å resolution. *Journal of molecular biology* 168 (2), 367-387 (1983)

Richmond J K und Baglolle D J: Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences. *BMJ* 327, 1271-1275 (2003)

Schmitz H: Arenaviren. In: Adam D, Doerr H W, Link H, Lode H: *Die Infektiologie*, 1. Aufl., S. 858-860, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2004

Strecker T, Eichler R, Meulen J, Weissenhorn W, Klenk H D, Garten W, Lenz O: Lassa Virus Z Protein Is a Matrix Protein Sufficient for the Release of Virus-Like Particles. *Journal of Virology* 77, 10700-10705 (2003)

### **Adressen aus dem Internet**

[www.emedicine.com/ped/byname/lymphocytic-choriomeningitis-virus.htm](http://www.emedicine.com/ped/byname/lymphocytic-choriomeningitis-virus.htm) (30. 01. 2004)

[www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/arena.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/arena.htm) (04. 12. 2005)

[www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/lcmv/.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/lcmv/.htm) (04. 12. 2005)

[www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch057.htm](http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch057.htm) (04. 12. 2005)

[www.m-ww.de/krankheiten/tropenkrankheiten/lassa.htm](http://www.m-ww.de/krankheiten/tropenkrankheiten/lassa.htm) (23. 03. 2004)

[www.physnet.uni-hamburg.de/home/vms/group\\_u/ueberuns.htm](http://www.physnet.uni-hamburg.de/home/vms/group_u/ueberuns.htm) (29. 11. 2005)

[www.physik.uni-luebeck.de/~paulsen/biophysik/6-MB.PDF](http://www.physik.uni-luebeck.de/~paulsen/biophysik/6-MB.PDF) (08. 02. 2006)

## Eigene Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen der „*International Workshop on Discovery of Antiviral Compounds*“ (26. – 29. 04. 2006, Lübeck) als Poster veröffentlicht. Ein Abstract ist nachfolgend wiedergegeben.

### **Biochemical and biophysical characterization and preliminary crystallization of the Lassa virus Z protein**

*Krishna Nagarajan, Amber Chaudhry, Lars Böttger<sup>1)</sup>, Wolfram Meyer-Klaucke<sup>2)</sup>, Stephan Günther<sup>3)</sup>, Christian L. Schmidt and Rolf Hilgenfeld*

*Institute of Biochemistry, and <sup>1)</sup>Institute of Physics, Center for Structural and Cell Biology in Medicine, University of Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck, Germany*

*<sup>2)</sup>EMBL Hamburg, c/o DESY, Notkestrasse 85, D-22603 Hamburg, Germany*

*<sup>3)</sup>Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine (BNI), Bernhard-Nocht-Strasse 74, D-20359 Hamburg, Germany*

Lassa fever is a viral hemorrhagic fever transmitted from rodents to humans mostly endemic in West Africa. Approximately 100,000 people are estimated to be infected annually including 5000 deaths (1). The Lassa virus is a member of the *Arenaviridae*, containing a bipartite, negative-strand RNA genome. The virus particles are enveloped, generally round or pleiomorphic, with a diameter of 80-150 nm. The small (S) RNA encodes the viral glycoprotein precursor protein (GPC) and the nucleoprotein (NP). The large (L) RNA encodes the viral polymerase (Lassa L) protein and the Z protein (1).

Arenaviral Z proteins are small zinc-binding proteins of approximately 99 amino-acid residues. The central RING domain consisting of about 60 residues is able to bind two zinc ions. The C-terminal part contains the so-called late domains (PTAP and PPPY), responsible for interactions with cellular target proteins to promote virus release by membrane fission (2).

The N-terminal His-tagged Lassa-Z-Protein was expressed in *E. coli* and purified on a Ni-NTA column. The addition of metal ions to the growth medium affected the solubility and the oligomerization state of the protein. The Z protein from non-metal-supplemented cultures consisted of a mixture ranging from monomers to polymers. The addition of Zn<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup> resulted in a narrower oligomer-distribution with a maximum corresponding to

12- to 14mers. The metal-binding sites of the  $^{57}\text{Fe}$ -substituted Z protein were probed by Mößbauer spectroscopy. The initial analysis confirmed the presence of two distinguishable  $^{57}\text{Fe}$ -ions in binding modes fully compatible with a homology model calculated on the basis of the coordinates of the equine Herpes virus Z protein (PDB: 1CHC). Advanced Mößbauer-studies revealed that the individual metal-ions are not electronically isolated as suggested by the homology model, but in close electronic contact, possibly due to the oligomerization.

The metal content was determined by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) and by Proton-Induced X-ray Emission-spectroscopy (PIXE). The more accurate PIXE measurements reproducibly resulted in an unexpected ratio of 3 Zn/protein monomer. Up to now, the nature and the location of the third metal-binding site are unknown. However, it could be located at the interface between the monomers.

Uni-modal protein fractions as indicated by Dynamic Light Scattering (DLS) experiments produced small crystals. Optimization of the crystallization conditions is in progress.

The elucidation of the structure and function of the viral proteins will pave the way for a better understanding of virus pathogenicity and facilitate the search for novel therapeutic antiviral compounds. This is especially important for viruses such as the Lassa virus, for which no vaccine for humans is available.

#### References:

- [1] Günther, S., and Lenz, O.: *Crit Rev Clin Lab Sci.*, **41**, 339-390 (2004)
- [2] Strecker T., Eichler R., Meulen J.T., Weissenhorn W., Klenk H.D., Garten W. and Lenz O.: *J Virol.*, **77**, 10700-100705 (2003)

## 8. Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders danke ich folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das Überlassen des Materials.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Christian L. Schmidt möchte ich besonders herzlich danken für die freundliche Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit sowie die vielen Ratschläge und geduldigen Erklärungen. Ich habe sehr gerne bei ihm gearbeitet.

Herrn/Frau ..... aus der medizinischen Fakultät, der/die freundlicherweise das Zweitreferat der Dissertation übernahm.

Frau Doris Mutschall für ihre freundliche Hilfe, die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und für die Durchführung von AAS und Vorbereitung des Proteins für die PIXE-Analyse.

Herrn Stefan Günter aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin für die Bereitstellung der Lassa- und LCMV-Klone

Herrn Lars Böttger aus dem Institut für Physik von der Universität Schleswig-Holstein Campus Lübeck für die Durchführung der Mößbauerversuche

Herrn Wolfgang Meyer-Klaucke aus EMBL Hamburg für die Durchführung der PIXE-Analyse

## 9. Lebenslauf

Name: Chaudhry  
Vorname: Amber  
Geboren am: 01. Januar 1979  
Geburtsort: Karachi/Pakistan  
Familienstand: verheiratet



Schulbildung: Abitur

1984 – 1989  
Grundschule  
New School, Lahore/Pakistan

1989 – 1991  
Hauptschule  
Hauptschule St. Nikola, Landshut

1991 – 1997  
Gymnasium  
Gymnasium der Cistercienserinnen Landshut-Seligenthal

1997 – 2000  
Gymnasium  
Städtisches Gymnasium Bad Segeberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

2000 – 2006  
Studium der Medizin  
Universität Schleswig-Holstein Campus Lübeck