

Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des
Proteins *Amoebapore A* mit Hilfe der
mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Oliver Hecht

Kiel
April 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	<i>Entamoeba histolytica</i> und Amöbiasis	4
1.2	Die <i>Amoebapores</i>	5
1.3	Psoriasin und Psoriasis	7
1.4	NMR-Spektroskopie	8
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Reinigung von <i>Amoebapore A</i>	15
2.2	Reinigung von Psoriasin.....	15
2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	15
2.4	NMR-Spektroskopie	15
2.4.1	Die Signalzuordnung in homonuklearen NMR-Spektren.....	16
2.4.2	Experimentelle Bedingungen.....	20
2.4.3	Grundlagen der Strukturberechnung	21
2.5	Bestimmung der porenbildenden Aktivität	22
2.5.1	Die Membran-permeabilisierende Aktivität des Psoriasins	22
2.5.2	Die porenbildende Aktivität von <i>Amoebapore A</i>	24
2.6	CD-Spektropolarimetrie	24
2.7	Gelfiltrationschromatographie.....	25
2.8	Diethylpyrocarbonat-Modifikation	26
3	Ergebnisse und Diskussion	27
3.1	<i>Amoebapore A</i>	27
3.1.1	NMR-spektroskopische Experimente	27
3.1.2	Die sequentielle Zuordnung.....	29
3.1.3	Die Sekundärstruktur	31

Inhaltsverzeichnis	3
3.1.4	Das H/D-Austauschexperiment 32
3.1.5	<i>Long range</i> -Kontakte 33
3.1.6	Die Struktur des Proteins <i>Amoebapore A</i> 35
3.1.7	Strukturvergleich von <i>Amoebapore A</i> , Granulysin und NK-Lysin..... 40
3.1.8	PH-Abhängigkeit..... 42
3.1.9	Ausbildung stabiler Dimere von <i>Amoebapore A</i> 43
3.1.10	Histidin-vermittelte Dimerisation von <i>Amoebapore A</i> 46
3.1.11	Ein Model der <i>Amoebapore A</i> -Oligomerisation 49
3.1.12	Biologische Bedeutung 53
3.2	Psoriasis 54
3.2.1	Strukturvergleich von <i>Amoebapore A</i> und Psoriasis 54
3.2.2	Permeabilisierung der Liposomenmembran 55
3.2.3	Konzentrationsabhängigkeit 56
3.2.4	PH-Abhängigkeit..... 57
3.2.5	Biologische Implikationen 58
4	Summary/Zusammenfassung 60
4.1	Summary 60
4.2	Zusammenfassung 61
5	Abkürzungen 64
6	Literaturverzeichnis..... 66
7	Publikationen 77
7.1	Originalarbeiten 77
7.2	Poster und Abstracts 77
8	Lebenslauf 79

1 Einleitung

1.1 *Entamoeba histolytica* und Amöbiasis

Der humanpathogene protozoische Parasit *Entamoeba histolytica* ist der Erreger der Amöbiasis, auch als Amöbenruhr bezeichnet. Diese Krankheit manifestiert sich in der Zerstörung von Wirtsgewebe, Colitis und extraintestinalen, hauptsächlich in der Leber auftretenden Abszessen (1). Etwa 50 Millionen Menschen leiden weltweit an dieser Krankheit und 100 000 von ihnen sterben jedes Jahr infolge dieser Infektion (2). Somit ist die Amöbiasis nach Malaria weltweit die zweithäufigste Todesursache infolge parasitärer Infektionen (3).

Im Gegensatz zu vielen anderen protozoischen Parasiten hat *E. histolytica* einen recht einfachen Lebenszyklus. Sie existiert entweder als infektiöse Zyste oder als amoeboid beweglicher Trophozoid. Menschen und eventuell einige nicht humane Primaten sind die einzig bekannten Wirte. Die Infektion beginnt gewöhnlich mit der Aufnahme von Zysten durch fäkal kontaminiertes Wasser bzw. Nahrung. Die säureresistenten Zysten passieren dann den Magen und gelangen anschließend über den Dünndarm in den Dickdarm, wo sie sich zum trophozoiden Stadium exzystieren. Hier ernährt sich der Trophozoid von Bakterien, um sich nach seiner Vermehrung anschließend wieder zu enzystieren. Die Ausscheidung der Zysten über den Stuhl vollendet dann schließlich den Lebenszyklus von *E. histolytica* (3).

Die Mehrheit der Infektionen mit *E. histolytica* verläuft symptomlos. Aus bisher ungeklärten Gründen können jedoch in etwa 10% der Fälle die Amöben das Darmgewebe durchdringen und sich im Körper über den Blutstrom ausbreiten. Es kommt zur invasiven Amöbiasis, die unbehandelt zum Tode führt (4). Eine Erklärung für den invasiven Verlauf der Amöbeninfektion ist derzeit noch nicht präsent, zumal die Invasion in das Wirtsgewebe eine weitere Proliferation und Enzystierung der Amöben unmöglich macht und somit eine Sackgasse in deren Lebenszyklus darstellt (5).

Eine herausragende Eigenschaft von *E. histolytica* ist ihre äußerst starke zytolytische Aktivität gegenüber einer Vielzahl von Zelltypen. Dabei stellt der direkte Kontakt zwischen *E. histolytica* und der Zielzelle eine Voraussetzung für die zytolytische

Aktivität dar (6). Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Faktoren entdeckt, die letztendlich zur Schädigung des Wirtes beitragen.

So wurde auf der Zelloberfläche der trophozoiden Form ein Galaktose/N-Acetylgalaktosamin-spezifisches Lektin entdeckt, das die Adhäsion an das Darmepithel und die Wirtszellen vermittelt (7). Des Weiteren wurden von den Amöben sezernierte Cystein-Proteinasen beschrieben, die durch das Prozessieren von extrazellulären Matrixproteinen gewebezersetzend wirken (8). Neben den bereits genannten Faktoren, gelang es, eine Familie von membranaktiven Polypeptiden, sogenannte *Amoebapores*, zu isolieren. Diese existieren in drei Isoformen, die als *Amoebapore A*, *B* und *C* bezeichnet werden (9).

1.2 Die *Amoebapores*

Die *Amoebapores* sind in der Lage, ein breites Spektrum an Zielzellen, inklusive humaner Wirtszellen und Bakterien, zu lysieren. Jüngst konnte gezeigt werden, dass Trophozoiten von *E. histolytica*, die mit Hilfe des *transcriptional silencing* des Proteins *Amoebapore A* beraubt wurden, keine pathogenen Attribute mehr besaßen (10). *E. histolytica* zerstört seine Zielzelle durch die Schädigung der Membran. Der Verlauf der Ereignisse, an dessen Ende die Zielzellen zerstört werden, d.h. Adhärenz an die Zielzelle, gefolgt von der Sekretion lytischer Faktoren in den interzellulären Spalt der Kontaktzone, erinnert stark an die zytolytische Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten. Diese sezernieren nach Kontakt mit ihrer Zielzelle ein porenbildendes Protein namens Perforin. Dieses Protein ist in der Lage, seine Zielzelle zu lysieren indem es zu Transmembranporen polymerisiert (11). Der vergleichbare Ablauf der zytotoxischen Reaktion bei *E. histolytica* und den zytotoxischen T-Lymphozyten führte dazu, auch bei *E. histolytica* nach einer porenbildenden Aktivität zu suchen. Diese wurde 1982 im Extrakt der trophozoiden Form auch gefunden (12). Sechs Jahre später gelang es, ein Protein anzureichern, dass die selben porenbildenden Eigenschaften aufwies wie die zuvor genannten. Es wird seitdem als *Amoebapore* bezeichnet (13). 1991 gelang es, dieses Protein bis zur Homogenität zu reinigen (14), um wenig später auch dessen cDNA zu isolieren und zu sequenzieren (15). Damit war die Primärstruktur des später als *Amoebapore A* bezeichneten Proteins aufgeklärt.

Bis heute wurden drei *Amoebapore*-Isoformen (*Amoebapore A*, *B* und *C*) beschrieben und biochemisch charakterisiert (14-16). Die drei Isoformen sind in

zytoplasmatischen Granula lokalisiert. Sie liegen dort in einem Mengenverhältnis von ungefähr 35:10:1 vor und bestehen alle aus 77 Aminosäureresten. Die in allen Isoformen vorkommenden Cysteinreste, insgesamt 6, sowie auch ein c-terminal lokalisierter Histidinrest sind konserviert (Abb. 1). Ansonsten sind die Aminosäuresequenzen relativ divergent. Verglichen mit *Amoebapore A* zeigen *Amoebapore B* und *C* 57% bzw. 47% Sequenzidentität (16). Untersuchungen der Sekundärstrukturen mittels Circular dichroismus (CD) zeigten, dass *Amoebapore A* ein rein α -helikales Protein ist (15). Dies wurde auch für die beiden anderen Isoformen vorausgesagt (16). Alle drei Isoformen sind in der Lage, durch Oligomerisation Poren in Membranen zu bilden und somit die Integrität von Zellmembranen zu zerstören (16, 17).

Auf Grund von Sequenzhomologien wurden die *Amoebapores* in die Strukturfamilie der *saposin-like proteins* (SAPLIP) eingruppiert. Obwohl die Mitglieder dieser Familie unterschiedliche biologische Funktionen aufweisen, sind sie doch alle in der Lage, mit Lipiden zu interagieren. Abgesehen von einer Ausnahme besitzen alle Mitglieder die bereits erwähnten 6 konservierten Cysteinreste (Abb. 1), die alle an der Ausbildung des für diese Familie typischen Disulfidbrücken-Musters beteiligt sind (18).

Trotz einer enormen evolutionären Distanz gibt es zwischen den *Amoebapores* und den Membran-permeabilisierenden Effektormolekülen aus Säugetierlymphozyten *NK-Lysin* (aus Schweinen) und *Granulysin* (human) substantielle Ähnlichkeiten in der Primärstruktur (Abb. 1). Wie *Amoebapores* so befinden sich auch *NK-Lysin* und *Granulysin* in intrazellulären Granula und sind wie diese in der Lage, Bakterien und eukaryotische Zellen zu lysieren (16, 19, 20).

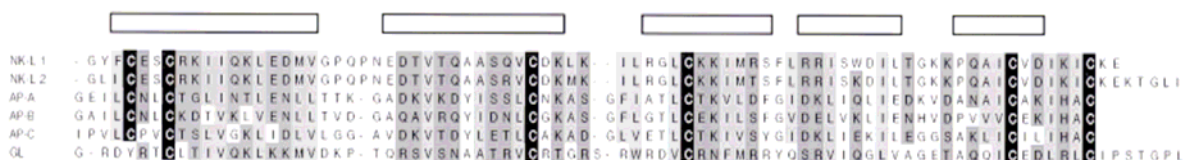


Abb. 1: Multisequenz-Vergleich der SAPLIP-Proteine NK-Lysin 1 (NK-L1), NK-Lysin 2 (NK-L2), Amoebapores A, B, C (AP-A, AP-B, AP-C) und Granulysin (GL).

Cystein-Reste sind mit weißen Buchstaben auf schwarzem Hintergrund dargestellt, konservierte hydrophobe Reste (Ile, Val, Leu, Phe, Met, Ala) sind hellgrau unterlegt und konservierte polare Reste (Asp, Asn, Glu, Gln, Arg, Lys, His, Ser, Thr) sind dunkelgrau unterlegt. Die 5 Helices in der Struktur des NK-Lysins sind durch obenliegende Rechtecke gekennzeichnet. Aus: Bruhn und Leippe (21).

1.3 Psoriasin und Psoriasis

Die Psoriasis, auch als Schuppenflechte bezeichnet, ist eine entzündliche Hauterkrankung, von der 2 bis 3% der Bevölkerung betroffen sind (22). Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine T-Zell-vermittelte Hyperproliferation der Keratinozyten und bildet verschiedene, sich teils überlappende Phänotypen aus (23). Während der Anteil von proliferierenden zu nicht-proliferierenden Keratinozyten in der normalen Haut ca. 60% beträgt (24), liegt der Anteil in der psoriatischen Haut bei annähernd 100% (25). Dabei ist die Hyperproliferation nicht auf den basalen, den Stammzell-enthaltenden Bereich begrenzt, sondern betrifft auch die suprabasalen Zellen (26). Psoriasis hat einen starken und komplexen genetischen Hintergrund. So zeigt sich in Bezug auf die Manifestation der Krankheit bei betroffenen eineiigen Zwillingen eine Übereinstimmung von annähernd 60% (27). Auch Umwelteinflüsse tragen einen Teil zur Entwicklung der Krankheit bei (28): So gilt z.B. eine Racheninfektion mit β -hämolytischen Streptokokken als der am besten dokumentierte externe Auslöser dieser Krankheit (29). Des Weiteren spielen anscheinend proinflammatorische Zytokine bei der Entwicklung der Psoriasis eine Rolle. So fand man in Psoriasispatienten erhöhte Spiegel von Interleukin (IL)-6, IL-8, Interferon-gamma (30) und IL-1 (31-33). Interessanterweise sind auch Wachstumsfaktoren wie TGF- α und IGF-1 in psoriatischer Epidermis hochreguliert (34). Wie IL-1 sind auch diese Wachstumsfaktoren in der Lage, die antimikrobiellen Peptide *human cationic antimicrobial protein* (hCAP)-18, *secretory leucocyte protease inhibitor* (SLPI), *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) und *human β -defensin* (hBD)-3, die man alle in psoriatischen Läsionen findet, zu induzieren (35-38).

Ein weiteres Protein, von dem man annimmt, dass es eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Psoriasis spielt, ist das sogenannte Psoriasin (39). Psoriasin ist ein Mitglied der S100-Familie und wird auch als S100A7 bezeichnet (40). Wie alle S100-Proteine ist es in der Lage, Calcium zu binden (41). Psoriasin wurde zunächst als ein 11.4 kDa großes, sezerniertes Protein identifiziert, dass in psoriatischer Haut exprimiert wird (42). Seine Expressionsrate liegt dort um mindestens ein 5-faches höher als in nicht-erkrankter Haut (41) (Abb. 2).

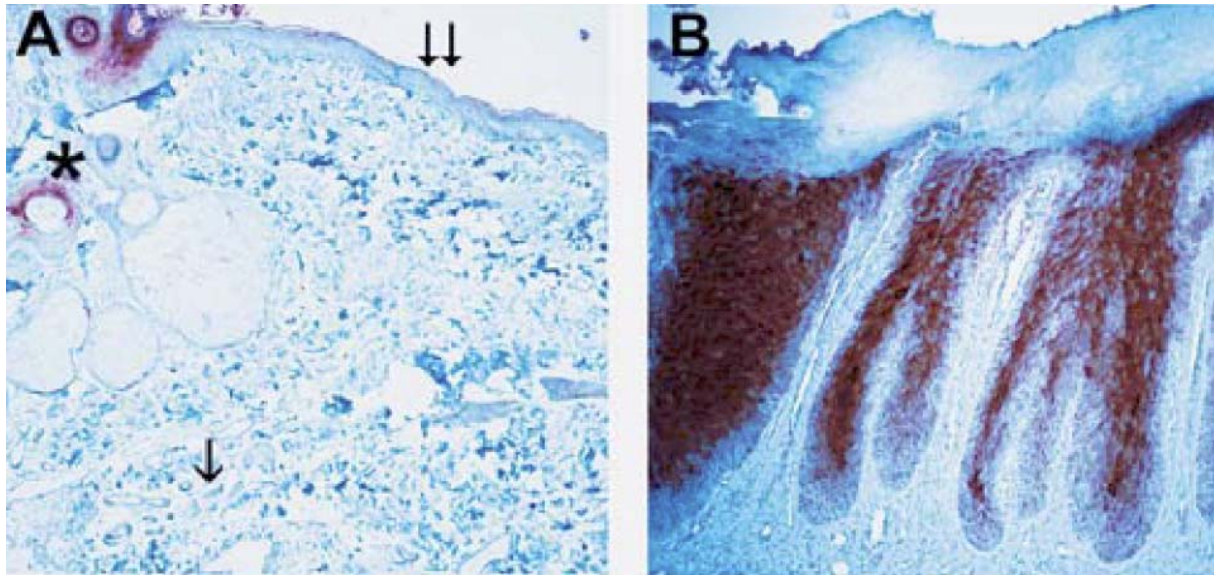


Abb. 2: Immunohistochemische Detektion (dunkle Färbung) von Psoriasin.

A. Psoriasin ist in normaler Dermis und Epidermis (Doppelpfeil) und im Bereich der eccrinen Drüsen nicht nachweisbar. Es wird jedoch im Bereich der Haarfollikel exprimiert (Stern).

B. Bei psoriatisch veränderter Haut wird Psoriasin im Bereich der oberen Lagen der Epidermis stark exprimiert Aus: Alowami, et.al. (43).

Nachfolgend konnte dann gezeigt werden, dass ein verändertes Expressionsmuster von Psoriasin auch mit einer veränderten Keratinozyten-Differenzierung assoziiert ist (44, 45). Auch in karzinös veränderten Zellen, wie z.B. bei Brustkrebs (46) oder dem *squamous cell carcinoma* (47) wurde eine verstärkte Expression des Psoriasins beschrieben. Damit wird deutlich, dass Psoriasin mit veränderten und abnormalen Wegen epidermaler Zelldifferenzierung assoziiert ist (43). Erst kürzlich konnte eine antibakterielle Aktivität für das Psoriasin nachgewiesen werden (Prof. Dr. J.-M.Schröder, mündliche Mitteilung).

Obwohl bislang viele wissenschaftliche Untersuchungen durchgeführt wurden, die molekularen Mechanismen der Psoriasis aufzuklären, ist noch immer sehr wenig darüber bekannt. Auch die Funktion des Psoriasins ist noch immer unbekannt (41).

1.4 NMR-Spektroskopie

Die kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) ist neben der Röntgenstrukturanalyse das wichtigste spektroskopische Verfahren zur Strukturaufklärung von Proteinen (48).

Sie wurde 1946 von Bloch (49) und Purcell (50) entwickelt und später durch die Einführung der Fourier-Transform-Technik durch Ernst (51) grundlegend verbessert.

Die Technik der NMR-Spektroskopie ist einzigartig in ihrer Fähigkeit, strukturelle und dynamische Eigenschaften von komplexen biologischen Molekülen unter physiologischen Bedingungen zu analysieren. Sie wurde eine Standardmethode zur Strukturbestimmung von wasserlöslichen Proteinen (52).

Die Limitierungen der NMR-Spektroskopie ergeben sich aus der relativ niedrigen Empfindlichkeit der Technik sowie dem hohen Grad an Komplexität und Informationsgehalt der NMR-Spektren. Weiterentwicklungen in der Spektrometertechnik und immer stärkere Magnetfelder mit supraleitenden Magneten verbesserten die Empfindlichkeit und spektrale Auflösung. Verfahren zur Markierung von Proteinen mit den in der Natur nur selten vorkommenden Isotopen ^{13}C und ^{15}N , erlauben, dass die Signale dieser Kerne gemessen werden können. Dadurch wird die Auswertung der Spektren extrem vereinfacht. Durch diese und weitere Entwicklungen konnten die zu Beginn auftretenden Probleme dieser Technik teilweise überwunden werden, so dass heute Proteine mit einer Masse von bis zu 80 kDa NMR-spektroskopisch untersucht werden können (53). Jüngst konnte die Arbeitsgruppe um den Nobelpreisträger Kurt Wüthrich sogar zeigen, dass selbst Proteine mit einer Masse von mehr als 100 kDa generell für die NMR-Spektroskopie zugänglich sind (54).

Die NMR-Spektroskopie basiert auf einem magnetischen Resonanzphänomen, wobei der Kernmagnetismus durch das magnetische Moment eines Atomkerns bestimmt wird. Die meisten Kerne haben einen Kern- oder Eigendrehimpuls, den sogenannten Kernspin. Alle Kerne mit einem von Null verschiedenem Kernspin I zeigen ein magnetisches Moment und können laut den Gesetzen der Quantenmechanik in einem äußeren Magnetfeld nur diskrete Energiezustände annehmen. Erfolgt eine Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment eines Atomkerns in einem konstanten Magnetfeld und einem elektromagnetischem Hochfrequenzfeld einer bestimmten Frequenz und Polarisation, so ist die Resonanzfrequenz eines Kerns gegeben. Zwischen den verschiedenen Energiezuständen der Kerne werden unter dem Einfluss eines Hochfrequenzfeldes Übergänge angeregt. Die daraus resultierende Energiedifferenz wird als Signal registriert und als Resonanzfrequenz in einem Spektrum abgebildet.

In der hochauflösenden NMR-Spektroskopie werden hauptsächlich Kerne mit einem Spin von $I=1/2$ untersucht. Dazu zählen die Wasserstoffkerne ^1H , aber auch die oben bereits erwähnten Isotopen ^{13}C und ^{15}N . Laut quantenmechanischen Gesetzen

können diese Kerne in einem statischem Magnetfeld B_0 nur zwei Orientierungen einnehmen: entweder den parallel ausgerichteten α -Zustand (*spin-up*) oder den antiparallelen β -Zustand (*spin-down*). Ausgehend vom thermischem Gleichgewicht ist die parallele Orientierung energetisch günstiger als die antiparallele. Dem entsprechend ist daher der parallele Zustand häufiger anzutreffen. Die sich daraus ergebene Differenz der Besetzungszustände führt zu einer messbaren, makroskopischen Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 (auch als M_z bezeichnet). Sie bildet sich in Richtung des angelegten Magnetfeldes aus und wird als z- oder longitudinale Magnetisierung bezeichnet. Strahlt man nun ein hochfrequentes, elektromagnetisches Wechselfeld senkrecht zum äußeren Magnetfeld ein, so kann dieser Zustand der Gleichgewichtsmagnetisierung gestört werden. Dabei wird z-Magnetisierung aus der Achse des Magnetfeldes B_0 ausgelenkt und in transversale Magnetisierung (M_x, M_y) überführt. Die mit der Larmor-Frequenz ω präzedierende transversale Magnetisierung wird durch Relaxationsprozesse wieder in longitudinale Magnetisierung überführt. Die Bloch'schen Gleichungen beschreiben diese zeitabhängige Änderung der makroskopisch beobachteten Magnetisierung (55). Bloch unterscheidet in seinen Gleichungen zwei phänomenologisch unterschiedliche Relaxationszeiten: die longitudinale (T_1) und die transversale (T_2). Die Ursachen der Relaxation sind unterschiedliche zeitabhängige Wechselwirkungen zwischen dem Spin und seiner Umgebung (T_1) bzw. den Spins untereinander (T_2). Daher wird T_1 auch als Spin-Gitter- und T_2 als Spin-Spin-Relaxationszeit bezeichnet. Die Relaxationszeiten sind abhängig von der molekularen Beweglichkeit des Moleküls in Lösung, charakterisiert durch die sogenannte Rotations-Korrelationszeit τ_c des Moleküls.

Die einfachste Form der NMR-Spektroskopie ist ein eindimensionales (1D-) Experiment. Hierbei wird während der Phase der sogenannten Präparation das Spinsystem in einen definierten Zustand gebracht, während in der Phase der Detektion die Antwort hierauf registriert wird. Die Präparation des Spinsystems besteht im einfachsten Fall aus einem etwa $10 \mu\text{s}$ lang andauernden Anregungspuls aus der x-Richtung. Bei geeigneter Wahl der Pulsdauer ist dieser Puls in der Lage, die Magnetisierung von ihrer ursprünglichen Orientierung entlang der z-Achse vollständig zur y-Achse zu überführen (Abb 3).

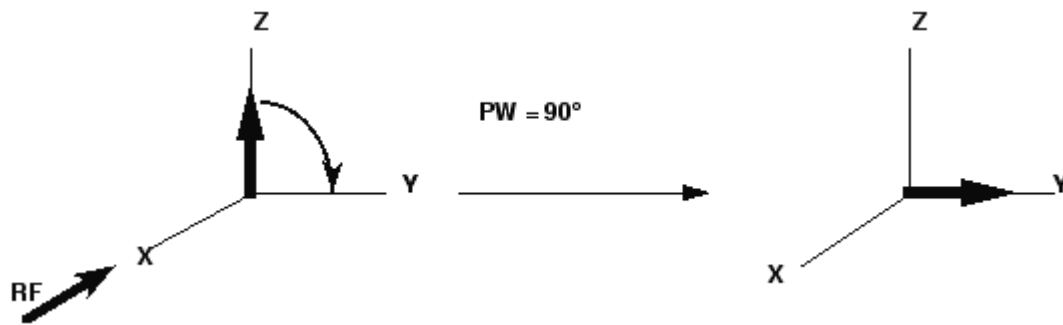


Abb. 3: Wirkung eines 90° -Pulses auf die z -Magnetisierung: Der aus der x -Richtung kommende Puls (RF) dreht die z -Magnetisierung rechtshändig um 90° um die x -Achse (links) und klappt sie vollständig zur y -Achse hin (rechts).

Nach diesem 90° -Puls präzedieren die verschiedenen Kerne mit ihren unterschiedlichen Larmor-Frequenzen um die z -Achse und induzieren in einer Empfängerspule eine Spannung, die registriert und gespeichert wird. Da diese Spannung infolge der T_2 -Relaxation abnimmt, werden die registrierten Daten als FID (*Free Induction Decay*, freier Induktionszerfall) bezeichnet. Die als FID gesammelten Daten werden nun durch eine mathematische Operation, die sogenannte Fourier-Transformation, von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne transformiert. Dadurch erhält man das endgültige 1D-Spektrum (Abb.4).

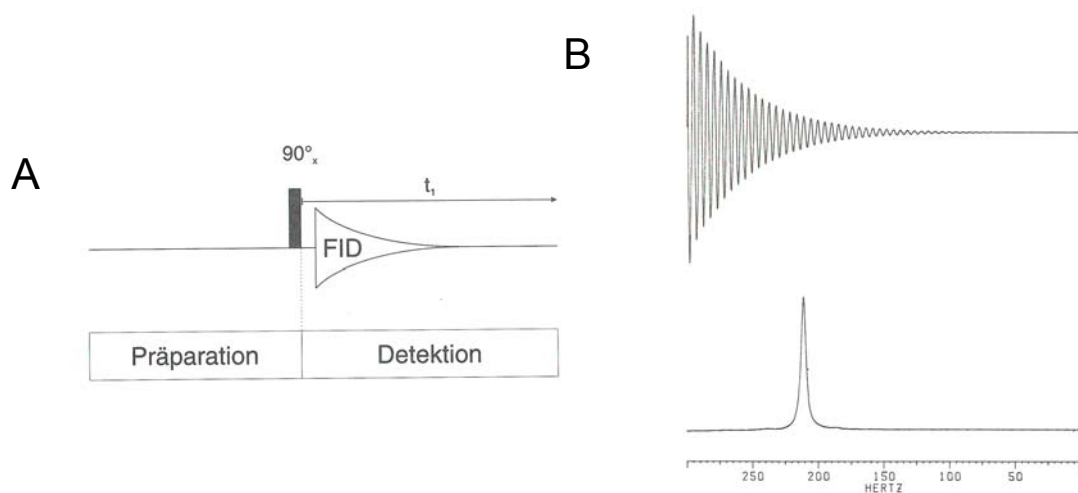


Abb. 4: Signalentstehung im 1D-Experiment: A) Schematische Darstellung der Pulssequenz eines eindimensionalen NMR-Experiments. Ein 1D-Experiment besteht aus den beiden Phasen Präparation und Detektion. Im einfachsten Fall ist die Präparation ein einzelner 90° -Puls, hier dargestellt durch einen schwarzen Balken. Anschließend wird während der Detektion die Antwort des Spinsystems (FID) auf diesen Puls registriert. Aus: F. Lottspeich und H. Zorbas (53). B). Durch die Fourier-Transformation werden die als FID gesammelten Daten (oberer Bildausschnitt) von der Zeitdomäne in Frequenzdaten übersetzt (unterer Bildausschnitt). Nach: Derome A.E. (56).

Ein grundlegender Parameter der NMR-Spektroskopie ist die chemische Verschiebung. Als chemische Verschiebung bezeichnet man den Effekt, dass sich die Larmor-Frequenzen einzelner Kerne auf Grund ihrer unterschiedlichen chemischen Umgebung voneinander unterscheiden. Dieser Effekt kommt dadurch zustande, dass die in einem Molekül den Kern umgebenden Elektronen ihrerseits ein schwaches Magnetfeld erzeugen mit dessen Hilfe sie den Kern geringfügig vom Hauptfeld abschirmen. Der Wert der chemischen Verschiebung (δ) eines Signals wird nicht in Hertz, sondern in ppm (parts per million) angegeben, da diese Einheit unabhängig von der Feldstärke des jeweiligen benutzten Magneten ist.

Auf Grund von Überlagerungen ist die Interpretation eines 1D-Spektrums für komplexere Moleküle unmöglich. Diese Überlagerungen können jedoch durch die Einführung weiterer spektraler Dimensionen aufgelöst werden. Im Falle des zweidimensionalen (2D)-Experiments werden hierzu die schon im 1D-Experiment verwendeten Bausteine der Präparation und der Datenaquisition um zwei weitere Bausteine, eine indirekte Evolutionszeit t_1 , sowie eine Mischzeit erweitert (Abb. 5).

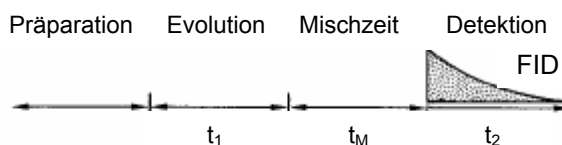


Abb. 5: Schematische Darstellung eines zweidimensionalen NMR-Experiments.

Die Spins können nach der Präparation während einer festen Zeit t_1 frei präzedieren. Die Magnetisierung wird während t_1 gleichsam mit der chemischen Verschiebung des ersten Kerns „markiert“. Durch die Mischsequenz wird anschließend der Zustand der Magnetisierung am Ende von t_1 abgefragt, sowie Magnetisierung vom ersten Kern auf einen anderen übertragen. Zum Transfer der Magnetisierung werden dabei zwei wesentliche Mechanismen verwendet: die skalaren Kopplungen, d.h. Kopplungen, die direkt über die chemischen Bindungen in einem Molekül erfolgen, und die dipolaren Kopplungen, die durch die räumliche Nähe gegeben sind. Den Abschluss des Experiments bildet die Datenakquisition (t_2 -Zeit), in der die Magnetisierung mit der chemischen Verschiebung des zweiten Kerns markiert wird. Nach Fourier-Transformation in der t_2 -Richtung erhält man somit ein 1D-Spektrum. In weiteren Einzelexperimenten wird jeweils nur die Zeit t_1 um einen festen Betrag erhöht, so dass eine Abfolge von Einzelaufnahmen entsteht. Führt man jetzt eine weitere

Fourier-Transformation diesmal entlang der t_1 -Richtung durch, so entsteht das endgültige 2D-Spektrum (53) (Abb. 6).

2D-Experimente können entweder homonuklearer Natur sein, d.h. die Messung erfolgt ausschließlich an z.B. ^1H -Kernen. Bei heteronuklearen 2D-Experimenten wird zusätzlich eine weitere Kernsorte mit einbezogen (z.B. ^{15}N oder ^{13}C). Für kleine Proteine von bis zu 100 Aminosäureresten sind homonukleare ^1H -Experimente für die Strukturaufklärung meist ausreichend. Um die dreidimensionale Struktur größerer Proteine aufzuklären, bedient man sich der heteronuklearen mehrdimensionalen NMR-Techniken. Hierzu werden die Proteine vollständig mit ^{15}N - und ^{13}C -Isotopen markiert und die Signale somit in eine dritte (3D) oder sogar vierte (4D) Dimension ausgeweitet (57).

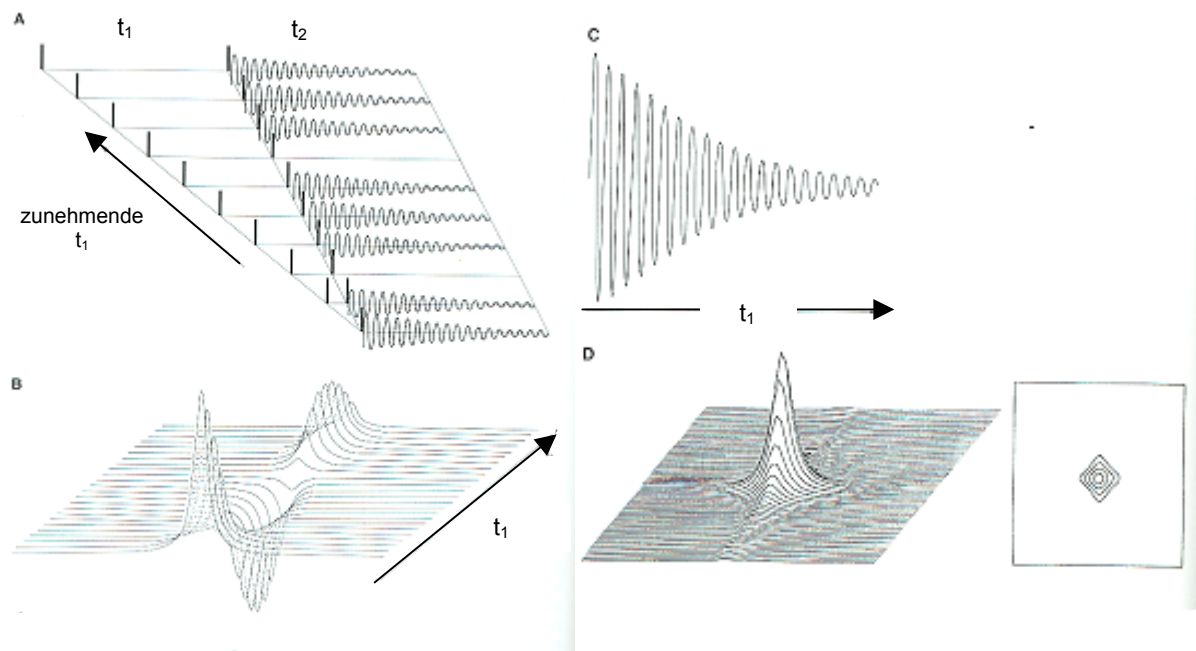


Abbildung 6: Entstehung eines 2D-NMR-Spektrums durch zweidimensionale Fourier-Transformation aus den Messdaten. A) Zwischen den aufeinanderfolgenden 1D-Experimenten eines 2D-Experiments wird jeweils die t_1 -Zeit inkrementiert. Dadurch wird die indirekte Zeitdomäne schrittweise abgetastet. B) Nach Fourier-Transformation in t_2 entsteht eine Serie eindimensionaler Spektren, die in t_1 moduliert sind. C) Schnitt durch die Daten aus B parallel zu t_1 durch die jeweiligen Maxima der Signale. Dies ist einfach ein FID in der indirekten Zeitdimension. D) Nach Fourier-Transformation auch der indirekten Dimension (t_1) entsteht eine zweidimensionale Absorptionenlinie, links in dreidimensionaler Darstellung, rechts in Aufsicht in der gebräuchlicheren Darstellung als Konturplot mit Höhenlinien. Aus: F. Lottspeich und H. Zorbas (53).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die dreidimensionale Raumstruktur des Proteins *Amoebapore A* von *E. histolytica* mittels NMR-Spektroskopie aufzuklären.

2 Material und Methoden

2.1 Reinigung von *Amoebapore A*

Das Protein *Amoebapore A* wurde freundlicher Weise von Herrn Prof. Matthias Leippe bereitgestellt und wie angegeben gereinigt:

Amoebapore A wurde aus Granula von *E. histolytica* mit einer Kombination aus saurer Extraktion, Gelfiltration und Umkehrphasen-*high-pressure-liquid-chromatography* (HPLC) gereinigt. Die Reinheit wurde mit *Sodiumdodecylsulfate*/Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS/PAGE), sowie mit Proteinsequenzanalyse und Massenspektrometrie kontrolliert (16, 21). Die gereinigten Peptide wurden anschließend lyophilisiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2 Reinigung von Psoriasin

Das Protein Psoriasin wurde von Herrn Prof. Jens-Michael Schröder und Dr. Jürgen Harder aus den Schuppen von Psoriasis-Patienten isoliert (58), und gereinigt (58, 59) und freundlicher Weise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurde mit Hilfe des Absorptionsspektrums im Bereich von 240-320 nm nach der Methode von Waxman bestimmt (60).

2.4 NMR-Spektroskopie

Da es bis heute nicht möglich ist, *Amoebapore A* bakteriell zu exprimieren, konnte es nicht mit ^{15}N oder ^{13}C markiert werden. Da eine solche Markierung jedoch für die Durchführung mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-Experimente erforderlich ist, wurde die Strukturaufklärung von *Amoebapore A* mittels homonuklearer 2D-NMR-Spektroskopie durchgeführt.

Im Prinzip ist es möglich, Strukturen von Proteinen mit einem Molekulargewicht von bis zu 10 kDa mit Hilfe von zwei homonuklearen 2D-Experimenten aufzuklären: 2D-NOESY (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*) (61, 62) und 2D-TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) (63). Diese Spektren enthalten die Informationen,

die notwendig sind, um die einzelnen Resonanzfrequenzen im Spektrum den entsprechenden Protonen im Protein zuordnen zu können.

Ein weiteres Experiment, das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist das sogenannte H/D-Austausch-Experiment. Die Austauschrate der Amidprotonen mit den Protonen des Lösungsmittels (H_2O) ist ein wichtiger Parameter für die Identifizierung von Wasserstoffbrücken (64). Beim H/D-Austauschexperiment wird die protonierte Probe in reinem D_2O gelöst und der Austausch der Amidprotonen gegen Deuterium durch die Aufnahme zeitlich versetzter NOESY-Spektren verfolgt. Da helikale Bereiche durch Wasserstoffbrücken zwischen dem Carbonylsauerstoff von i und dem Amidproton der Aminosäure $i + 4$ stabilisiert werden, erfolgt der H/D-Austausch hier nur sehr langsam.

2.4.1 Die Signalzuordnung in homonuklearen NMR-Spektren

Bei der Strukturaufklärung von Proteinen spielt das NOESY-Experiment die entscheidende Rolle. Es basiert auf der dipolaren Wechselwirkung der Kernspins, dem Kern-Overhauser-Effekt. Die dipolaren Wechselwirkungen werden über den Raum transferiert. Ihre Stärke ist in erster Näherung proportional zu $1/r^6$, wobei r der Abstand zwischen den beteiligten Kernen ist. Die Korrelation zweier Protonen ist also von ihrem räumlichen Abstand abhängig. Ein Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen wird nur dann beobachtet, wenn ihr Abstand weniger als 5 Å beträgt. Das hat zur Folge, dass neben den typischer Weise auftretenden Kreuzsignalen zwischen Protonen innerhalb eines Aminosäurerestes i (intraresiduale Kontakte), interresidualen Kreuzsignalen zwischen Protonen der Aminosäurereste i und $i + 1$ (sequentielle Kontakte) und i und $i + 2$ bis $i + 4$ (*medium range*-Kontakte) auch Protonen miteinander korreliert sind, die in der Primärstruktur weit voneinander entfernt liegen (*long range*-Kontakte), wenn ihr Abstand auf Grund der Tertiärstruktur kleiner ist als 5 Å (Abb. 7). Diese Korrelation von Protonen auf Grund ihrer räumlichen Beziehung stellt die wichtigste Strukturinformation in der NMR-Spektroskopie von Proteinen dar (53).

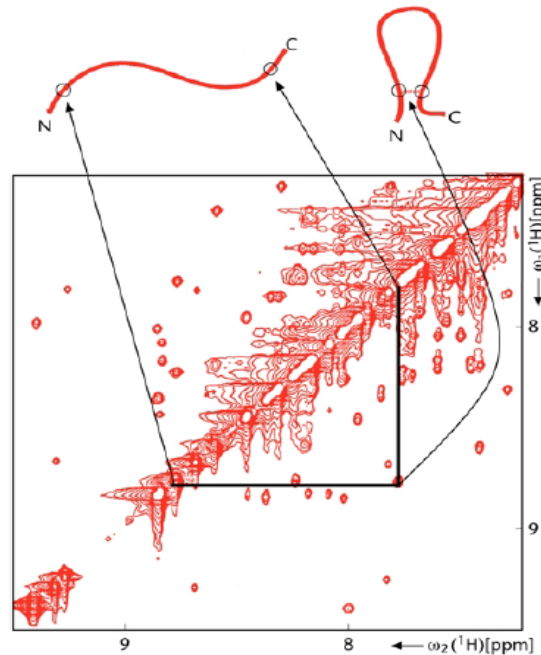


Abb. 7: Ausschnitt eines homonuklearen ^1H 2D-NOSY-Spektrums und schematische Darstellung einer Polypeptidkette mit N- und C-Terminus. Gezeigt ist ein Kreuzsignal zwischen 2 Protonen (dargestellt als Kreise), die in ihrer Primärstruktur weit voneinander entfernt liegen, sich jedoch auf Grund der Tertiärstruktur des Proteins so nahe kommen (näher als 5 Å), dass sich ein Signal entwickelt. Aus: Kurt Wüthrich (57).

Die Schwierigkeit bei der sequenzspezifischen Zuordnung der Resonanzen besteht u.a. in der Unterscheidung der Spinsysteme, d.h. es gilt herauszufinden, ob ein auftretendes Kreuzsignal intraresidualer oder interresidualer Natur ist. Um dieses Problem zu lösen, werden TOCSY-Experimente durchgeführt, die auf der Spin-Spin-Kopplung vincinaler Protonen basieren.

In einem TOCSY-Experiment wird die Magnetisierung durch einen mehrstufigen, sukzessiven Transfer über das gesamte Spinsystem verteilt. Damit sind alle Protonen eines Spinsystems, in Proteinen also eines Aminosäurerestes, über skalare Kopplungen miteinander korreliert. Daher erhält man im Spektrum für jeden Aminosäurerest ein charakteristisches Signalmuster, das dem Spinsystem dieses Aminosäurerestes entspricht (Abb. 8). Anhand dieser Signalmuster lassen sich die einzelnen Aminosäurereste identifizieren.

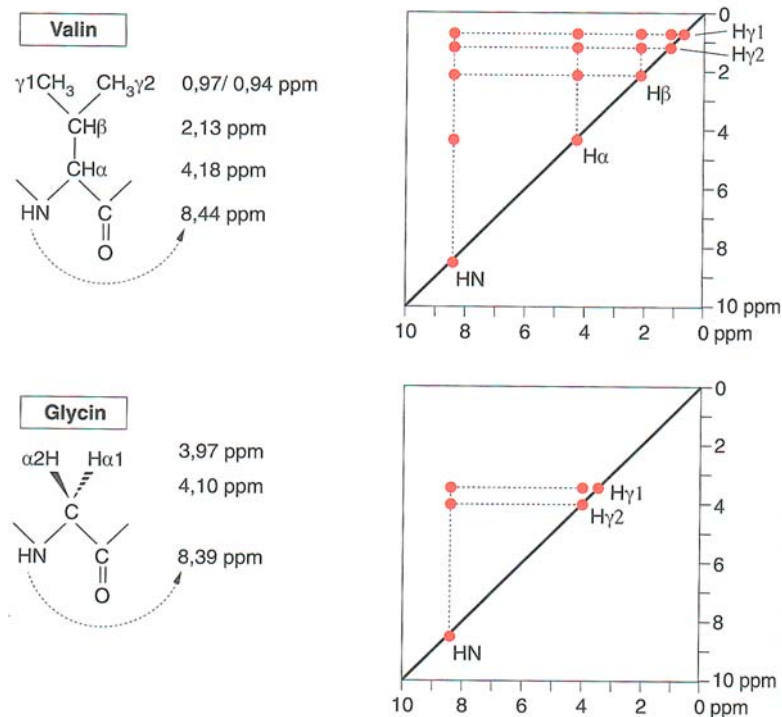


Abb. 8: Schematische Darstellung der charakteristischen Signalmuster von Glycin und Valin, die auf Grund ihrer Eindeutigkeit als Startpunkte für die sequenzspezifische Zuordnung im TOCSY-Spektrum leicht zu identifizieren sind. Auf der linken Seite sind die entsprechenden Aminosäureprotonen mit der Benennung und der typischen chemischen Verschiebung eingezeichnet. (Die unterhalb der Diagonalen symmetrisch angeordneten Signalreihen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt). Aus: F. Lottspeich und H. Zorbas (53).

Es können jedoch nicht alle Aminosäurereste durch ihr Signalmuster eindeutig identifiziert werden, da z.B. alle Aminosäuren mit einer CH_2 -Gruppe als Seitenkettenspinsystem, wie Ser, Cys, Asp, Asn, His, Trp, Phe und Tyr identische Muster aufweisen (Abb. 10).

Die Methode der Zuordnung der NMR-Signale zu den entsprechenden Aminosäureresten auf Grund ihrer Wechselwirkung mit den sequentiell benachbarten Aminosäureresten wird als sequenzspezifische Zuordnung (*sequence specific assignment*) bezeichnet und wurde maßgeblich von Kurt Wüthrich (64) entwickelt. Durch die Kombination der NOESY- und TOCSY-Spektren ist es dabei möglich, die sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen durchzuführen. Der Aminosäurerest $i + 1$ in der Sequenz kann dabei über die direkte Nachbarschaft zum Aminosäurerest i identifiziert werden (i bezeichnet jeweils die Stellung eines Aminosäurerestes in der Primärstruktur). Da auf Grund der Molekülgeometrie der Abstand des NH -Protons (Amidproton) des Aminosäurerestes $i + 1$ zu den H^α -, H^β -, bzw. H^γ -Protonen des

Aminosäurerestes i nahezu immer kleiner ist als 5 Å, kann die Verknüpfung benachbarter Aminosäurereste im NOESY-Spektrum identifiziert werden (Abb. 9).

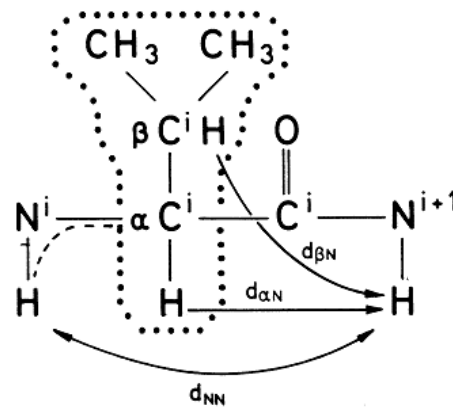


Abb. 9: Ausschnitt aus einem Polypeptidsegment. Die gepunktete Linie umkreist die H^α -, H^β -, und H^γ -Protonen, sowie die dazugehörigen Kohlenstoffatome des Spinsystems i . Die Pfeile zeigen die NOE-Konnektivitäten zwischen dem Aminosäurerest i und dem NH-Protonen (Amidproton) des Aminosäurerestes $i + 1$.

Um zwischen interresidualen und intraresidualen Signalen auf der H^N -Frequenz eines Aminosäurerestes zu unterscheiden, vergleicht man das 2D-NOESY-Spektrum mit dem 2D-TOCSY-Spektrum durch Übereinanderlegen der beiden Spektren. Auf diese Weise erhält man über die charakteristischen Signalmuster der intraresidualen Kreuzsignale die Information, um welchen Aminosäurerest es sich handeln könnte. Die sequentiellen Kreuzsignale dagegen geben über die Verknüpfung zum vorausgehenden Aminosäurerest Auskunft. Prolinreste haben im Gegensatz zu den übrigen proteinogenen Aminosäureresten kein Amidproton, so dass die Kette der sequentiellen Verknüpfungen an dieser Stelle unterbrochen wird. Da die Signalmuster der intraresidualen Kreuzsignale nicht immer eindeutig sind, muss zunächst versucht werden, Aminosäurereste, wie z.B. Glycin, Alanin, Valin und Isoleucin zu identifizieren, da deren Signalmuster sich deutlich von denen anderen Aminosäurereste unterscheidet (53) (Abb. 8). Die Signalmuster der einzelnen Aminosäurereste sowie ihre in Tetrapeptiden auftretenden chemischen Verschiebungen (*random coil chemical shifts* in ppm) sind in Abb. 10 aufgelistet.

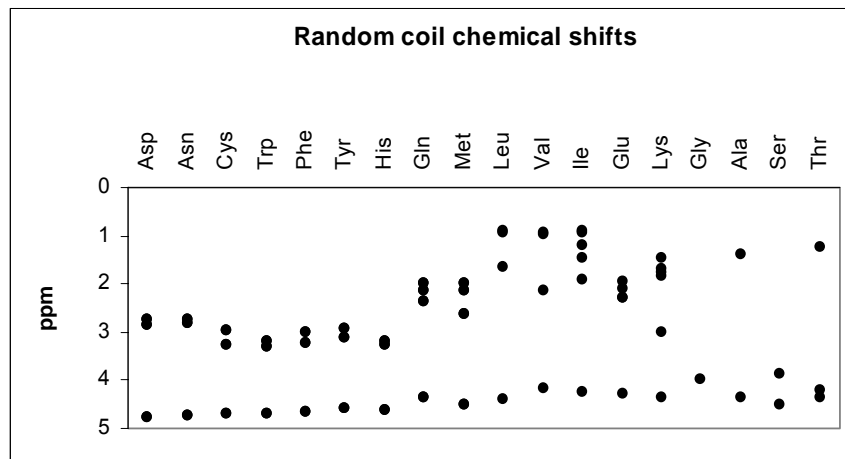


Abb. 10: Random coil ^1H chemical shifts der 20 Aminosäurereste. Zu sehen sind die für die einzelnen Aminosäuren typischen Signalmuster und ihre in nicht-terminalen Tetrapeptiden (GGXA) auftretenden Frequenzen der einzelnen Protonen in ppm. Verändert nach: Wüthrich, K. (64).

2.4.2 Experimentelle Bedingungen

Das lyophilisierte Protein *Amoebapore A* wurde in einem Gemisch aus 93% Wasser und 7% Deuteriumoxid (D_2O) aufgenommen und mit HCl auf einen pH-Wert von 3.5 eingestellt. Die Proteinkonzentration betrug 1.5 mM.

Zweidimensionale homonukleare ^1H -NMR TOCSY- und NOESY-Spektren wurden mit einem Varian INOVA 750 bzw. mit einem Bruker Avance 600/750-Spektrometer bei 600 bzw. 750 MHz und einer Temperatur von 24 °C aufgenommen. Die Mischzeiten (t_m) der 6 NOESY-Spektren betragen 60, 100, 140, 180, 250 bzw. 300 ms. Die spektrale Breite betrug 8200 Hz in beiden Dimensionen. Zur Unterdrückung des Wassersignals wurde ein schwacher Radiofrequenz (rf)-Puls während der Äquilibrierungsphase des Experiments eingestrahlt. Jedes Spektrum wurde mit 400 t_1 -Inkrementen in der direkten (F1) und 2048 komplexen Punkten in der indirekten Dimension (F2) unter Verwendung des TPPI-Schemas (65) aufgenommen. Vor der Fourier-Transformation wurden die Daten in beiden Dimensionen mit einem um 60° verschobenen Sinus als Wichtungsfunktion multipliziert und zur Verbesserung der Auflösung in t_1 ein *zero filling* der Datenpunkte auf 1024 X 1024 vorgenommen. Abschließend erfolgte eine Basislinienkorrektur mit einer polynomen Funktion.

Um das H/D-Austausch-Experiment durchzuführen, wurde das Protein wieder lyophilisiert und anschließend in 100% D_2O aufgenommen. Der pH-Wert und die Konzentration waren dieselben wie bei den vorigen Experimenten. Die NOESY-Spektren wurden mit einer Mischzeit von 150 ms auf einem Bruker AVANCE 500-

Spektrometer aufgenommen. Die spektrale Breite betrug 6009 Hz in beiden Dimensionen. Die Unterdrückung des Wassersignals erfolgte wie im zuvor beschriebenen Experiment. Auf Grund der nur sehr langsam austauschenden Amidprotonen wurde die Temperatur von anfangs 24 °C in den ersten Experimenten auf 50 °C in den letzten erhöht.

Alle Daten wurden auf einer SGI Indigo *Workstation* mit Hilfe des Programms nmrDraw (66) prozessiert. Alle nachfolgenden Prozeduren wie z.B. die sequentielle Zuordnung und die Kreuzsignalintegration wurden mit dem Programm NMRview (67) durchgeführt.

2.4.3 Grundlagen der Strukturberechnung

Zur Generierung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins müssen die aus den NOESY-Experimenten bestimmten Protonenabstände, die internen Koordinaten entsprechen, in kartesische Koordinaten überführt werden. Nur bei Kenntnis aller intermolekularen Atomabstände wäre die Lösung einer solchen Transformation eindeutig. Aus den NOESY-Experimenten sind jedoch, wie bereits erwähnt, nur solche Protonen-Protonen-Abstände zugänglich, die kleiner als 5 Å sind. Ein Verfahren, mit dem dreidimensionale Strukturen aus interatomaren Abständen generiert werden können, ist die sog. *Distance-Geometry* (DG)-Prozedur. Die mathematischen Grundlagen dieses Verfahrens wurden von L. M. Blumenthal (68) entwickelt und von Crippen in den Bereich der chemischen Strukturaufklärung eingeführt (69, 70). Bei der *Distance-Geometry*-Prozedur, die für die Strukturgenerierung des Proteins *Amoebapore A* verwendet wurde, werden aus allen verfügbaren Abstandsbedingungen den Bindungs- und Torsionswinkel sowie den van-der-Waals-Radien Matrices von Abstandsgrenzen für jedes Atompaar erstellt. Dieser Satz von Abständen wird aus dem n -dimensionalen Abstandsraum in den Raum eines kartesischen Koordinatensystems projiziert, in dem dann die Koordinaten für alle Atome des Proteins bestimmt sind (53).

Die Strukturberechnungen wurden mit dem Programm DYANA (71) durchgeführt. Die aus den NOESY-Spektren bestimmten Intensitäten der *crosspeaks* wurden dazu zunächst in die entsprechenden interatomaren Abstände überführt. Dazu wurden die Intensitäten der 709 NOE-*cross-peaks* als stark, mittel oder schwach klassifiziert und ihnen die entsprechenden interatomaren Abstandsgebiete von 1.8 - 2.8, 2.8 - 3.4, bzw. 3.4 - 5.0 Å zugeteilt. Die so berechneten Abstände wurden dann in der

Distance-Geometry-Prozedur als obere Grenzen des Abstandes eingesetzt. Die unteren Grenzen ergaben sich jeweils aus der Summe der van-der-Waals-Radien der beiden beteiligten Atome. Zusätzlich zu den aus den Intensitäten der NOE-*cross-peaks* generierten Abstände wurden 2×58 Abstände von den an Wasserstoffbrücken beteiligten Atomen sowie 3×12 Abstände von den an Disulfidbrücken beteiligten Atomen in der Berechnung berücksichtigt. Dabei waren die Verknüpfungen der Disulfidbrücken bekannt und die der Wasserstoffbrücken gingen aus dem H/D-Austauschexperiment hervor. Die interatomaren Abstände der an Wasserstoffbrücken beteiligten Atome wurden mit 1.8 - 2.4 Å, und 2.8 - 3.4 Å für H/O- bzw. N/O-Distanzen berücksichtigt. Die interatomaren Abstände der an Disulfidbrücken beteiligten Atome gingen mit 2.03 - 2.15, 3.03 - 3.13 und 2.97 - 4.49 Å für S γ /S γ , S γ /C β bzw. S γ /C α -Distanzen in die Rechnung ein. Insgesamt wurden somit 1570 interatomare Abstände (obere und untere Grenzen) in die Strukturberechnung einbezogen und 75 Strukturen berechnet. Von diesen 75 Strukturen wurden die 20 mit der geringsten potentiellen Energie (*lowest target funktion*) ausgewählt. Die 20 Strukturen dieses Ensembles wurden abschließend superpositioniert, um eine geometrisch gemittelte Struktur (*average structure*) zu generieren.

2.5 Bestimmung der porenbildenden Aktivität

2.5.1 Die Membran-permeabilisierende Aktivität des Psoriasins

Die porenbildende Aktivität von Psoriasin wurde mittels Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein aus Liposomen bestimmt (*calcein release assay*).

Hierzu wurden zunächst die benötigten Puffer (A und B) hergestellt:

Puffer A: 10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes (Boehringer)), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA (Fluka)), pH 7.4.

Puffer B: 10 mM Hepes, 150 mM Natriumchlorid (NaCl), 1mM EDTA, pH 7.4.

Die Puffer wurden vor Gebrauch filtriert (Millex-GV 0.22 μ m Filter (Millipore)).

5 mg Calcein (Fluka) wurden in 270 μ l Puffer A nach Zugabe von 5-10 μ l 1 M Natronlauge gelöst (Calceinkonzentration = 30 mM).

Für die Liposomenpräparation wurden anschließend 2.5 mg grob gereinigtes Phosphatidylcholin (Asolektin (Fluka)) in 1.5 ml Chloroform gelöst und im Rotationsverdampfer so eingeengt, dass sich an der Kolbenwand ein dünner

Lipidfilm bildete. Dieser wurde in 270 μl Calceinlösung (s.o.) suspendiert und anschließend 1 min geschüttelt. Es folgten vier Zyklen von abwechselndem Gefrieren bei -196°C (flüssiger Stickstoff) und Auftauen bei 37°C (Wasserbad). Zwischen den einzelnen Zyklen wurde jeweils 30 Sekunden geschüttelt. Die Suspension wurde anschließend mit 280 μl Puffer A aufgefüllt und solange auf Eiswasser sonifiziert (SONOPULS, BANDELIN electronics), bis die Trübung verschwand. Die so hergestellten Liposomen wurden, um das nicht in den Liposomen eingeschlossene Calcein zu entfernen, mit Hilfe einer Gefiltrationssäule PD5 (Amersham Biosciences) gereinigt. Dazu wurden 0.5 ml der Liposomensuspension auf die mit Puffer B equilibrierte Säule aufgetragen und zunächst mit 0.3 ml Puffer B eluiert. Dieses erste Eluat wurde verworfen. Anschließend wurde mit 0.35 ml Puffer B eluiert. Dieses Eluat, welches die Liposomen enthielt, wurde für die Messungen verwendet.

Die Detektion der porenbildenden Aktivitäten erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers (F-2500, Hitachi) bei einer Excitationswellenlänge von 494 nm und einer Emissionswellenlänge von 512 nm. Hierzu wurden 5 μl Liposomeneluat zu 500 μl in einer Halbmikroliterküvette befindlichen Puffer (s.u.) gegeben und die Grundfluoreszenz bestimmt. Dieser Wert entspricht einer 0%igen Aktivität. Danach wurde die Probe hinzugegeben und die Fluoreszenz so lange gemessen, bis kein weiterer Anstieg mehr erfolgte. Anschließend wurden 5 μl Triton X-100 (10% in ddH₂O) hinzugefügt. Durch das Triton wird die Liposomenmembran vollständig zerstört und das gesamte eingeschlossene Calcein freigegeben, so dass der Fluoreszenzwert nach Triton-Zugabe als 100%-Wert galt. Die prozentuale Aktivität ist demnach definiert als:

$$\% \text{ Aktivität} = \frac{(\text{Fluoreszenz nach Probenzugabe} - \text{Grundfluoreszenz}) \times 100}{(\text{Fluoreszenz nach Triton X-100} - \text{Grundfluoreszenz})}$$

Die Messungen erfolgten bei pH 5.0, 5.25 und 5.5 unter Verwendung von 50 mM Natriumacetatpuffer bzw. bei pH 6.0, 6.5, 7.0 und 7.5 unter Verwendung von 50 mM Natriumphosphatpuffer. Alle Puffer wurde mit NaOH, bzw. HCl auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

2.5.2 Die porenbildende Aktivität von *Amoebapore A*

Die porenbildende Aktivität von *Amoebapore A* wurde über eine Membrandepolarisation mit dem Fluoreszenzfarbstoff 3,3'-Diethylthiocarbocyaniniodid (Kodak) mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers (F-2500, Hitachi) gemessen. Dabei betragen die Excitations- und Emissionswellenlängen 620 bzw. 670 nm.

Für die Liposomenpräparation wurden 60 mg grob gereinigtes Phosphatidylcholin (Asolektin; Fluka) in 1.5 ml Chloroform gelöst und im Stickstoffstrom so eingeengt, dass sich an der Kolbenwand ein dünner Lipidfilm bildete. Um etwaige Lösungsmittelreste zu entfernen, wurde der Lipidfilm danach mehrere Stunden im Excikator getrocknet. Der Lipidfilm wurde anschließend durch 15-minütiges Schütteln in 1.5 ml Puffer (50 mM Kaliumsulfat, 0.5 mM EDTA, 50 mM Tris-Maleat, pH 5.2) suspendiert (Lipidkonzentration = 40 mg/ml). Die so entstandene Lipidsuspension wurde 15 min unter Eiskühlung sonifiziert. Darauf folgten vier Zyklen von abwechselndem Gefrieren bei -196°C (flüssiger Stickstoff) und Auftauen bei 37°C (Wasserbad). Dann wurde nochmals 15 min unter Eiskühlung sonifiziert.

Für die Messung wurden die Liposomen 1:4000 mit Puffer (50 mM Natriumsulfat, 0.5 mM EDTA, 50 mM Tris-maleat) verdünnt und der pH auf 5.2 eingestellt. Durch die Zugabe von 1 nM Valinomycin wurde ein K^+ -Diffusionspotential über die Liposomenmembran induziert. Der Fluoreszenzfarbstoff wanderte in die Liposomen und die Fluoreszenz wurde unterdrückt (0% Fluoreszenz). Nach Zugabe eines porenbildenden Proteins kann der Farbstoff wieder entweichen. Der Anstieg der Fluoreszenz innerhalb einer Minute bei Raumtemperatur nach Proteinzugabe auf 5% des Wertes vor Valinomycinzugabe wurde als eine Aktivitätseinheit definiert.

2.6 CD-Spektropolarimetrie

Die CD-Spektroskopie beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht. Proteine weisen im Bereich des fernen UV (180-250 nm) in Abhängigkeit ihrer Sekundärstrukturen einen circularen Dichroismus auf.

CD-Spektren in diesem Spektralbereich können zur Bestimmung des relativen Anteils verschiedener Sekundärstrukturanteile eines Proteins verwendet werden. Diese Analyse basiert auf der Annahme, dass das CD-Spektrum eines Proteins im

fernen UV durch eine Linearkombination bekannter CD-Spektren der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente dargestellt werden kann (53).

Die CD-Messungen wurden auf einem Jasco J-720-Spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Ltd., Tokyo, Japan) durchgeführt. Das Spektrometer wurde nach Chen und Yang kalibriert (72). Die spektrale Bandweite betrug 1 nm. Die Messungen wurden bei 24 °C durchgeführt.

2.7 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie (kurz Gelfiltration, oder auch Größenausschlußchromatographie genannt) bietet die Möglichkeit, Makromoleküle auf Grund ihres hydrodynamischen Volumens und somit zumeist entsprechend ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte zu trennen. Die Gelfiltration bietet dabei u.a. folgende Vorteile: 1. milde Bedingungen erlauben auch die Isolierung instabiler Substanzen; 2. geringer Verlust an Substanz; 3. hohe Reproduzierbarkeit; 4. Substanzen, die sich in ihrem Molekulargewicht um 25 % voneinander unterscheiden, können zumeist während einer einzigen Chromatographie vollständig voneinander getrennt werden.

Die Matrix einer Gelfiltrationssäule besteht aus kleinen Partikeln mit schwammartiger Struktur von relativ einheitlichem Porendurchmesser. Kleine Moleküle können in die Poren eindringen und werden auf ihrem Weg durch die Säule länger zurückgehalten, während den großen Molekülen nur das Volumen außerhalb der Matrix zur Verfügung steht. Hierauf beruht generell das Trennverfahren bei der Größenausschlußchromatographie (73).

Für die Gelfiltration wurde ca. 1.2 mg gefrietrocknetes *Amoebapore A* in 50 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 3.5), 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 5.2) bzw. 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8.0) gelöst. Die Proben von jeweils 1 ml Volumen wurden 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann der Gelfiltration zugeführt. Bei der Gelfiltrationssäule handelte es sich um eine mit dem jeweiligen Puffer (s.o.) äquilibrierte Superdex-75-(16/60)-Säule (Amersham Biosciences), die bei den Experimenten mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min bei 4 °C betrieben wurde. Während der Gelfiltration wurde das aufgetrennte Protein in 3-ml-Fractionen gesammelt.

Für die Kalibration der Säule wurde ein Gemisch aus vier Proteinen bekannter Größe verwendet: Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa) und Ribonuklease A (13.7 kDa).

2.8 Diethylpyrocarbonat-Modifikation

Das Ziel der chemischen Modifikation mittels Diethylpyrocarbonat (DEPC) war die Überführung eines Histidylrestes in ein nicht mehr ionisierbares N-carbethoxyhistidyl-Derivat (74) (Abb. 11).

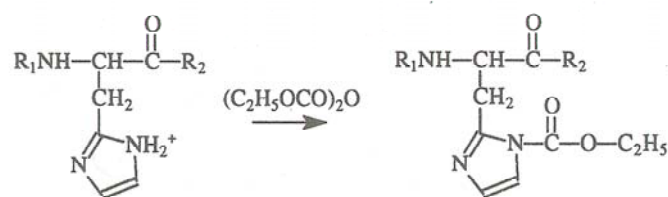


Abb. 11: Modifikation eines Histidylrestes (links) in ein N-carbethoxyhistidyl-Derivat (rechts) mittels DEPC.

Dazu wurden 0.58 mg *Amoebapore A* in 4.0 ml 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6.0) gelöst. Nach Inkubation mit der 200-fach molaren Menge an DEPC für zunächst 1.5 h bei 4 °C und nachfolgender Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur (RT) wurde die Lösung der Gelfiltration zugeführt und anschließend mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 5.2) bei 4 °C eluiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Amoebapore A

3.1.1 NMR-spektroskopische Experimente

3.1.1.1 Das NOESY-Experiment

Ein wichtigstes Experiment zur Strukturaufklärung von Proteinen ist das NOESY-Experiment, da es die für die Strukturaufklärung essentiellen Protonen/Protonen Abstandsinformationen enthält. Abbildung 12 zeigt das mit einer Mischzeit von 180 ms aufgenommene NOESY-Spektrum von *Amoebapore A*.

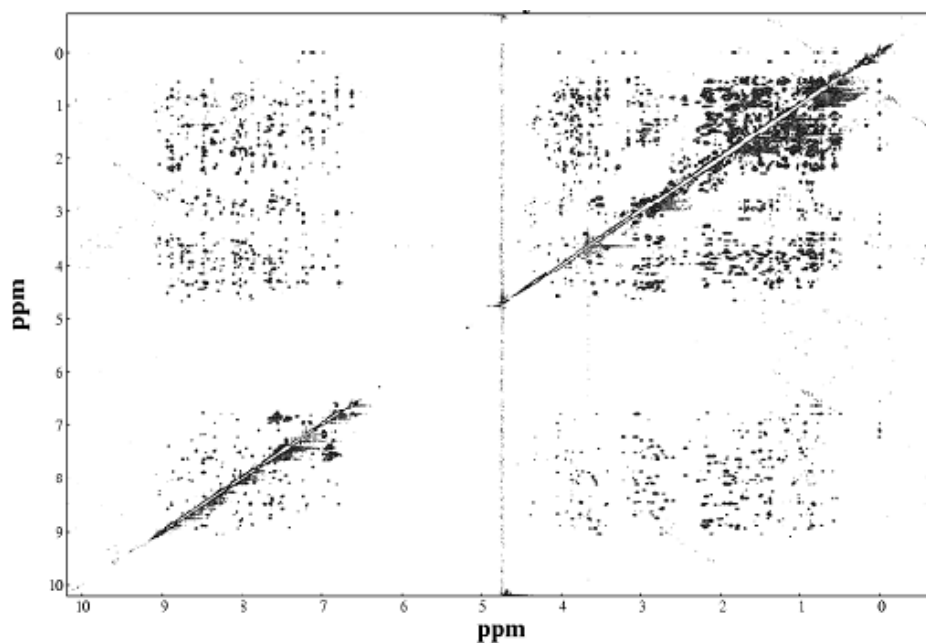


Abb. 12: Komplettes NOESY-Spektrum von *Amoebapore A*. Zu sehen sind alle Kreuzsignale, die auf dipolar koppelnden Protonen beruhen, deren Abstand kleiner als 5 Å ist.

Anhand der großen Dispersion der Signale lässt sich auf den ersten Blick erkennen, dass das Protein eine definierte Tertiärstruktur besitzt. Die im Noesy-Spektrum zu erkennende Diagonale spiegelt das 1D-Spektrum von *Amoebapore A* wider. Die einzelnen spektralen Bereiche, in denen sich die Kreuzsignale befinden, sind in Abb. 13 schematisch dargestellt. Es ist auffällig, dass sich im H^N-H^N-Bereich des NOESY-Spektrums von *Amoebapore A* sehr viele Kreuzsignale befinden (Abb. 12). Diese große Zahl an H^N-H^N-Kontakten ist typisch für ein α -helikales Protein (64).

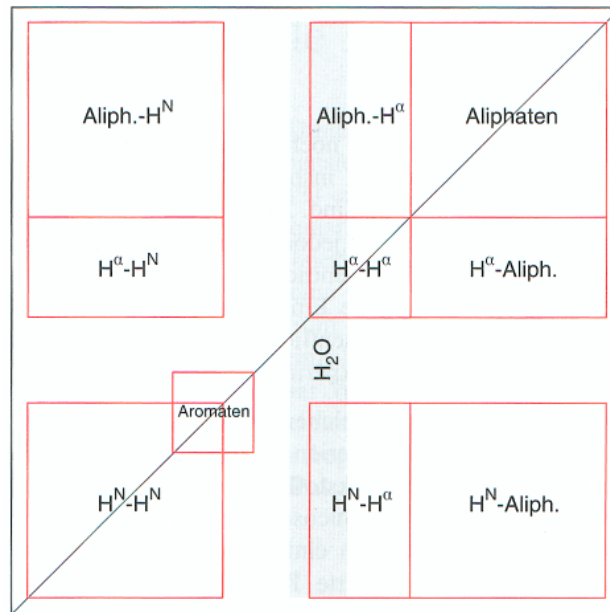


Abb. 13: Schematische Darstellung eines NOESY-Spektrums. Die verschiedenen spektralen Regionen, die man im NOESY-Spektrum von *Amoebapore A* sehen kann, sind hier als rote Rechtecke dargestellt. Die in den betreffenden Regionen beobachteten NOE-Signale sind jeweils innerhalb der Rechtecke angegeben. Die Wasserlinie ist als graues Rechteck dargestellt. Im NOESY-Spektrum von *Amoebapore A* befinden sich innerhalb der Aromätenregion ebenfalls die H^N -Signale der Amidgruppen von Asparagin und Glutamin. Nach: F. Lottspeich und H. Zorbas (53).

3.1.1.2 Das TOCSY-Experiment

Bei der Strukturaufklärung mittels homonuklearer 2D-NMR-Spektroskopie benötigt man das TOCSY-Experiment um zwischen intraresidualen und interresidualen Kontakten zu unterscheiden. Abbildung 14 zeigt das TOCSY-Spektrum von *Amoebapore A*. Da das TOCSY-Spektrum nur Kreuzsignale beinhaltet, die innerhalb eines Spinsystems entstehen, ist die Anzahl der im TOCSY-Spektrum auftauchenden Signale naturgemäß geringer als die in einem NOESY-Spektrum. Besonders auffällig ist dies in dem Bereich, in dem im NOESY-Spektrum die zahlreichen H^N - H^N -Kontakte auftreten. In diesem Bereich entwickeln sich im TOCSY-Spektrum nur die Signale der Aromäten sowie die H^N -Signale der Amidgruppen von Asparagin und Glutamin.

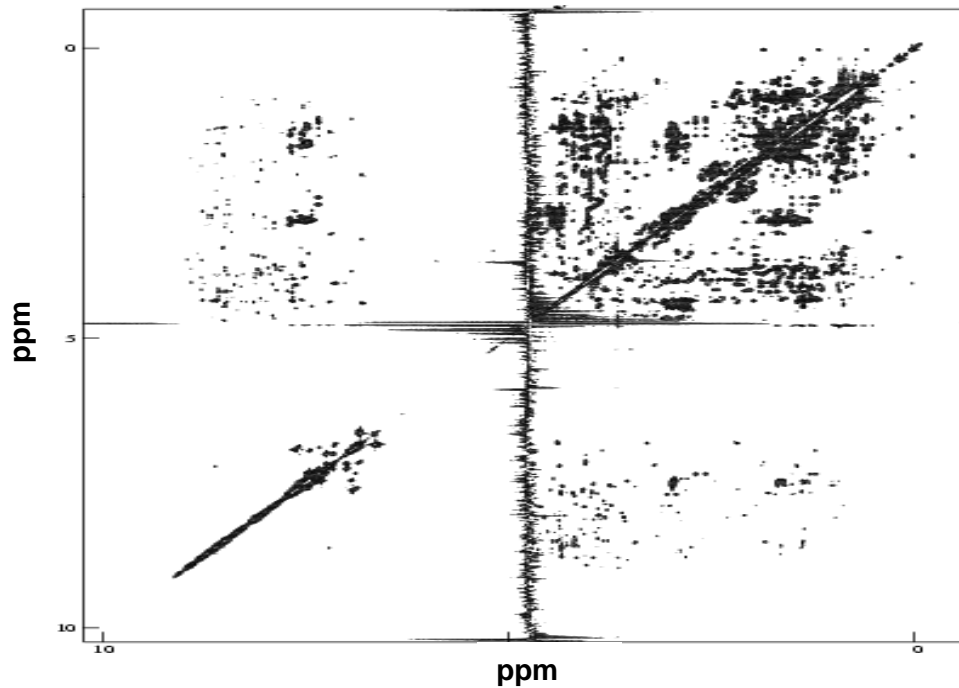


Abb. 14: Komplettes TOCSY-Spektrum von Amoebapore A. Zu sehen sind alle Kreuzsignale, die auf skalar koppelnden Protonen beruhen.

3.1.2 Die sequentielle Zuordnung

Um zwischen interresidualen und intraresidualen Signalen eines Aminosäurerestes unterscheiden zu können, vergleicht man das 2D-NOESY-Spektrum mit dem 2D-TOCSY-Spektrum durch Übereinanderlegen der beiden Spektren. Dies soll hier exemplarisch am Beispiel des Aminosäurerestes Asp-25 von Amoebapore A gezeigt werden:

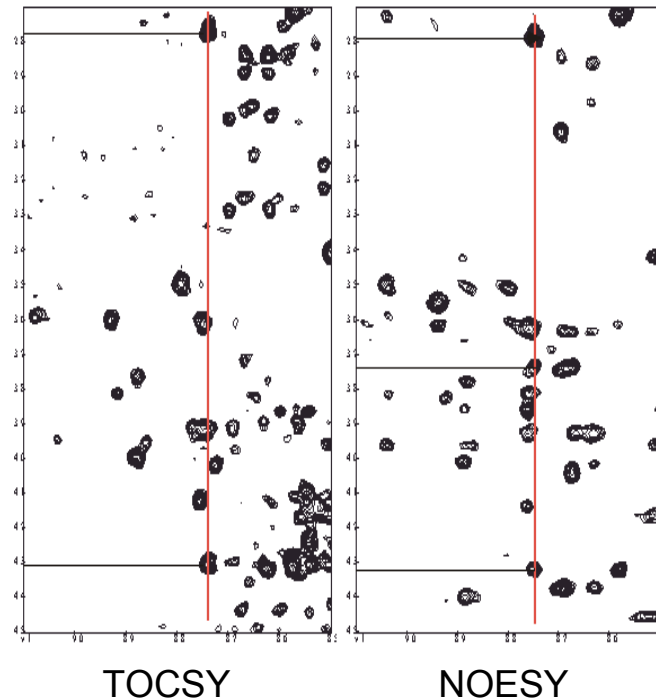


Abb. 15: Ausschnitt aus dem TOCSY-Spektrum (links) und dem NOESY-Spektrum (rechts) von *Amoebapore A*. Die Senkrechte liegt auf der H^N -Frequenz des Aminosäurerestes Asp 25. Die Waagerechten kennzeichnen die Kreuzsignale, die sich zwischen dem H^N -Proton des Aminosäurerestes Asp 25 und weiteren skalaren Kontakten im TOCSY bzw. dipolaren Kontakten im NOESY entwickeln.

Im NOESY-Spektrum (Abb. 15) auf der H^N -Frequenz (rote Linie) der Aminosäure Asp-25 befinden sich drei Kreuzsignale, die auf Grund von dipolaren Kopplungen entstehen. Um zu erkennen, welche dieser Kreuzsignale nicht zum eigenen Spinsystem dieses Aminosäurerestes gehören, vergleicht man sie mit dem TOCSY-Spektrum (Abb. 15). Hier befinden sich auf derselben H^N -Frequenz nur zwei Kreuzsignale (zwischen dem H^N - und dem H^α -Proton (unteres Kreuzsignal), sowie zwischen dem H^N - und einem H^β -Proton (oberes Kreuzsignal) von Asp-25). Sie entstehen auf Grund skalarer Kopplungen und gehören somit zum Spinsystem des Aminosäurerestes Asp-25. Das im NOESY-Spektrum zusätzlich zum TOCSY-Spektrum auftauchende Kreuzsignal gehört also nicht zum eigenem Spinsystem, sondern entwickelt sich auf Grund der engen räumlichen Nachbarschaft zwischen dem H^N -Proton des Aminosäurerestes Asp 25 und einem Proton eines nicht zu diesem Spinsystem gehörenden Aminosäurerestes. Im Laufe der weiteren Analyse der Spektren stellte sich das im NOESY-Spektrum zusätzlich auftauchende

Kreuzsignal als sequentieller Kontakt zum H^{α} -Proton des Aminosäurerestes Ala 24 heraus.

Auf diese Weise konnten alle Aminosäurereste identifiziert und ihre Kreuzsignale im NOESY-Spektrum zugeordnet werden.

3.1.3 Die Sekundärstruktur

Untersuchungen der Sekundärstruktur mittels Circular dichroismus (CD) zeigten, dass *Amoebapore A* ein hauptsächlich α -helikales Protein ist (15). Ein typisches Merkmal von α -helikalen Proteinen ist, dass sie im NOESY-Spektrum im Bereich der Amidprotonenfrequenzen eine Vielzahl von Kreuzsignalen liefern, die sich auf Grund der geringen räumlichen Abstände zwischen sequentiell benachbarten Amidprotonen entwickeln (64). So war es ein probates Mittel, sequentielle Kontakte des α -helikalen Proteins *Amoebapore A* im Frequenzbereich der Amidprotonen zu suchen. Dies ist in Abb. 16 exemplarisch am Beispiel des sequentiellen Kontakts zwischen dem Aminosäurerest Asp 25 und Lys 26 gezeigt.

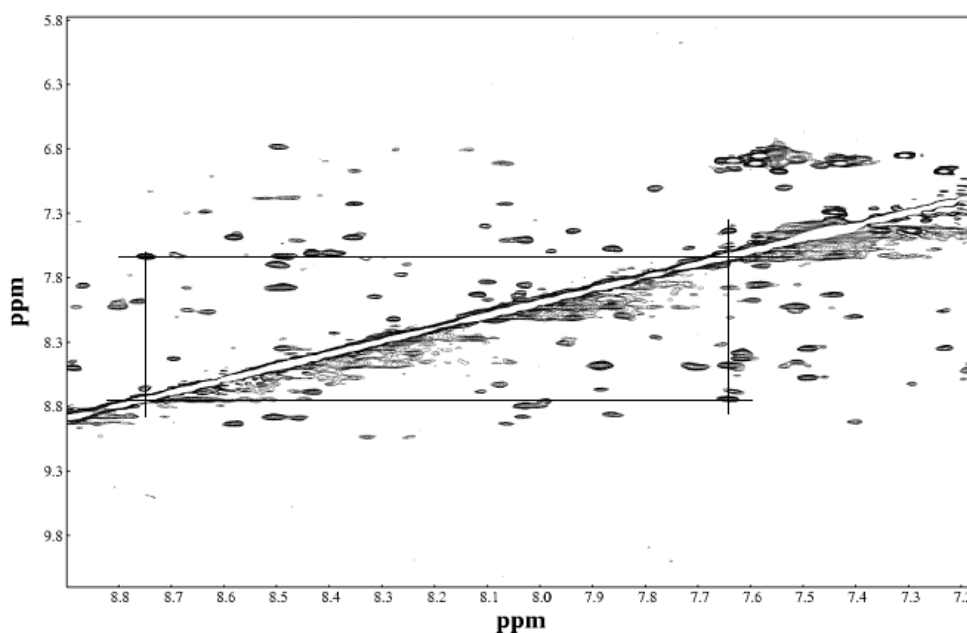


Abb. 16: Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von *Amoebapore A* im Bereich der Amidprotonenfrequenzen. Die Senkrechten liegen auf den H^N -Frequenzen des Aminosäurerestes Asp 25 (links) und Lys 26 (rechts). Die waagerechten Linien schneiden die Senkrechten zum einen auf der Diagonalen (der jeweiligen H^N -Frequenz) und zum anderen im Zentrum des Kreuzsignals, das sich auf Grund der engen räumlichen Nähe der beiden H^N -Protonen entwickelt.

Weitere, typischer Weise in α -helikalen Proteinen auftretende Kontakte sind die zwischen dem H^α -Proton des Aminosäurerestes i und dem H^N -Proton des Aminosäurerestes $i + 3$ ($d_{\alpha N}(i + 3)$). Diese, sowie weitere über sequentielle ($i, i+1$) oder mittlere (*medium range*) ($i, i+2 - i, i+4$) Distanzen (bezogen auf die sequentielle Anordnung der Aminosäurereste) auftretende Kontakte, die in den Spektren von *Amoebapore A* identifiziert werden konnten, sind in Abb.17 zusammengefasst.

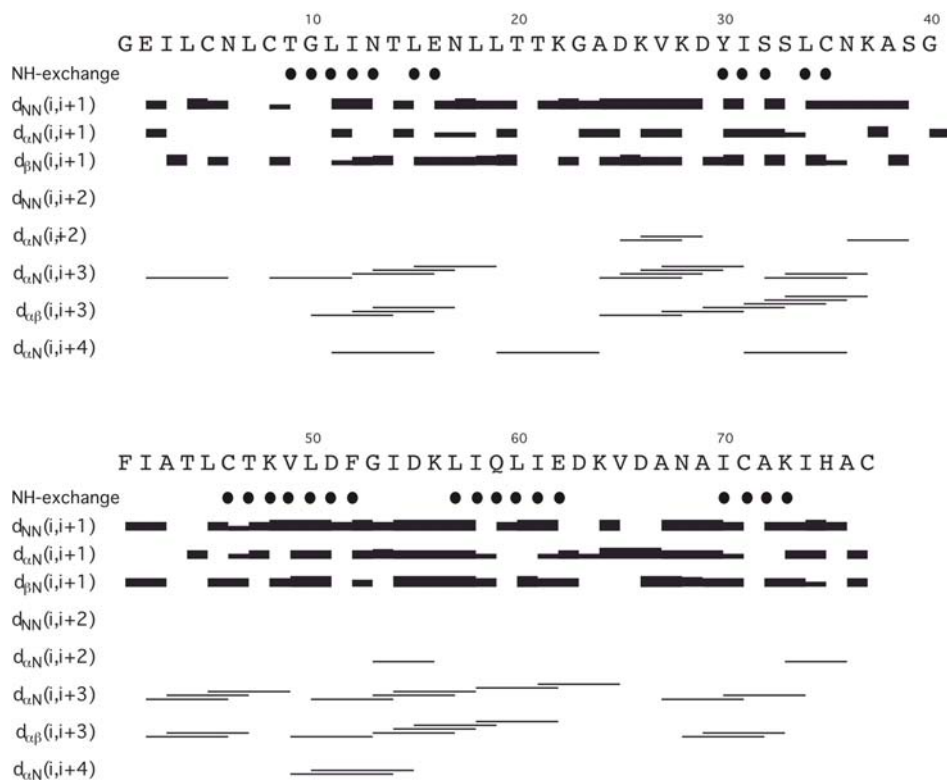


Abb. 17: Schematische Darstellung der sequentiellen und *medium range*-Kontakte, die gemäß ihrer NOE-Signalintensitäten als stark, mittel und schwach (zu erkennen an der Höhe der Balken) eingestuft wurden. Aminosäurereste deren Amidprotonen auch nach einer Temperaturerhöhung auf 50 °C für 24 h nicht mit dem D_2O ausgetauscht sind, werden als ausgefüllte Kreise dargestellt. Die jeweils obere Buchstabenreihe kennzeichnet die Primärstruktur von *Amoebapore A* im Ein-Buchstaben-Code.

3.1.4 Das H/D-Austauschexperiment

Zusätzliche Informationen über die Sekundärstruktur von *Amoebapore A* konnte durch die Auswertung des H/D-Austausch-Experiments (Abb. 18) gewonnen werden. Da die Kreuzsignale von 29 Amidprotonen selbst nach einer 24-stündigen Erwärmung auf 50 °C noch immer präsent waren, kann man davon ausgehen, dass diese Amidprotonen in die Ausbildung von Wasserstoffbrücken involviert sind. Diese

zusätzlichen Informationen wurden daher in die Strukturberechnung mit einbezogen. Die höchst wahrscheinlich an Wasserstoffbrücken beteiligten Amidprotonen sind in Abb.17 gekennzeichnet.

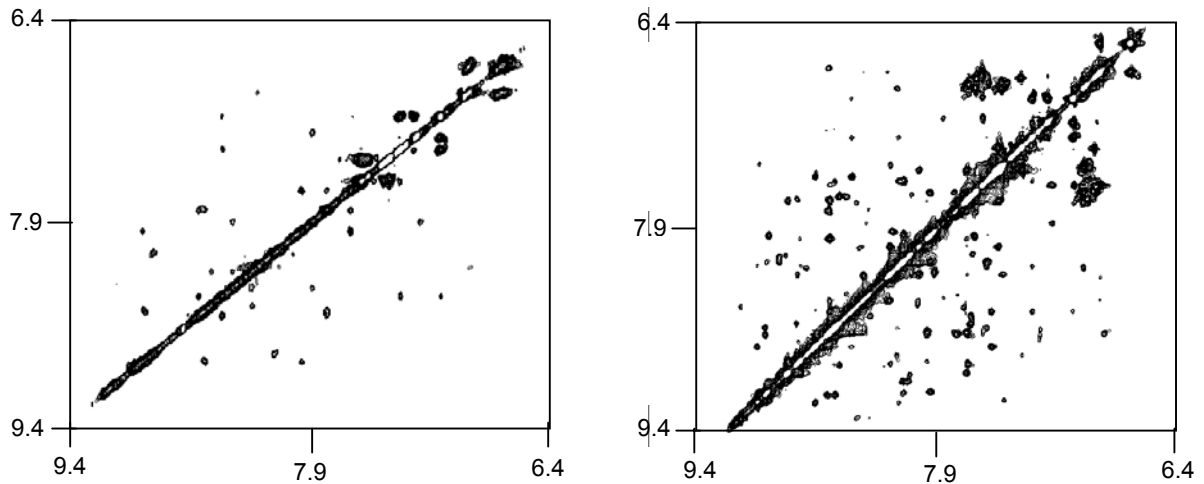


Abb. 18: Ausschnitte zweier NOESY-Spektren von Amoebapore A. Die Koordinaten geben den Frequenzbereich des Spektrums in ppm wieder. Das linke Bild zeigt das Spektrum nach dem H/D-Austausch, das rechte hingegen das NOESY-Spektrum des in Wasser gelösten Proteins.

3.1.5 Long range-Kontakte

Mit den in Abschnitt 2.4.1. beschriebenen Strategien über die Signalzuordnung in homonuklearen 2D-Spektren war es möglich, die sequentielle Zuordnung der Signale zu erhalten und zusätzliche Informationen über die Sekundärstrukturanteile von *Amoebapore A* zu bekommen. Um die Tertiärstruktur dieses Proteins aufzuklären, werden die Kreuzsignale im NOESY-Spektrum zugeordnet, die auf Grund von in der Primärstruktur weiter entfernten H^1-H^1 -Kontakten (*long range*) entstehen.

Dies wird hier am Beispiel des $H^{\epsilon 1}$ -Protons (30.HE1) des Aminosäurerestes Tyr-30 gezeigt (Abb. 19).

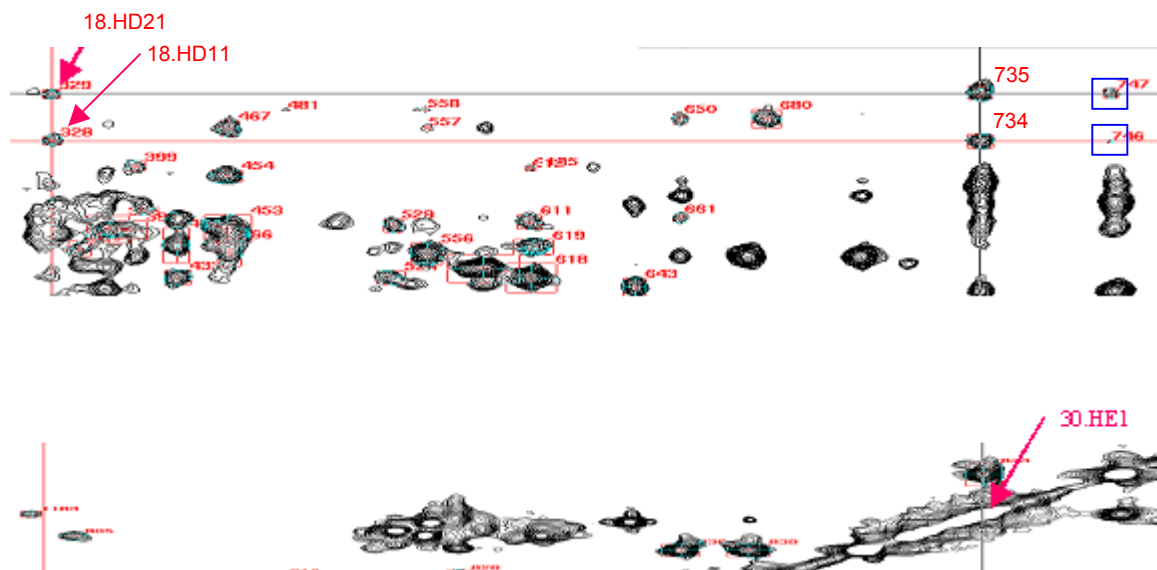


Abb. 19: Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von Amoebapore A. Die schwarze senkrechte Linie kennzeichnet die Resonanzfrequenz des $H^{\epsilon 1}$ -Protons von Tyrosin 30 (30.HE1), während die rote Senkrechte die Frequenz des Amidprotons von Leu 18 kennzeichnet. Die beiden Senkrechten werden von zwei waagerechten Linien geschnitten. Auf den 4 Schnittpunkten liegen jeweils 2 Kreuzsignale auf der Frequenz des $H^{\epsilon 1}$ -Protons von Tyr 30 und jeweils zwei auf der Frequenz des Amidprotons von Leu 18. Die blauen Kästchen markieren dipolare Kreuzsignale auf der $H^{\delta 2}$ -Protonenfrequenz von Tyr 30.

Die schwarze senkrechte Linie kennzeichnet die Resonanzfrequenz des $H^{\epsilon 1}$ -Protons von Tyr-30 (30.HE1), während die rote Senkrechte die Frequenz des Amidprotons von Leu-18 kennzeichnet. Die beiden Senkrechten werden von zwei waagerechten Linien geschnitten. Auf den vier Schnittpunkten liegen jeweils 2 Kreuzsignale auf der Frequenz des $H^{\epsilon 1}$ -Protons von Tyr-30 und jeweils zwei auf der Frequenz des Amidprotons von Leu-18. Die auf der Frequenz des Amidprotons von Leu-18 liegenden Kreuzsignale sind auch im entsprechenden TOCSY-Spektrum wiederzufinden und gehören somit zum Spinsystem von Leu-18. Dabei wurde das untere im Schnittpunkt liegende Kreuzsignal (Nr. 328) als $H^{\delta 1}$ -Proton (18.HD11) und das obere (Nr. 329) als $H^{\delta 2}$ -Proton (18.HD21) des Aminosäurerestes Leu-18 identifiziert. Die entsprechenden auf den Schnittpunkten von 30.HE1 liegenden Kreuzsignale (Nr. 734 und Nr. 735) sind im TOCSY-Spektrum nicht vorhanden und stellen somit einen Kontakt zwischen den H^{δ} -Protonen des Aminosäurerestes Leu-18

und dem $H^{\epsilon 1}$ -Proton von Tyr-30 dar. Führt man nun diese beiden im NOESY-Spektrum identifizierten *long range*-Kontakte (30.HE1-18.HD11 und 30.HE1-18.HD21) in die Strukturberechnung mit ein, so befinden sie sich in der dreidimensionalen Struktur in räumlicher Nachbarschaft zueinander (Abb. 20).

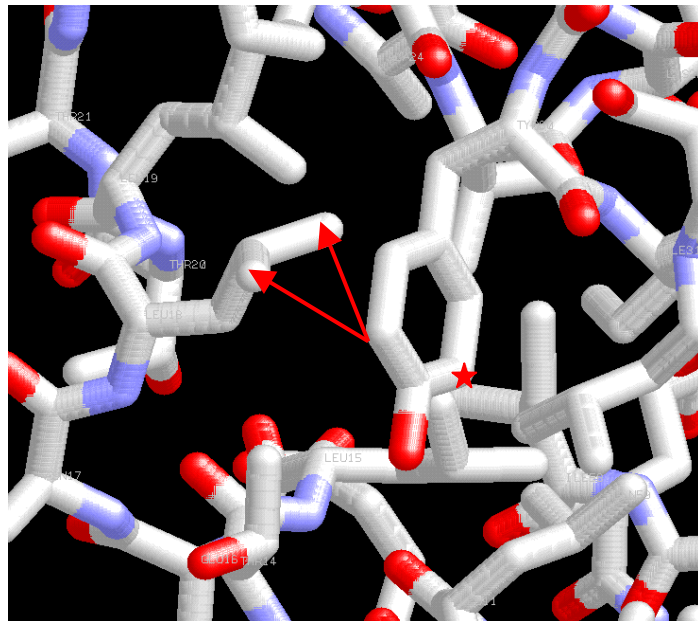


Abb. 20: Ausschnitt aus der mittleren NMR-Struktur von Amoebapore A. Die roten Pfeile verlaufen vom $H^{\epsilon 1}$ -Proton des Tyr-30 zu den H^{δ} -Protonen von Leu-18. Der rote Stern kennzeichnet das $H^{\epsilon 2}$ -Proton von Try-30. Die Darstellung wurde mit dem Programm Rasmol (75) erzeugt.

Abbildung 20 zeigt, dass das $H^{\epsilon 2}$ -Proton von Tyr-30 (markiert mit einem rotem Stern) weiter von den H^{δ} -Protonen von Leu-18 entfernt ist als das $H^{\epsilon 1}$ -Proton von Tyr-30. Dieser größere räumliche Abstand spiegelt sich auch im NOESY-Spektrum wieder (Abb.19). Die beiden auf der $H^{\epsilon 2}$ -Protonenfrequenz von Try-30 liegenden, durch blaue Kästchen markierten Kreuzsignale (Nr. 746 und Nr. 747) entwickelten sich auf Grund dipolarer Kopplungen (Abb. 19). Ihre Intensitäten sind auf Grund des größeren Abstandes zu den H^{δ} -Protonen von Leu-18 deutlich schwächer (vergl. Abb. 19 u. Abb. 20).

3.1.6 Die Struktur des Proteins Amoebapore A

Durch den Vergleich des NOESY- und des TOCSY-Spektrums wurden 303 intraresiduale Kontakte im NOESY-Spektrum den einzelnen Aminosäureresten zugeordnet. Die sequentielle Zuordnung der Signale wurde durch die Identifizierung von 203 sequentiellen Kontakten erreicht. Durch die im NOESY-Spektrum

identifizierten sequentiellen und 123 *medium range*-Kontakte war es möglich, die Sekundärstrukturelemente des Proteins zu definieren, während die 80 *long range*-Kontakte für die Bestimmung der Tertiärstruktur genutzt wurden.

In der NMR-Spektroskopie erhält man am Ende der Strukturberechnung keine exakt definierte Struktur, sondern vielmehr eine Strukturfamilie (Ensemble), die je nach Qualität des Ergebnisses einen mehr oder weniger eng begrenzten Konformationsraum absteckt. Die Qualität einer NMR-Struktur kann daher über die mittlere Abweichung (*root mean square deviations*, rmsd) dieser Strukturfamilie bestimmt werden. Je kleiner die Abweichungen von der mittleren Struktur sind, desto enger ist der Konformationsraum. Die Abweichungen von der mittleren Struktur sind in den einzelnen Regionen der Struktur unterschiedlich. Strukturbereiche mit flexibler Struktur oder mit fehlender definierter Sekundärstruktur zeigen häufig große Abweichungen, da für diese Bereiche meist zu wenig Abstandsinformationen vorhanden ist, um den Konformationsraum genügend stark einzuschränken (53).

Um eine qualitativ hochwertige Struktur zu erhalten, ist es also notwendig, ein möglichst hohes Maß an Abstandsinformationen aus den NOESY-Spektren zu extrahieren. Abbildung 21 zeigt den Vergleich zweier Strukturfamilien von jeweils 13 superpositionierten Strukturen von *Amoebapore A*.

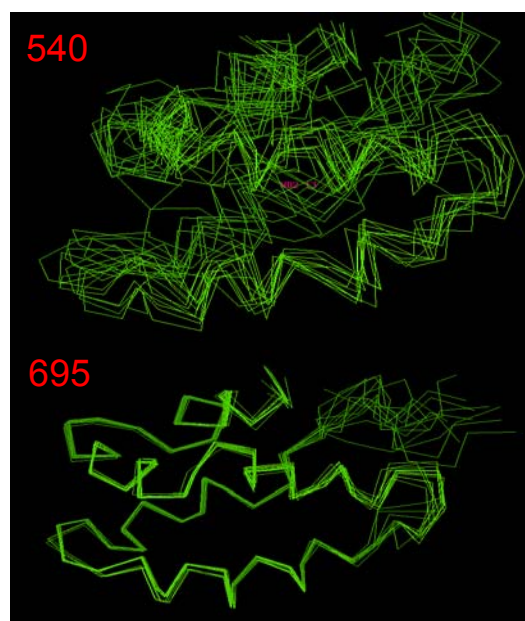


Abb. 21: Darstellung des Proteinrückgrates von jeweils 13 unabhängig voneinander berechneten NMR-Strukturen von *Amoebapore A* nach Superpositionierung. Die obere Strukturfamilie wurde anhand von 540 NOESY-Kreuzsignalen, die untere anhand von 695 NOESY-Kreuzsignalen berechnet.

Anhand des Vergleiches dieser beiden Ensembles, lässt sich verdeutlichen, dass das obere Ensemble, zu dessen Berechnung 540 Abstände zu Grunde lagen, wesentlich schlechter definiert ist als das untere mit 695 Abständen berechnete Ensemble.

Die endgültige Struktur von *Amoebapore A* wurde anhand der Intensitäten von 709 NOESY-Kreuzsignalen sowie den zusätzlichen Abstandsinformationen aus Disulfid- und Wasserstoffbrücken-Geometrien (siehe hierzu Abschnitt 1.8.4) berechnet. Jedem der 709 NOESY-Kreuzsignalen wurde je nach seiner Intensität eine obere und eine untere Abstandsgrenze zugeteilt (siehe hierzu Abschnitt 1.8.4), so dass $2 \times 709 = 1418$ sogenannte *NOE-distance restraints* die Grundlage der Strukturberechnung bildeten. Eine detailliertere Aufstellung über die Anzahl der identifizierten intraresidualen, sequentiellen, *medium* und *long range*-Kontakte, findet sich in Tabelle 1.

Abbildung 23 A zeigt das Proteinrückgrat von *Amoebapore A* als Stereobild. Die Darstellung der Superposition der 20 unabhängig voneinander berechneten Strukturen verdeutlicht die Kohärenz des generierten Ensembles. Insbesondere innerhalb der helikalen Regionen beträgt die mittlere Abweichung (rmsd) für die Atome des Proteinrückgrates nur 0.25 Å (siehe auch Tab.1).

Die Qualität einer berechneten Struktur kann unter anderem anhand des sogenannten Ramachandran-Diagramms (76) analysiert werden. In einem solchen Diagramm werden die Diederwinkel Φ und Ψ des Proteinrückgrates gegeneinander aufgetragen. In Polypeptidketten sind in der Regel für diese Diederwinkel nur drei Bereiche des Konformationsraums zugänglich, während der überwiegende Teil auf Grund hoher potentieller Energie nicht eingenommen werden kann. Das Ramachandran-Diagramm (Abb. 22) zeigt, dass 75% der Φ/Ψ -Diederwinkelpaare des Proteinrückgrates innerhalb des energetisch begünstigsten Bereichs liegen und dass keines in den unerlaubten Regionen zu finden ist (siehe Tab.1).

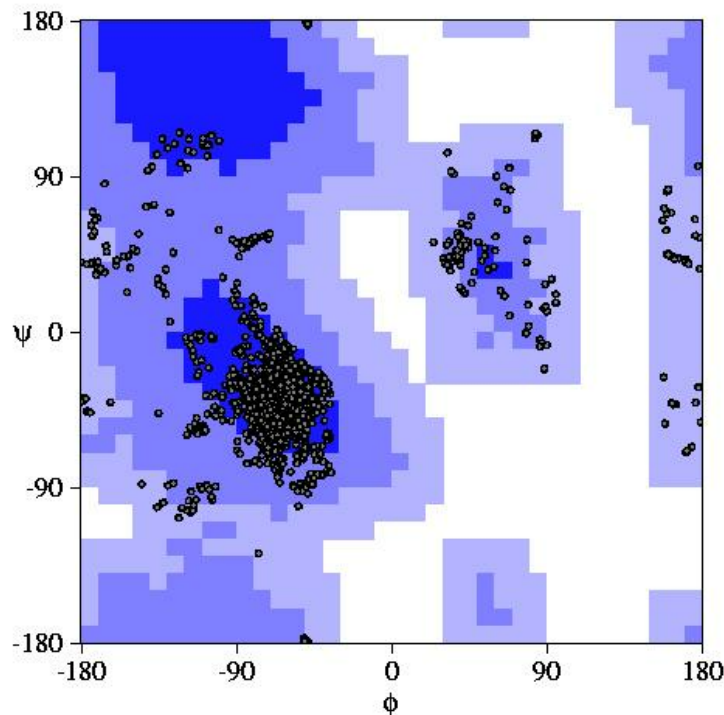


Abb. 22: Ramachandran-Plot aller 20 Strukturen des NMR-Ensembles. Die Aminosäurereste werden durch schwarze Punkte symbolisiert. Die dunkelblauen Bereiche entsprechen den energetisch am meisten begünstigten Bereichen, die mittelblauen den zusätzlich erlaubten und die hellblauen den generell erlaubten Bereichen. Die weissen Bereiche entsprechen unerlaubten Φ/Ψ -Diederwinkelpaaren.

Auf der Basis dieses Ensembles wurde eine mittlere Struktur berechnet (Abb. 23 B).

Die Struktur von *Amoebapore A* besteht aus 5 α -Helices (Abb 23 B), die die Aminosäurereste 4-16 (Helix I), 25-35 (Helix II), 42-52 (Helix III), 55-63 (Helix IV) und 67-73 (Helix V) beinhalten. Die Helices II und III sind durch eine einzelne Disulfidbrücke verknüpft. Zwei Disulfidbrücken verknüpfen Helix I und V. Gemäß der Strukturdatenbank SCOP (*structural classification of proteins*) (77) wird die Struktur als gefaltetes Blatt (*folded leaf*) beschrieben, wobei die Helices I und II als die eine Hälfte des Blattes gegen die Helices III, IV und V gefaltet sind, die die andere Hälfte des Blattes repräsentieren. Helices I und II sind durch einen *loop*, der aus 8 Aminosäureresten (17-24) besteht, miteinander verbunden, während Helix III und IV ineinander übergehen und nur durch die Aminosäurereste 53 und 54 voneinander getrennt sind. Die Aminosäurereste 64 bis 66 verbinden die Helices IV und V. Die beiden Teile des *folded leaf* sind durch einen *loop* zwischen Helix II und III (Aminosäurereste 36-41) miteinander verbunden.

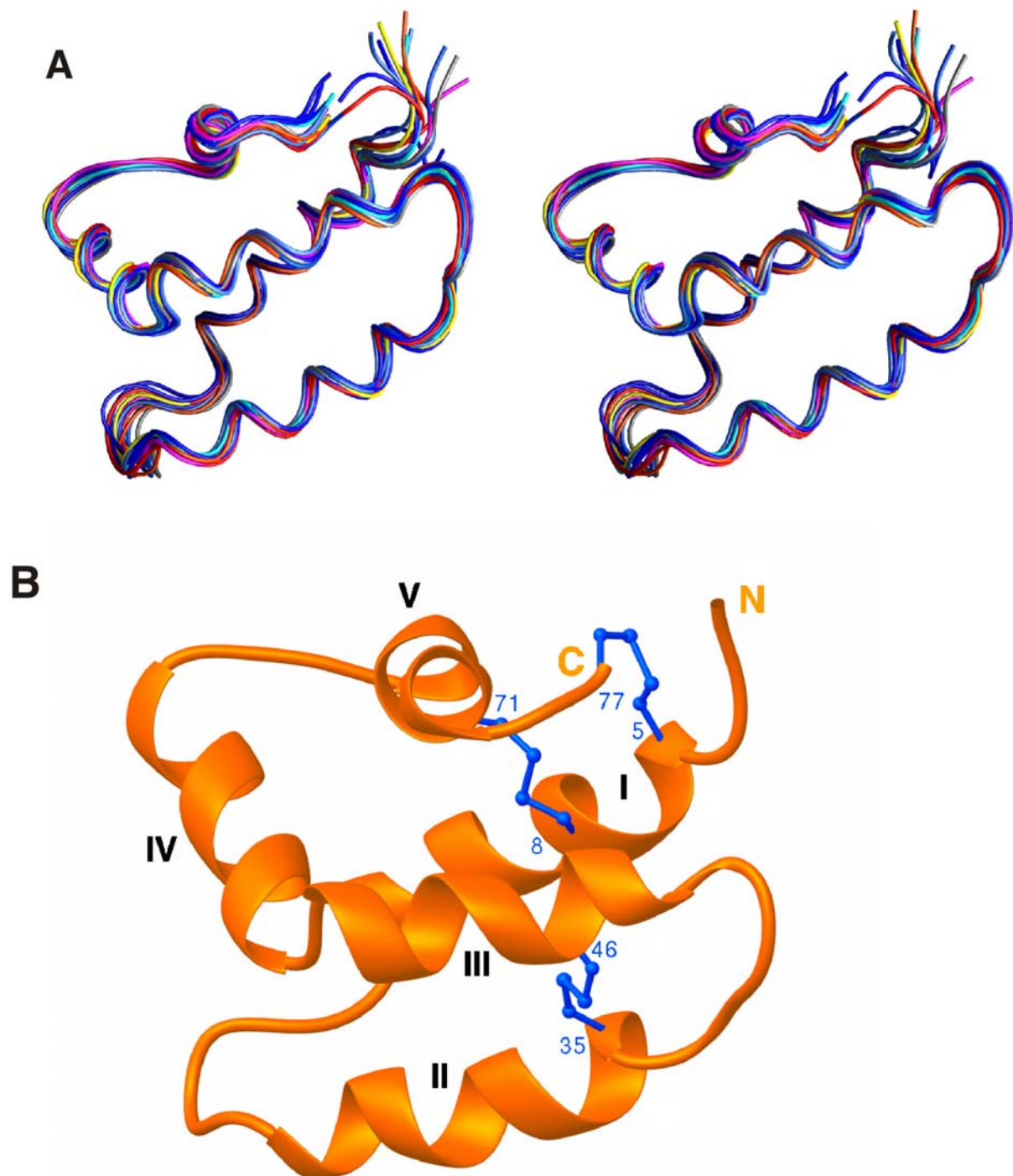


Abb. 23: Die dreidimensionale Struktur von Amoebapore A.

A. Stereodarstellung des Proteinrückgrates der 20 unabhängig voneinander berechneten NMR-Strukturen von Amoebapore A nach Superpositionierung.

B. Ribbon-Darstellung der energieminierten mittleren Struktur (Orientierung wie oben). Die Disulfidbrücken sind in blau dargestellt und N- und C-Termini sind markiert. Die Helices sind mit römischen Ziffern nummeriert. Die Abbildungen wurden mit den Programmen GRASP (A) (78) bzw Ribbons (B) (79) erstellt.

Table 1. Strukturelle Statistik der 20 NMR-Strukturen von <i>Amoebapore A</i> ¹	
<i>Distance restraints</i>	
Intraresidual (i-j = 0)	606
Sequentiell (i-j = 1)	406
<i>Medium range</i> (2 ≤ i-j ≤ 4)	246
<i>Long range</i> (i-j ≥ 5)	160
Wasserstoffbrücken	2x58
Disulfidbrücken	3x12
Insgesamt	1570
Paarweiser rmsd für die Aminosäurereste 6-73 in Å	
Mittlerer Rückgrat rmsd	0.71 ± 0.15
Mittlerer rmsd der schweren Atome	1.20 ± 0.16
Paarweiser rmsd für die Sekundärstrukturelemente in Å	
Mittlerer Rückgrat rmsd	0.25 ± 0.11
Mittlerer rmsd der schweren Atome	0.78 ± 0.16
Ramachandran plot ²	
Am meisten begünstigter Bereich (%)	75
Zusätzlich erlaubter Bereich (%)	18
Generell erlaubter Bereich (%)	7
Unerlaubter Bereich (%)	0
¹ In keiner der 20 Strukturen weichen die NOE <i>distance restraints</i> stärker als 0.5 Å von der mittleren Struktur ab.	
² Mittelwerte aller 20 Strukturen	

3.1.7 Strukturvergleich von *Amoebapore A*, *Granulysin* und *NK-Lysin*

Abbildung 24 zeigt einen Vergleich der Strukturen zwischen *Amoebapore A* und den Membran-permeabilisierenden Effektormolekülen *NK-Lysin* und *Granulysin*.

Obwohl alle drei Strukturen die gleiche Faltungstopologie besitzen, unterscheiden sie sich in der relativen Anordnung ihrer Helices zueinander. Die Orientierungen der Helices II, III und IV relativ zueinander sind in allen drei Strukturen sehr ähnlich. Betrachtet man innerhalb der Struktur von *Amoebapore A* allerdings die Orientierung der Helices I und V relativ zu II, III und IV, so erkennt man, dass sich diese deutlich von der des *Granulysins* und *NK-Lysins* unterscheidet (Abb. 24). Die Struktur des

Amoebapore A lässt erkennen, dass Helix I fast parallel zu den Helices II und III verläuft, während sie in *NK-Lysin* und *Granulysin* einen Winkel von nahezu 90° zu den Helices II und III aufweist. Anhand der Darstellung des elektrostatischen Potentials, projiziert auf die molekulare Oberfläche, lassen sich bestimmte Eigenschaften von Proteinen ableiten. So besitzen geladene Oberflächen einen eher hydrophilen und ungeladene einen eher hydrophoben Charakter. bemerkenswerterweise hat der Bereich der molekularen Oberfläche von *Amoebapore A*, der durch die Helices I und II ausgebildet wird, einen überwiegend hydrophoben Charakter (Abb. 24). Die Länge dieses hydrophoben Bereiches von ca. 36 Å wäre ausreichend, um eine Lipiddoppelschicht zu durchspannen (80).

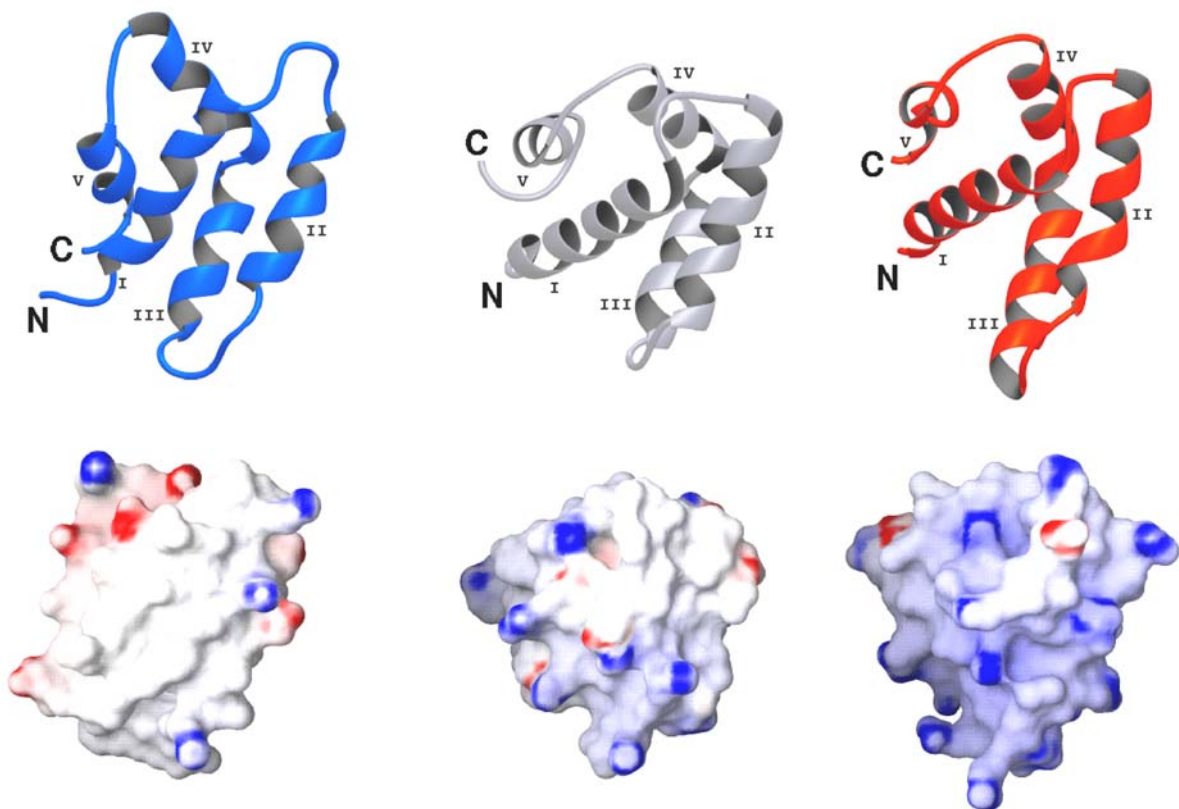


Abb. 24: In der oberen Reihe sind Ribbon (79)-Darstellungen des *Amoebapore A* (links), *NK-Lysin* (Mitte) und *Granulysin* (rechts) gezeigt. Die C- und N-Termini sind mit schwarzen Buchstaben gekennzeichnet. Alle Molekülstrukturen wurden anhand der $C\alpha$ -Atome der Aminosäurereste 30 – 60 superpositioniert. Die Helices sind mit römischen Ziffern nummeriert. In der unteren Reihe ist das elektrostatische Potential, projiziert auf die molekulare Oberfläche, dargestellt (blau zeigt ein positives, rot ein negatives Potential an). Die Moleküle befinden sich hier in gleicher Orientierung, wie in der oberen Reihe. Die Darstellung der Oberflächen wurde mit dem Programm GRASP (78) generiert.

Im Gegensatz zu *Amoebapore A* weisen *NK-Lysin* und *Granulysin* Anhäufungen von positiv geladenen Aminosäureresten auf. Es wird vermutet, dass diese für den initialen Kontakt dieser Moleküle mit der Membran verantwortlich sind (81, 82). Auf der molekularen Oberfläche von *Amoebapore A* sind solche kationischen Anhäufungen nicht vorhanden (Abb. 24), so dass für dieses Molekül ein anderer Mechanismus für die Interaktion mit der Membranen angenommen werden muss.

3.1.8 PH-Abhängigkeit

Es wurde gezeigt, dass *Amoebapore A* seine größte porenbildende Aktivität bei einem pH-Wert von 5.2 besitzt (83). Aus diesem Grund wurden die ersten NMR-Experimente bei diesem pH-Wert durchgeführt. Dabei wurde zunächst die transversale Relaxationszeit (T_2) des Proteins bestimmt. Diese ist abhängig von der Rotationskorrelationszeit des Moleküls, welche wiederum von seiner Größe bestimmt wird. Somit kann man durch die Messung der T_2 -Zeiten auf die Größe des untersuchten Moleküls schließen, wobei die T_2 -Zeiten mit zunehmender Molekülgröße abnehmen (52). Leider wiesen die T_2 -Zeiten darauf hin, dass *Amoebapore A* bei pH 5.2 nicht als Monomer vorliegt. Erst eine schrittweise Verringerung des pH-Wertes auf 3.5 resultierte in T_2 -Zeiten, die dem monomeren Zustand des Proteins entsprechen.

Durch die Verringerung des pH-Wertes werden zunehmend saure Aminosäurereste (Glu, Asp), deren pK-Werte bei 4.4 (48) liegen, protoniert, d.h. deionisiert. Bei einem pH-Wert von 4.4 sind also noch die Hälfte der sauren Aminosäurereste ionisiert. Verringert man den pH-Wert weiter, so wird die Möglichkeit, mit basischen Aminosäureresten elektrostatische Wechselwirkungen einzugehen, für diese Aminosäurereste immer geringer. Offensichtlich sind also elektrostatische Interaktionen für die Oligomerisation von *Amoebapore A* verantwortlich, die durch die Protonierung der sauren Aminosäurereste nach einer Verringerung des pH-Wertes auf 3.5 verhindert werden.

Um zu prüfen, ob sich die Konformation von *Amoebapore A* unter verschiedenen pH-Wert-Bedingungen ändert, wurden CD-Spektren dieses Proteins bei pH 3, 4, 5, 6 und 7 aufgenommen. Die völlig identischen CD-Spektren (Abb. 25) zeigen deutlich, dass die Konformation durch eine Änderung des pH-Wertes nicht beeinflusst wird.

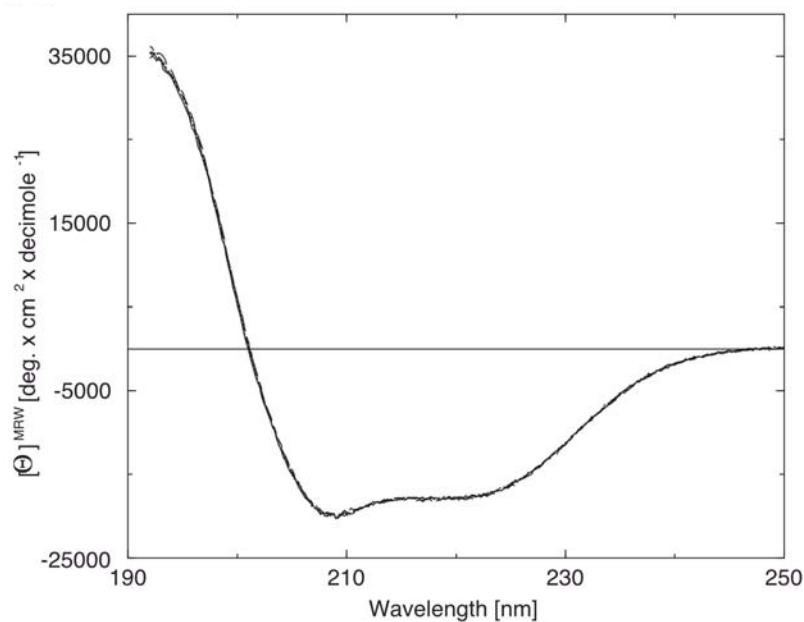


Abb. 25: CD-Spektroskopie von Amoebapore A. Die CD-Spektroskopie wurde bei einem von pH 3 (durchgezogen), 4 (gepunktet), 5 (gestrichelt), 6 (lang-gestrichelt) und 7 (punkt-gestrichelt) durchgeführt.

Da sich die Konformation von *Amoebapore A* in dem getesteten pH-Bereich nicht änderte, wurden die NMR-Experimente bei einem pH-Wert von 3.5 aufgenommen, denn bei diesem pH-Wert war keine Selbstassoziation von *Amoebapore A* zu beobachten.

3.1.9 Ausbildung stabiler Dimere von *Amoebapore A*

Durch die Beobachtung der pH-Wert-abhängigen Oligomerisation von *Amoebapore A* stellte sich die Frage nach der Stöchiometrie der funktionellen Proteinkomplexe. Um die Stöchiometrie und die Stabilität der *Amoebapore A*-Oligomere zu untersuchen, wurden Gelfiltrationschromatographien bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. In Übereinstimmung mit den T_2 -Messungen zeigten diese Experimente, dass *Amoebapore A* bei einem pH-Wert von 3.5 als stabiles Monomer existiert (Abb. 26). Bei einem pH-Wert von 5.2 sieht man im Elutionsprofil ein einzelnes Maximum bei einer Retentionszeit, die einem Dimer entspricht (Abb. 26). Höhere Oligomere wurden nicht nachgewiesen. Die Tatsache, dass *Amoebapore A* bei diesem pH-Wert seine stärkste Aktivität aufweist (83), legte nahe, dass die Dimerisation eine Voraussetzung für die porenbildende Aktivität darstellt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie,

die das Dimer enthielten, auf ihre porenbildende Aktivität hin untersucht (dieser Versuch wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Heike Bruhn, Universität Würzburg durchgeführt). Das dabei beobachtete Verschwinden eines durch Valinomycin induzierten Diffusionspotentials (siehe Abschnitt 2.5.2) ergab, dass sich die gesamte porenbildende Aktivität in den Fraktionen befand, die das Dimer enthielten.

Es wurde beschrieben, dass *Amoebapore A* bei einem pH-Wert von 8.0 keine porenbildende Aktivität aufweist (83). Um den Oligomerisations-Status von *Amoebapore A* bei pH 8.0 zu untersuchen, wurde eine Gelfiltrationschromatographie bei diesem pH-Wert durchgeführt. Interessanter Weise eluierte das Protein überwiegend als Monomer (Abb. 26). Zu bemerken ist weiterhin, dass das Protein bei allen untersuchten Bedingungen als distinkte Species eluierte. Somit lag - zumindest während der Dauer des Experimentes (3 – 4 h) - kein Monomer/Dimer-Gleichgewicht vor.

Die Beziehung zwischen der pH-Wert-abhängigen Aktivität und dem Oligomerisations-Status von *Amoebapore A* wurde weiterhin durch sogenannte *crosslinking*-Experimente bestätigt (84). Hierbei werden Moleküle, die sich in enger Nachbarschaft befinden, chemisch kreuzvernetzt. Diese Experimente zeigten, dass *Amoebapore A* bei einem pH-Wert von 4.5, bei dem die Seitenketten der sauren Aminosäuren deprotoniert und die Seitenketten der Histidinreste ($pK = 6.5$ (48)) protoniert sind, als Dimer vorliegt. Führt man das *crosslinking*-Experiment bei pH 7.0 durch, so zeigt sich, dass *Amoebapore A* bei diesem pH-Wert nur als Monomer existiert (84). Prinzipiell wäre eine Dimerisation auf Grund von hydrophoben Interaktionen denkbar. So könnte der saure pH-Wert von 3.5, bei dem *Amoebapore A* monomer vorliegt, dazu führen, dass aufgrund der positiven Ladung des Moleküls bei diesem pH-Wert mögliche hydrophobe Wechselwirkungen durch elektrostatische Abstoßung verhindert werden. Bei pH 5.2 wären diese zur Abstoßung führenden Kräfte aufgehoben und die Moleküle könnten dimerisieren. Aufgrund der Tatsache, dass *Amoebapore A* jedoch bei pH 7.0 bzw. 8.0 ebenfalls monomer vorliegt, kann man hydrophobe Interaktionen als treibende Kraft für die Dimerisation ausschließen.

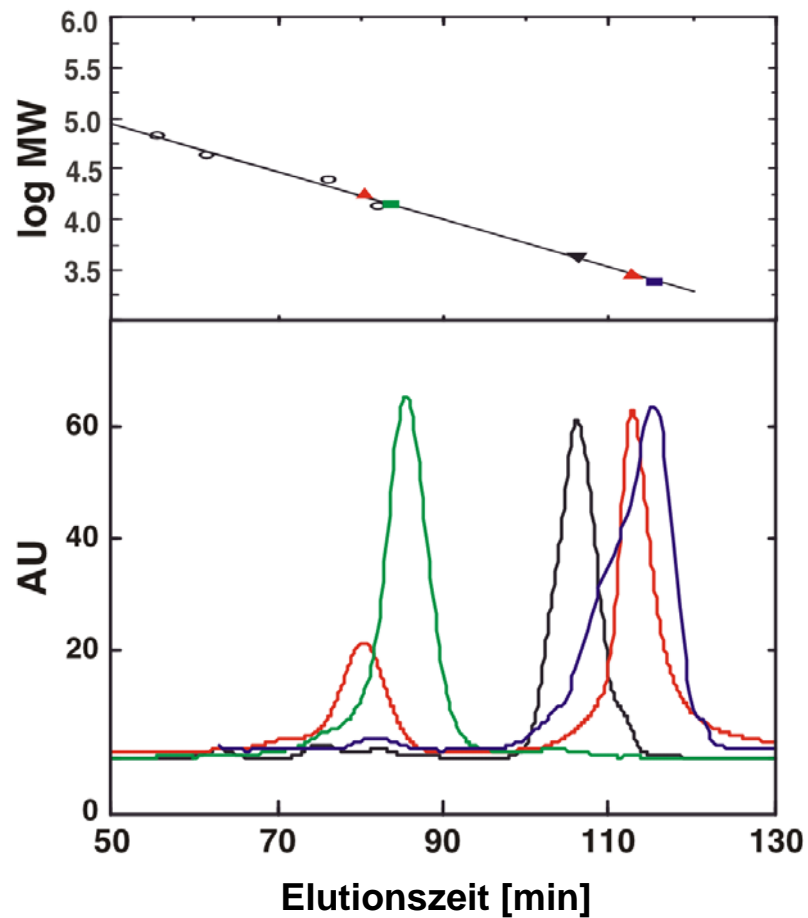


Abb. 26: Gelfiltrationschromatographie: Der untere Teil der Abbildung zeigt die Elutions-Profile von Amoebapore A während der Gelfiltrationschromatographie. Zu erkennen ist die pH-Wert-abhängige Stöchiometrie des Proteins. Die Experimente wurden bei pH 3.5 (schwarz), pH 5.2 (grün), pH 8.0 (rot) und pH 5.2 nach DEPC-Behandlung (blau) durchgeführt. Das Protein eluierte als Monomer bei pH 3.5, als Dimer bei pH 5.2, überwiegend als Monomer bei pH 8.0 und als Monomer bei pH 5.2 nach DEPC-Behandlung. Die variierenden hydrodynamischen Volumina sind vermutlich verantwortlich für die variierenden Elutionszeiten der Monomere und Dimere bei den unterschiedlichen Lösungsmittelbedingungen. Die Absorptionen (AU) wurden bei 280 nm gemessen und auf eine vergleichbare Größe skaliert. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Kalibrationskurve der Gelfiltrationschromatographie-Säule und die Elutionszeiten von Amoebapore A bei den verschiedenen pH-Bedingungen. Die Elutionszeiten der für die Kalibration (bei pH 7.5) benutzten Proteine sind als Kreise dargestellt. Die Elutionszeiten von Amoebapore A bei den unterschiedlichen pH-Bedingungen sind als farbige Symbole gemäß der unterschiedlichen pH-Werte gekennzeichnet.

3.1.10 Histidin-vermittelte Dimerisation von *Amoebapore A*

Während *NK-Lysin* innerhalb eines weiten pH-Wert-Bereichs biologisch aktiv ist (21), ist die porenbildende Aktivität von *Amoebapore A* auf einen engen pH-Bereich beschränkt (83). So konnte für *Amoebapore A* in einem pH-Bereich zwischen 6.5 und 10 keine porenbildende Aktivität beobachtet werden. Bei einem pH-Wert von 6.0 stieg sie allerdings deutlich an und erreichte bei einem pH-Wert von 5.2 ihr Maximum (83). Im Gegensatz dazu entfaltet *Granulysin* seine größte Aktivität bei einem pH von 7.4 (85). Da Histidin die einzige Aminosäure ist, die in einem pH-Bereich um 6.0 protoniert wird, kann man vermuten, dass der Protonierungsstatus des Histidinrestes für die pH-Wert-abhängige Aktivität des *Amoebapore A* verantwortlich ist.

Eine Analyse der *Amoebapore A*-Struktur zeigte, dass der einzige in *Amoebapore A* vorkommende Histidinrest (His-75) dem umgebenden Medium gegenüber exponiert ist (Abb. 27 B). Aus Abb. 28 lässt sich ausserdem entnehmen, dass es im NOESY-Spektrum keine Anzeichen für *long range*-Kontakte der Histidinseitenkette gibt. Aus diesem Grund zeigt der Histidinrest einen hohen rmsd-Wert von 1.87 Å, verglichen mit dem Durchschnittswert von 1.20 Å, was wiederum die hohe Bewegungsfreiheit für diese Aminosäureseitenkette widerspiegelt (Abb. 27).

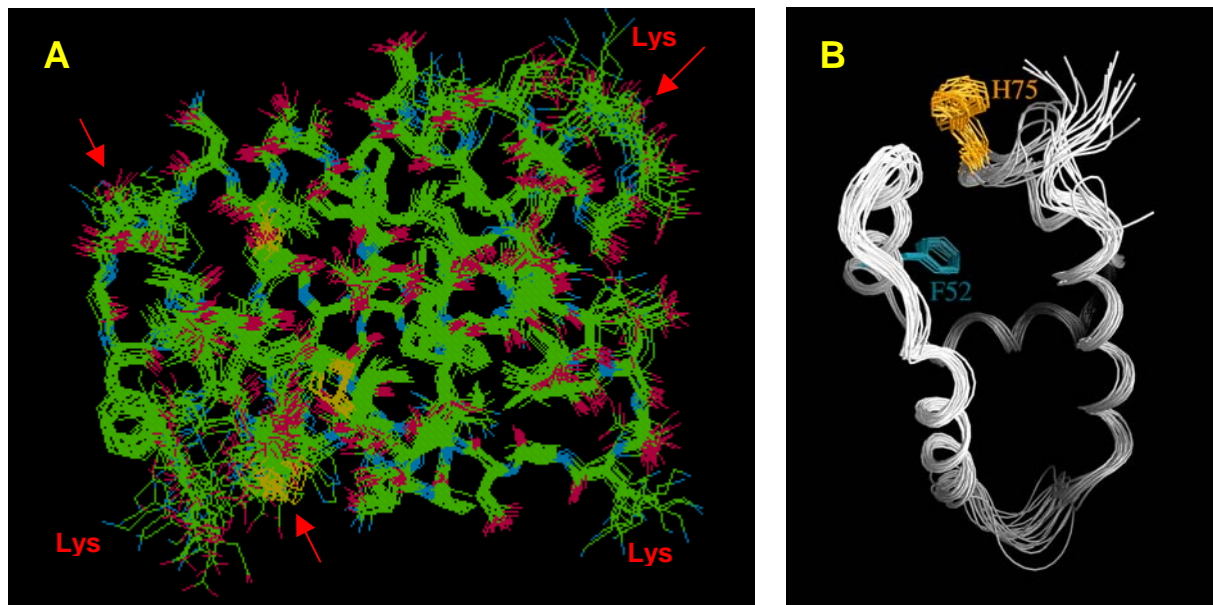


Abb. 27: Struktur von *Amoebapore A*

A. Darstellung der 20 unabhängig voneinander berechneten NMR-Strukturen von *Amoebapore A* inklusive der Aminosäureseitenketten nach Superpositionierung. Die flexiblen Loop-Bereiche sind durch rote Pfeile markiert und einige der naturgemäß flexiblen Lysinreste sind gekennzeichnet.

B. Proteinrückgrat der 20 unabhängig voneinander berechneten NMR-Strukturen von *Amoebapore A* nach Superpositionierung. Der flexible Histidinrest ist einem nicht-flexiblen Phenylalaninrest gegenübergestellt.

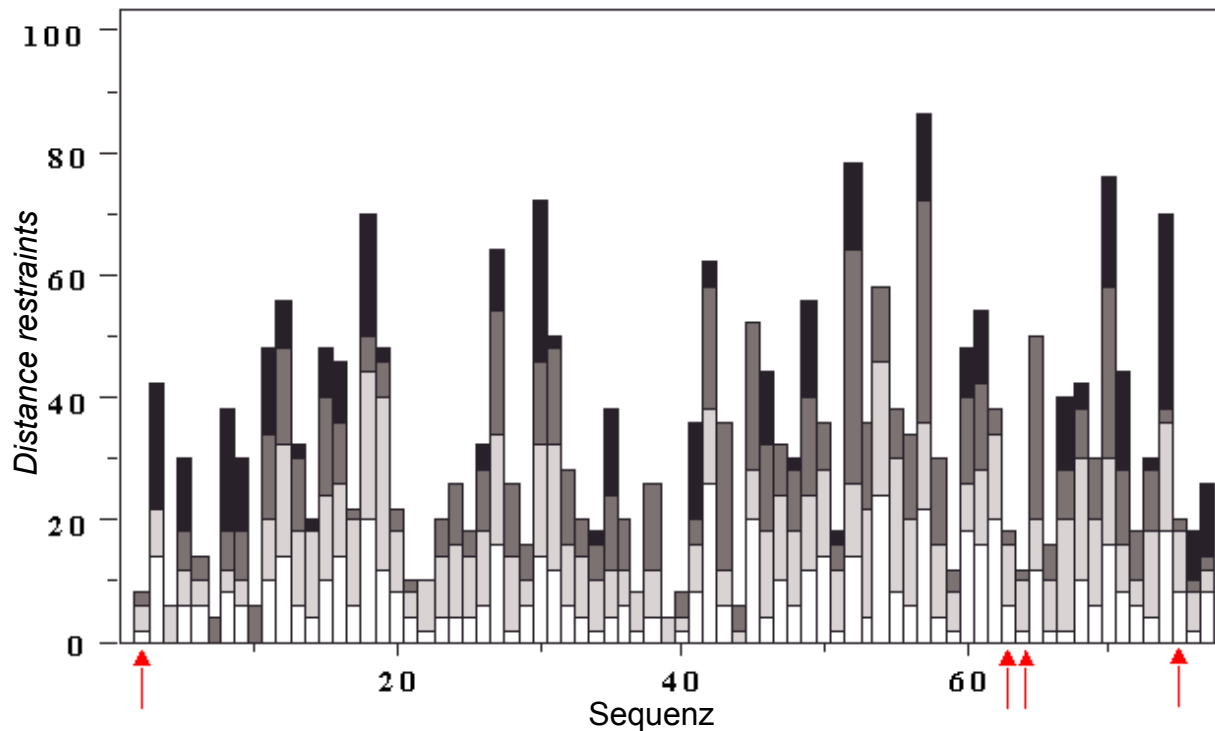


Abb. 28: Anzahl der *distance restraints* der einzelnen Aminosäurereste, die zur Generierung des Strukturensambles eingesetzt wurden. Die weißen Balken kennzeichnen die intraresidualen, die hellgrauen die sequentiellen, die dunkelgrauen die *medium range*- und die schwarzen die *long range*-Kontakte. Die roten Pfeile deuten auf Aminosäurereste, welche im Modell die elektrostatischen Wechselwirkungen in diesem Protein hervorrufen.

Die Bedeutung der Protonierbarkeit des Histidinrestes für die Aktivität von *Amoebapore A* wird durch die reversible chemische Modifikation dieses Aminosäurerestes belegt. Eine Behandlung von *Amoebapore A* mit DEPC, derivatisiert das His-75 zu einem nicht-ionisierbaren N-carbethoxyhistidyl-Derivat. Diese Derivatisierung resultiert in einem fast kompletten Verlust der porenbildenden Aktivität, wobei dieser Aktivitätsverlust durch chemische Abspaltung des DEPC reversibel ist (83). Um den Oligomerisations-Status des DEPC-behandelten *Amoebapore A* zu untersuchen, wurde eine Gelfiltrationschromatographie mit DEPC-behandeltem Protein bei einem pH-Wert von 5.2 durchgeführt (Abb. 26). Im Gegensatz zum nativen Protein eluierte das DEPC-behandelte bei pH 5.2 als Monomer. Weiterhin haben *crosslinking*-Experimente gezeigt, dass oligomere Formen, Dimere bis hin zu Hexameren, von *Amoebapore A* existieren, wenn das Protein an Liposomen gebunden ist (14). Diese Oligomerisation wurde nicht beobachtet, wenn das Histidin-modifizierte Protein verwendet wurde (83). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die DEPC-Modifikation eine

Konformationsänderung im Protein induzierte, wurden wiederum CD-Spektren von nativen und DEPC-modifizierten Proteinen aufgenommen (Abb. 29). Die Spektren sind identisch und zeigen somit, dass die Derivatisierung des Histidins keinen Einfluss auf die Konformation des *Amoebapore A* hat. Zusammenfassend lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Protonierung des einzigen in *Amoebapore A* vorkommenden Histidinrestes die unabdingbare Voraussetzung für die Dimerisation und somit für die Aktivierung dieses Proteins darstellt.

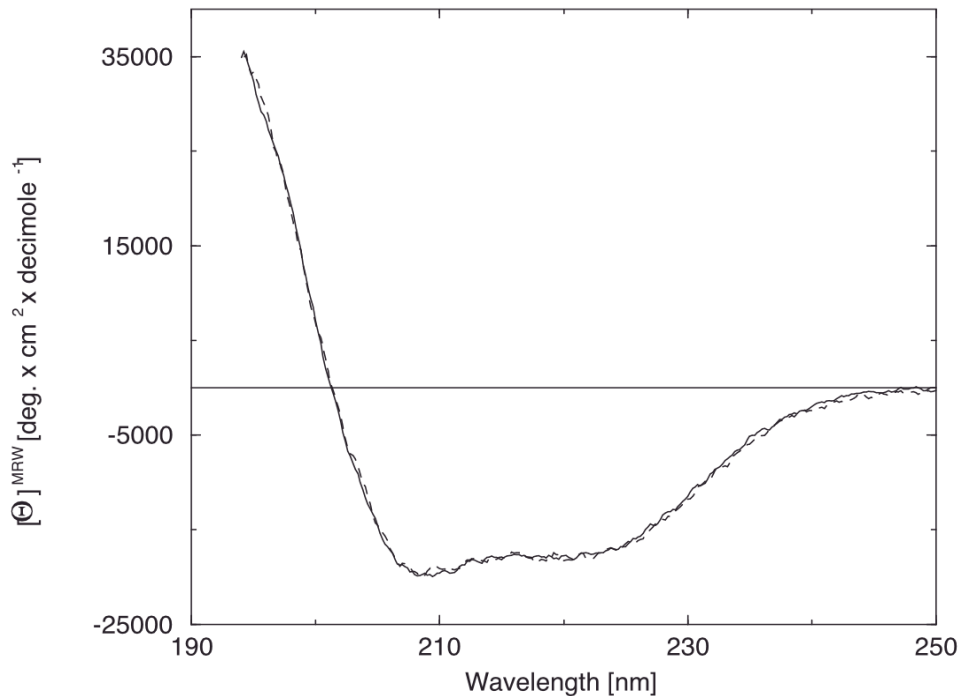


Abb. 29: CD-Spektrum von DEPC-behandeltem (gestrichelt) und unbehandeltem (durchgezogen) Amoebapore A.

Eine Partizipation von Histidinresten in Membran-assoziierten Oligomerisationsprozessen wurde auch für andere, strukturell nicht verwandte, porenbildende Toxine beobachtet: Für Aerolysin (86, 87) von *Aeromonas hydrophyla* und für das α -Toxin (88) von *Staphylococcus aureus* wurde berichtet, dass eine Histidin-Modifizierung mit DEPC bzw. eine Mutagenese des Histidins die Aggregation sowie die porenbildende Aktivität dieser Proteine blockierte. Die Kristallstruktur des α -Toxins zeigt ein Histidin, das über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen zwei Monomeren die Oligomerisation dieses Toxins fördert (89). Im Gegensatz zu *Amoebapore A* wurde für diese Proteine keine distinkten Oligomere in Lösung nachgewiesen.

3.1.11 Ein Model der *Amoebapore A*-Oligomerisation

Auf Grund der Tatsache, dass das *Amoebapore A*-Dimer die funktionelle Spezies ist, konnte geschlossen werden, dass die Dimerisation in einer *head-to-head*-Orientierung stattfinden muss (Abb. 30). Eine *head-to-tail*-Interaktion würde zu Oligomeren höherer Ordnung führen, die im Laufe der Experimente nicht beobachtet wurden. Konsequenter Weise müssen sich die beiden Histidine bei einer *head-to-head*-Orientierung innerhalb der Grenzfläche des Dimers befinden. Daraus folgernd wären zwei unterschiedliche Dimer-Modelle möglich. Das erste Model beinhaltet eine parallele Orientierung der Monomere, das zweite eine antiparallele (Abb. 30).

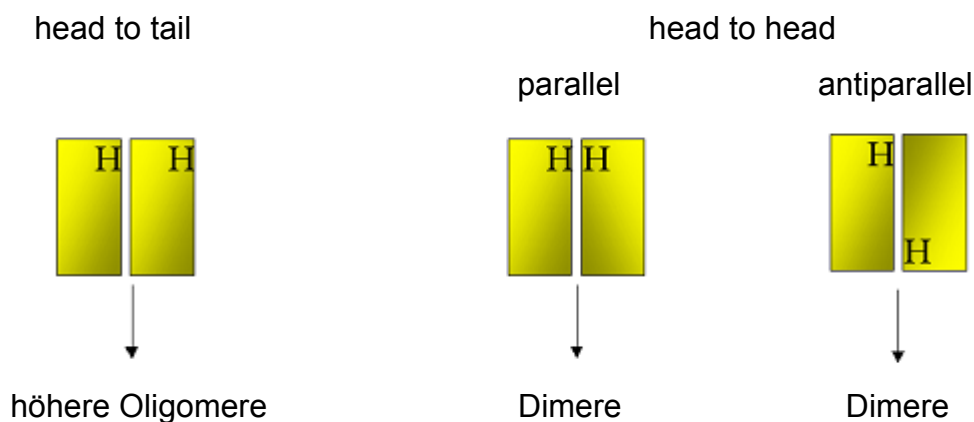


Abb. 30: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Monomer-Orientierungen innerhalb des Dimers. Die Lokalisation des einzelnen Histidinrestes ist mit H gekennzeichnet.

Im Fall der parallelen Orientierung würden die hydrophoben Bereiche der beiden Monomere in entgegengesetzte Richtungen zeigen (siehe hierzu auch Abb. 24), im Fall der antiparallelen Anordnung hingegen weisen die hydrophoben Bereiche in die selbe Richtung. Diese beiden Möglichkeiten hätten zwei unterschiedliche Dimerisationsflächen zur Folge. Ein Vergleich dieser Grenzflächen zeigt, dass die parallele Orientierung Epitope gleicher Ladung zusammenführen würde. Auf Grund der daraus resultierenden elektrostatischen Abstoßung erscheint eine solche Orientierung unwahrscheinlich. Im Gegensatz dazu würde eine antiparallele Orientierung zu einer Grenzfläche führen, in der sich Epitope unterschiedlicher Ladung gegenüber stehen. Eine elektrostatische Anziehung zwischen den beiden Monomeren wäre die Folge. Da während der Dimerisation von *Amoebapore A* keine strukturellen Veränderungen zu beobachten waren (Abb. 25), konnte die NMR-

Struktur des *Amoebapore A*-Monomers für die Modellierung des aktiven Dimers verwendet werden.

Obwohl eine Beschreibung der Dimer-Grenzfläche auf atomarer Ebene nicht möglich ist, bietet ein solches Modell doch die Möglichkeit, Aminosäurereste, die an der Dimerisation beteiligt sein könnten, zu identifizieren. Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Dimerisation auf der Interaktion geladener Aminosäurereste basieren muss, wurden zunächst Ionenpaare innerhalb der Dimer-Grenzfläche gesucht, die für diese elektrostatische Interaktion verantwortlich sein könnten. Abbildung 31 zeigt ein solches Modell, bei dem die an der Dimerisation beteiligten Aminosäurereste innerhalb der Grenzfläche hervorgehoben sind.

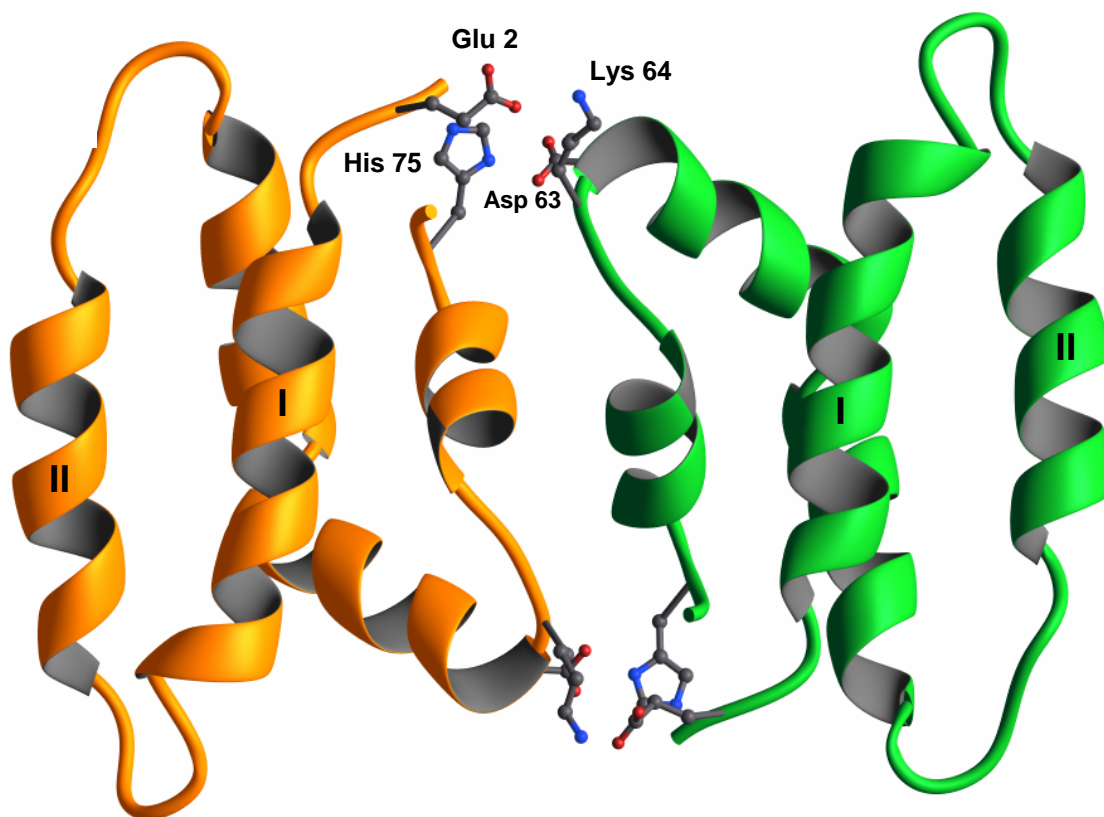


Abb. 31: *Ribbon-Darstellung des Dimer-Modells. Die an den elektrostatischen Interaktionen beteiligten Aminosäurereste sind gekennzeichnet. Helices I und II, die die hydrophobe Oberfläche bilden, sind ebenfalls gekennzeichnet.*

Auf Grund der antiparallelen Orientierung der beiden Monomere sind die dargestellten Interaktionen jeweils zweimal vorhanden und symmetrisch angeordnet. Bei diesem Modell bildet das His-75 des ersten Monomers ein Ionenpaar mit dem Asp-63 des zweiten Monomers. Das zweite in diesem Modell vorhandene Ionenpaar wird von Glu-2 und Lys-64 gebildet. Für alle an den Interaktionen beteiligten

Aminosäureresten wurden keine NOE-*long range*-Kontakte beobachtet (Abb. 28), d.h. sie sind frei beweglich und zugänglich. Somit ist ihre Beteiligung an intermolekularen Interaktionen prinzipiell möglich. Da innerhalb der Dimer-Grenzfläche weder überlappende van-der-Waals-Radien, noch ausgedehnte Hohlräume zu erkennen sind, ist die Form der an der Dimerisation beteiligten Oberflächen komplementär zueinander. Eine augenscheinliche Konsequenz, die sich aus der hier dargestellten Art der Dimerisation ergibt, ist die Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche. Sie kommt zustande, indem sich die Monomere so zusammenlagern, dass jeweils die Helices I und II, die die hydrophobe Oberfläche im Monomer bilden (siehe auch Abb. 24), einander ergänzen (Abb. 31). Da *Amoebapore A* ein porenbildendes Toxin ist, könnte dieses vergrößerte hydrophobe Epitop in der Interaktion mit der hydrophoben Umgebung der Zellmembran involviert sein. Aufgrund von biophysikalischen Experimenten wurde vermutet, dass *Amoebapore A* seine porenbildende Aktivität gemäß dem *barrel-stave*-Modell (Abb. 32) entwickelt (90). Dieses Modell beschreibt die Bildung einer Membranpore als eine Assemblierung von Proteinen, die in die Membran inseriert sind. Wie die Dauben eines Fasses, so orientieren sich in diesem Modell die hydrophoben Bereiche der Proteine zu den Lipiden der Membran, während die hydrophilen Bereiche das Innere der Pore auskleiden (91).

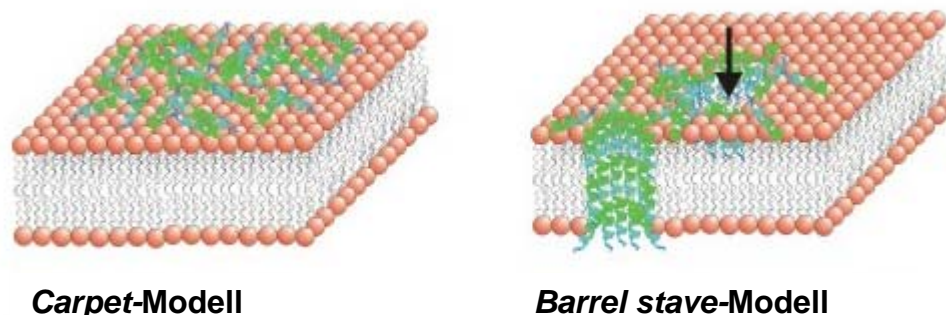


Abb. 32: Schematische Darstellung des carpet-Modells, bei dem die oberflächliche Interaktionen eines Proteins (grün) mit der Membran zu einer gestörten Membranintegrität führt, und des barrel stave-Modells bei dem ein Protein (grün) eine stabile Membranpore ausbildet.

Das für *Amoebapore A* vorgeschlagene *barrel stave*-Modell stimmt gut mit den strukturellen Eigenschaften des Dimer-Modells überein. Im Gegensatz dazu wurde für andere porenbildende Proteine der SAPLIP-Familie, *NK-Lysin* und *Granulysin*, beschrieben, dass diese nur oberflächlich mit der Membran interagieren und auf

diese Weise Membranstörungen hervorrufen, die die Integrität der Membran aufheben (82, 92).

Crosslinking-Experimente in Gegenwart von Lipid-Vesikel legen nahe, dass *Amoebapore A* nach der Insertion in die Membran Hexamere ausbildet (14). Wie die Dimerisation in wässriger Lösung ist auch die Bildung von Hexameren innerhalb der Membran nicht von strukturellen Änderungen begleitet. (15).

Aus diesem Grund ist wie im Fall des Dimers die NMR-Struktur des *Amoebapore A*-Monomers ein geeignetes Modul, um auch ein Modell des Hexamers zu konstruieren. Abbildung 33 zeigt, dass die Konformation des Dimers es erlaubt, drei solcher Dimere in einer zirkulären Konfiguration zu arrangieren. Auf diese Weise wird wiederum die hydrophobe Oberfläche so vergrößert, dass sich ein das Hexamer umschließender hydrophober Bereich formt (Abb. 33).

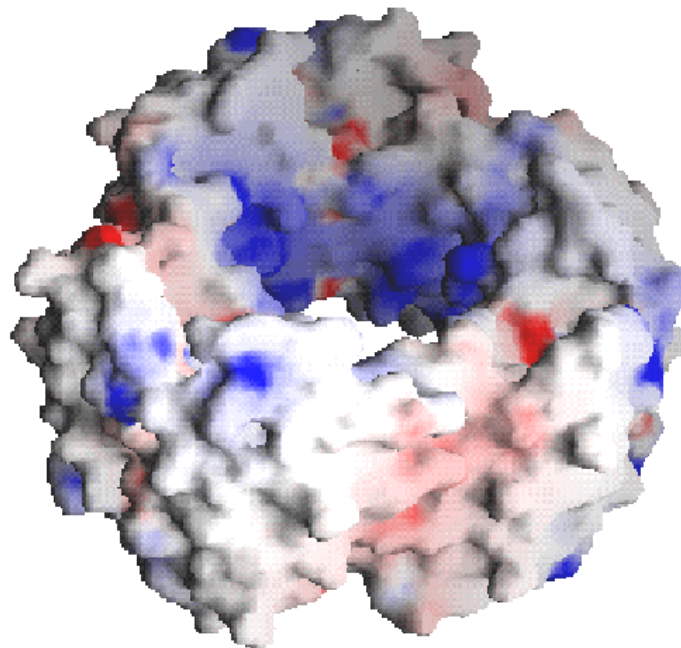


Abb. 33: *Elektrostatistisches Potential der molekularen Oberfläche der modellierten hexameren Membranpore; positives Potential ist in blau, negatives Potential in rot dargestellt. Das Bild des elektrostatistisches Potentials der molekularen Oberfläche wurde mit dem Programm GRASP generiert.*

Wie bereits die Monomer-/Monomer-Grenzfläche so konnte auch die Dimer-/Dimer-Grenzfläche ohne überlappende van-der-Waals-Radien oder ausgedehnte Hohlräume innerhalb der Grenzfläche konstruiert werden. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass *Amoebapore A* Poren mit einem Durchmesser zwischen 1.3 und 2.2 nm in Membranen bildet (17). Der Durchmesser des modellierten Hexamers, mit

annähernd 2 nm, ist in sehr guter Übereinstimmung mit diesem experimentellen Wert. Betrachtet man die elektrostatische Oberfläche des Hexamers, so erfüllt auch dieses die Kriterien des *barrel stave*-Modells, d.h. die überwiegend hydrophobe Fläche befindet sich auf der äußeren, den Lipiden der Membran zugewandten Seite, während die innere Oberfläche einen vorwiegend hydrophilen Charakter besitzt (Abb. 33), was den Durchtritt von wässrigem Zytosol ermöglicht.

3.1.12 Biologische Bedeutung

Die Aktivität der beiden anderen *Amoebapore*-Isoformen *B* und *C* ist ebenfalls pH-abhängig. Auch besitzen sie beide einen Histidinrest gleicher Lokalisation (16). Daher gelten die Schlüsse, die aus den strukturellen Daten von *Amoebapore A* gezogen werden konnten, wahrscheinlich auch für die Isoformen *B* und *C*.

Durch die pH-Wert-abhängige Konvertierung in das permeabilisationskompetente Dimer ist es möglich, *Amoebapore A* in seiner reifen, aber inaktiven Form in den zytoplasmatischen Granula der Amöbe zu lagern. Nach gegenwärtiger Sicht ist die primäre Aufgabe der *Amoebapores* die Zerstörung von phagozytierten Bakterien innerhalb der Amöbe. Dazu entlädt sie ihre *Amoebapores* in die saure Umgebung der Phagolysosomen, in denen sich die eingeschlossenen Bakterien befinden (93). Die Annahme, dass *Amoebapores* an der Abtötung von Wirtszellen beteiligt sind, wurde durch folgende Beobachtungen gestützt: Diese Proteine lysieren eukaryotische Zellen (94, 95), und Amöben, denen die Hauptform *Amoebapore A* fehlt, sind nicht mehr in der Lage, Wirtsgewebe (sowie phagozytierte Bakterien) zu zerstören (10). Den Ablauf der zytolytischen Reaktion könnte man sich folgendermaßen vorstellen: Nachdem der Kontakt zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle stattgefunden hat, werden die *Amoebapores* aus den zytoplasmatischen Granula in die begrenzte Umgebung der Kontaktzone entladen. In diesem eng begrenzten Bereich könnte eine hohe Proteinkonzentration sowie ein relativ niedriger pH-Wert erreicht werden. Dies führt dann zur Dimerisation und somit zur Aktivierung dieser porenbildenden Toxine, die dann die hexameren Poren in der Membran ausbilden.

Die hier präsentierte NMR-Struktur von *Amoebapore A* ist die erste Proteinstruktur eines Toxins eines eukaryotischen Parasiten. Die strukturellen Informationen und die daraus abgeleiteten Implikationen über die Wirkungsweise dieses Schlüsselfaktors der invasiven Amöbiasis sollten zu einem besseren Verständnis dieser Krankheit führen.

3.2 Psoriasin

3.2.1 Strukturvergleich von *Amoebapore A* und Psoriasin

Nachdem die NMR-Struktur von *Amoebapore A* gelöst war, zeigten sich gewisse Ähnlichkeiten mit der Struktur des Protein Psoriasin. Die Ähnlichkeiten sind dabei nicht so auffällig wie die zwischen *Amoebapore A*, *NK-Lysin* und *Granulysin*, die alle derselben Strukturfamilie (SAPLIP) angehören und sich durch ihre Sequenzähnlichkeiten auszeichnen. Vergleicht man jedoch den generellen Verlauf der Helices in *Amoebapore A* und Psoriasin, so erkennt man, dass dieser sich in beiden Proteinen gleicht (Abb. 34). Damit besitzen *Amoebapore A* und Psoriasin die gleiche Faltungstopologie.

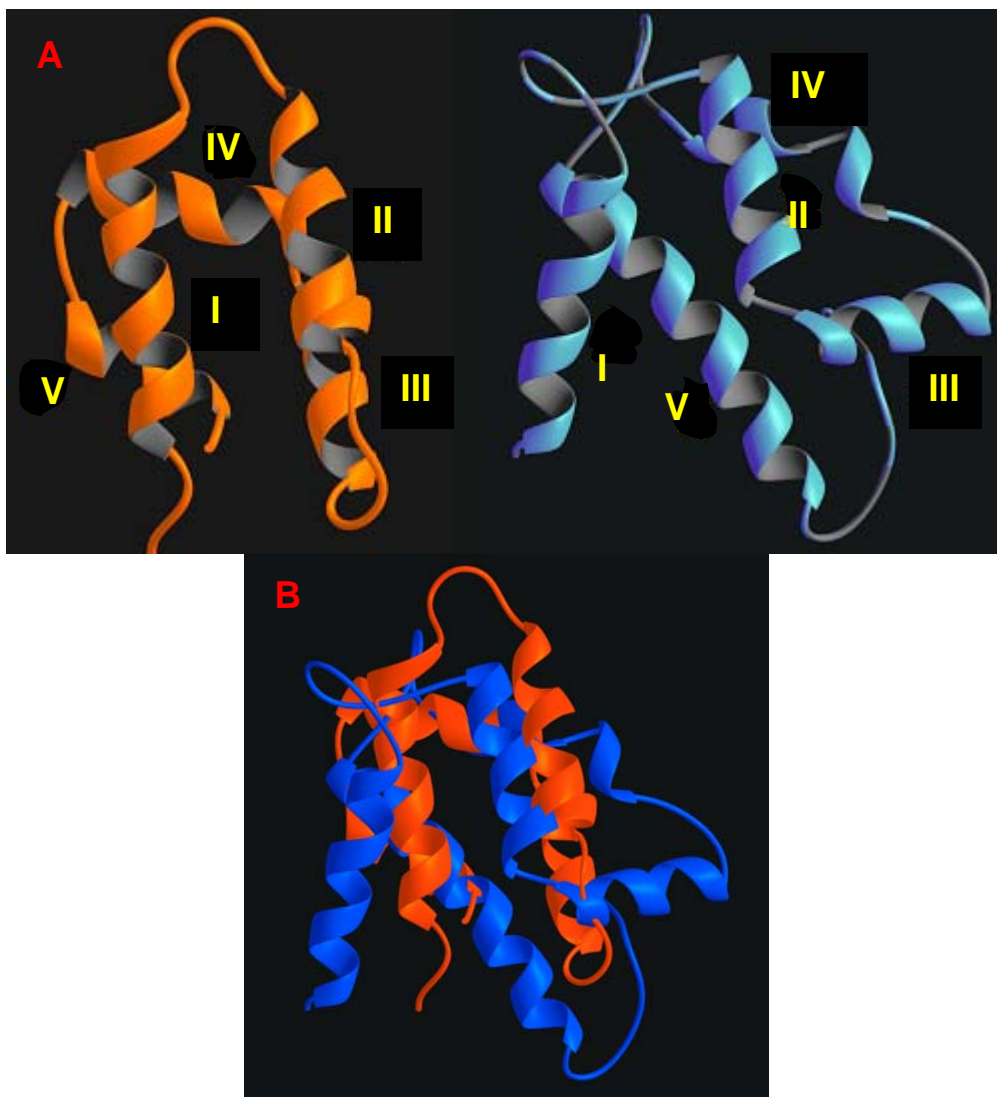


Abb. 34: Strukturvergleich von *Amoebapore A* (orange) und Psoriasin (blau)

A. Die beiden Proteine sind nebeneinander dargestellt. Die fünf Helices sind mit A-E gekennzeichnet.

B. Superpositionierung von *Amoebapore A* und Psoriasin.

Die Familie der SAPLIPS ist u.a. dadurch gekennzeichnet, dass ihre helikalen Strukturen durch drei Disulfidbrücken stabilisiert werden. Dass Proteine, die dieses Merkmal nicht tragen, dennoch die gleiche Faltungstopologie (*fold*) aufweisen können, zeigt das Beispiel des porenbildenden Proteins Bacteriocin AS-48: Bacteriocin AS-48 fehlen die drei Disulfid-Brücken, die für den SAPLIP-*fold* charakteristisch sind. Auch gibt es keine Sequenzähnlichkeiten zwischen ihnen. Nichtsdestoweniger läßt dieselbe molekulare Architektur sowie eine ähnliche Ladungsanordnung, wie sie im *NK-Lysin* beobachtet wird, auf einen gleichen Mechanismus bezüglich der antibakteriellen Aktivität schließen (96).

3.2.2 Permeabilisierung der Liposomenmembran

Da *Amoebapore A* und Psoriasin offensichtlich die gleiche Faltungstopologie aufweisen, galt es herauszufinden, ob sie auch mechanistische Fähigkeiten im Sinne der für *Amoebapore A* bekannten porenbildenden Aktivität teilen.

Hierzu wurde die Membran-permeabilisierende Aktivität von Psoriasin mittels Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein aus Liposomen bestimmt (*calcein release assay*). Erste Untersuchungen bei einem „physiologischen“ pH-Wert von 7.4 zeigten, dass nach Zugabe von Psoriasin kein Anstieg der Fluoreszenz infolge der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs aus den Liposomen erfolgte (Abb. 35). Damit war Psoriasin nicht in der Lage, die Integrität der Liposomenmembran unter diesen Bedingungen zu stören.

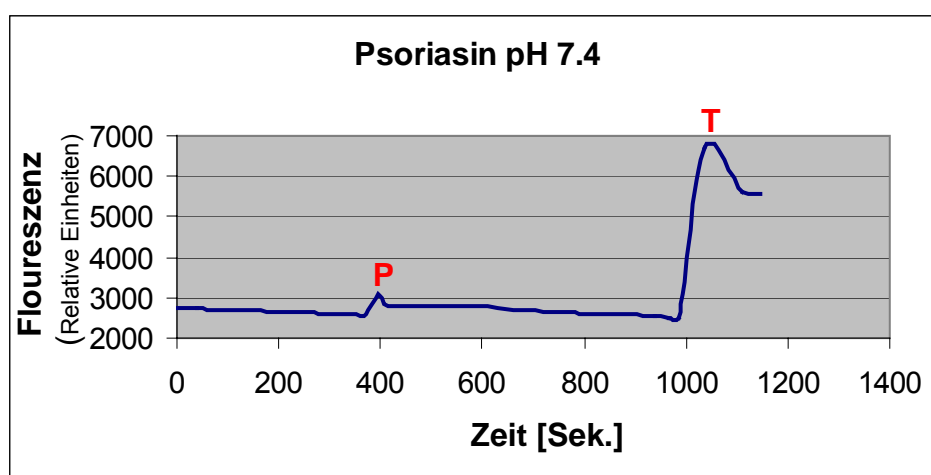


Abb. 35: Membran-permeabilisierende Aktivität von Psoriasin bei pH 7.4. Die Konzentration des zugegebenen Psoriasins betrug 350 nM. Die Zugabe des Psoriasins ist mit dem Buchstaben P, die des Triton X-100 mit T gekennzeichnet.

Da *Amoebapore A* sein Aktivitätsmaximum bei einem pH von 5.2 hat, wurde zunächst geprüft, ob das Psoriasin bei diesem pH-Wert membranolytisch aktiv ist. Abbildung 36 zeigt das Resultat des bei einem pH-Wert von 5.2 durchgeführten Experiments. Nach Zugabe von Psoriasins ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz infolge der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs aus den Liposomen zu erkennen. Ein weiterer Anstieg der Fluoreszenz erfolgte nach Zugabe des Triton X-100. Nach der in Abschnitt 2.5.1. beschriebenen Vorgehensweise zur Berechnung der Aktivität ergibt sich aus diesem Experiment eine Aktivität von 60% für das Psoriasin bei einem pH-Wert von 5.2. Bei pH 5.2 ist dieses Protein also aktiv, während es bei pH 7.4 keine Aktivität zeigt.

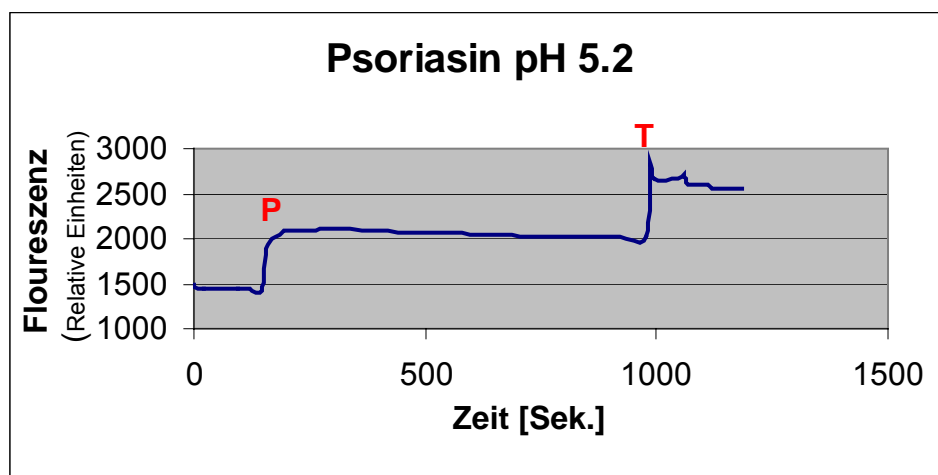


Abb. 36: Membran-permeabilisierende Aktivität von Psoriasin bei pH 5.2. Die Konzentration des zugegebenen Psoriasins betrug 350 nM. Die Zugabe des Psoriasins ist mit dem Buchstaben P, die des Triton X-100 mit T gekennzeichnet.

3.2.3 Konzentrationsabhängigkeit

Im Weiteren sollte der Konzentrationsbereich von Psoriasin ermittelt werden, in dem es membranolytisch aktiv ist. Dazu wurde die porenbildende Aktivität des Psoriasins bei einem pH-Wert von 5.2 (ohne Zugabe von NaCl) in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 250 nM bestimmt. Diese Experimente zeigten, dass Psoriasin bereits in geringer Dosierung in der Lage ist, die Integrität der Liposomenmembran zu zerstören (Abb. 37).

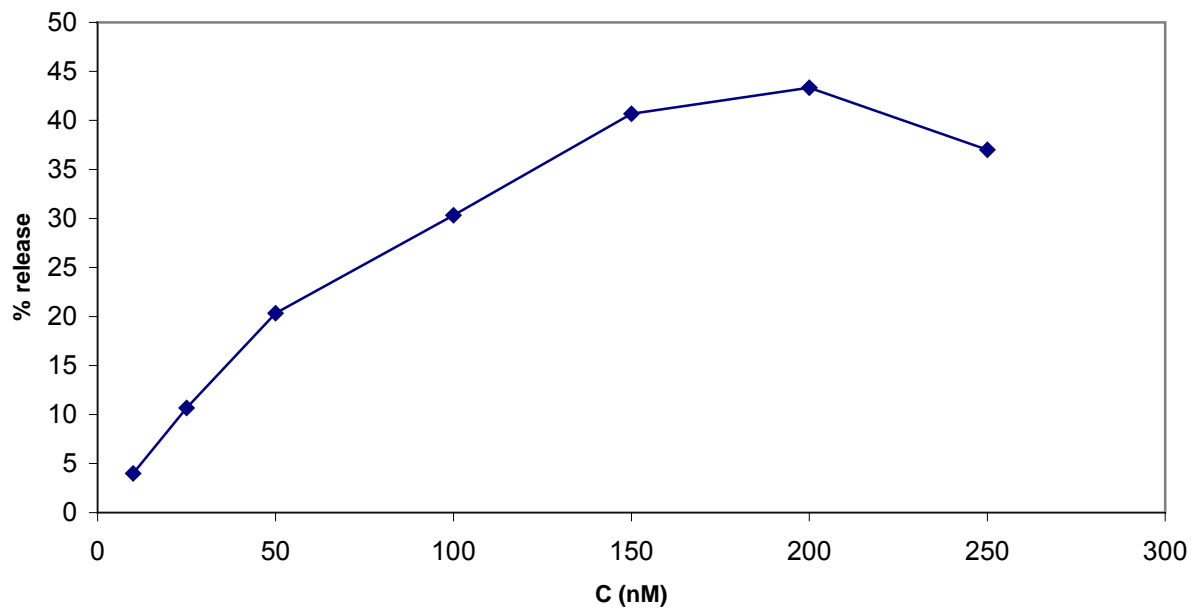


Abb. 37: Membran-permeabilisierende Aktivität von Psoriasin in % der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs aus den Liposomen (% release) bei pH 5.2 in Abhängigkeit von der Psoriasin-Konzentration (C). Die Messpunkte entsprechen den Mittelwerten von experimentellen Dreifachwerten.

3.2.4 PH-Abhängigkeit

Nachdem die porenbildende Aktivität des Psoriasins bei pH 5.2 in Abhängigkeit von dessen Konzentration bestimmt worden war, sollte nun die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert näher untersucht werden. Da Psoriasin bei einer Konzentration von 150 nM bereits eine Aktivität von 40% zeigt, wurden die Experimente zur Ermittlung der pH-Abhängigkeit mit einer Psoriasinkonzentration von 150 nM durchgeführt. Dabei zeigte das Protein ein Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 5.5 (Abb. 38). Dass dieser pH-Wert genau dem der menschlichen Haut entspricht (97), könnte für die Funktion des Psoriasins von großer Bedeutung sein.

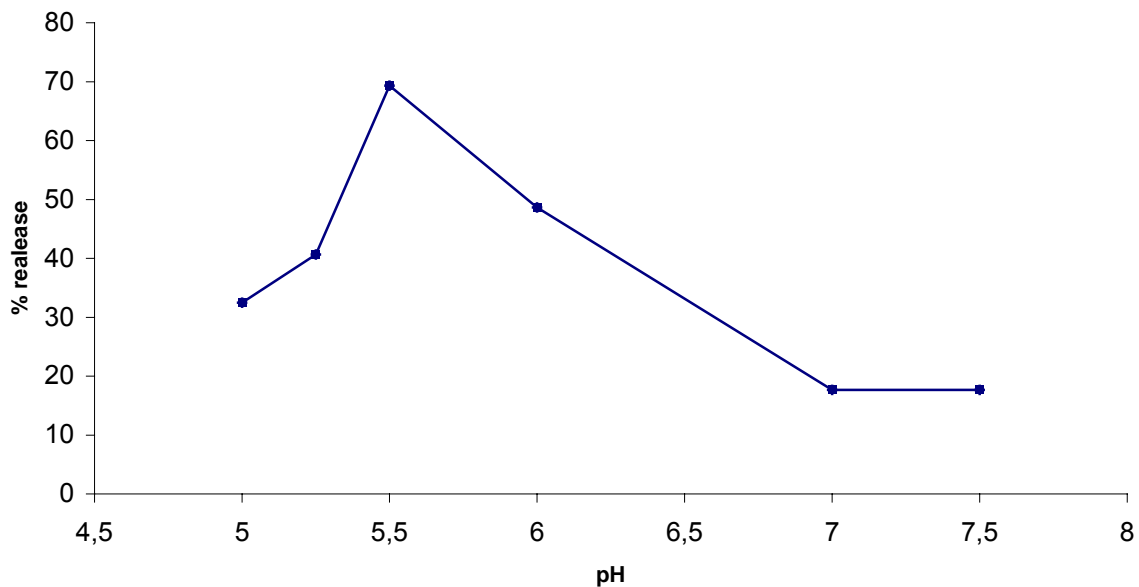


Abb. 38: Membran-permeabilisierende Aktivität von Psoriasin in % der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs aus den Liposomen (% release) bei einer Psoriasinkonzentration von 150 nM in Abhängigkeit vom pH-Wert (pH). Die Messpunkte entsprechen den Mittelwerten von experimentellen Dreifachwerten

3.2.5 Biologische Implikationen

Da trotz intensiver Forschung bisher nur wenig über die funktionelle Rolle des Psoriasins bekannt ist (41), könnte die Entdeckung, dass es sich bei diesem Protein um ein membranolytisches Molekül handelt, von großer Bedeutung sein. So legt die jüngst entdeckte antibakterielle Wirkung des Psoriasins (Prof. Dr. J.-M.Schröder, mündliche Mitteilung) nahe, dass diese auf die Membran-permeabilisierende Eigenschaft zurückzuführen ist. Diese antibakterielle Wirkung richtet sich insbesondere gegen das Bakterium *E. Coli*, das infolge dieser Wirkung nicht mehr in der Lage ist, die menschliche Haut zu besiedeln (Prof. Dr. J.-M.Schröder, mündliche Mitteilung). Dass das membranolytische Aktivitätsmaximum des Psoriasins bei pH 5.5, also dem pH-Wert der menschlichen Hautoberfläche, liegt (97), lässt einen solchen Mechanismus äußerst plausibel erscheinen.

Es sind jedoch auch weitere Implikationen denkbar, die sich aus dieser Entdeckung ergeben. Obwohl es bisher nur wenig konkrete Hinweise gibt, nimmt man an, dass das Psoriasin eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Psoriasis zukommt (39). Wie im Falle von Psoriasin, so sind auch für das Zytokin IL-1 erhöhte Spiegel in Psoriasispatienten beschrieben worden (31-33). IL-1 könnte für die Pathogenese der

Psoriasis von besonderer Bedeutung, da es viele pathologische Merkmale dieser Krankheit erklären könnte (98). Da IL-1 kein Signalpeptid besitzt, verbleibt es im Zytosol der Keratinozyten. Es benötigt einen Stimulus, z.B. eine Verletzung der Zelle, um nach außen zu gelangen (99). Interessanterweise wurde beschrieben, dass Keratinozyten, die man aus psoriatischer Haut isolierte, im Gegensatz zu Keratinozyten aus normaler Haut einen Verlust der Membranintegrität aufwiesen. Infolge dieser gestörten Membranintegrität konnte IL-1 aus der Zelle gelangen (32). Die hier erstmals beschriebene Eigenschaft des Psoriasins, die Integrität von Liposomenmembranen zu stören, mag eine Erklärung für dieses Phänomen liefern. Zieht man in Betracht, dass im Falle der Amöbiasis ein mögliches Analogon, d.h. IL-1-Freisetzung infolge der Membran-permeabilisierenden Wirkung der *Amoebapores* postuliert wurde (4), so wäre die Wirkung von membranolytischen Proteinen auf die Zellmembran als ein genereller Mechanismus der IL-1-Freisetzung denkbar.

4 Summary/Zusammenfassung

4.1 Summary

Within the scope of this work the 3D-structure of the pore-forming protein amoebapore A from *E. histolytica* was solved by NMR spectroscopy. As it was known that this protein displays its maximal pore-forming activity at a pH of 5.2 initial NMR-experiments were performed at this pH. Unfortunately, the proton T_2 values measured under these conditions were indicative of protein oligomerisation. Stepwise lowering the pH to 3.5 resulted in proton T_2 values corresponding to a monomeric protein species. Due to the fact that amoebapore A is most active at pH 5.2 it first had to be examined whether the global conformation of amoebapore A changes with pH. The identical CD spectra observed clearly indicate that the overall conformation of amoebapore A is not influenced by shifting the pH in a range from 3 to 7. Therefore TOCSY- and NOESY-spectra that are essential for the determination of the three-dimensional structure were recorded. The former were used to determine which proton resonances belong to which amino acid residues and the latter were used for the detection of the spatial arrangement of the protons. The calculation of the 3D-structure was performed using the NOE-signals detected in the NOESY spectrum. Such a signal develops as a result of the spatial proximity of two protons. Due to the intensity of such a NOE the distance between these protons can be calculated. By using of all these distances a network is formed that results in the three-dimensional structure. For the calculation of the amoebapore A structure 709 NOEs could be assigned unambiguously. To get further structural information hydrogen/deuterium-exchanges were performed to identify hydrogen bonds within the protein. The structure was then calculated using the data derived from the NOESY spectra and the hydrogen/deuterium-exchange experiments. The quality of the structure was shown after superposition of 20 independently calculated structures that differed only slightly from each other. Additionally the performed Ramachandran plot revealed that none of the backbone Φ/Ψ -dihedral angle pairs had been observed in disallowed regions.

It was shown by gel chromatography that *amoebapore* A solely exists as a stable dimer in the pH range at which it is biologically active, on the other hand it is monomeric at pH values at which it is membranolytically inactive. The narrow pH

range at which amoebapore A is active, is exactly the pH range at which histidine residues are protonated. Former experiments have shown that chemical modification (DEPC) of the sole histidine led to a complete loss of activity. In this work, it is shown that the DEPC-modified amoebapore A was no longer able to dimerise. By CD spectroscopy it was also demonstrated that DEPC derivatisation of the histidine residue resulting in a non-ionizable side chain did not influence the overall conformation of amoebapore A. On the basis of the structural data it became apparent that the histidine side chain is solvent exposed and highly flexible, which is a prerequisite for the involvement in the dimerisation. Thus, pH-dependent histidine-mediated dimerisation is the molecular switch for pore formation and reveals a novel activation mechanism of pore-forming toxins. By using the experimental derived monomeric structure, a model of the dimer and the membrane pore could be provided. These models are in excellent agreement with all experimental data available so far.

Considering the structure of *amoebapore A* it was realised that psoriasin which is expressed in the upper part of human skin shares the same fold. The assumption that it also shares similar properties regarding membranolytic activity was confirmed experimentally. It was most active at pH 5.5 which is also the pH of the human skin. This observation could be of great importance considering that the skin is the place at which psoriasin develops its activity.

4.2 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 3D-Struktur des porenbildenden Proteins *Amoebapore A* von *E. histolytica* mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Da es bekannt war, dass dieses Protein sein Aktivitätsmaximum bezüglich seiner porenbildenden Aktivität bei einem pH-Wert von 5.2 erreicht, wurden die ersten NMR-Messungen bei diesem pH-Wert durchgeführt. Durch die Analyse der transversalen Relaxationszeit (T_2) wurde festgestellt, dass das Protein bei diesem pH-Wert nicht monomer vorliegt. Um die Struktur des monomeren Proteins dennoch lösen zu können, wurde der pH-Wert verringert, bis die T_2 -Zeiten ein ausschließlich monomer vorliegendes Protein anzeigten. Dies war bei einem pH-Wert von 3.5 der Fall. Da *Amoebapore A* bei pH 5.2 die stärkste porenbildende Aktivität zeigt, musste zunächst festgestellt werden, ob die Struktur von *Amoebapore A* unter verschiedenen pH-Bedingungen konstant ist. Mittels CD-spektroskopischer

Untersuchungen in einem pH-Bereich von pH 3 - 7 konnte gezeigt werden, dass *Amoebapore A* keinen pH-Wert-abhängigen Konformationsänderungen unterliegt. Daraufhin wurden die für die Strukturaufklärung benötigten TOCSY- und NOESY-Spektren aufgenommen. Erstere dienen der Zuordnung der einzelnen Protonenresonanzen zu den jeweiligen Aminosäureresten und letztere der Detektion der Protonen in ihrer räumlichen Anordnung. Die Berechnung der dreidimensionalen Struktur erfolgte mit Hilfe der im NOESY nachgewiesenen Signale. Über die Intensität eines solchen NOE-Signals, das allein durch die räumliche Nähe zweier Protonen entsteht, lässt sich der Abstand zweier Protonen recht genau bestimmen, so dass man durch das Netzwerk aller in die Berechnung einfließenden Protonenabstände die dreidimensionale Struktur des Proteins erhält. Für die Berechnung der Raumstruktur von *Amoebapore A* konnten insgesamt 709 NOEs eindeutig zugeordnet werden. Um zusätzliche strukturelle Informationen zu erhalten, wurden sogenannte H/D-Austauschexperimente durchgeführt, mit deren Hilfe im Protein vorhandene Wasserstoffbrücken identifiziert wurden. Der nächste Schritt bestand darin, alle aus den NOEs und aus den Austauschexperimenten gewonnenen Daten in die Strukturberechnung einzubeziehen. Die Qualität der so berechneten Struktur zeigte sich nach der Überlagerung von 20 unabhängig voneinander berechneten Strukturen, die allesamt nur geringfügig voneinander abwichen (niedrige rmsd-Werte). Zusätzlich zeigte der Ramachandran-Plot, dass sich keiner der Torsionswinkel des Proteinrückgrates in energetisch unerlaubten Bereichen befand.

Mittels Größenausschlusschromatographie wurde gezeigt, dass *Amoebapore A* in dem pH-Bereich, in dem es seine biologische Aktivität entfaltet, ausschließlich als stabiles Dimer vorliegt. Dagegen ist es in den pH-Wert-Bereichen, in denen es keine Aktivität zeigt, stets monomer. Der pH-Bereich, in dem *Amoebapore A* aktiv ist, ist eng begrenzt und liegt genau im Protonierungsbereich der Aminosäure Histidin. Frühere Experimente hatten gezeigt, dass eine chemische Modifizierung des einzigen in diesem Protein vorhandenen Histidinrestes zum völligem Aktivitätsverlust des Proteins führte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass DEPC-modifiziertes *Amoebapore A* ebenfalls nicht mehr in der Lage ist, Dimere auszubilden, weil das Histidin die Fähigkeit verloren hatte, elektrostatische Wechselwirkungen mit anderen Gruppen einzugehen. Mittels CD-Spektroskopie wurde gezeigt, dass die Derivatisierung des Histidinrestes keine Konformationsänderung von *Amoebapore A* zur Folge hat. Anhand der strukturellen

Daten wurde erkannt, dass der in *Amoebapore A* vorhandene Histidinrest eine exponierte Stellung sowie eine hohe strukturelle Flexibilität aufweist. Dies ist eine Voraussetzung für die experimentell nachgewiesene Dimerisation. Es konnte also gezeigt werden, dass die pH-abhängige, Histidin-vermittelte Dimerisation der molekulare Schalter für die Aktivierung dieses porenbildenden Proteins ist. Damit ist ein bis heute unbekannter Aktivierungsmechanismus für porenbildende Toxine entdeckt worden. Mit Hilfe der experimentell ermittelten monomeren Struktur konnte hier ein Modell des Dimers und der Membranpore vorgestellt werden, dass allen bisher bekannten experimentell ermittelten Daten gerecht wird.

Anhand der Struktur von *Amoebapore A* wurde erkannt, dass das von den Keratinocyten der oberen Hautschichten exprimierte Protein Psoriasin die gleiche Faltungstopologie (*fold*) wie *Amoebapore A* aufweist. Die daraus gefolgerte Vermutung, dass Psoriasin auch mechanistische Fähigkeiten im Sinne der für *Amoebapore A* bekannten poren-bildenden Aktivität zeigen könnte, ließ sich experimentell bestätigen. Das für Psoriasin ermittelte pH-Optimum der Membran-permeabilisierenden Aktivität liegt bei pH 5.5. Dieser pH-Wert entspricht dem pH-Wert der menschlichen Haut. Da die Haut der Ort ist an dem Psoriasin exprimiert und sezerniert wird, könnte das hier beschriebene pH-Optimum für die Funktion des Proteins entscheidend sein.

5 Abkürzungen

ω	Lamor-Frequenz
τ_c	Rotations-Korrelationszeit
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
4D	Vierdimensional
Å	Angström
AP-A	<i>Amoebapore A</i>
AP-B	<i>Amoebapore B</i>
AP-C	<i>Amoebapore C</i>
B_0	statisches Magnetfeld
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
D ₂ O	Deuteriumoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	<i>Distance-Geometry</i>
DSP	<i>Dithiobis(succinimidylpropionate)</i>
EDC	<i>1-Ethyl-3-(Dimethylaminopropyl)-Carbodiimide</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FID	<i>Free Induction Decay</i>
H/D	Wasserstoff/Deuterium
H/O	Wasserstoff/Sauerstoff
H ₂ O	Wasser
hBD-3	<i>human β- defensin</i>
hCAP-18	<i>human cationic antimicrobial protein 18</i>
Hepes	<i>4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HPLC	<i>high-pressure-liquid-chromatography</i>
I	Kernspin
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8

kDa	Kilodalton
M_0	Makroskopische Gleichgewichtsmagnetisierung
N/O	Stickstoff/Sauerstoff
NaCl	Natriumchlorid
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy</i>
ppm	<i>parts per million</i>
r.m.s.d	root mean square deviations
rf	Radiofrequenz
RMS	<i>Root Mean Square</i>
SAPLIP	<i>saposin-like proteins</i>
SCOP	<i>structural classification of proteins</i>
SDS/PAGE	<i>Sodiumdodecylsulfate/Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
SLPI	<i>secretory leucocyte protease inhibitor</i>
T_1	Longitudinale Relaxationszeit
t_1, t_2	Zeitvariablen
T_2	Transversale Relaxationszeit
TGF- α	<i>Transforming growth factor-α</i>
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan

6 Literaturverzeichnis

1. Ravdin, J. I. 1995. Amebiasis. *Clin Infect Dis* 20:1453.
2. Walsh, J. A. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 8:228.
3. Stanley, S. L., Jr. 2003. Amoebiasis. *Lancet* 361:1025.
4. Huston, C. D. 2004. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends Parasitol* 20:23.
5. Bruhn, H., and M. Leippe. 2001. Membrane-permeabilizing polypeptides of amoebapore-constituents of an archaic antimicrobial system. *Zoology* 104:3.
6. Ravdin, J. I., B. Y. Croft, and R. L. Guerrant. 1980. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 152:377.
7. Petri, W. A., Jr., R. Haque, and B. J. Mann. 2002. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 56:39.
8. Bruchhaus, I., T. Jacobs, M. Leippe, and E. Tannich. 1996. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol* 22:255.
9. Leippe, M. 1997. Amoebapores. *Parasitology Today* 13:178.
10. Bracha, R., Y. Nuchamowitz, and D. Mirelman. 2003. Transcriptional Silencing of an Amoebapore Gene in *Entamoeba histolytica*: Molecular Analysis and Effect on Pathogenicity. *Eukaryot Cell* 2:295.

11. Tschopp, J., and M. Nabholz. 1990. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 8:279.
12. Lynch, E. C., I. M. Rosenberg, and C. Gitler. 1982. An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *Embo J* 1:801.
13. Rosenberg, I., D. Bach, L. M. Loew, and C. Gitler. 1989. Isolation, characterization and partial purification of a transferable membrane channel (amoebapore) produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 33:237.
14. Leippe, M., S. Ebel, O. L. Schoenberger, R. D. Horstmann, and H. J. Müller-Eberhard. 1991. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7659.
15. Leippe, M., E. Tannich, R. Nickel, G. van der Goot, F. Pattus, R. D. Horstmann, and H. J. Müller-Eberhard. 1992. Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Embo J* 11:3501.
16. Leippe, M., J. Andrä, R. Nickel, E. Tannich, and H. J. Müller-Eberhard. 1994. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol* 14:895.
17. Gutschmann, T., B. Rieckens, H. Bruhn, A. Wiese, U. Seydel, and M. Leippe. 2003. Interaction of Amoebapores and NK-lysin with Symmetric Phospholipid and Asymmetric Lipopolysaccharide/Phospholipid Bilayers. *Biochemistry (in press)*.
18. Munford, R. S., P. O. Sheppard, and P. J. O'Hara. 1995. Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res* 36:1653.

19. Andersson, M., H. Gunne, B. Agerberth, A. Boman, T. Bergman, B. Olsson, A. Dagerlind, H. Wigzell, H. G. Boman, and G. H. Gudmundsson. 1996. NK-lysin, structure and function of a novel effector molecule of porcine T and NK cells. *Vet Immunol Immunopathol* 54:123.
20. Pena, S. V., D. A. Hanson, B. A. Carr, T. J. Goralski, and A. M. Krensky. 1997. Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol* 158:2680.
21. Bruhn, H., B. Riekens, O. Berninghausen, and M. Leippe. 2003. Amoebapores and NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. *Biochem J* 375:737.
22. Kharfi, M., M. Zghal, and M. R. Kamoun. 2003. [Psoriasis: an update]. *Tunis Med* 81:363.
23. Gudjonsson, J. E., A. Johnston, H. Sigmundsdottir, and H. Valdimarsson. 2004. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol* 135:1.
24. Gelfant, S. 1982. On the existence of non-cycling germinative cells in human epidermis in vivo and cell cycle aspects of psoriasis. *Cell Tissue Kinet* 15:393.
25. Weinstein, G. D., J. L. McCullough, and P. A. Ross. 1985. Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol* 85:579.
26. Leigh, I. M., K. A. Pulford, F. C. Ramaekers, and E. B. Lane. 1985. Psoriasis: maintenance of an intact monolayer basal cell differentiation compartment in spite of hyperproliferation. *Br J Dermatol* 113:53.
27. Brandrup, F., N. Holm, N. Grunnet, K. Henningsen, and H. E. Hansen. 1982. Psoriasis in monozygotic twins: variations in expression in individuals with identical genetic constitution. *Acta Derm Venereol* 62:229.

28. Bowcock, A. M., and W. O. Cookson. 2004. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 13:R43.
29. Gudjonsson, J. E., A. M. Thorarinsson, B. Sigurgeirsson, K. G. Kristinsson, and H. Valdimarsson. 2003. Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *Br J Dermatol* 149:530.
30. Jacob, S. E., M. Nassiri, F. A. Kerdel, and V. Vincek. 2003. Simultaneous measurement of multiple Th1 and Th2 serum cytokines in psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm* 12:309.
31. Camp, R. D., N. J. Fincham, F. M. Cunningham, M. W. Greaves, J. Morris, and A. Chu. 1986. Psoriatic skin lesions contain biologically active amounts of an interleukin 1-like compound. *J Immunol* 137:3469.
32. Debets, R., J. P. Hegmans, R. J. Troost, R. Benner, and E. P. Prens. 1995. Enhanced production of biologically active interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta by psoriatic epidermal cells ex vivo: evidence of increased cytosolic interleukin-1 beta levels and facilitated interleukin-1 release. *Eur J Immunol* 25:1624.
33. Schmid, P., D. Cox, G. K. McMaster, and P. Itin. 1993. In situ hybridization analysis of cytokine, proto-oncogene and tumour suppressor gene expression in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 285:334.
34. Sorensen, O. E., J. B. Cowland, K. Theilgaard-Monch, L. Liu, T. Ganz, and N. Borregaard. 2003. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* 170:5583.
35. Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707.

36. Frohm, M., B. Agerberth, G. Ahangari, M. Stahle-Backdahl, S. Liden, H. Wigzell, and G. H. Gudmundsson. 1997. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 272:15258.
37. Wiggins, M., B. H. van Bergen, P. S. Hiemstra, J. F. Meis, I. M. van Vlijmen-Willems, P. L. Zeeuwen, J. Mulder, H. A. Kramps, F. van Ruissen, and J. Schalkwijk. 1998. Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111:996.
38. Mallbris, L., K. P. O'Brien, A. Hulthen, B. Sandstedt, J. B. Cowland, N. Borregaard, and M. Stahle-Backdahl. 2002. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker for dysregulated keratinocyte differentiation in human skin. *Exp Dermatol* 11:584.
39. Broome, A. M., D. Ryan, and R. L. Eckert. 2003. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem* 51:675.
40. Madsen, P., H. H. Rasmussen, H. Leffers, B. Honore, K. Dejgaard, E. Olsen, J. Kiil, E. Walbum, A. H. Andersen, B. Basse, and et al. 1991. Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 97:701.
41. Brodersen, D. E., J. Nyborg, and M. Kjeldgaard. 1999. Zinc-binding site of an S100 protein revealed. Two crystal structures of Ca²⁺-bound human psoriasin (S100A7) in the Zn²⁺-loaded and Zn²⁺-free states. *Biochemistry* 38:1695.
42. Moog-Lutz, C., P. Bouillet, C. H. Regnier, C. Tomasetto, M. G. Mattei, M. P. Chenard, P. Anglard, M. C. Rio, and P. Basset. 1995. Comparative expression of the psoriasin (S100A7) and S100C genes in breast carcinoma and co-localization to human chromosome 1q21-q22. *Int J Cancer* 63:297.

43. Alowami, S., G. Qing, E. Emberley, L. Snell, and P. H. Watson. 2003. Psoriasin (S100A7) expression is altered during skin tumorigenesis. *BMC Dermatol* 3:1.
44. Watson, P. H., E. R. Leygue, and L. C. Murphy. 1998. Psoriasin (S100A7). *Int J Biochem Cell Biol* 30:567.
45. Hoffmann, H. J., E. Olsen, M. Etzerodt, P. Madsen, H. C. Thogersen, T. Kruse, and J. E. Celis. 1994. Psoriasin binds calcium and is upregulated by calcium to levels that resemble those observed in normal skin. *J Invest Dermatol* 103:370.
46. Porter, D. A., I. E. Krop, S. Nasser, D. Sgroi, C. M. Kaelin, J. R. Marks, G. Riggins, and K. Polyak. 2001. A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res* 61:5697.
47. Ostergaard, M., H. Wolf, T. F. Orntoft, and J. E. Celis. 1999. Psoriasin (S100A7): a putative urinary marker for the follow-up of patients with bladder squamous cell carcinomas. *Electrophoresis* 20:349.
48. Stryer, L. 1999. *Biochemie*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg Berlin Oxford.
49. Bloch, F., and W. W. Hansen. 1946. *Pys. Rev.* 69:127.
50. Purcell, E. M., H. C. Torrey, and R. V. Pound. 1946. *Phys. Rev.* 69:37.
51. Ernst, R. R., W. A. Anderson, and . 1966. *Rev. Sci. Instr* 37:93.
52. Cavanagh, J., W. J. Fairbrother, A. G. Palmer, and N. J. Skelton. 1996. *Protein NMR Spectroscopy - Principles and Practice*. Academic Press, San Diego.
53. Lottspeich, F., and H. Zorbas. 1998. *Bioanalytik*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg-Berlin.

54. Fiaux, J., E. B. Bertelsen, A. L. Horwich, and K. Wuthrich. 2002. NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex. *Nature* 418:207.
55. Ernst, R. R., G. Bodenhausen, and A. Wokaun. 1987. *Prinziples of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Oxford University Press, Oxford.
56. Derome, A. E. 1987. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*.
57. Wüthrich, K. 2001. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of proteins. *Encyclopedia of life science*.
58. Schroder, J. M. 1997. Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease. *Methods Enzymol* 288:266.
59. Harder, J., and J. M. Schroder. 2002. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277:46779.
60. Waxman, E., E. Rusinova, C. A. Hasselbacher, G. P. Schwartz, W. R. Laws, and J. B. Ross. 1993. Determination of the tryptophan:tyrosine ratio in proteins. *Anal. Biochem.* 210:425.
61. Noggle, J., and R. E. Schirmer. 1971. *The Nuclear Overhauser Effect: Chemical Applications*. Academic Press, New York.
62. Neuhaus, D., and M. Williamson. 1989. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. VCN Publishers, New York.
63. Braunschweiler, L., and R. R. Ernst. 1983. *J. Magn. Reson* 53:512.
64. Wüthrich, K. 1986. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley and Sons, Inc., New York.

65. Bodenhausen, D., R. Vold, and R. Vold. 1980. Multiple quantum spin-echo spectroscopy. *J Magn Reson* 37:93.
66. Delaglio, F., S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax. 1995. NMRPipe: Multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6:277.
67. Johnson, B. A., and R. A. Blevins. 1994. NMRview: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* 4:603.
68. Blumenthal, L. M. 1970. *Theory and Applications of Distance Geometry*, Chelsea, New York.
69. Crippen, G. M. 1979. Distance constraints on macromolecular conformation. *Int J Pept Protein Res* 13:320.
70. Havel, T. F., and K. Wuthrich. 1985. An evaluation of the combined use of nuclear magnetic resonance and distance geometry for the determination of protein conformations in solution. *J Mol Biol* 182:281.
71. Guntert, P., C. Mumenthaler, and K. Wuthrich. 1997. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J Mol Biol* 273:283.
72. Chen, G. C., and J. T. Yang. 1977. Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid. *Anal. Lett.* 10:1195.
73. Cooper, T. G. 1981. *Biochemische Arbeitsmethoden*. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
74. Miles, E. W. 1977. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol* 47:431.
75. Sayle, R. A., and E. J. Milner-White. 1995. RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci* 20:374.

76. Ramachandran, G. N., and V. Sasisekharan. 1968. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem* 23:283.
77. Murzin, A. G., S. E. Brenner, T. Hubbard, and C. C. 1995. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247:536.
78. Nicholls, A., K. A. Sharp, and B. Honig. 1991. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11:281.
79. Carson, M. 1991. Ribbons 2.0. *J. Appl. Crystallogr.* 24:946.
80. Bransburg-Zabary, S., A. Kessel, M. Gutman, and N. Ben-Tal. 2002. Stability of an ion channel in lipid bilayers: implicit solvent model calculations with gramicidin. *Biochemistry* 41:6946.
81. Miteva, M., M. Andersson, A. Karshikoff, and G. Otting. 1999. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK- lysin. *FEBS Lett* 462:155.
82. Anderson, D. H., M. R. Sawaya, D. Cascio, W. Ernst, R. Modlin, A. Krensky, and D. Eisenberg. 2003. Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *J Mol Biol* 325:355.
83. Andrä, J., and M. Leippe. 1994. Pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. Significance of positively charged amino acid residues for its mode of action. *FEBS Lett* 354:97.
84. Riekens, B. 2002. Vergleichende Funktionsanalysen von strukturell ähnlichen cytolytischen Peptiden aus Protozoen, Evertebraten und Vertebraten. Universität Hamburg.

85. Hanson, D. A., A. A. Kaspar, F. R. Poulain, and A. M. Krensky. 1999. Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Mol Immunol* 36:413.
86. Garland, W. J., and J. T. Buckley. 1988. The cytolytic toxin aerolysin must aggregate to disrupt erythrocytes, and aggregation is stimulated by human glycophorin. *Infect Immun* 56:1249.
87. Green, M. J., and J. T. Buckley. 1990. Site-directed mutagenesis of the hole-forming toxin aerolysin: studies on the roles of histidines in receptor binding and oligomerization of the monomer. *Biochemistry* 29:2177.
88. Jursch, R., A. Hildebrand, G. Hobom, J. Trantum-Jensen, R. Ward, M. Kehoe, and S. Bhakdi. 1994. Histidine residues near the N terminus of staphylococcal alpha-toxin as reporters of regions that are critical for oligomerization and pore formation. *Infect Immun* 62:2249.
89. Song, L., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux. 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274:1859.
90. Keller, F., W. Hanke, D. Trissl, and T. Bakker-Grunwald. 1989. Pore-forming protein from *Entamoeba histolytica* forms voltage- and pH- controlled multi-state channels with properties similar to those of the barrel-stave aggregates. *Biochim Biophys Acta* 982:89.
91. Boheim, G. 1974. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. *J Membr Biol* 19:277.
92. Ruyschaert, J. M., E. Goormaghtigh, F. Homble, M. Andersson, E. Liepinsh, and G. Otting. 1998. Lipid membrane binding of NK-lysin. *FEBS Lett* 425:341.
93. Andrä, J., R. Herbst, and M. Leippe. 2003. Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev Comp Immunol* 27:291.

94. Leippe, M., J. Andrä, and H. J. Müller-Eberhard. 1994. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2602.
95. Berninghausen, O., and M. Leippe. 1997. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 65:3615.
96. Gonzalez, C., G. M. Langdon, M. Bruix, A. Galvez, E. Valdivia, M. Maqueda, and M. Rico. 2000. Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11221.
97. Ushijima, T., M. Takahashi, and Y. Ozaki. 1984. Acetic, propionic, and oleic acid as the possible factors influencing the predominant residence of some species of *Propionibacterium* and coagulase-negative *Staphylococcus* on normal human skin. *Can J Microbiol* 30:647.
98. Cooper, K. D., C. Hammerberg, O. Baadsgaard, J. T. Elder, L. S. Chan, D. N. Sauder, J. J. Voorhees, and G. Fisher. 1990. IL-1 activity is reduced in psoriatic skin. Decreased IL-1 alpha and increased nonfunctional IL-1 beta. *J Immunol* 144:4593.
99. MacKenzie, A., H. L. Wilson, E. Kiss-Toth, S. K. Dower, R. A. North, and A. Surprenant. 2001. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15:825.

7 Publikationen

7.1 Originalarbeiten

Solution Structure of the Pore-forming Protein of *Entamoeba histolytica*

Oliver Hecht, Nico A. van Nuland, Karin Schleinkofer, Andrew J. Dingley, Heike Bruhn, Matthias Leippe, Joachim Grötzinger. *J Biol Chem*, Vol. 279, No. 17, Issue of April 23, pp. 17834–17841, 2004

Letter to the Editor: ^1H , ^{15}N and ^{13}C Backbone Assignment of the Carboxyl terminal Domain of the Cytokine binding Module of the Interleukin-6 Receptor

Andreas Schwantner, Andrew J. Dingley, Suat Özbek, **Oliver Hecht**, Stefan Rose-John, Joachim Grötzinger. *J Biol NMR* (in press).

Dynamics of Receptor Complexes of gp130 Cytokines: A Model for Assembly on the Cellular Membrane

Andreas Schroers, **Oliver Hecht**, Karl-Josef Kallen, Michael Pachta-Nick, Petra Regenhard, Stefan Rose-John, Joachim Grötzinger (submitted)

7.2 Poster und Abstracts

Towards the Solution Structure of Amoebapore A from *Entamoeba histolytica*

Oliver Hecht, Heike Bruhn, Matthias Leippe, Joachim Grötzinger

5th European NMR Large Scale Facilities User Meeting 2001. November 8-11, 2001, Frankfurt, Germany

Resolving the 3D-Structure of the Protein Amoebapore A

Oliver Hecht, Heike Bruhn, Matthias Leippe, Joachim Grötzinger.

6th European NMR Large Scale Facilities User Meeting 2002. October 17-20, 2002, Montecatini Terme, Italy

Solution Structure of Amoebapore A reveals a novel Activation Mechanism of Pore-forming Toxins

Oliver Hecht, Nico A. van Nuland, Karin Schleinkofer, Andrew J. Dingley, Heike Bruhn, Matthias Leippe, Joachim Grötzinger.

7th European NMR Large Scale Facilities User Meeting 2003. November 20-23, 2003, Oosterbeek, The Netherlands

Membrane-permeabilization by Saposin-like Proteins – variations on a common Fold

Heike Bruhn, **Oliver Hecht**, Joachim Grötzinger, Matthias Leippe

Int. J. Med. Microbiol. 293, 78

8 Lebenslauf

Oliver Hecht

18.07.1969	geboren in Neustadt in Holstein
Staatsangehörigkeit:	deutsch
1976 - 1980	Besuch der Grundschule in Göhl
1980 - 1986	Besuch der Realschule in Oldenburg in Holstein
1986 - 1990	Ausbildung zum Energieanlagenelektroniker in Rendsburg
1990 - 1991	Zivildienst in Oldenburg in Holstein
1991 - 1994	Besuch des Fachgymnasiums in Oldenburg in Holstein
06.1994	Allgemeine Hochschulreife
09.1994	Aufnahme des Studiums im Fach Biologie/Diplom an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
04.2000 – 05.2001	Diplomarbeit am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. H. Lemke, Thema: Analyse des Repertoires der natürlichen mit 2-Phenyloxazolol reagierenden Antikörper.
09.07.2001	Diplom im Fach Biologie
seit 08.2001 - heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

