

Optimierung der *in vivo* Kristallisationsbedingungen
heterolog exprimierter Proteine in Sf9
Insektenzellen und Charakterisierung der Kristalle

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

von

Benjamin Philip Sommer
aus Hamburg

Tübingen 2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	27.07.2016
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Michael Duszenko
2. Berichterstatter:	Prof. Christian Betzel

Luftveränderung

Fahre mit der Eisenbahn,
fahre, Junge, fahre,
Auf dem Deck vom Wasserkahn
wehen deine Haare.

Tauch in fremde Städte ein,
lauf in fremden Gassen;
höre fremde Menschen schrein,
trink aus fremden Tassen.

Flieh Betrieb und Telefon,
grab in alten Schmökern,
sieh am Seinekai, mein Sohn,
Weisheit still verhökern.

Lauf in Afrika umher,
reite durch Oasen;
lausche auf ein blaues Meer,
hör den Mistral blasen!

Wie du auch die Welt durchflitzt
ohne Rast und Ruh-:
Hinten auf dem Puffer sitzt du.

Kurt Tucholsky, 1924

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Michael Duszenko am Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard Karls Universität zu Tübingen durchgeführt. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank für die interessante Themenstellung, seine intensive und freundliche Betreuung, sowie seine Unterstützung und fortwährende Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Christian Betzel für die Übernahme meines Zweitgutachtens und seinem großen Interesse an meiner Arbeit.

Dem Arbeitskreis Duszenko möchte ich für die freundliche Aufnahme und die große Unterstützung danken. Die Hilfsbereitschaft von jedem in der Arbeitsgruppe und der freundschaftliche Umgang miteinander war vorbildlich. Auch hatten wir eine schöne Zeit neben dem Laboralltag.

Dem Arbeitskreis Betzel möchte ich für die Hilfe und Unterstützung bei meinem Projekt danken. Hier gilt mein besonderer Dank Dr. Marko Klinge und Dr. Tatyana Danyukova.

Dem Arbeitskreis Kalbacher möchte ich für die Anfertigung der Massenspektren danken.

Dem Arbeitskreis García-Sáez möchte ich dafür danken, dass sie mich bei der Anfertigung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen unterstützt haben und ich ihr Mikroskop benutzen durfte.

Für die tolle Unterstützung und Motivation in schwierigen Phasen und für die vielen schönen Momente jenseits der Arbeit möchte ich Chantal Patrizia „Knautschie“ Fiebigger einen großen Dank aussprechen.

Meiner Familie gilt mein größter Dank, sie hat mich stets nach allen Möglichkeiten in meinen Plänen bestärkt und unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Protein Kristallisation	1
1.2	<i>In vivo</i> Kristallisation	3
1.3	Das Baculovirus Expressionssystem	10
1.4	Röntgenlaser Kristallographie	13
1.5	Behandelte Proteine	15
1.5.1	<i>Trypanosoma brucei</i>	15
1.5.1.1	Variant Surface Glycoprotein	16
1.5.1.2	Tubulin	17
1.5.2	Lysozym	18
1.5.3	Myoglobin	19
1.5.4	Methicillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.5.4.1	Acriflavin resistance protein B	20
1.5.5	Cathepsin B	23
2	Zielsetzung der Arbeit	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Bakterien	25
3.1.2	Insektenzellen	25
3.1.3	Antikörper	25
3.1.4	Chemikalien	25
3.1.5	Plasmide	27
3.1.6	Primer	28
3.1.7	Kits	29
3.1.8	Medien	30
3.1.8.1	Insektenzellen	30
3.1.8.2	Bakterien	30
3.1.9	Puffer und Lösungen	31
3.1.9.1	Gelelektrophorese	31
3.1.9.2	Proteine	31
3.1.9.3	Puffer für SDS-PAGE-Gele	32
3.1.9.4	Puffer für Western Blot	32
3.1.9.5	Puffer für Silberfärbung	33
3.1.9.6	Puffer für Coomassie-Färbung	34
3.1.9.7	Sonstige Lösungen	35
3.1.10	Sonstige Materialien	35
3.2	Methoden	35
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1.1	Polymerasekettenreaktion	35

3.2.1.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese	36
3.2.1.3	Gelextraktion	37
3.2.1.4	DNA Konzentrationsbestimmung	37
3.2.1.5	Restriktionsverdau	37
3.2.1.6	Minipräparation von Plasmid-DNA	38
3.2.1.7	Minipräparation von Bacmid-DNA	38
3.2.1.8	Ligation	38
3.2.1.9	Transformation	39
3.2.1.10	Kolonie-PCR	39
3.2.1.11	E. coli Kulturstabilate	40
3.2.1.12	DNA-Sequenzierung	40
3.2.2	Kultivierung von Organismen	40
3.2.2.1	Bakterienzellkultur	40
3.2.2.2	Insektenzellkultur	41
3.2.2.3	Aufzucht der Insektenzellen	41
3.2.2.4	Kultivierung von Monolayerkulturen	41
3.2.2.5	Kultivierung von Suspensionskulturen	42
3.2.2.6	Herstellung von Stabilaten	42
3.2.2.7	Transformation in DH10Bac-Zellen	42
3.2.2.8	Transfektion	43
3.2.2.9	Bestimmung des Virus-Titers nach der Ausverdünnungsmethode	43
3.2.3	Allgemein proteinchemische Methoden	45
3.2.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford	45
3.2.3.2	SDS-PAGE	46
3.2.3.3	Coomassie-Färbung	47
3.2.3.4	Silber-Färbung	47
3.2.3.5	Trocknung des Gels	47
3.2.3.6	Western Blot	47
3.2.4	<i>In vivo</i> Kristalle in Sf9 Insektenzellen	48
3.2.4.1	Isolierung der <i>in vivo</i> Kristalle	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Auswahlkriterien für Proteine	49
4.2	Klonierungsstrategien	50
4.3	Transfektion von Sf9-Zellen	50
4.4	Auftreten von kristallartigen Strukturen während der Expression	51
4.4.1	Isolierung und Solubilisierung der Kristalle	51
4.5	Expression von Hühnereiweiß Lysozym unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle	51
4.5.1	Klonierung	51
4.5.1.1	Ligation und Transformation	52
4.5.1.2	Transfektion in Sf9-Zellen	53

4.5.2	Auftreten von Kristallartigen Strukturen während der Expression	53
4.5.3	Isolierung und Solubilisierung der Kristalle	54
4.6	Expression von humanem Catheptin B	55
4.6.1	Klonierung	55
4.6.1.1	Ligation und Transformation	56
4.6.2	Transfektion in Sf9-Zellen	57
4.7	Expression von acriflavin resistance protein b unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle	58
4.7.1	Klonierung	58
4.7.1.1	Ligation und Transformation	59
4.7.2	Transfektion in Sf9-Zellen	60
4.7.2.1	Auftreten von Kristallartigen Strukturen während der Expression	60
4.7.3	Isolierung und Solubilisierung der Kristalle	61
4.8	Expression von Pottwahl Myoglobin	62
4.8.1	Klonierung	63
4.8.1.1	Transformation	63
4.8.2	Transfektion in Sf9-Zellen	64
4.8.2.1	Expression in Sf9 Insektenzellen	64
4.8.2.2	Identifikation von Myoglobin mittels Massenspektrometrie	64
4.9	Expression von variant surface glycoprotein 221 unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle	65
4.9.1	Klonierung	65
4.9.1.1	Ligation und Transformation	66
4.9.2	Transfektion in Sf9-Zellen	67
4.9.3	Auftreten von Kristallartigen Strukturen während der Expression	67
4.9.4	Isolierung und Solubilisierung der Kristalle	68
4.10	Expression von TbTubulin unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle .	69
4.10.1	Klonierung	69
4.10.1.1	Ligation und Transformation	70
4.10.2	Transfektion in Sf9-Zellen	71
4.10.3	Auftreten von Kristallartigen Strukturen während der Expression	71
4.10.4	Isolierung und Solubilisierung der Kristalle	72
4.11	Expression von einer um neun Aminosäuren gekürzten Version von TbIMPDH	73
4.11.1	Klonierung	74
4.11.1.1	Ligation und Transformation	75
4.11.2	Transfektion in Sf9-Zellen	75
4.11.2.1	Expression von IMPDH-9AS in Sf9 Insektenzellen	75
4.11.2.2	Identifikation von IMPDH-9AS mittels Western Blot	75
4.12	Expression von TbCatB ohne Propeptid	76
4.12.1	Klonierung	76
4.12.1.1	Ligation und Transformation	77
4.12.2	Transfektion in Sf9-Zellen	78
4.12.2.1	Expression von TbCatB-Prop in Sf9 Insektenzellen	78

4.12.2.2 Identifikation von TbCatB-Prop mittels Western Blot . . .	78
4.13 Zusammenfassung	79
5 Diskussion	81
5.1 Charakterisierung der <i>in vivo</i> Kristalle	82
5.2 Mögliche Ursachen der <i>in vivo</i> Kristallbildung	83
5.3 Ausblick	85
5.4 Zusammenfassung	86
6 Abkürzungsverzeichnis	88
Literatur	89

1 Einleitung

1.1 Protein Kristallisation

Bei der Kristallisation von Proteinen geht man von einer gereinigten Lösung aus. Dabei bleibt ein Protein solange in Lösung, bis es eine bestimmte Konzentration erreicht. Wenn diese Grenzkonzentration erreicht ist, wird die Lösung nicht länger homogen bleiben, das Protein wird in einen neuen Zustand oder Phase übergehen. Dieses Phänomen bildet die Grundlage für alle Protein-Kristallisationsexperimente. Durch Veränderung der Bedingungen kann man versuchen, die Kristallisationseigenschaften zu verändern und Kristalle zu erzeugen [McPherson, 1999]. Dabei stellt die Kristallisation eine Herausforderung dar. Durch das Verändern der Bedingungen tritt häufig eines der folgenden Probleme auf:

- Das Protein bleibt in homogener Lösung
- Es tritt eine neue Phase auf, aber es handelt sich nicht um einen Kristall stattdessen ist es ein Aggregat oder eine Flüssigkeit
- Es formieren sich Kristalle, die aber nicht geeignet sind für Strukturbestimmung, da sie ein schlechtes Beugungsbild abgeben.

Es ist oft möglich durch *trial and error* diese Probleme zu lösen. Dazu muss allerdings eine Vielzahl an Experimenten unter vielen verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden. Aber nicht in allen Fällen führt dieser Weg auch zum Erfolg. Auch wenn man die optimalen Bedingungen für die Kristallisation gefunden hat, so muss dies nicht bedeuten, dass man diese Bedingungen generalisieren kann. Diese Kristallisationsbedingungen, die für ein Protein gelten, müssen nicht auch die optimalen Bedingungen für ein anderes Protein sein [Asherie, 2004]. Die Probleme, die mit der Produktion von Proteinkristallen verbunden sind, haben zu grundsätzlicher Forschungsarbeit im Bereich der Proteinkristallisation angeregt. Ein wichtiges Werkzeug in der Proteinkristallisation ist das Phasendiagramm (Abb. 1) [Zemansky, 1997]. Für eine Proteinlösung sind die entscheidenden Größen, die Konzentration des Proteins, die Temperatur und Charakteristika der Lösung wie pH-Wert und Ionenstärke. Die übliche Form des Phasendiagramms für Proteine ist zweidimensional. Normalerweise wird die Konzentration des Proteins als Funktion eines anderen Parameters dargestellt, während alle anderen Parameter konstant sind [Saridakis et al., 1994].

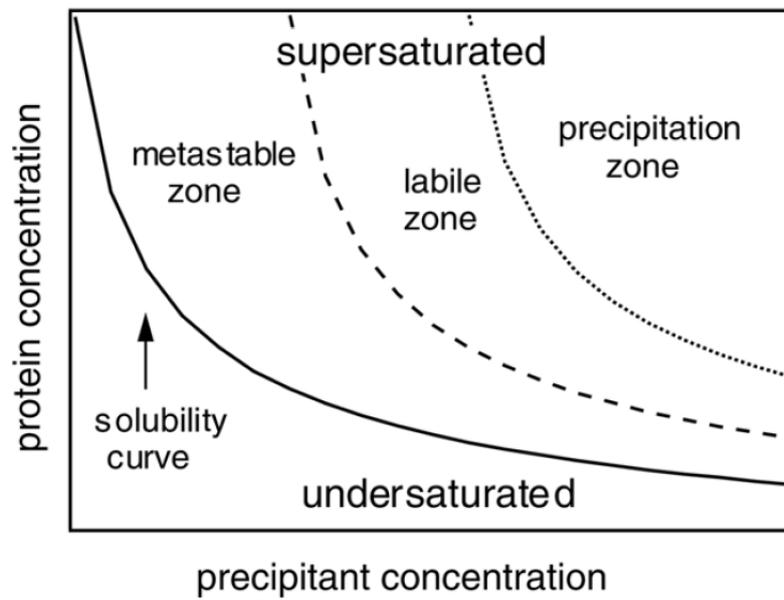


Abbildung 1: Ein Phasendiagramm, das zeigt, wie sich die Löslichkeit eines Proteins als Funktion der Konzentration eines Fällungsmittels verhält. [Asherie, 2004].

Die Protein Data Bank (PDB) ist die erste frei zugängliche Quelle für dreidimensionale biologische Strukturen. Die PDB wurde 1971 mit sieben Strukturen etabliert und ist stetig gewachsen, so dass sie heute über 110000 Strukturen beinhaltet [Zardecki et al., 2016]. Abbildung 2 zeigt den Zuwachs an Proteinen in der PDB.

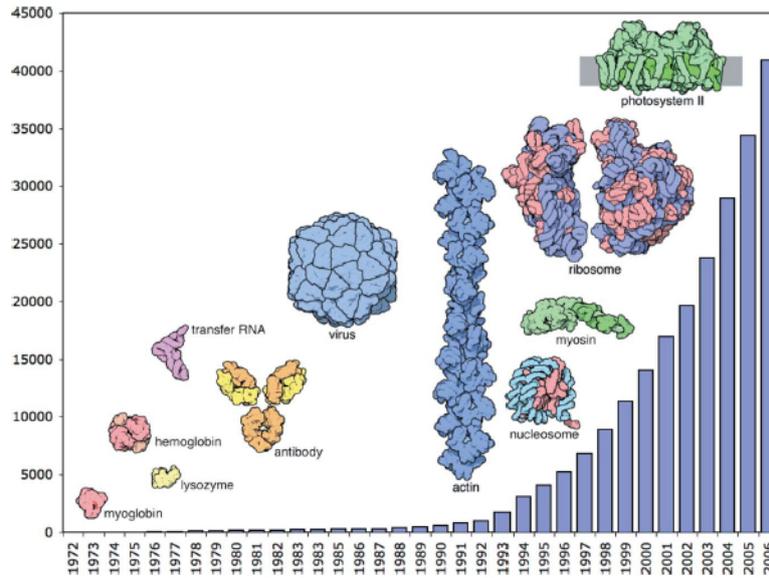


Abbildung 2: Wachstumsdiagramm der PDB. Dargestellt ist die zeitliche Zunahme an verfügbaren Strukturen in der PDB von 1972 bis 2006. Hervorgehoben sind besondere Strukturen. [Berman, 2007].

1.2 *In vivo* Kristallisation

Proteinkristallisation *in vivo* ist seit langem bekannt [Doye and Poon, 2006], fand aber wenig Beachtung [Axford et al., 2014]; [Koopmann et al., 2012]. Neben den Beispielen von Proteinkristallisation in Pflanzensamen [Colman et al., 1980], Insulin in sekretorischen Vesikeln [Dodson and Steiner, 1998] und Enzymen in Peroxisomen [Doye and Poon, 2006], gibt es noch eine Reihe von heterolog exprimierten Proteinen (Tabelle 1). 1996 veröffentlichten Fan et al. mit Calcineurin das erste heterolog exprimierte Protein, das *in vivo* Kristalle bildete. Calcineurin ist eine eukaryontische Ca^{2+} und Calmodulin abhängige Serin/Threonin Proteinphosphatase. Es handelt sich dabei um ein Heterodimer, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit A (Calcineurin A, etwa 60 kDa), welche das aktive Zentrum enthält, und einer fest zugehörigen Calcium bindenden Untereinheit B (Calcineurin B, etwa 19 kDa) [Li et al., 2011]; [Rusnak and Mertz, 2000]. Die Koexpression der beiden Untereinheiten führte zur *in vivo* Kristallisation in Insektenzellen [Fan et al., 1996].

Cypoviren (cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV) bilden genau wie Baculoviren ei-

ne Schutzhülle aus Polyhedrin. 2007 veröffentlichten Coulibaly et al., mit Polyhedrin die erste Kristallstruktur eines *in vivo* Kristalls. Diese Kristalle zeichnen sich durch eine bemerkenswerte Stabilität aus. So sind sie von einem pH-Wert 1.9 bis 10.5 stabil. [Coulibaly et al., 2007]. CVP sind Mitglieder der Reoviridae, einer Virusfamilie doppelsträngiger RNA Viren, deren Virionen ikosaedrische Capside sind [Knipe et al., 2001]. Die Viruspartikel der Cypoviren sind durch eine Polyhedrin-Hülle vor Umwelteinflüssen geschützt [Rohrman, 1986]. Das Genom der Reoviren ist dabei von einem Protein umhüllt, das den Kontakt mit dem Cytoplasma der Wirtszelle und zellulären Abwehrmechanismen verhindert. Wird das Virus von dem Wirt aufgenommen, so löst sich die Polyhedrinhülle im alkalischen Milieu des Mitteldarms auf und die Infektion beginnt. CPV infizieren nur Arthropoden (Gliederfüßler) und sind potenzielle Insektizide [Payne and Mertens, 1983]; [Hill et al., 1999]. Die *in vivo* Kristalle haben eine Länge von 5 bis 12 μm und liefern eine röntgenkristallographische Auflösung von bis zu 2 Å [Coulibaly et al., 2007]. Ginn et al. gelang es unter Verwendung eines Freien-Elektronen-Lasers (XFEL) die Struktur von Polyhedrin aus Cypovirus Typ 17 aufzuklären [Ginn et al., 2015].

Mit Immunoglobulin G (IgG) wurden von einem weiteren Protein *in vivo* Kristalle beobachtet. Die Expression von humanem IgG in chinese hamster ovary (CHO) [Hasegawa et al., 2011] sowie in human embryo kidney (HEK) [Hasegawa et al., 2014] Zellen führte zur Kristallisation *in vivo*. Unter optimierten Bedingungen, konnte das Kristallwachstum von humanen IgG im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) beobachtet werden. Hasegawa et al. vermuten, dass die Synthesegeschwindigkeit von neuem IgG dabei größer ist, als die Exportgeschwindigkeit von IgG aus dem ER und so die Konzentration ansteigt, bis es zur Kristallisation kommt [Hasegawa et al., 2011]. In einigen Fällen konnten die IgG Kristalle bis zu einer Länge von 80 μm wachsen [Hasegawa et al., 2014]. Immunoglobuline dienen als wichtige Modellproteine für die Untersuchung biochemischer Prozesse, insbesondere der oxidativen Proteinfaltung [Brewer and Hendershot, 2005]

Mit Cathepsin B aus *Trypanosoma brucei* (TbCatB) gelangen Koopmann et al. 2012 sowie Redecke et al. 2013 ein Durchbruch. Es gelang ihnen, *in vivo* Kristalle für „serial femtosecond crystallography“ (SFX) [Chapman et al., 2011] zu benutzen und dabei das „diffraction-before-destruction“ Prinzip [Neutze et al., 2000]; [Chapman et al., 2011] anzuwenden [Koopmann et al., 2012]; [Redecke et al., 2013]. TbCatB ist essentiell für

die Parasiten, d.h. ein Knock Down führte zu deren Tod [Mackey et al., 2004]. Cysteinproteasen von Parasiten werden in zwei Hauptgruppen unterteilt, den clan CA und clan CD Proteasen [Barrett, 1994]; [Rawlings and Barrett, 1993]; [Sajid and McKerrow, 2002]. 1879 wurde die erste Cysteinprotease aus der Papaya-Frucht gereinigt und charakterisiert und so Papain genannt. Papain war auch die erste Cysteinprotease deren Struktur aufgeklärt wurde [Sajid and McKerrow, 2002]. Cathepsin B ist eine lysosomale Cysteinprotease [Musil et al., 1991]. Es spielt eine wichtige Rolle in der Biologie von Parasiten und ist ein mögliches Ziel für Wirkstoffe. Proteasen katalysieren die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen. Dabei kann die Hydrolyse innerhalb der Peptidkette initiiert werden (Endoprotease-Aktivität) oder aber vom Amino- bzw. Carboxylterminus (Exoprotease-Aktivität). Proteasen werden in verschiedene Gruppen unterteilt, die wichtigsten sind Serin-, Threonin-, Aspartat-, Metallo- und Cysteinproteasen. Cysteinproteasen benötigen ein Cystein im aktiven Zentrum für die Hydrolyse des Substrates. Die Nucleophilie der Thiolgruppe wird durch die Nähe zu einem Histidin im aktiven Zentrum erhöht. Es gibt eine Protonenübertragung von der Thiolgruppe der Cysteinseitenkette auf den Imidazolring des Histidins. Ein Glutaminrest formt das Oxianion-Loch, das kritische Element bei der Bildung des elektrophilen Zentrums und bei der Stabilisierung des tetraedrischen Intermediates bei der Hydrolyse. Diese beiden ionenstabilisierenden Gruppen der Thiolat-Imidazolium Diade erlauben einen weiten pH Bereich der Enzymaktivität [Turk et al., 1998].

Cathepsin B hat in der katalytischen Domäne einen zusätzlichen loop, den so genannten „occluding loop“ zusätzlich zur Endoproteaseaktivität (wie Cathepsin L) hat Cathepsin B somit eine Exopeptidasefunktion. Diese lässt sich auf den 20 Aminosäuren langen occluding loop zurückführen [Musil et al., 1991]; [Turk et al., 1996]. Dieser erhielt seinen Namen, da er einen Teil des aktiven Zentrums verdeckt. Der occluding loop kann auch zur Identifikation von Cathepsin B genutzt werden [Sajid and McKerrow, 2002].

Koopmann et al. berichteten neben den Kristallen von TbCatB auch von *in vivo* Kristallen von Inosinmonophosphat Dehydrogenase aus *Trypanosoma brucei* (TbIMPDH). Guanin-Nukleotide sind an vielen zellulären Vorgängen beteiligt [Schmidt and Hall, 2002]; [Parandoosh et al., 1989]; [Parandoosh et al., 1990]; [Mandanans et al., 1993], darunter an der DNA Replikation, sowie der RNA- und Proteinsynthese [Jayaram et al., 1982]. Die Synthese von Guanosin 5'-Monophosphat (GMP) geht von Inosin 5'-Monophosphat (IMP) aus und wird durch die IMPDH katalysiert. Dabei wird IMP in einer NAD-

abhängigen Reaktion zu Xanthosin Monophosphat (XMP) oxidiert. Im Anschluss wird XMP durch die GMP Synthase zu GMP umgewandelt (Abb. 3). IMPDH ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Guanin-Nukleotidbiosynthese und ein Schlüsselenzym in der Zellproliferation und Differenzierung [Wang and Hedstrom, 1997]; [Markham et al., 1999]; [Digits and Hedstrom, 1999]. Die IMPDH ist ein Homotetramer [Sintchak and Nimmesgern, 2000]. Kinetische Untersuchungen zeigen, dass trypanosomale IMPDH sich von der aus Säugetieren unterscheidet und somit ein geeignetes Zielmolekül für antiparasitäre Wirkstoffe ist [Bessho et al., 2013].

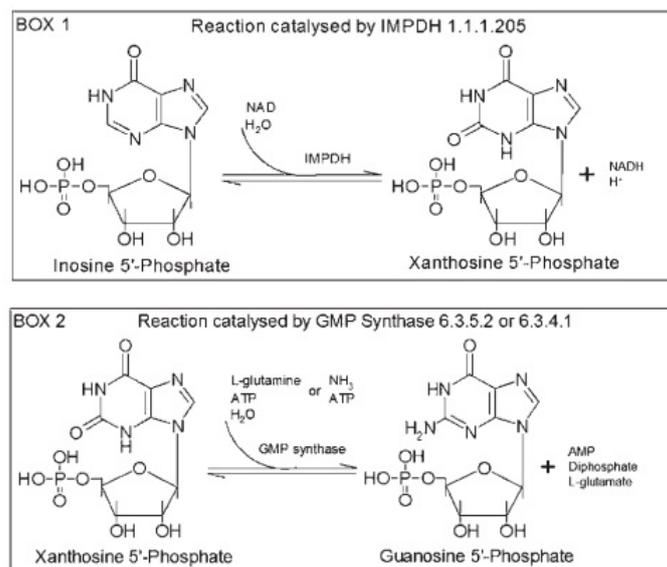


Abbildung 3: Guanin 5'-Monophosphat Biosynthese Weg. [Bessho et al., 2013].

Ein weiteres Protein, dass *in vivo* Kristalle bildet ist die Neuraminidase. Neuraminidase ist eine Glycosidase, die entständige Sialinsäure von Oligosacchariden und Glycolipiden hydrolysiert. Es handelt sich dabei um eines von den zwei Proteinen auf der äußeren Membran von Influenza-Viren [Varghese et al., 1983]; [Potier et al., 1990]. Das Genom von Influenza A und B Viren besteht aus acht einzelsträngigen RNA Partikeln. Die RNA ist verbunden mit einem Nukleoprotein und drei Proteinen, die an der Replikation und Transkription beteiligt sind. Dieser Replikations-Komplex ist von einer Membran umgeben. Eingebettet in die Lipiddoppelschicht sind zwei Oberflächenglykoproteine, das Hemagglutinin und das Enzym Neuraminidase. Das Virus nimmt dabei kontinuierlich

eine mutationsbasierte Antigenvariation vor [Air and Laver, 1989]. Neuraminidasen, haben auch wichtige Funktionen in Lysosomen von Säugetieren. Ein Mangel an Neuraminidase führt im Menschen zu Sialidose, einer rezessiv vererbaren lysosomalen Speicherkrankheit, die durch einen fortschreitenden neurologischen Verfall, Schüttelkrämpfe und Skelettveränderungen charakterisiert ist [Potier et al., 1990] [Lowden and O'Brien, 1979].

Die Expression von Xpa (crystallizable and photo activatable), einem Mutanten von Kikume Green-Red (KikGR) in HEK Zellen, führte auch zur Kristallisation *in vivo*. Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen zeigen, dass die Kristalle von einer Lipidmembran umgeben waren. Die Autoren vermuteten, dass die Kristalle vollständig im Cytosol gebildet und dann durch Autophagie von einer Membran umhüllt wurden. Neben den Kristallen im Cytosol beobachteten Tsutsui et al. auch Kristalle im Kern. Die *in vivo* Kristalle wiesen eine hohe Stabilität auf und röntgenkristallographische Untersuchungen erlaubten eine Stukturaufklärung mit einer Auflösung von 2.9 Å [Tsutsui et al., 2015]. KikGR stammt aus der Steinkoralle *Favia fava* [Tsutsui et al., 2005]. Analog zu GFP ist KikGR ein grün fluoreszierendes Protein mit einer β -Fass Struktur, dass von grüner zu roter Fluoreszenz durch Belichtung mit UV Licht umgeschaltet werden kann [Habisov and Kirkin, 2015]; [Tsutsui et al., 2005].

Ebenfalls zur *in vivo* Kristallisation führte die Expression von μ NS in Insektenzellen. μ NS ist ein Protein des avian Reovirus der für bedeutende ökonomische Verluste in der Geflügelindustrie verantwortlich ist [Jones, 2000]. Das Genom des Reovirus besteht aus 10 Segmenten doppelsträngiger RNA, die in drei Klassen Unterteilt werden, L, M und S. μ NS ist eines von zwei Nichtstrukturproteinen, es ist 719 Aminosäuren lang und hat einen hohen α -Helix Anteil von über 50%, welches dem anderen Nichtstrukturprotein σ NS sehr ähnlich ist. In Reovirus-infizierten Zellen kommen zwei Formen von μ NS vor, μ NS und μ NSC, welchem am N-Terminus eine Region von 5 kDa fehlt. Dabei scheint μ NSC kein Spaltprodukt von μ NS zu sein, sondern wird separat gebildet [Wiener et al., 1989]. Die GFP- μ NS Kristalle erreichen eine Länge von bis zu 10 μ m ohne dabei die normale Größe der Sf9 Zellen zu überschreiten. Die Morphologie der Insektenzellen ändert sich nicht durch die Kristalle. Die Expression von μ NS in Sf9 Zellen ist sehr effizient, da nahezu jede Zelle einen Kristall enthielt. μ NS Kristalle waren bei hohen und niedrigen Salzkonzentrationen sowie bei niedrigen pH-Werten stabil. Sie lösten sich aber bei pH-Werten von über 10. Interessanter-Weise bildete GFP- μ NS auch dann Kristalle, wenn man das Fusionsprotein in einem Shuttle-Vektor in direkt transfizierten *chicken embryo*

fibroblast Zellen exprimierte [Schönherr et al., 2015].

Als Chemolumineszenz bezeichnet man die Emission von Licht, das bei einer chemischen Reaktion entsteht, in der Produkte entstehen, die im angeregten Zustand gebildet werden [McCapra, 2000]. Die meisten bekannten Chemolumineszenz Substrate habe eine Peroxidbindung [McCapra, 2000]; [Matsumoto, 2004]. Tritt Chemolumineszenz in einem lebenden Organismus, durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion auf, wird sie Biolumineszenz genannt [McCapra, 2000]. Das Enzym, dass diese Reaktion katalysiert wird allgemein Luciferase genannt, obwohl es verschiedene Strukturen und Aminosäure Zusammensetzungen haben kann [Viviani, 2002]. Leuchtkäfer Luciferase katalysiert eine zweistufige Reaktion. Luciferin reagiert mit ATP zu einem Adenylyl-Intermediat. Im zweiten Schritt, wird dieses durch Sauerstoff oxidiert, wobei unter Abspaltung von Kohlendioxid und AMP OxyLuciferin gebildet wird (Abb. 4) [Marques and Esteves da Silva, 2009]; [Leitão and da Silva, 2010]; [Inouye, 2010]. Leuchtkäfer Luciferase kristallisierte in Sf9 Zellen. Dabei erreichen die Luciferase Kristalle eine Länge von bis zu 200 μm . Schönherr et al. beobachteten, dass Luciferase auch dann Kristalle bildete, wenn das Protein in direkt transfizierten Zellen exprimiert wird. Die isolierten Luciferase Kristalle sind allerdings nur wenige Stunden stabil [Schönherr et al., 2015].

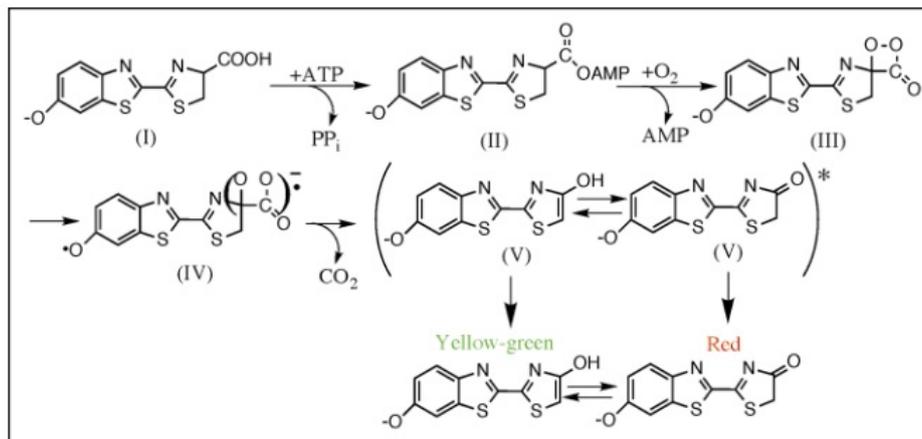


Abbildung 4: Vorgeschlagerener Mechanismus der Leuchtkäfer Biolumineszenz-Reaktion. Die Carboxylat-Gruppe von Leuchtkäfer Luciferin (I) wird durch ATP aktiviert und bildet das adenylierte Luciferin (II). Als nächstes findet eine Reaktion mit molekularem Sauerstoff statt und es entsteht (III). Unter Abspaltung des Dioxetane Rings (IV) entsteht das angeregte OxyLuciferin (V) [Baldwin, 1996].

Tabelle 1: Heterolog exprimierte Protein, die *in vivo* Kristalle bilden.

Protein	Zelllinie	Jahr	Quelle
Calcineurin	Sf9	1996	[Fan et al., 1996]
Polyhedrin	Insektenzellen	2007	[Coulibaly et al., 2007]
IgG	CHO	2011	[Hasegawa et al., 2011]
Cathepsin B	Sf9	2012	[Koopmann et al., 2012]
IMPDH	Sf9	2012	[Koopmann et al., 2012]
IgG	HEK	2014	[Hasegawa et al., 2014]
Neuraminidase	CHO und HEK	2014	[Gallat et al., 2014]
CPV17 Polyhedrin	Sf9	2015	[Ginn et al., 2015]
Xpa	HEK	2015	[Tsutsui et al., 2015]
GFP- μ NS	Sf9	2015	[Schönherr et al., 2015]
Luciferase	Sf9	2015	[Schönherr et al., 2015]

1.3 Das Baculovirus Expressionssystem

Das Insektenzellen-Baculovirus-Expressionssystem, ist ein System für die Expression von rekombinanten Proteinen. Dabei werden die Insektenzellen mit einem Baculovirus infiziert, das das gewünschte Gen enthält. Das System wurde von Gale Smith und Max Summers [Smith et al., 1983b] entwickelt. Es handelt sich um ein vielseitiges System, das zur Expression von einem oder mehreren rekombinanten Proteinen genutzt werden kann [Miller, 1988].

Häufig werden eukaryontische Expressionssysteme gewählt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass das Produkt biologisch aktiv ist. Viele Faktoren beeinflussen die biologische Aktivität von eukaryontischen Proteinen, inklusive der posttranslationalen Modifikationen. Insektenzellen erkennen und spalten Säugetier Signalsequenzen, die das Protein in das ER dirigieren [Miller, 1988]. Das Baculoviren-Expressionssystem hat eine Reihe von positiven Eigenschaften:

- **Hohe Vielseitigkeit**
Eine Zelllinie und ein Baculovirus können genutzt werden, um jedes beliebige Gen zu exprimieren.
- **Geschwindigkeit**
Große Mengen rekombinantes Protein können in kurzer Zeit erhalten werden.
- **Hohe Expression**
Das Baculovirus hat einen der stärksten bekannten Promotoren, den Polyhedrin Promotor.
- **Posttranslationale Modifikationen**
Die Insektenzellen können die meisten posttranslationalen Modifikationen aus eukaryontischen Proteinen herstellen.
- **Skalierbarkeit**
Insektenzellen können bis zu tausenden von Litern kultiviert werden.
- **Sicherheit**
Arbeiten mit Baculoviren und Insektenzellen werden der biologischen Sicherheitsstufe 1 zugeordnet.

Im Baculoviren Expressionssystem (insect cell-baculovirus expression vector system (BEVS)), wachsen die Insektenzellen bis zu einer gewünschten Dichte heran und werden dann mit

dem Baculovirus infiziert. Nach der Infektion übernimmt das Baculovirus die Kontrolle über die Zelle und verhindert die Transkription der zellulären Gene. Es können drei Phasen der Genexpression unterschieden werden. [Palomares et al., 2015]

- Die frühe Phase

Während der frühen Phase der Genexpression (0-6 h p.i.) wird die virale DNA repliziert und eine Zahl an frühen Genen exprimiert.

- Die späte Phase

(6-18 h p.i.) Die späte Phase ist charakterisiert durch umfassende Replikation der viralen DNA und der Bildung erster budded viruses (BV). Diese Phase umfasst die Bildung von Strukturproteinen der Nukleocapsiden.

- Die sehr späte Phase

Die finale Phase (18 - 72 h p.i.) wird auch als occlusion Phase oder sehr späte Phase der Genexpression bezeichnet. Diese Phase ist charakterisiert durch reichhaltige Polyhedrin Produktion und die Formation der occluded virus (OV) im Nukleus der Insektenzelle.

Jeder OV ist ca. $2\mu\text{m}$ lang und enthält zahlreiche Nukleokapside. Polyhedrin wird das vorherrschende Protein in der Zelle [Miller, 1988]. 48 Stunden nach der Infektion kann das Polyhedrin-Transkript 24% aller mRNAs ausmachen [Chen et al., 2013].

Die Produktion von rekombinanten Proteinen mit BEVS, setzte voraus, dass man eine lebende Zellkultur und einen hoch infektiösen Virenstock hat. Zur Amplifizierung des Virenstocks wird eine lebendige Insektenzellkultur benötigt. BEVS ist ein robustes System und führt zu hohen Ausbeuten an rekombinantem Protein [Palomares et al., 2015]. Die erste Insektenzelllinie wurde von Shaug Gao in China etabliert [Vlak, 2007]. Unabhängig von Gao etablierte Grace vier Insektenzelllinien und legte wichtige Grundlagen für die in vitro Kultivierung von Insektenzellen [Grace, 1962].

Es gibt über 400 Insektenzelllinien, aber nur wenige sind von kommerzieller Bedeutung. Für BEVS wurden Zelllinien aus *Spodoptera frugiperda* und *Trichoplusia ni* am intensivsten untersucht und genutzt. Die Sf21 Zelllinie war die von Smith et al. genutzt als das BEVS ursprünglich entwickelt wurde [Smith et al., 1983b]. Seine Abkömmlinge die Sf9 Zellen werden am häufigsten für die Expression von rekombinanten Proteinen genutzt. Eine dritte Zelllinie die von Bedeutung ist, sind die High Five Insektenzellen. Insektenzellen werden bei einer Temperatur von 26°C bis 29°C kultiviert. Die Insektenzellen können dabei sowohl in Suspensionskultur als auch in adherierten Kulturen

wachsen [Palomares et al., 2015].

Baculoviren sind doppelsträngige DNA Viren mit Insekten als Wirtsorganismen. Sie besitzen ein einziges Molekül aus zirkulärer supercoiled doppelsträngiger DNA von 80 - 220 kb. Die DNA ist gepackt als stäbchenförmiges Nukleocapsid. Nuclear polyhedrosis virus (NPV) ist eine Untergruppe der Baculoviren. NPVs werden unterschieden, ob sie nur ein (SNPV) oder mehrere (MNPV) Nukleocapside enthalten. [Palomares et al., 2015]; [Miller, 1988]. Baculoviren können nur aus Invertebraten isoliert werden. In der Literatur wird von über 400 Baculoviren berichtet aber weniger als 20 sind Gegenstand intensiver Forschung. Am intensivsten untersucht, ist ein MNPV der ursprünglich aus *Autographa californica*, einer Schmetterlingsart isoliert ist. Dieses Virus ist bekannt als AcMNPV [Miller, 1988]. Aufbauend auf den Erfahrungen mit AcMNPV wurden auch andere NPVs entwickelt. Zum Beispiel NPV aus *Bombyx mori* (Seidenraupe) BmNPV wird auch als Genexpressionssystem genutzt [Maeda et al., 1985]. Der Lebenszyklus der Baculoviren beinhaltet zwei Typen von Viruspartikeln. Einer ist umhüllt von einer kristallinen Matrix aus Polyhedrin, die occluded virionen (OV). Dieser ist verantwortlich für die horizontale Infektion von Insekt zu Insekt. Die OVs sind nur infektiös, wenn sie aus der Polyhedrin-Schicht befreit werden [Miller, 1988]; [Palomares et al., 2015]. Polyhedrin ist bei hohen pH-Werten löslich, wie man es auch im Mitteldarm der Insektenlarven findet [Rohrmann, 2013]. BVs kommen durch Endocytose in die Zelle [Volkman, 1986]. Das stäbchenförmige Nukleocapsid geht dann in den Nukleus der Zelle [Tweeten et al., 1980]. OVs sind durch die Polyhedrinschicht vor Umwelteinflüssen geschützt. Der zweite Typ von Virionen wird budded Virus (BV) genannt. Nur BV sind in Zellkulturen infektiös. Die Schutzhülle aus Polyhedrin ist im Fall einer Zellkultur nicht nötig. Daher kann im BEVS das Polyhedrin gegen ein Zielgen ausgetauscht werden, unter Verwendung des starken Polyhedrin Promotors. Die Substitution des Polyhedringens durch ein fremdes Gen stört die Produktion der OV, hat aber nur einen geringen Einfluss auf die Produktion der BV [Smith et al., 1983a]. Auf diese Weise, kann eine große Menge an rekombinantem Protein auf schnelle und einfache Weise erhalten werden. Die Passagenzahl des Baculovirenstocks sollte so niedrig wie möglich gehalten werden, am besten unter 6 [Palomares et al., 2015]; [Miller, 1988]. Die Amplifizierung des Baculovirenstocks, ist einer der wichtigsten Schritte, ein Stock von geringer Qualität führt zu sehr niedrigen Ausbeuten. Es gibt zwei Aspekte, die die Qualität des Virenstocks beeinflussen können. Erstens, die genetische Instabilität, bei der das Zielgen während der Amplifizierung verloren geht [Kohlbrenner et al., 2005]. Dieser Punkt kann umgangen werden, durch

sorgsames Design des Vektors um instabile Konstrukte zu vermeiden. Zweitens ist das Auftreten von defective interfering particles (DIP), welche Deletionen in ihrem Genom haben und nur 43% des Genoms umfassen [Kool et al., 1991]. DIP akkumulieren bei einer Amplifizierung, da sie schneller repliziert werden, als der ganze Virus. DIP können sich nicht selbst replizieren, sie benötigen einen kompletten Virus, der die fehlenden Gene bereitstellt. Aus diesem Grund, spielt die multiplicity of infection (MOI) eine Schlüsselrolle bei der Virenstock-Amplifizierung. Der MOI ist die Zahl an infektiösen Partikeln, die zu einer Kultur zugegeben wird und wird plaque forming units per cell (pfu/cell) genannt. DIP werden nur repliziert, wenn eine Zelle mit einem kompletten Baculovirus koinfiziert ist [Palomares et al., 2015]. Es gibt zwei Strategien, die zur Erzeugung von rekombinanten Protein genutzt werden können.

- Geringe MOI (unter 1 pfu/Zelle)
Hier wird nur ein Teil der Population durch das Virus infiziert (primäre Infektion). Nicht infizierte Zellen wachsen weiter, bis sie durch Nachkommen der Baculoviren, der anfangs infizierten Zellen infiziert werden (sekundäre Infektion). Diese Methode hat den Vorteil, dass nur geringe Volumina an Baculovirenstocks benötigt werden.
- Hoher MOI (über 2 pfu/Zelle)
Führt zu synchroner Infektion. Diese Variante ist hoch reproduzierbar, da der Teil der anfangs infiziert ist, nicht von der MOI abhängig ist. Hier werden allerdings große Mengen an Virusstock benötigt.

Die Dauer des Prozesses und die Produktionskinetik sind abhängig von der gewählten Strategie [Palomares et al., 2015].

1.4 Röntgenlaser Kristallographie

Der erste Freie-Elektron-Laser (Free-Electron-Laser (FEL)) ist am Institut für Energy's Linac Coherent Light Source (LCLS) an der Stanford University in Californien installiert worden [Spence, 2014]. Dieser leistungsfähige FEL kann Röntgenstrahlungspulse von ca 30 bis 400 femtosekunden (fs) Länge erzeugen. Dabei kann beispielsweise ein 40 fs, 2keV langer Puls mit einer Strahlungsdichte von 10^{17} W cm⁻² dazu führen, dass ca 10% aller Kohlenstoffatome in einem Proteinkristall ein Photon absorbieren. Die Energie wird anfangs durch Emission von Photoelektronen und Auger Elektronen abgegeben, gefolgt von einer Elektronen-Kaskade von geringerer Energie. Die Erwärmung des Systems führt zu einem hohen Druck. Während eines Pulses werden alle chemischen Bindungen gebrochen

und die Temperatur steigt auf über 500.000 K, was zu einer vollständigen Verdampfung der Probe führt [Barty et al., 2012]. Simulationen [Neutze et al., 2000]; [Bergh et al., 2004]; [Bergh et al., 2008]; [Caleman et al., 2011]; [Hau-Riege et al., 2004]; [Hau-Riege et al., 2007]; [Gnodtke et al., 2009] haben gezeigt, dass Ionen sich etwa 0.5 nm in weniger als 100 fs bewegen können und das Pulse von 10 fs Länge nötig sind um atomare Auflösung zu erreichen [Barty et al., 2012]. Röntgenstrahlen haben immer schon zu Schädigungen in den biologischen Proben geführt und so die Auflösung limitiert [Henderson, 1995]. Mit der Entwicklung des femtosekunden Freie-Elektronenlasers ergab sich aber die Möglichkeit, diese Limitierung zu Durchbrechen. Sofern man so kurze femtosekunden Röntgenlaser Pulse nutzt, dass eine Beugung stattfindet, bevor die Probe durch die Strahlung verdampft [Neutze et al., 2000]. Experimente am FLASH FEL in Hamburg, Deutschland, bestätigen die Machbarkeit von „diffraction-before-destruction“ [Chapman et al., 2011]. Das „diffraction-before-destruction“ funktioniert, zeigt das Beispiel von dem Membranprotein Photosystem I. Dieser große Membranproteinkomplex (1 MDa Masse, 36 Proteine, 381 Kofaktoren) der als biosolarer Energiekonverter im Prozess der oxygenen Photosynthese dient, wurde für die neuartige Methode genutzt wobei mehr als 3.000.000 Beugungsbilder hergestellt wurden. Diese Studie zeigte, dass es gelingt, Beugungsdaten aufzunehmen, bevor die Zerstörung des Kristalls auftritt. Zudem konnte gezeigt werden, dass Strukturfaktoren erhalten werden können und zehntausende von Kristallen Beugungen zeigen und interpretierbare Daten liefern. Ein einzelner LCLS Puls zerstört das gesamte feste Material in seinem Fokus. Die zerstörten Kristalle werden aber im Probenstrahl durch neue Kristalle ersetzt, bevor der nächste Puls kommt [Chapman et al., 2011]. Das Wachstum von großen, gut geordneten Proteinkristallen ist einer der bedeutendsten Engpässe in der Kristallstrukturanalyse. Wichtige biologische Targets wie integrale Membranproteine und posttranslational modifizierte Proteine stellen eine besondere Herausforderung in der Kristallisation von Proteinen dar [Bill et al., 2011]; [Redecke et al., 2013]. Große Kristalle werden benötigt, um hochauflösende Beugungsdaten zu erhalten [Southworth-Davies et al., 2007]. Obwohl Mikrofokus beamlines es ermöglichen Beugungsmuster von Mikrometer großen Proteinkristallen aufzunehmen [Riek, 2004], liegt die tolerierbare Strahlungsdosis für kryogenisch gekühlte Proben bei weniger als 30 MGy. Die tolerierbare Strahlungsdosis für Messungen bei Raumtemperatur liegt dagegen bei 1 MGy [Southworth-Davies et al., 2007]. *In vivo* Kristalle sind dagegen optimal geeignet für die neue Methode der „serial femtosecond crystallography“ [Chapman et al., 2011]; [Redecke et al., 2013] die es erlaubt, das 1 MGy limit zu überschreiten, aufgrund des „diffraction before destruction“ Prinzips [Chapman et al., 2011]; [Barty

et al., 2012].

1.5 Behandelte Proteine

In den nächsten Kapitel werden die Proteine beschrieben, die in dieser Arbeit behandelt wurden.

1.5.1 *Trypanosoma brucei*

Die Schlafkrankheit ist eine Vektorkrankheit, die durch die Infektion mit dem protozoan Parasiten *Trypanosoma brucei* ausgelöst wird. Die Krankheit wird durch die Tsetse Fliege (*Glossina* genus) übertragen. Es sind 65 Millionen Menschen in 36 Ländern südlich der Sahara bedroht. Durch anhaltende Kontrollen konnte 2009 das erste Mal seit 50 Jahren die Zahl an Neuinfektionen auf unter 10000 Fälle pro Jahr reduziert werden. Die Schlafkrankheit kommt hauptsächlich in ländlichen Gebieten vor. Es gibt zwei Formen der Trypanosomiasis, abhängig von dem Parasiten, der für die Krankheit verantwortlich ist. *Trypanosoma brucei gambiense* wird in 24 Ländern in West- und Zentralafrika gefunden. Diese Form ist aktuell für über 98 % der bekannten Fälle verantwortlich und verursacht eine eher chronische Infektion. Eine infizierte Person kann über Monate und Jahre hinweg ohne Symptome der Krankheit zu zeigen leben. Klarere Symptome treten oft erst dann auf, wenn die Krankheit in einem fortgeschrittenen Stadium und das zentrale Nervensystem betroffen ist. *Trypanosoma brucei rhodesiense* kann in 13 Ländern in Ost- und Südafrika gefunden werden. Aktuell sind weniger als 2% der bekannten Fälle durch diese Form verursacht. Es handelt sich dabei um eine akute Form der Infektion. Erste Zeichen der Krankheit können Wochen nach der Infektion beobachtet werden. Die Krankheit schreitet schnell voran und befällt das zentrale Nervensystem. Nur in Uganda können beide Formen der Schlafkrankheit auftreten, aber in unterschiedlichen Regionen. Eine dritte Form der humanen Trypanosomiasis tritt in Lateinamerika auf. Sie ist bekannt als amerikanische Trypanosomiasis oder Chagas Krankheit. Die Erreger dieser Krankheit gehören zu einer anderen Trypanosomen Art und wird durch einen anderen Vektor übertragen. Andere *Trypanosoma* Spezies und Sub-Spezies sind Tierpathogen und verursachen Nagana oder andere Tiererkrankungen in wilden und domestizierten Tieren. Die Trypanosomiasis, besonders in Rindern, ist eines der größten Hindernisse für die wirtschaftliche Entwicklung von landwirtschaftlichen Gebieten in Afrika. [WHO, 2015].

1.5.1.1 Variant Surface Glycoprotein

Mit dem Biss einer Tsetse-Fliege gelangen Trypanosomen mit ca 20 verschiedenen Varianten Oberflächen Glycoprotein (VSG) Typen in die Wunde. Daraus wachsen Parasitenklone klonal mit einem einheitlichen VSG hoch. Nach ca. sieben Tagen entstehen Antikörper, die die Parasiten opsonieren. Gegen das vorherrschende VSG werden IgM Antikörper gebildet [Pan et al., 2006]. Die Population der opsonierten Parasiten wird dadurch eliminiert [Hiepe et al., 2006]. In der Zwischenzeit wechseln aber einige der Trypanosomen ihren VSG-Mantel, so dass die Zahl der Trypanosomen im Blut zwar abnimmt aber die Trypanosomen nicht vollständig verschwinden. Aus diesem repetitiven Vorgang aus der Dezimierung der mit Antikörper markierten Parasiten und dem klonalen Hochwachsen der Trypanosomen mit einem neuen VSG-Mantel ergeben sich zusammen mit der Dichteregulation der Parasiten ein Wellenförmiger Verlauf der Parasitämie (Abb. 6) [Hiepe et al., 2006]; [Reuner et al., 1997]; [Frey, 2012]. Das VSG-Switching gewährleistet so ein permanentes Entkommen vor dem Immunsystem und eine persistente Infektion. Die Antigenvariation verhindert außerdem die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Trypanosomen [Frey, 2012]. VSG ist auf der Oberfläche der Trypanosomen extrem dicht gepackt, denn es finden sich ca 10^7 identische VSG Moleküle pro Zelle [Englund, 1993], [Black et al., 2010], die etwa $5 * 10^6$ Homodimere bilden [Mehlert et al., 2002]. Die stäbchenförmigen Moleküle von 12 - 15 nm Länge [Vickerman, 1969] sind mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in die Plasmamembran inseriert [Englund, 1993]. Der Antigenwechsel ist ein Prozess, der bei einem von 10.000 Parasiten vorkommt [Aitcheson et al., 2005]. Es gibt etwa 1000 nicht exprimierte VSG Gene im Trypanosomen-Genom. Von diesen sind nur 7 % voll funktionsfähig wohingegen 9 % atypisch sind, 66 % sind Pseudogene und 18 % Genfragmente, die meist nur für den C-Terminalen Teil vom VSG kodieren [Berriman et al., 2005]. VSG ist ein Preproprotein mit einer N-Terminalen Signalsequenz und einer hydrophoben C-Terminalen Domäne, welche Posttranslational durch einen GPI-Anker ersetzt wird [Kang et al., 2002]. Dieser Membrananker-Austausch wird über eine Transamidase vermittelt [Udenfriend and Kodukula, 1995]. Das N-Terminale Signal dirigiert das naszierende Polypeptid durch das raue Endoplasmatische Retikulum (rER) Membran in das Lumen des ER und wird cotranslational entfernt [McConnell et al., 1981].

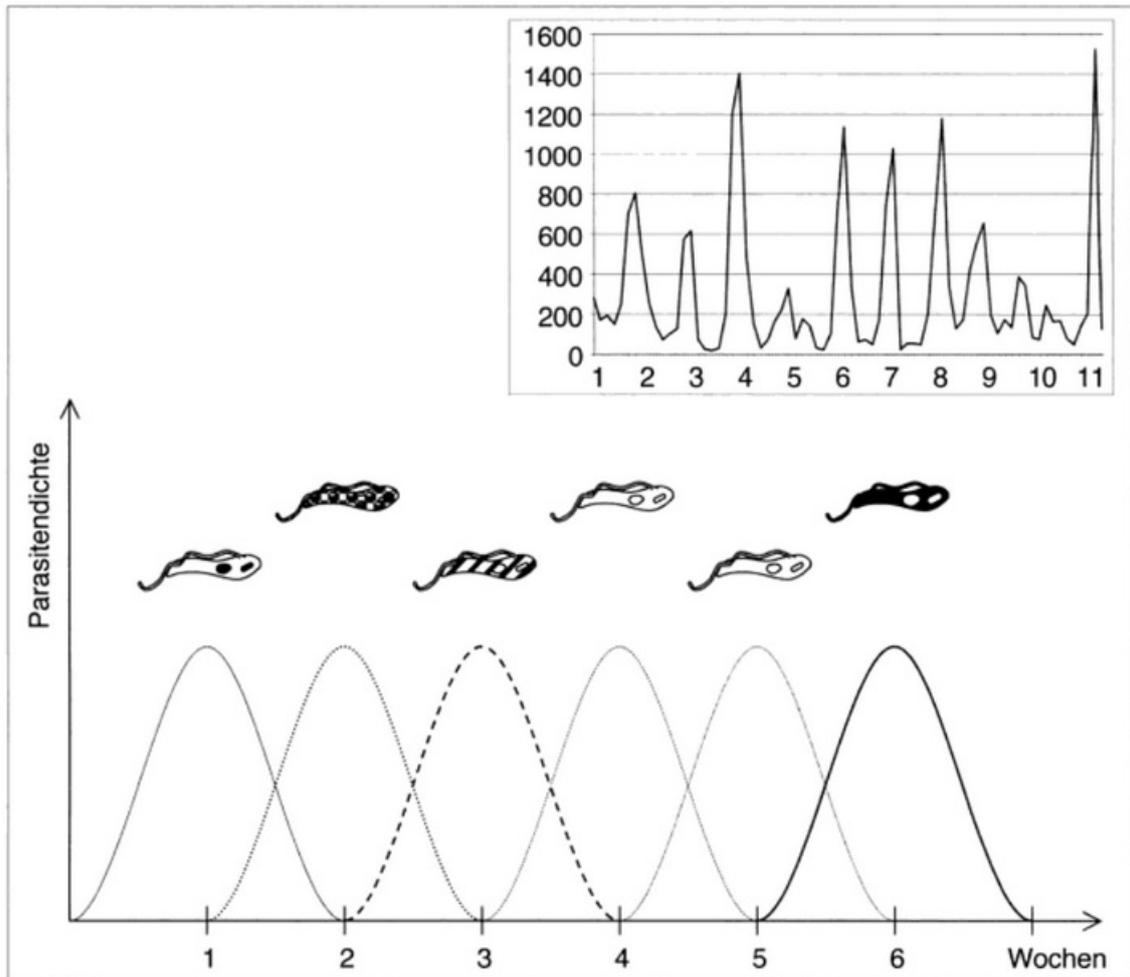


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Trypanosomenkonzentration im Blut eines Patienten [Hiepe et al., 2006].

1.5.1.2 Tubulin

Trypanosomen enthalten eine Anzahl an mikrotubulären Strukturen darunter die Axoneme und den Basalkörper [Sherwin et al., 1987]. Die Tubulin Gen-Familie besteht aus drei verschiedenen aber hoch konservierten Unterfamilien alpha-, beta- und gamma-Tubulin. Von den drei Varianten kommen alpha- und beta-Tubulin am häufigsten in eukaryontischen Zellen vor und wurden intensiv untersucht. Heterodimere von diesen beiden Proteinen sind der Hauptbestandteil von Mikrotubuli die, wiederum wichtig für den Aufbau von Flagellum, Zilie, dem Spindelapparat und dem Zytoskelett von Eukaryonten sind [Keeling and Doolittle, 1996]. Gamma-Tubulin wurde erst später entdeckt [Oakley

and Oakley, 1989] und seine Funktion ist weniger klar obwohl es auch eine wichtige Rolle im Mikrotubuli-organisierendem Zentrum spielt [Oakley et al., 1990]; [Zheng et al., 1991] und auch bei anderen Prozessen von Bedeutung ist [Gard, 1994]; [Lajoie-Mazenc et al., 1994]. Mitte der Neuzigerjahre wurden zwei weitere Tubulin Familienmitglieder vorgeschlagen, das so genannt delta-Tubulin und das epsilon-Tubulin [Burns, 1995]. Dabei unterscheiden sich die Sequenzen sehr stark von denen der bekannten Tubuline [Keeling and Doolittle, 1996]. Mikrotubuli sind polare zytoskelett-Filamente, die sich durch die ganze Zelle ziehen können und Verbindungen aus alpha-beta-Heterodimeren sind [Hammond et al., 2008].

1.5.2 Lysozym

Hühnereiweiß Lysozym (Hen-egg-white Lysozyme, HEWL) war das erste Enzym, dessen Struktur durch Kristallstrukturanalyse bestimmt werden konnte [Blake et al., 1965]. HEWL macht etwa 3.4 % aller Hühnereiweiß-Proteine aus. Es besteht aus 129 Aminosäuren und hat eine Masse von 14.3 kDa. Es gibt vier Disulfidbrücken im HEWL und es hat einen isoelektrischen Punkt von 10.7 [Mine, 1995]. Die FAO und die WHO haben zusammen mit vielen Ländern, darunter Deutschland, die gesundheitliche Unbedenklichkeit von Lysozym anerkannt und billigen seinen Einsatz im pharmazeutischen und therapeutischen Bereich [Cunningham et al., 1991]. Frisches Gemüse, Fisch, Fleisch, Früchte sowie Meeresfrüchte können durch eine Behandlung der Oberfläche mit Lysozym konserviert werden [Mine et al., 2004]. In Kombination mit EDTA kann Lysozym effektiv die Bakterienvermehrung in einigen Fleischprodukten wie Würstchen, Salami, Schweine- oder Rinderfleisch verhindern [Bolder, 1997]; [Hughey et al., 1989]. Zusätzlich zu seiner bakteriolytischen Wirkung wurden viele andere biologische Funktionen über das Lysozym berichtet, so auch die Inaktivierung bestimmter Viren [Jolles and Jolles, 1984], potenzielle antibiotische Effekte [El-Nimr et al., 1981], Entzündungs- und antihistaminische Effekte [Ossermann et al., 1974], direkte Aktivierung von Immunzellen [LeMarbre et al., 1981] und Antitumor Aktivität [Sava et al., 1988]. Lysozym gehört zu einer Klasse von Enzymen, die die Zellwand von Gram positiven Bakterien lysiert, indem es die $\beta(1-4)$ Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin aus Peptidoglycanen, die in der Zellwand von Bakterien vorkommen, spaltet [Mine et al., 2004]. Es ist sehr effektiv gegen bestimmte Gram positive Bakterien, wie *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium thermosaccharolyticum* und *Clostridium tyrobutyricum* [Cunningham et al., 1991], ist aber weitgehend ineffektiv gegen Gram negative Bakterien [Mine et al., 2004]. Das

antimikrobielle Spektrum von Lysozym kann verbreitert werden durch Behandlung der Target Bakterien in einer Vielzahl von Wegen. Eine Vorbehandlung mit chelatbildenden Mitteln wie EDTA sensibilisiert einige Gram negative Bakterien für die Behandlung mit Lysozym [Samuelson et al., 1985]. Zusammen mit Dextran zeigt Lysozym eine erhöhte Aktivität gegen Gram positive wie Gram negative Bakterien besonders, wenn die Temperatur während der Behandlung erhöht wird [Nakamura et al., 1990].

1.5.3 Myoglobin

Myoglobin ist ein globuläres Häm-Protein, das im Herz- und Skelettmuskel von Tieren gefunden werden kann [Faustman and Phillips, 2001]; [Ordway and Garry, 2004]. Die Konzentration und der Redoxzustand des Myoglobins bestimmen weitgehend, die Farbe des Muskels. Die Konzentration ist abhängig von der Genetik und der Umgebung in der das Tier lebt [Giddings and Hultin, 2009]; [Livingston and Brown, 1982]; [Faustman et al., 1996]. Myoglobin bindet reversibel Sauerstoff an seine Hämgruppe, genau gesagt an den Eisenkomplex im Porphyrin-Ring. Myoglobin ist ein Sauerstoffspeicher-Protein im Muskel und puffert außerdem die intrazelluläre Sauerstoffkonzentration, wenn die Muskelaktivität steigt [Ordway and Garry, 2004]. Myoglobin ist ein zytosolisches Hämprotein, dass aus einer einzigen Polypeptidkett besteht, die 154 Aminosäuren enthält. Myoglobin erhielt seinen Namen aufgrund seiner funktionellen und strukturellen Ähnlichkeit zu Hämoglobin [Kendrew et al., 1954]; [Wittenberg and Wittenberg, 1989]. Evolutionär betrachtet stammen Hämoglobin und Myoglobin von einem einzigen Urgen ab. Wie Hämoglobin, bindet Myoglobin reversibel Sauerstoff und erleichtert so den Sauerstofftransport von den roten Blutkörperchen zu den Mitochondrien während Perioden der gesteigerten metabolischen Aktivität oder dient als Sauerstoff-Reservoir während hypoxischen oder anoxischen Zuständen. Im Gegensatz zu Hämoglobin ist Myoglobin ein Monomer mit einer einzigen Sauerstoffbindestelle. Myoglobin hat eine hyperbolische Sauerstoffsättigungskurve statt der sigmoidal geformten Sättigungskurve beim tetrameren Hämoglobin [Ordway and Garry, 2004]. Die Struktur von Myoglobin wurde erstmals von Kendrew et al. aufgeklärt [Kendrew et al., 1958]; [Kendrew et al., 1960]; [Kendrew, 1963]. Myoglobin besteht aus acht α -Helice und es bindet ein Sauerstoff-Molekül über die Hämgruppe. Diese prosthetische Gruppe ist zwischen zwei Histidinen (His64 und His93) positioniert. Das Eisenion hat sechs Liganden, vier davon werden durch die Pyrrol-Stickstoffatome aus dem Porphyrin-Ring gebildet. Die Imidazol-Seitenkette des Histidins93 stellt den fünften Liganden, der die Hämgruppe stabilisiert. Der sechste Ligand ist im Desoxymyoglobin unbesetzt und dient als Bindeposition für Sauerstoff,

aber auch für andere potentielle Liganden, wie Kohlenstoffmonoxid oder Stickstoffmonoxid [Ordway and Garry, 2004].

1.5.4 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein wandlungsfähiges humapathogenes Bakterium, das eine Vielzahl von Erkrankungen auslöst. Angefangen bei relativ milden Infektionen der Haut und des Weichgewebes bis hin zu lebensbedrohlicher Sepsis [Lowy, 1998]. Das Auftreten Antibiotikaresistenter Keime ist aktuell ein großes Problem, besonders in Krankenhäusern. Allein in den USA traten 2002 geschätzte 1,7 Millionen nosokomiale Infektionen auf. Etwa 99.000 von ihnen führten zum Tod [Klevens et al., 2007]. USA300 ist der am weitesten verbreitete Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Erreger auf dem amerikanischen Kontinent. Er kommt auch in Europa, Asien und Ozeanien vor [Yamamoto et al., 2010]; [DeLeo et al., 2010]. Multi-drug resistente Organismen stellen eine große Herausforderung dar, daher ist die Vermeidung der Verbreitung von diesen Erregern in Gesundheitseinrichtungen von großer Bedeutung. Wahrscheinlich hat keiner dieser Organismen mehr Aufmerksamkeit auf sich gezogen als methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* [Kallen et al., 2010]. Mit MRSA infizierte Patienten werden isoliert behandelt und es werden besondere Hygienemaßnahmen ergriffen [Dissemond et al., 2005].

1.5.4.1 Acriflavin resistance protein B

Das Acriflavin resistance protein B (AcrB) aus MRSA ist ein Mitglied der Resistance Nondulation Cell Division (RND) Superfamilie, deren Mitglieder ubiquitär in Bakterien, Archaeen und Eukaryonten gefunden werden können. Die Hauptfunktion ist die des Proton/Substrat Antiporters [Saier et al., 2001]. Medikamentenresistenz während einer Infektions- oder Krebsbehandlung ist oft eine Folge von einer Überproduktion eines Efflux Transporters, dies führt zu einer abnehmenden Konzentration von Antibiotika oder Chemotherapeutika in der Zelle [Li and Nikaido, 2004]; [Ambudkar et al., 2006]. Effluxpumpen können vom ABC Typ sein, der die freie Energie der ATP Hydrolyse nutzt oder sie können Transporter sein, die die Protonenbewegung ausnutzt, um eine Verdrängung des Wirkstoffs zu erreichen. ABC-Typ Transporter sind vorherrschend in Eukaryonten, während Prokaryonten hauptsächlich H^+ /Wirkstoff Transporter nutzen. In Gram-positiven Bakterien wird die Resistenz häufig durch die Major-Facilitator-Superfamilie vermittelt [Markham and Neyfakh, 2001]. In Gram-negativen Bakterien

spielen RND Typ Effluxpumpen eine bedeutende Rolle [Li and Nikaido, 2004]; [Poole, 2004]. Die erste Struktur einer RND Pumpe, die aufgeklärt wurde, war die von AcrB (3.5 Å Auflösung), dazu hat man ein Kristall verwendet, der in einem trigonalen Kristallsystem und der Raumgruppe R32 gewachsen war [Murakami et al., 2002]. AcrB und seine Homologe sind die wichtigsten Effluxpumpen in Gram-negativen Bakterien und sorgen für eine multiple drug Resistenz, wenn sie überproduziert werden [Poole et al., 1993]; [Ma et al., 1994]; [Okusu et al., 1996]; [Poole, 2001]. AcrB wirkt mit einem äußeren Membranprotein, TolC, und einem Membranfusionsprotein AcrA zusammen [Dinh et al., 1994]; [Paulsen et al., 1997]; [Tikhonova and Zgurskaya, 2004]. Dieser dreigeteilte Komplex exportiert eine breite Vielfalt von Antibiotika, Antiseptika, Antikrebsmittel und anderen toxischen Verbindungen aus der Zelle heraus. Diese Reaktion wird durch eine Protonenbewegung angetrieben [Zgurskaya and Nikaido, 1999]; [Sulavik et al., 2001]. In diesem Komplex aus AcrA, AcrB und TolC, bestimmt die innere Membrankomponente, AcrB, die Substratspezifität und exportiert aktiv die Substrate [Zgurskaya and Nikaido, 2000]. Ein AcrB-Durg Komplex besteht aus drei asymmetrischen Protomeren, von denen jedes eine unterschiedliche Konformation besitzt, die je einem der drei Zustände des Transportzyklus entspricht. Eintritt, Bindung und Verdrängung [Lomovskaya et al., 2007]. Das gebundene Substrat kann in der aromatischen Bindetasche in nur einem der drei Protomere gefunden werden. In dieser Tasche gibt es viele aromatische Aminosäuren, so dass hydrophobe Substrate leicht gebunden werden können [Murakami et al., 2006]. Der Transportmechanismus beruht auf einem dreistufigen Rotationssystem [Murakami, 2008].

- Im ersten oder Zugangszustand ist der Vorraum zum Periplasma hin geöffnet. Die Bindetasche ist in einem geschrumpften Zustand. Jetzt haben potentielle Substrate Zugang zu dem Vorraum.
- Im zweiten oder Bindezustand, ist der Vorraum immer noch offen und die Bindetasche ist ausgedehnt, um ein Substrat aufnehmen zu können. Wirkstoffe können in den Vorraum von oberhalb der Membran eintreten, bewegen sich durch den Aufnahmekanal und bleiben in der Substrat-Bindetasche. Zu diesem Zeitpunkt ist der Ausgang durch eine zentrale Helix blockiert.
- Im dritten oder Verdrängungszustand ist der Vorraum geschlossen und der Ausgang geöffnet, die zentrale Helix ist nicht mehr im Weg. Der Wirkstoff wird aus der schrumpfenden Bindetasche in den freien Kanal von TolC gedrückt.

Nach der Verdrängung des Substrates, dreht das Protomer zurück in den Zugangszustand, um das nächste Substrat aufnehmen zu können. Diese strukturelle Veränderungen sind an eine Protonenbewegung gekoppelt (Abb. 5) [Murakami, 2008].

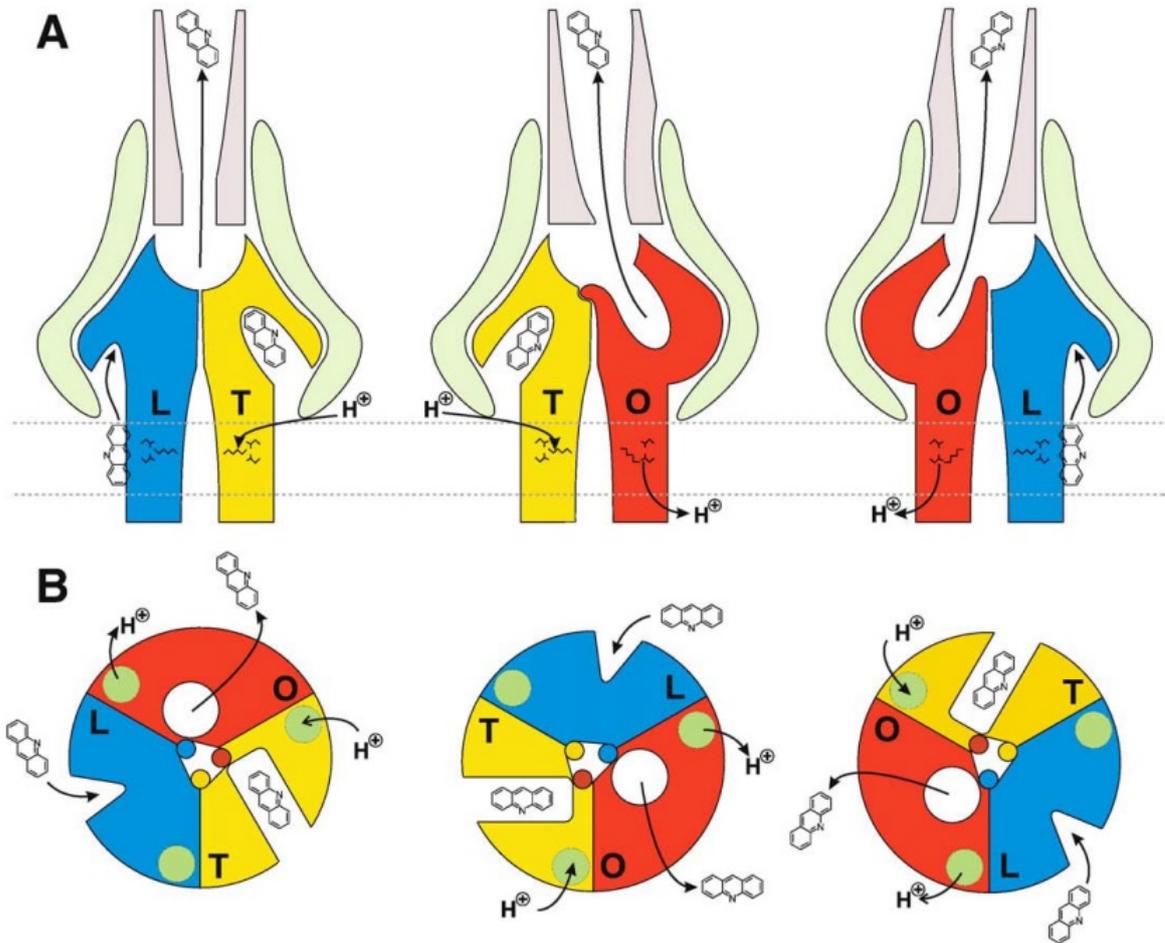


Abbildung 6: Darstellung eines rotationsbasierten Transportmechanismus von AcrB. Die Konformationszustände loose (L), tight (T) und open (O) sind blau, gelb und rot dargestellt. (A) Seitenansicht eines AcrB-Trimers. AcrA und TolC sind in hellgrün bzw. hellviolett angedeutet. (B) Die seitlichen Einkerbungen in dem L und T Monomer stehen für die Substrat-Bindetasche. Die verschiedenen geometrischen Strukturen spiegeln niedrige (Dreieck), hohe (Rechteck) oder keine (Kreis) Affinität von dem zu transportierendem Substrat zur Bindetasche wider. Im ersten Schritt des Zyklus bindet ein Monomer ein Substrat (hier: Acridin) dies entspricht der L Konformation. Als nächstes findet eine Umwandlung in den T Zustand statt, das Substrat ist in der hydrophoben Bindetasche. Schließlich wird das Substrat in den Schlot von TolC freigelassen (O Konformation) [Pos, 2009].

1.5.5 Cathepsin B

Cathepsin B ist eine lysosomale Cysteinprotease aus der Papain Familie. Es ist ein 30 kDa Protein und fungiert als Proteinase. Dabei spaltet es innere Peptidbindungen, wobei es große hydrophobe Seitenketten im Substrat bevorzugt. Zusätzlich zu seiner Proteinaseaktivität hat Cathepsin B eine Peptidyl-dipeptidase-Aktivität, durch die Dipeptide vom C-Terminus eines Proteins abgespalten werden. Für diese Aktivität ist der occluding loop verantwortlich, der einzigartig in Cathepsin B ist. Dieser loop blockiert teilweise das aktive Zentrum und positioniert gleichzeitig den positiv geladenen Imidazolring eines Histidins (His111) am C-Terminus eines Substrates, um deren negative Ladung zu erkennen. Der occluding loop ist allerdings nicht starr, sondern kann andere Konformationen annehmen und so die Bindetasche frei machen und Cathepsin B kann dann als Endoprotease wirken [Mort and Buttle, 1997]. Cathepsin B ist eine weniger effektive Endoprotease als andere Mitglieder der Papain-Familie, vermutlich wegen der Energie, die aufgebracht werden muss, um eine Konformationsänderung des occluding loops zu erreichen [Cygler et al., 1996]. Preprocathepsin B wird von einem einzigen Gen kodiert, es wird am rauen ER gebildet, dabei wird das Signalpeptid co-translational abgespalten. Als nächste erfolgt der Transport zum Golgi-Apparat, das Enzym wird glycosyliert und das glycosylierte Enzym kann dann von einem Mannose-6-phosphat Rezeptor im Trans-Golgi-Apparat erkannt werden. Der Transport von Procathepsin B zu einem Lysosom ist rezeptor-vermittelt. In diesem Kompartiment wird das Enzym durch Abspaltung des Propeptids aktiviert. Während des Transports wird das Transportvesikel angesäuert. Die Ansäuerung löst auch die proteolytische Prozessierung des Proenzym aus, mit der Freisetzung des Propeptids. Bis zu diesem Zeitpunkt ist das Enzym inaktiv um Schäden an der Biosynthese-Maschinerie der Zelle zu vermeiden [Mort and Buttle, 1997]. Es gibt Ergebnisse die zeigen, dass die Aktivierung eine unimolekulare Autoprozessierung ist, intermolekulare Prozessierung durch Cathepsin B oder andere Proteinase können ein alternativer Mechanismus sein [Rowan et al., 1992]. Zusätzlich zu seiner Funktion als Enzym-Inhibitor, stabilisiert das Propeptid das Cathepsin B. Der Verlust des Propeptids führt zu einer Instabilität, des Enzyms bei neutralem oder alkalischem pH-Wert. Trotz der harschen Bedingungen im Lysosom beträgt die Halbwertszeit der meisten löslichen lysosomalen Proteine über 24 h. Ein Prolin am N-Terminus ist eine beständig anzufindende Aminosäure von lysosomalen Cysteinproteasen. [Mort and Buttle, 1997]. Wahrscheinlich schützt diese Aminosäure sie vor dem Abbau durch Aminoproteasen,

die generell keine Prolinreste mögen. Auch Cathepsin B übersteht die Bedingungen im Lysosom nicht vollständig unbeschadet. Es kann in zwei verschiedene Abbauprodukte umgesetzt werden. Dabei wird das einzelne Peptid in eine zweikettige Form umgewandelt, wobei ein Dipeptid abgespalten wird. Die zweikettige Form wird dabei über eine Disulfid-Brücke zusammengehalten [Mort and Buttle, 1997].

2 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit, sollte eine Methode gefunden werden, nach der es möglich war Proteine *in vivo* zu kristallisieren. Dabei sollte ein möglichst allgemeiner Ansatz gefunden werden, nachdem verschiedene Proteine in lebenden Insektenzellen kristallisieren. Dazu wurden Hühnereiweiß Lysozym, humanes Cathepsin B, *Staphylococcus aureus* Acriflavin resistance protein B, Pottwahl Myoglobin und die trypanosomalen Proteine Variant surface glycoprotein und Tubulin in Sf9 Zellen exprimiert und auf ihre Fähigkeit untersucht *in vivo* Kristalle zu bilden. Es wurden gezielt verschiedenartige Proteine genommen um eine große Bandbreite an Proteinen zu untersuchen und so die Bedingungen allgemeingültig optimieren zu können. Außerdem sollten die in früheren Arbeiten bereits kristallisierten Protein TbIMPDH und TbCatB erneut untersucht werden. Dabei sollte gezeigt werden, ob TbIMPDH auch in einer, am N-Terminus um neuen Aminosäuren gekürzten Form kristallisiert. TbCatB sollte ohne das Propeptid aber mit Signalpeptid in Insektenzellen exprimiert werden. Hierzu sollten diese Proteine mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems in Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) Insektenzellen exprimiert werden. Anschließend sollten die hergestellten *in vivo* Kristalle isoliert und mit Hilfe von Western-Blot und Massenspektrometrie charakterisiert werden. Unter Berücksichtigung des Einflusses der MOI, der Zelldichte, der Temperatur und der Generationszahl der Insektenzellen sollten die optimalen Bedingungen für die *in vivo* Kristallisation gefunden werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterien

Für die Klonierung wurden kompetente Zellen des Stammes NEB Turbo Competent *E. coli* (High Efficiency) eingesetzt. Zum Herstellen rekombinanter Viren wurden DH10-Bac Zellen (Invitrogen) verwendet.

3.1.2 Insektenzellen

Für die heterologe Expression von Proteinen wurden Sf9 Zellen aus *Spodoptera frugiperda* eingesetzt.

3.1.3 Antikörper

Tabelle 2: Liste der eingesetzten Antikörper.

Antikörper	Hersteller
6-His-Antibody (Rabbit)	Biomol, Hamburg
Cathepsin B Polyclonal (Rabbit)	Chemicon International
Cathepsin B Human Liver (Rabbit)	Calbiochem
VSG221-Antibody (Rabbit)	Labor Prof. Dr. M. Duszenko
Anti-Rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate	Sigma Aldrich, München

3.1.4 Chemikalien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien.

Produkt	Hersteller
6X DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	BioRad Laboratories, München
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
Coomassie brilliant blue G-250	Roth, Karlsruhe
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
Eisessig (100 %)	Sigma Aldrich, München
Ethanol (100 %)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %)	Roth, Karlsruhe
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo scientific, Karlsruhe
Gentamycin	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich, München
Glycerin (99 %)	Sigma Aldrich, München
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
I-PER Insect Cell Protein Extraction Reagent	Thermo scientific, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma Aldrich, München
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol (100 %)	Sigma Aldrich, München
Midori Green Advance DNA stain	Nippon Genetics Europe, Dueren
Natriumazid	Sigma-Aldrich, München
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat-5-hydrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)	Sigma-Aldrich, München
Osmiumtetroxid	Plano, Marburg
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo scientific, Karlsruhe
PBS Tabletten	Invitrogen, Karlsruhe

Produkt	Hersteller
Pepton	Roth, Karlsruhe
Propylenoxid	Plano, Marburg
Proteinladepuffer Roti-Load (4fach, reduzierend)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese (Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sucrose	Sigma-Aldrich, München
TEMED p.a.	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
X-TremeGene HP DNA Transfection Reagent	Roche, Mannheim

3.1.5 Plasmide

Zur Subklonierung wurde das CloneJET PCR Cloning Kit mit dem Vektor pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, Karlsruhe). Für die Herstellung des rekombinanten Virus in den Insektenzellen wurden die Vektoren des Bac-to-Bac[®]-Kits verwendet, pFastBac1, pFastBac-HTb

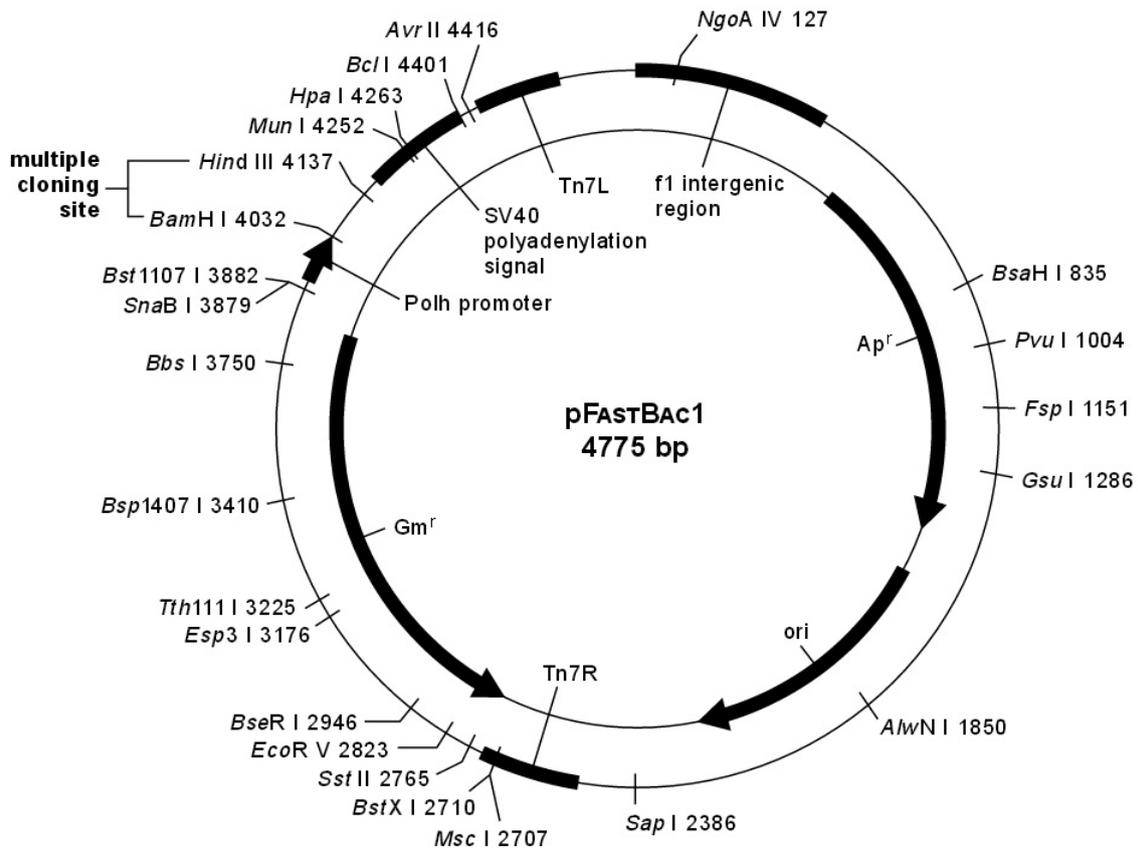


Abbildung 7: Karte des Vektors pFastBac 1. <https://www.embl.de>

3.1.6 Primer

1. Für die Expression von Lysozym in Sf9 Insektenzellen
 fw-BamHI-HEWL: 5'-GGATCCATGAAAGTATTTGGCCGTTGCGAGCT-3'
 rv-NotI-HEWL: 5'-GCGGCCGCTTACAGACGGCAGCCTCGAA-3'
2. Für die Expression von humanem CatB in Sf9 Insektenzellen
 fw-BamHI-HCatB: 5'-GGATCCATGTGGCAGCTCTGGGCCTCC-3'
 rv-XhoI-HCatB: 5'-CTCGAGTTAGATCTTTTCCCAGTACTGAT-3'

3. Für die Expression von Acriflavin resistance protein B in Sf9 Insektenzellen

fw-BamHI-XbaI-AcrB:

5'-GGATCCTCTAGAATGATAAAAAAGCTATTACAATTTTCTTTAG-3'

rv-HindIII-XhoI-AcrB:

5'-AAGCTTCTCGAGCTATCGTTTAGTGAATCGTTTTTTTA-3'

4. Für die Expression von Variant Surface Glycoprotein (TbVSG) in Sf9 Insektenzellen

fw-BamHI-VSG: 5'-GGATCCATGCCTTCCAATCAGGAGGCCCG-3'

rv-XbaI-KDEL-VSG:

5'-TCTAGATTAAAGTTCATCCTTAAAAAGCAAACCTGCAAGCCA-3'

5. Für die Expression von Alpha-Tubulin (TbTubulin) in Sf9 Insektenzellen

fw-BamHI-Tubulin: 5'-GGATCCATGCGTGAGGCTATCTGCATCCACAT-3'

rv-HindIII-Tubulin: 5'-AAGCTTCTAGTACTCCTCCACATCCTCCTCAC-3'

6. Für die Expression von TbIMPDH in Sf9 Insektenzellen

fw-BamHI-IMPDH-9AS: 5'-GGATCCATGACGCTGCGGGACGGTACCAC-3'

rv-NotI-IMPDH: 5'-GCGGCCGCTTAGAGCTTCGAGGCAAAGAGTTTCC-3'

7. Für die Expression von TbCatB in Sf9 Insektenzellen

fw-BamHI-SP-CatB: 5'-GGATCCATGCATCTCATGCGTGCCT

GCATCACATTTTGTATCGCTTCGACGGCTGTAGTCG

CCGTAAACGCCCTTCCAGCAGCTTCGATTCCGCT-3'

rv-XhoI-TbCatB: 5'-TAACTCGAGCTACGCCGTGTTGGGTG-3'

3.1.7 Kits

Tabelle 4: Liste der eingesetzten Kits.

Produkt	Hersteller
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Bac-to-Bac [®] Baculovirus Expression System	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.8 Medien

3.1.8.1 Insektenzellen

Für die Insektenzellenkulturen wurde EX-Cell[®] 420 Serumfreies Medium ohne L-Glutamin (Sigma-Aldrich, München) verwendet. Dieses Medium wurde auch für die Lipofektion benutzt.

3.1.8.2 Bakterien

LB-Medium, pH 7,4

Hefeextrakt 0,5 %

NaCl 0,5 %

Pepton 1 %

Die Bestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst, mit Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt und autoklaviert. Gegebenenfalls wurde das Medium entweder mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin (aus 1000 \times Stammlösung in 70 % Ethanol) oder 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin (aus 1000 \times Stammlösung in Wasser, sterilfiltriert), 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin (aus 1000 \times Stammlösung in Wasser, sterilfiltriert) und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tetracyclin (aus 1000 \times Stammlösung in 70% Ethanol) versetzt.

SOC-Medium, pH 7

Hefeextrakt 0,5 %

Trypton 2 %

KCl 2,5 mM

NaCl 10 mM

MgCl₂ 10 mM

MgSO₄ 10 mM

Glucose 20 mM

Die Bestandteile wurden in destiliertem Wasser gelöst und mit Salzsäure auf pH 7 eingestellt und autoklaviert.

LB-Agarplatten Die Kultivierung von *E. coli* auf Festmedium wurde mit 2% Agarplatten durchgeführt. Die Platten wurden vor Gebrauch aus 2× LB-Medium und einer 4% Agarlösung frisch hergestellt. Vor dem Gießen wurde das Medium mit Ampicillin bzw. mit Kanamycin, Gentamycin und Tetracyclin, X-Gal und IPTG versetzt.

3.1.9 Puffer und Lösungen

3.1.9.1 Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50×) pH 8

Tris/Acetat 40 mM

EDTA 1 mM

Agarose Gel

TAE-Puffer (1×)

Agarose 1 %

Midori Green Advance DNA stain 0,05 %

3.1.9.2 Proteine

RIPA-Lyse-Puffer pH 7,4

1 mM EDTA

50 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

0,01 % (w/v) Natriumazid

0,1 % (w/v) SDS

0,25 % (w/v) Natriumdeoxycholat

1 % (v/v) Igepal CA-630 (früher NP-40)

Kristall-Solubilisierungs-Puffer pH 1,5

1% Triton X-100

Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4KH₂PO₄ 2,3 mMNa₂HPO₄ x 2H₂O 7,7 mM

KCl 8,7 mM

NaCl 120 mM

Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4

KCl 2,7 mM

Tris-HCl 25 mM

NaCl 137 mM

3.1.9.3 Puffer für SDS-PAGE-Gele**SDS-PAGE-Gele**

Tabelle 5: Zusammensetzung von vier 10% Gelen.

Lösung	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
Wasser (bidest.)	8,4 ml	6,6 ml
Acrylamid 30 %	2,0 ml	7,6 ml
1M Tris-HCl (pH 8,8)		8,6 ml
1M Tris-HCl (pH 6,8)	1,5 ml	
10 % SDS	120 µl	228 µl
10 % APS	60 µl	78 µl
TEMED	12 µl	24 µl

Laufpuffer pH 8,3 (10fach)

SDS 10 g

Tris 30 g

Glycin 144 g

3.1.9.4 Puffer für Western Blot**Waschpuffer pH 7,4**

Tween20 0,1 %
Tris-HCl 10 mM
NaCl 150 mM

Transferpuffer pH 9,0 - 9,4

Glycin 39 mM
Tris 48 mM
SDS (10 %-Lsg.) 0,375 %
Methanol 20 %

Blockinglösung

Milchpulver 3,5 g
PBS (2fach) 31,5 ml

AP-Puffer

MgCl₂ 10 mM
NaCl 20 mM
Tris-HCl 150 mM

Western Blot Entwicklungslösung

BCIP 0,38 mM (28,16 mg/ml in DMF)
NBT 0,40 mM (32,7 mg/ml in 70 % DMF)
ad 100 ml AP-Puffer

3.1.9.5 Puffer für Silberfärbung**Fixierlösung**

Essigsäure 24 ml
Ethanol 80 ml
ad 200 ml Wasser (bidest.)

Waschlösung (Silberfärbung)

Ethanol 50 %

Imprägnierlösung

Natriumthiosulfat (10 %-Lsg.) 400 μ l
ad 200 ml Wasser (bidest.)

Silberinkubationslösung

Silbernitrat 0,1 g
Formaldehyd (37 %) 37 μ l
ad 50 ml Wasser (bidest.)

Silberfärbung-Entwicklungslösung

Natriumcarbonat 6 g
Natriumthiosulfat (10 %-Lsg.) 4 μ l
Formaldehyd (37 %) 50 μ l
ad 100 ml Wasser (bidest.)

Stopp-Lsg.

Ethanol 80 ml
Essigsäure (100 %) 24 ml
ad 200 ml Wasser (bidest.)

Geltrockenlösung

Glycerol (87 %) 11,5 ml
Ethanol 125 ml
ad 500 ml Wasser (bidest.)

3.1.9.6 Puffer für Coomassie-Färbung**Coomassie-Färbelösung**

Coomassie brilliant blue G-250 300 mg
Essigsäure 70 ml
Methanol 405 ml
ad 1000 ml Wasser (bidest.)

Entfärbelösung

Essigsäure 100 ml

Methanol 400 ml
ad 1000 ml Wasser (bidest.)

3.1.9.7 Sonstige Lösungen

Tabelle 6: weitere verwendete Lösungen.

Produkt	Hersteller
Buffer BamHI	Thermo scientific, Karlsruhe
Buffer Tango	Thermo scientific, Karlsruhe
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo scientific, Karlsruhe
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo scientific, Karlsruhe

3.1.10 Sonstige Materialien

Tabelle 7: zusätzlich verwendete Materialien.

Produkt	Hersteller
10 kDa NMWL Zentrikons	Millipore, Schwalbach
CellMASTER Polystyrol Filter Rollerflasche	Greiner, Frickenhausen
CELLSTAR Filter Top Zellkultur Flaschen	Greiner, Frickenhausen
Eppendorfgefäße (1,5 und 2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Falcon Tubes (15, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Greiner, Frickenhausen
Plastikküvetten 10 x 10 x 45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Eppendorfgefäß	Roth, Karlsruhe
Schott-Glasflaschen (50 ml - 1000 ml)	Fischer Scientific, Ulm
Zellschaber	TPP, Trasadingen (Schweiz)

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) Das PCR-Programm lautet:

Tabelle 8: PCR-Programm für Phusion High-Fidelity DNA Polymerase.

	Temperatur (°C)	Dauer (sek)
Hot Start	98	30
Denaturieren	98	8
Annealing	53*	25
Extension	72	180**
30 Zyklen		
Finale Extension	72	600
Kühlen	4	∞

* abhängig vom jeweiligen Primer

** abhängig von der Länge des jeweiligen Gens

HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) lautet das PCR-Programm:

Tabelle 9: PCR-Programm für HotStarTaq DNA Polymerase.

	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Hot Start	95	15
Denaturieren	94	1
Annealing	56*	1
Extension	72	3**
35 Zyklen		
Finale Extension	72	10
Kühlen	4	∞

* Abhängig vom jeweiligen Primer

** Abhängig von der Länge des jeweiligen Gens

3.2.1.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Es wurden 0,5 g Agarose mit 50 ml 1× TAE-Puffer versetzt (1 % Agarosegel) und im Mikrowellenherd erhitzt bis eine klare Lösung entstand. Das Agarosegel wurde mit Midori Green Advanced DNA stain versetzt und in eine Flachbettkammer ausgegossen. Die aufzutragenden Proben (20 µl) wurden mit 4 µl Laufpuffer (5×) versetzt und dann

in die Geltaschen gefüllt. Als Marker wurden 15 μl GeneRuler 1 kb DNA Ladder der Firma Thermo Scientific verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung wurde 50 min bei einer Spannung von 90 V ausgeführt und mittels Fluoreszenz-Anregung der gefärbten DNA mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm ausgewertet.

3.2.1.3 Gelextraktion

Die über Gelektrophorese aufgereinigte DNA wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Extraktion erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.4 DNA Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmungen wurden UV-Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photospektrometer durchgeführt. Dabei entspricht ein Absorptionwert von 1 AU bei einem Lichtweg von 1 cm einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für doppelsträngige DNA. Verunreinigungen durch Protein können ausgeschlossen werden, wenn bei einer Wellenlänge von 260 nm der Faktor 1,5 bis 2 höher ist als bei 280 nm. Bei Plasmiden liegt zirkuläre doppelsträngige DNA vor. In diesem Fall wird die Konzentration wie folgt berechnet

$$A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,05 = \text{Plasmid-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

3.2.1.5 Restriktionsverdau

Tabelle 9: Restriktionsverdau.

Komponente	Volumen (μl)
Templat (DNA)	10
Puffer	2
Enzym A	0,2
Enzym B	0,4
Wasser	7,4
Total	20

Die Restriktion der DNA wurde in einem PCR-Eppendorfgefäß durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionsansatz 4 h bei 37°C inkubiert.

3.2.1.6 Minipräparation von Plasmid-DNA

Von positiven Kolonien auf einer LB-Agarplatte oder von Stabilaten wurden Übernachtkulturen angesetzt. Jeweils 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 3 min mit $17.000\times g$ (Microzentrifuge MC-13, Heraeus) zentrifugiert. Die weiteren Reinigungsschritte erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden).

3.2.1.7 Minipräparation von Bacmid-DNA

Für das folgende Protokoll wurden die Puffer des Qiagen-Miniprep-Kits (s.o.) benutzt. Von 6 ml einer Übernachtkultur (LB-Medium, $50\ \mu\text{g/ml}$ Kanamycin, $7\ \mu\text{g/ml}$ Gentamycin und $10\ \mu\text{g/ml}$ Tetracyclin) von positiv transformierten DH10Bac-Zellen, wurden jeweils 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und für 3 min mit $17.000\times g$ (Microzentrifuge MC-13, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang wiederholt bis alle Bakterien pelletiert wurden. Das Bakterienpellet wurde in $300\ \mu\text{l}$ P1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von $300\ \mu\text{l}$ P2-Puffer erfolgte die alkalische Lyse, das Eppendorfgefäß wurde vier bis sechs mal invertiert und fünf min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von $300\ \mu\text{l}$ N3-Puffer zur Neutralisation wurde erneut vier bis sechs mal inkubiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit $17.000\times g$ zentrifugiert um die ausgefällten Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde in ein 2.0 ml Eppendorfgefäß überführt, welche zur DNA Fällung $800\ \mu\text{l}$ eiskaltes Isopropanol enthielt. Nach invertieren wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz 10 min bei $17.000\times g$ bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das DNA Pellet wurde mit $0,5\ \text{ml}$ eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen und erneut bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet unter der Sterilbank luftgetrocknet. Das Pallet wurde schließlich in $50\ \mu\text{l}$ sterilem EB Puffer resuspendiert. Die DNA wurde per PCR analysiert und in einem weiteren Schritt transfiziert. Für die Langzeitlagerung wurde die DNA bei -20°C eingefroren und es wurden Stabilate hergestellt.

3.2.1.8 Ligation

Die Ligation wurde mit der T4-Ligase (Thermo Fisher) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden verschiedene Verhältnisse (1:1 bis 1:3) von Plasmid zu

Fragment-DNA eingesetzt. Abweichend von den Herstellerangaben wurde der Ligationsansatz für jeweils 1 h zyklisch bei 22°C, 16°C und 4°C über Nacht inkubiert.

3.2.1.9 Transformation

Für die Transformation wurden NEB Turbo Competent E. coli (NEB) und DH10Bac Competent Cells (Thermo Fisher) verwendet. In Anlehnung an das Herstellerprotokoll gab es einzelne Modifikationen:

- Hitze-Schock bei 42°C für 45 sek.
- Der Ansatz wurde auf Eis für 2 min inkubiert
- Zusatz von 200 μl SOC-Medium (900 μl für DH10 Zellen)
- Inkubation im Eppendorfgefäß bei 37°C im Shaker (150 rpm) für 1 h (4h bei DH10 Zellen)
- Ausstreichen von 100 μl des Ansatzes auf einer LB-Platte mit Ampicillin (für DH10 Zellen mit Kanamycin, Gentamycin, Tetracyclin, IPTG und X-Gal)

3.2.1.10 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob eine Bakterienkolonie ein bestimmtes DNA-Fragment enthielt, wurde die entsprechende Kolonoie für eine PCR verwendet. Für fünf Reaktionen wurde dazu folgender Mastermix angesetzt:

HotStar Taq Master Mix 50 μl

Sense Primer 5 μl

Anti-Sense Primer 5 μl

RNase freies Wasser 40 μl

Von diesem Master Mix wurden jeweils 20 μl in eine PCR-Gefäß gegeben und die jeweilige Kolonie mit einer Mikropipettenspitze gepickt und kurz in den PCR-Ansatz getaucht. Als Negativkontrolle wurden 20 μl Master Mix ohne Zusatz von DNA verwendet. Als Positivkontrolle wurde bereits verifizierte Plasmid-DNA verwendet. Die PCR wurde nach HotStarTaq-Protokoll (3.2.1.1) durchgeführt und die Proben anschließend mit einem Agarosegel überprüft.

3.2.1.11 E. coli Kulturstabilate

Nachdem eine Hauptkultur über Nacht in die stationäre Phase eingetreten war, wurden 700 μl dieser Kultur mit 300 μl sterilem Glycerol (50 %) in ein Kryoröhrchen überführt und bei 77 K gelagert.

3.2.1.12 DNA-Sequenzierung

DNA Proben wurden über Gelextraktion gereinigt und für eine Sequenzierung bei Eurofins Genomics eingesandt. Als Primer wurden Eurofins-Standardprimer verwendet bzw. zu der Probe zugegeben und mitgesandt. Die erhaltenen Sequenzen wurden per Sequenzalignment mit der jeweiligen Gensequenz verglichen.

3.2.2 Kultivierung von Organismen

3.2.2.1 Bakterienzellkultur

Aufzucht auf Platten

Die Bakterienzellen wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tetracyclin, IPTG und X-Gal über Nacht bei 37°C kultiviert.

Aufzucht in Flüssigkultur

Die Bakterienzellen wurden in LB-Medium mit Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. mit Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Gentamycin (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Tetracyclin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) über Nacht bei 37°C und 150 rpm (Schüttler) kultiviert.

Bestimmung der Bakterienzellzahl (OD₆₀₀ Messung)

Die Zellzahl wurde spektrometrisch bei 600 nm gegen LB-Medium als Leerwert bestimmt.

3.2.2.2 Insektenzellkultur

Die Kultivierung und Transfektion der *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Insektenzellen erfolgte nach den Vorgaben des Bac-to-Bac[®]-Kits. Es wurden aber einige Anpassungen vorgenommen

3.2.2.3 Aufzucht der Insektenzellen

Ein Kryoröhrchen mit 2×10^7 Sf9-Insektenzellen wurde dem Stickstoffbehälter entnommen und im Wasserbad bei 27°C erwärmt bis die Zellen vollständig aufgetaut waren. Das Röhrchen wurde von außen mit 70 %igem Ethanol abgerieben und die aufgetauten Zellen unter der Sterilbank in eine 25 cm² Zellkulturflasche mit 10 ml ebenfalls auf 27°C vorgewärmtem Medium vorsichtig überführt. Die vitalen Zellen sollten am Boden der Kulturflasche als Monolayer adhärieren. Nach 45 min Inkubationszeit bei 27°C wurde das Medium zusammen mit nicht anhaftenden Zellen abgenommen und durch frisches ebenfalls auf 27°C vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Kultur wurde wachsen gelassen, bis etwa eine 90 %ige Konfluenz erreicht wurde und die Kultur für eine Passagierung verwendet werden konnte.

3.2.2.4 Kultivierung von Monolayerkulturen

Die Kultivierung der Insektenzellen als adhärierende Monolayer erfolgte in Kulturflaschen verschiedener Größe bei 27°C. Erreichten die Zellen eine 90 %ige Konfluenz, so wurde das Medium verworfen und durch neues ersetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Kulturflasche abgeschabt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Nach den Angaben in Tabelle 10 (3.2.2.4) aufgeführten Angaben wurden dann Monolayer-/Suspensions-Kulturen angesät.

Tabelle 10: Zelldichten für das Ansähen verschiedener Monolayer.

Gefäß	Anzahl der Zellen	Volumen des Mediums
25 cm ² -Flasche	1×10^7	10 ml
75 cm ² -Flasche	3×10^7	20 ml
150 cm ² -Flasche	6×10^7	40 ml

Die Passagierung erfolgte bis Passage 30, dann wurden frische Zellen aus Stabilaten herangezogen (3.2.2.3).

3.2.2.5 Kultivierung von Suspensionskulturen

Für größere Zelldichten wurden aus Monolayern, welche mindestens zweimal passagiert worden waren, Suspensionskulturen mit einer minimalen Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml angesät, welche in einem Schüttler bei 90 rpm und 27°C inkubiert wurden. Diese Zellen wurden standardmäßig zwei mal die Woche auf 1×10^6 verdünnt. Es wurden die gleichen Kulturflaschen wie bei den Monolayerkulturen verwendet. Die Kulturflaschen wurden in einem Winkel von 90° in den Schüttler fixiert. Dabei war darauf zu achten, das Gefäßvolumen gegenüber dem Kulturvolumen genügend groß zu wählen, um eine gute Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten. Es wurden keine Kulturen angesetzt die größer als 150 ml waren.

3.2.2.6 Herstellung von Stabilaten

Regelmäßig wurden Zellen niedriger Passage als Stabilate eingefroren um genügend frische Zellen als Reserve zur Verfügung zu haben. Dazu wurde eine vitale Suspensionskultur ausgezählt, abzentrifugiert und mit frischem Medium auf eine Dichte von 4×10^7 gebracht. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem Medium, welches 20 v/v% DMSO enthielt, gemischt. Von dieser Lösung wurden jeweils 1 ml in Kryoröhrchen gegeben und auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen für 12 h auf -20°C und dann über Nacht auf -70°C abgekühlt. Danach wurden die Stabilate für eine langzeit Lagerung bei -196°C aufbewahrt.

3.2.2.7 Transformation in DH10Bac-Zellen

Ein Eppendorfgefäß mit DH10Bac-Zellen (Invitrogen) wurden dem -80°C Kühlschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Es wurde dann 1 ng (entspricht 5 µl) der jeweiligen rekombinanten Plasmid-DNA dazugegeben und das Eppendorfgefäß zur Durchmischung

leicht angetippt. Anschließend wurde analog zu (3.2.1.9) verfahren. Der Ansatz wurde in zwei verschiedenen Verdünnungen 10^{-1} und 10^{-2} auf LB-Platten ausgestrichen und für mindestens 48 h bei 37°C inkubiert. Über Blau-Weiß-Selektion [Sambrook and Russell, 2001] wurden weiße Kolonien gewählt und Übernachtskulturen angesetzt. Die Bacmid-DNA wurde nach (3.2.1.7) isoliert.

3.2.2.8 Transfektion

Zur Transfektion wurden $5\ \mu\text{l}$ ($1\ \mu\text{g}$ DNA) der nach 3.2.1.7 gereinigten Bacmid-DNA in einem sterilen Eppendorfgefäß mit $100\ \mu\text{l}$ Medium verdünnt. In einem zweiten sterilen Eppendorfgefäß wurden $6\ \mu\text{l}$ einer vorher gut geschüttelten X-TremeGene HP DNA Transfection Reagent (Roche) in $100\ \mu\text{l}$ Medium verdünnt. Beide Ansätze wurden gemischt, invertiert und für mind. 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine 6-Well-Platte mit 2 ml einer Sf9-Suspensionskultur mit einer Dichte von 8×10^5 Zellen/ml pro Well angesät und 30 min gewartet, bis sich die Zellen angehaftet hatten. Am Ende der Inkubationszeit wurde der Lipofektionsansatz mit $800\ \mu\text{l}$ Medium versetzt und der Ansatz gegen das Medium in der 6-Well-Platte ausgetauscht. Dabei wurde mind. ein Well als Kontrolle mit regulärem ExCell-Kulturmedium versehen. Anschließend wurde die Platte für 5 h bei 27°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgezogen und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Die Platte wurde dann für mind. 96 h oder aber bis zu Anzeichen einer Infektion wie Wachstumsstopp, Zellschwellung oder Lyse der Zellen zu beobachten in Brutschrank inkubiert. Die Zellen im Kontrollwell sollten die gesamte Fläche zuwachsen, während sich bei den transfizierten Wells zunehmend Zellen ablösen und schließlich lysieren sollten.

3.2.2.9 Bestimmung des Virus-Titers nach der Ausverdünnungsmethode

Angelehnt an das Protokoll von Reed und Muench [Reed and Muench, 1938] wurden Insektenzellen mit verschiedenen Verdünnungen des jeweiligen Virus infiziert und diejenige Verdünnung ermittelt, welche in 50 % der Fälle zu einer Infektion führt, die so genannte TCID_{50} (50 % tissue-culture infection dose). Daraus lässt sich dann die Anzahl infektiöser Viruspartikel pro ml Virusüberstand (pfu/ml, plaque forming units pro ml) berechnen. Nachfolgend ist der Ablauf zu dem in Abb. 8 gezeigtem Pipettierschema beschrieben:

- Es wurden sechs Virusverdünnungen à 100 μl von 10^{-3} bis 10^{-8} angesetzt.
- Es wurden sieben Eppendorfgefäße mit jeweils 1,4 ml Sf9-Zellen der Dichte 5×10^4 Zellen/ml mit jeweils 70 μl einer Virusverdünnung angeimpft. Dabei wurde ein Eppendorfgefäß mit 70 μl Medium als negativ Kontrolle behandelt.
- Sieben Wells einer 96-Well-Platte wurden mit 200 μl der infizierten Zelllösung angesät.

Nach sieben Tagen Inkubationszeit bei 27°C wurden die Zellen ausgezählt und ausgewertet. Ein Beispiel für die Auswertung findet sich in Abb. 8. Für die jeweilige Verdünnung wurden infizierte (+) und nicht infizierte (-) Wells anhand der Morphologie (Zellschwellung, Lyse und Kristallbildung) und der Zelldichte bestimmt.

P3 Stx nach 7 Tagen								Verdünnung	infiziert	nichtinfiziert	%-infiziert
Kontrolle	+	+	+	+	+	+	+	10^{-3}	23	0	100%
Kontrolle	+	+	+	+	+	+	+	10^{-4}	16	0	100%
Kontrolle	+	+	-	+	+	-	+	10^{-5}	9	2	82%
Kontrolle	+	+	-	-	+	-	-	10^{-6}	4	6	40%
Kontrolle	-	+	-	-	-	-	-	10^{-7}	1	12	8%
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	10^{-8}	0	19	0%
PD									0,76		
TCID ₅₀									1,74E-06		
pfu/ml									3,98E+07		

Abbildung 8: Beispielrechnung

Zu den infizierten Kulturen einer Verdünnung wurden noch alle infizierten Wells der höheren Verdünnung hinzugezählt, unter der Annahme, dass die aktuelle Verdünnung diese Wells ebenfalls infiziert hätte. Umgekehrt gilt, dass für eine bestimmte Verdünnung die nicht infizierten Wells der niedrigeren Verdünnung durch die aktuelle Verdünnung ebenfalls nicht infiziert worden wären und damit zur Anzahl der direkt nicht infizierten Wells dieser Verdünnung addiert wurden.

Damit ergibt sich für das hier gezeigte Beispiel, dass bei einer Verdünnung von 10^{-6} drei Wells direkt infiziert sind. Es wurden aber auch ein Well der Verdünnung 10^{-7} infiziert und damit insgesamt vier positive Kulturen aufweist. Auf der anderen Seite gab es vier nicht-infizierte Kulturen zu denen zwei weitere der Verdünnung 10^{-5} gezählt werden also insgesamt sechs nicht infizierte Kulturen.

Anhand der sich ergebenden Prozentzahlen der infizierten Kulturen, lässt sich diejenige Verdünnung bestimmen, bei der 50 % aller Kulturen infiziert worden wäre. Im Beispiel liegt diese zwischen 10^{-5} (A) und 10^{-6} (B). Zunächst wird der PD (proportionale Distanz) zwischen der 50%-Infektionsstärke un der Infektionsstärke bei Verdünnung A nach der Gleichung 1

$$PD = \frac{(\%beiA - 50)}{\%beiA - \%beiB} \quad (1)$$

bestimmt. Mit diesem Wert lässt sich die $TCID_{50}$ bestimmen.

$$TCID_{50} = 10^{\text{Verdünnung bei A} - PD} \quad (2)$$

im Beispiel ist das

$$TCID_{50} = 10^{-5-0,76} = 10^{-5,76} = 1,74 \times 10^{-6} \quad (3)$$

Anschließend lässt sich der Virus-Titer nach Formel vier bestimmen:

$$\text{Virus - Titer(pfu/ml)} = \frac{1}{TCID_{50}} \times \ln(2) \times 100 = 3,98 \times 10^7 \text{ pfu/ml} \quad (4)$$

Da $10 \mu\text{l}$ des Original-Virenstocks eingesetzt wurden muss mit 100 multipliziert werden um auf 1 ml zu kommen. Der Virus-Titer geht in die Berechnung der MOI (multiplicity of infection) ein, welche reproduzierbare Infektionen ermöglicht. Nach der Bestimmung des Virus-Titers, wurden die Viruskonzentrationen auf 2×10^7 pfu/ml verdünnt.

3.2.3 Allgemein proteinchemische Methoden

3.2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Angelehnt an das Protokoll von [Bradford, 1976] wurde die Proteinkonzentration annäherungsweise bestimmt. Zunächst wurde mit Hilfe einer $0,2 \text{ mg/ml}$ BSA Stammlösung

verschiedene Verdünnung für eine Standard-Kurve erstellt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Bradford Standards.

Proteinmenge [μg]	Stammlösung [μl]	dH ₂ O [μl]
2	10	790
4	20	780
6	30	770
8	40	760
10	50	750

Die Standardproben wurden doppelt angesetzt und mit 200 μl Bradford-Reagenz versetzt und anschließend gut gemischt und fünf min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Leerprobe wurden 800 μl dH₂O und 200 μl Bradford-Reagenz vorbereitet. Im Anschluss wurden die Probe mit dem GeneQuant Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen und mit dem Programm "Bradford" über Regression eine Standardkurve erstellt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurden von dieser ebenfalls ein definiertes Volumen auf 800 μl ergänzt und mit 200 μl Bradford-Reagenz versetzt. Nach fünf min wurde dann die Absorption bei 600 nm gemessen und anhand der entsprechenden Standard-Kurve die Konzentration bestimmt. Alternativ wurde die Proteinkonzentration mit dem ND-1000 NanoDrop fotometrisch bestimmt.

3.2.3.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE erfolgte in einer Gelapparatur von Hoefer mighty small nach der Methode von [Laemmli, 1970]. Je nach Größe des Proteins wurde ein bestimmter prozentualer Anteil (10 %, 12 % und 15 %) an Acrylamid verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist am Beispiel eines 5 %igen Sammelgels und eines 10 %igen Trenngels unter aufgeführt. Die Geldicke betrug 0,75 mm. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel in reduzierendem Probenpuffer für fünf min bei 100°C erhitzt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden käufliche Standardprotein-Lösungen als Marker mit aufgetragen. Die Gele wurden unter Wasserkühlung bei einer maximalen Spannung von 160 V und einer konstanten Stromstärke von 10 mA pro Gel für etwa 2 h laufen gelassen. Im Anschluss wurden die Gele für eine Coomassie- oder Silberfärbung bzw. direkt für einen Western Blot verwendet.

3.2.3.3 Coomassie-Färbung

Nach der Auftrennung der Proteine wurde das Sammelgel vom Gel entfernt und das verbleibende Trenngel mit der Coomassie-Färbelösung für 1 h auf einem Schüttler (90 rpm) bei Raumtemperatur gefärbt. Zur Entfärbung wurde das Geld für 1 h in Entfärbelösung inkubiert.

3.2.3.4 Silber-Färbung

Die Silberfärbung von SDS-Gelen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 12: Silberfärbung-Protokoll.

	Vorgang	Lösung	Dauer
1	Fixieren	Fixierlösung	mind. 10 min
2	Waschen	50 % Ethanol	3 × 10 min
3	Imprägnierung	Imprägnierlösung	3 min
4	Waschen	Wasser (bidest.)	3 × 1 min
5	Silber-Färbung	Silbernitratlösung	20 min (im Dunkeln)
6	Waschen	Wasser (bidest.)	2 min
7	Entwickeln	Entwicklungslösung	variabel
8	Waschen	Wasser (bidest.)	2 × 2 min
9	Stoppen	Stopplösung	10 min
10	Waschen	50 % Ethanol	20 min

3.2.3.5 Trocknung des Gels

Zwei Einmachfolien wurden für fünf min in Geltrocknungslösung gelegt. Das Gel wurde zwischen die Folien positioniert und in einem Rahmen eingespannt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den Einmachfolien waren. Die Trocknung erfolgte über Nacht im Abzug.

3.2.3.6 Western Blot

Die Proteinproben wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und direkt im Anschluss mit einem Semi-Dry Apparat geblottet. Das Gel wurde kurz in Transferpuffer (3.1.9.4) ge-

taucht und auf eine Nitrozellulose-Membran (GE Healthcare, Dornstadt) gebracht, welche auf drei Lagen Whatman Blotting Papier lagt, die sich auf der Anoden-Platte befand. Darüber wurden ebenfalls drei Lagen Whatman Blotting Papier gebracht und schließlich die Kathoden-Platte aufgelegt. Das Whatman Blotting Papier und die Nitrozellulose-Membran wurden fünf min in Transferpuffer inkubiert. Beim Aufbau des Stapels wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten verbleiben. Es wurde eine Spannung von maximal 20 V und ein konstanter Strom von 400 mA für 1 h angelegt. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 10 % Milchpulver (2×PBS) blockiert. Im Anschluss wurde wie in Tabelle 13 beschrieben verfahren

Tabelle 13: Entwicklung Western Blot.

Schritt	Lösung	Inkubationszeit
Waschen	Waschpuffer	5 × 5 min
Primärer Antikörper	Antikörper	1 h
Waschen	Waschpuffer	5 × 5 min
Sekundärer Antikörper	Anti-rabbit IgG	1 h
	Alkalische Phosphatase in TBS 1:10000	
Waschen	Waschpuffer	5 × 5 min
Entwickeln	BCIP 0,38 mM in 100 % DMF, NBT 0,4 mM in 70 % DMF in 50 ml AP-Puffer	Visuelle Kontrolle
Stoppen	PBS	2 × 5 min

Der Blot wurde auf Whatman Blotting Papier getrocknet und dann eingescant.

3.2.4 *In vivo* Kristalle in Sf9 Insektenzellen

3.2.4.1 Isolierung der *in vivo* Kristalle

Die infizierten Sf9-Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Kulturgefäße entfernt und 10 min in kalten RIPA-Puffer lysiert. Durch Zentrifugation bei 200 ×g für 5 min wurden die Zellbestandteile abgetrennt. Der Überstand wurde dann für 10 min bei 10000 ×g zentrifugiert. Das Pallet wurde dann in PBS resuspendiert und auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen. Der Saccharose-Gradient setzt sich zusammen aus 4 ml 2,5 M Saccharose und 4 ml 1 M Saccharose. Anschließend wurden für 1 h bei 4°C

und $3000 \times g$ zentrifugiert. Danach wurde geprüft, wo sich Kristalle befanden und diese Bereiche wurden abgenommen und mittels eines 10 kDa-cutoff Zentrifugensatzes konzentriert.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahlkriterien für Proteine

Aufbauend auf den Ergebnissen von [Koopmann, 2010] wurde untersucht, ob weitere Proteine *in vivo* Kristalle bilden können. Dazu wurden acht Proteine in Sf9 Insektenzellen exprimiert. Diese Proteine wurden gezielt ausgewählt. Das erste Protein, das in Betracht gezogen wurde *in vivo* Kristalle zu bilden, war Lysozym. Lysozym ist ein Modell für Proteinkristallisation [Durbin and Feher, 1986] und daher ideal, um es für die *in vivo* Kristallisation heranzuziehen. Da das trypanosomale Cathepsin B hervorragend *in vivo* kristallisiert [Koopmann et al., 2012] liegt die Vermutung nahe, dass auch Cathepsin B aus anderen Organismen *in vivo* Kristalle bilden könnte. Daher wurde das humane Cathepsin B kloniert und in Sf9 Insektenzellen exprimiert um es auf seine Fähigkeit *in vivo* Kristalle bilden zu können zu untersuchen. Acriflavin resistance protein b (AcrB) kristallisiert sogar noch in einer Lösung die nur zu 5% aus diesem Protein besteht [Vesler et al., 2008]. Daher war dies ein sehr interessantes Protein für einen Versuch der *in vivo* Kristallisation. Um ein möglichst breites Spektrum an Proteinen zu untersuchen, wurde mit Myoglobin ein globuläres Protein [Fändrich et al., 2001] für den Versuch einer *in vivo* Kristallisation ausgewählt. Bevor VSG auf einen GPI-Anker übertragen wird, wird es als Membranprotein mit einer Transmembrandomäne (TMD) gebildet [Ferguson et al., 1986]. Es war darum interessant zu untersuchen, ob dieses Protein auch in Insektenzellen von der TMD abgetrennt und anschließend auf einen GPI-Anker übertragen wird. In früheren Arbeiten konnten von diesem Protein schon Nanokristalle *in vivo* beobachtet werden [Roccor, 2011]. Die bisher beobachteten *in vivo* Kristalle waren stäbchenförmig [Koopmann, 2010]. Tubulin ist ein Protein das längliche Mikrotubuli bildet [Moor, 1967]. Daher war dies ein Protein, das mit großer Wahrscheinlichkeit *in vivo* Kristalle bilden konnte und wurde so in dieser Arbeit verwendet. Außerdem wurden noch zwei Proteine untersucht, die bereits *in vivo* Kristalle gebildet haben [Koopmann et al., 2012]. Die trypanosomalen Protein TbCatB und TbIMPDH wurden in gekürzten Versionen in Insektenzellen exprimiert. Dabei wurde TbCatB ohne das Propeptid aber mit dem Signalpeptid in Sf9 Insektenzellen exprimiert, während von TbIMPDH eine um neun Aminosäuren gekürzte Version in den Insektenzellen exprimiert wurde. Ziel dieser

Experimente war, eine Analyse, wie groß der Einfluss der Struktur und der Sequenz auf die Fähigkeit der Proteine ist, *in vivo* Kristalle bilden zu können.

Nachfolgend wird beschrieben, wie die genannten Proteine kloniert, in Sf9 Insektzellen exprimiert und dann, wenn *in vivo* Kristalle entstanden sind, diese isoliert wurden.

4.2 Klonierungsstrategien

In dem meisten Fällen wurde zunächst eine PCR durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde in einem Agarose-Gel (3.1.9.1) gereinigt, dann aus dem Gel isoliert (3.2.1.3) und anschließend für eine Clonejet-Subklonierung nach Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurde das isolierte Plasmid sequenziert (3.2.1.12). Das sequenzierte Genfragment wurde mit Restriktionsenzymen aus dem pJET1.2 Vektor ausgeschnitten und über Gelextraktion (3.2.1.3) gereinigt.

Anschließend wurden im Verhältnis 3:1 von Fragment zu Plasmid eine Ligation nach 3.2.1.8 durchgeführt und so das Gen in die Vektoren pFastBac 1 und pFastBac HTb ligiert. Vom Ligationosansatz wurden 5 μl für eine Transformation (3.2.1.9) in kompetente Turbo-Zellen eingesetzt. Waren auf den ausgestrichenen Platten Kolonien gewachsen, wurden diese mittels Kolonie-PCR (3.2.1.1) auf den Einbau des Plasmid überprüft. Positive Plasmide konnten für die Transformation in DH10Bac-Zellen verwendet werden. Dazu wurde die Plasmid-DNA des rekombinanten pFastBac 1 und des pFastBac HTb für die Transformation in chemisch kompetente DH10Bac-Zellen eingesetzt (3.2.1.9). Nach dem Protokoll für Bacmid-DNA-Isolierung (3.2.1.7) wurde die Bacmid-DNA einer transformierten Kolonie gewonnen. Mit Hilfe einer HotStarTaq PCR (3.2.1.1) wurde überprüft, ob das Gen erfolgreich über homologe Rekombination in das Bacmid eingeführt worden war. Dazu wurden M13 Primer (sense und antisense) sowie eine Annealing Temperatur von 56°C und eine Elongationszeit von 6 min verwendet.

4.3 Transfektion von Sf9-Zellen

Die isolierte DNA wurde für eine Transfektion nach 3.2.2.8 verwendet. Nach drei Tagen zeigten die transfizierten Zellen erste Anzeichen einer Infektion (Hemmung der Zellteilung, Zellschwellung). Aus den entsprechenden Wells wurden je 2 ml Medium entnommen, um damit 20 ml einer Monolayerkultur mit einer Zellkonzentration von 1×10^6 anzuimpfen. Der Überstand wurde nach fünf Tagen isoliert und der P2-Viren-Stock für

die Herstellung eines P3-Virenstocks benutzt. Dazu wurden 200 μl des Virenstocks genommen und erneut 20 ml einer Monolayerkultur infiziert. Nach weiteren fünf Tagen konnte der P3-Viren-Stock isoliert werden. Die Viren-Stocks wurden bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Für langzeitlagerungen wurde der Virenstock bei -80°C gelagert. Der Virus-Titer wurde nach 3.2.2.9 bestimmt und auf 2×10^7 verdünnt.

4.4 Auftreten von kristallartigen Strukturen während der Expression

Der P3-Virenstock wurde für eine Infektion unterschiedlich konfluenter Monolayerkultur von Sf9 Insektenzellen verwendet. Es hat sich herausgestellt, dass die besten Ergebnisse bei etwa 60 % konfluenter Monolayer erzielt werden konnte. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen MOI infiziert. Nach etwa 9 Tagen konnten in einigen Fällen erste stäbchenförmige Strukturen im Lichtmikroskop beobachtet werden. Im weiteren Verlauf werden diese Strukturen als Kristalle bezeichnet, sofern sie folgende Kriterien erfüllten.

4.4.1 Isolierung und Solubilisierung der Kristalle

Für weitere Untersuchungen der Kristalle wurden diese nach 3.2.4.1 isoliert. Durch die Waschschritte ließen sich ein Großteil der Zellbestandteile und viele lösliche Proteine abtrennen. Durch Waschen mit dest. Wasser und dialysieren konnte die Saccharose aus der Lösung entfernt werden. Auch in dest. Wasser waren die Kristalle stabil. Mit Kristall-solubilisierungspuffer (3.1.9.2) oder mit Natronlauge wurden die Kristalle resolubilisiert und mittels Western Blot und Massenspektrometrie untersucht.

4.5 Expression von Hühnereiweiß Lysozym unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle

Ein Protein, das in Betracht gezogen wurde, *in vivo* Kristalle zu bilden, war das Hühnereiweiß Lysozym. In der Genom-Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) findet sich das 387 bp lange Gen mit der Gene ID 396218. Dieses Gen wurde in Sf9 Insektenzellen exprimiert. Ein Plasmid mit der DNA von hen egg white lysozyme (HEWL) wurde bei addgene (<https://www.addgene.org/>) käuflich erworben.

4.5.1 Klonierung

Da die Plasmid-DNA mit der Sequenz für Lysozym aufgrund der Restriktionsschnittstellen nicht direkt für einen Verdau und anschließende Ligation in die Vektoren pFastBac 1

und pFastBac HTb verwendet werden konnte, wurde mit den Primern (3.1.6) eine PCR nach dem Protokoll für die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (3.2.1.1) mit einer Annealing Temperatur von 53°C und einer Elongationszeit von 90 sek durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde in einem Agarose-Gel (3.1.9.1) gereinigt (Abb. 9). Das Gen wurde wie eingangs beschrieben weiter kloniert und dann mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI verdaut. Anschließend wurde das Produkt per Gelextraktion gereinigt (Abb. 10).

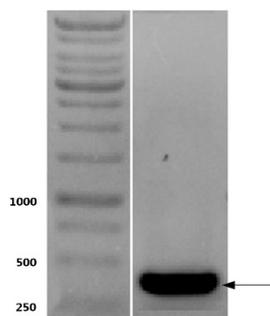


Abbildung 9: Agarosegel der PCR von Lysozym. Die Bande von Lysozym ist wie erwartet bei 387 bp zu sehen.

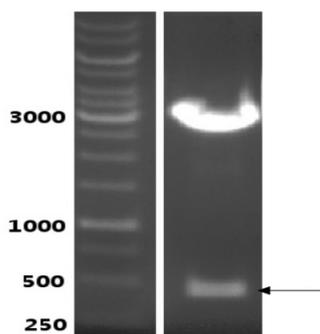


Abbildung 10: Verdau des Vektors pJet1.2-Lysozym mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI. Im Agarosegel haben die erwarteten Banden eine Größe von 2974 bp und 387 bp.

4.5.1.1 Ligation und Transformation

Nach der Reinigung im Gel und anschließender Ligation, konnte das Lysozym-Gen durch Transformation in DH10Bac-Zellen durch homologe Rekombination in das Bacmid eingeführt werden. Nach einer PCR waren im Agarosegel eine Bande bei 2687 bp (1) zu

sehen für Lysozym ohne His-Tag. Zwei weitere Banden (3 und 4) waren bei 2717 bp für Lysozym mit His-Tag zu erkennen (Abb. 11).

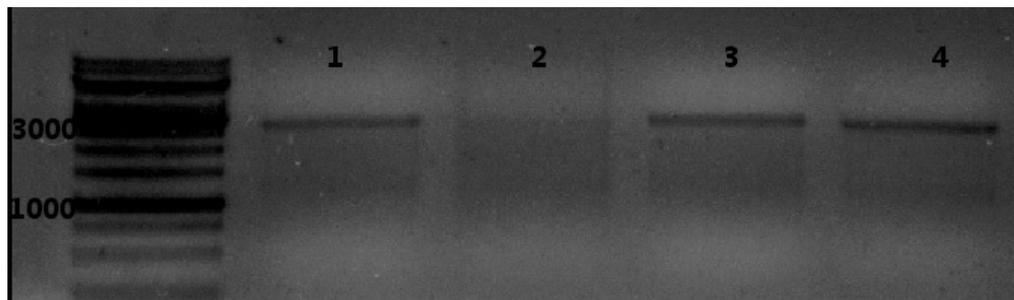


Abbildung 11: Agarosegel der PCR von Lysozym-Bacmid. Die erwartete Bande ist bei 2687bp zu sehen für Lysozym ohne His-Tag (1) und bei 2717bp für Lysozym mit His-Tag (3 und 4).

4.5.1.2 Transfektion in Sf9-Zellen

Die isolierte DNA wurde wie eingangs beschrieben für eine Transfektion verwendet. Anschließend wurde der P1-Virenstock isoliert und weiterverwendet um wie oben beschrieben einen P2- und P3-Virenstock herzustellen.

4.5.2 Auftreten von Kristallartigen Strukturen während der Expression

Der P3-Lysozym-Virenstock wurde für eine Infektion einer etwa 60 % konfluenten Monolayerkultur von Sf9 Insektenzellen verwendet. Dazu wurden die Zellen mit einer MOI von 0,025 pfu/Zelle infiziert. Nach etwa 9 Tagen konnten erste stäbchenförmige Strukturen im Lichtmikroskop beobachtet werden (Abb. 12). Die Lysozym-Kristalle hatten eine Länge von ca. 15 μm und einen Durchmesser von 0,5 - 0,8 μm .

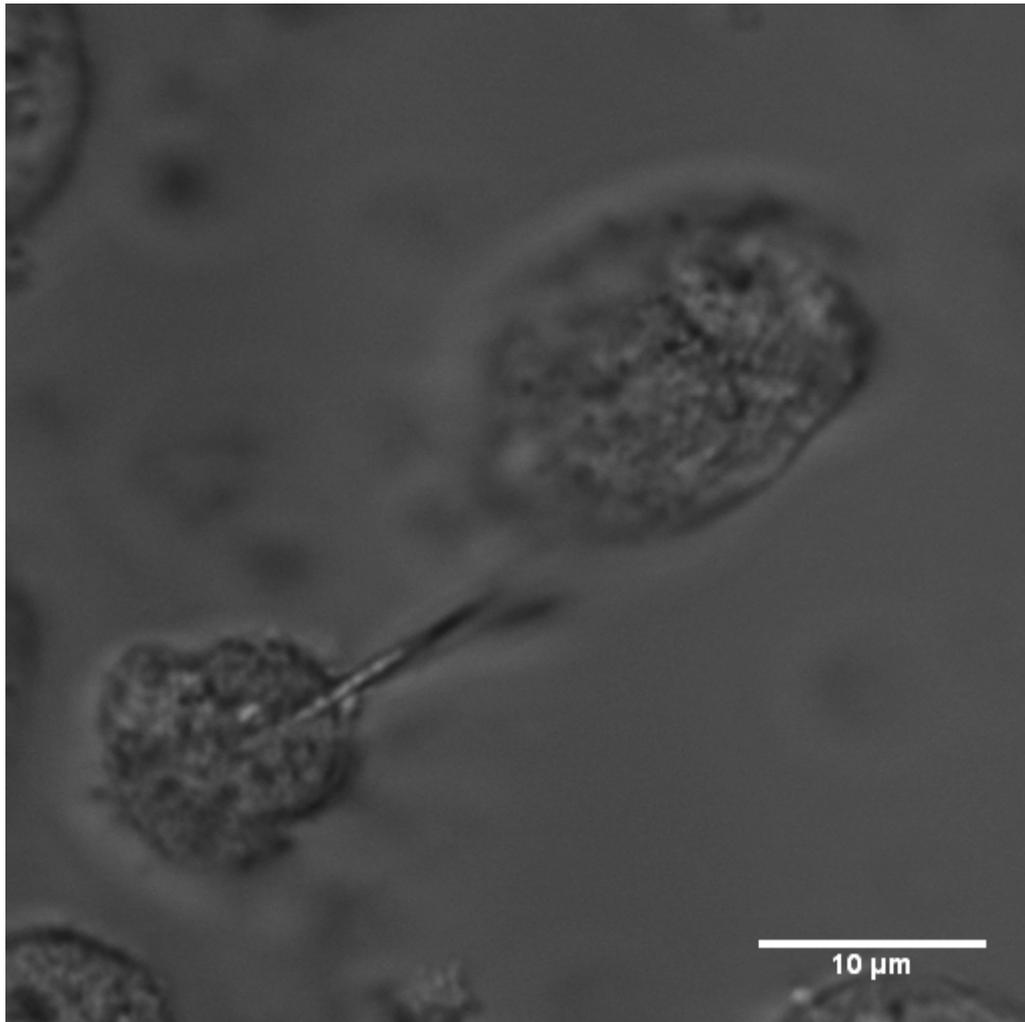


Abbildung 12: konfokalmikroskopische Aufnahme von einer mit Lysozym infizierten Sf9 Zellen nach 9 Tagen pi.

4.5.3 Isolierung und Solubilisierung der Kristalle

Die Kristalle wurden wie oben erwähnt isoliert und gereinigt. Es wurden jeweils 30 μ l einer Lösung mit etwa 2×10^6 Kristalle/ml solubilisiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen und aus diesen dann nach einer Silber- bzw. Coomassie-Färbung aus dem Gel ausgeschnitten und für eine weitere Massenspektrometrische Untersuchung verwendet. Alternativ konnte das Gel auch für einen Western-Blot verwendet werden.

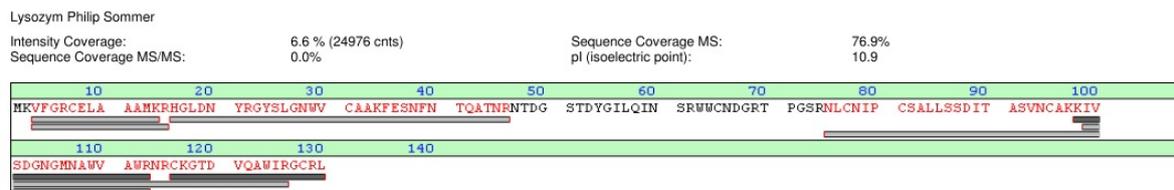


Abbildung 13: Sequenz von Hühnereiweiß Lysozym. Graue Balken: Durch MALDI-TOF detektierte Peptide nach Trypsin-Verdau. Rot: abgedeckte Sequenzen (76,9 %) durch die gefundenen Peptide.

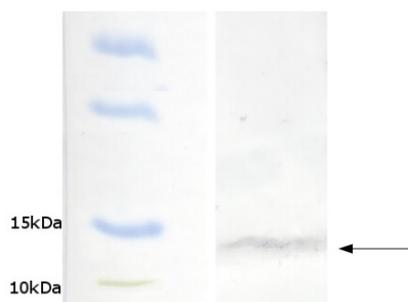


Abbildung 14: Western Blot resolubilierter Lysozym-Kristalle. Eine Bande ist bei etwa 14 kDa zu sehen.

4.6 Expression von humanem Catheptin B

Ein weiteres Protein, das in Betracht gezogen wurde, *in vivo* Kristalle zu bilden, war das humane Cathepsin B (HsCatB). In der Genom-Datenbank von NCBI findet sich das auf Chromosom 8 liegende, 1020 bp lange Gen mit der Gene ID: 1508. Ein Plasmid mit der DNA von HsCatB wurde bei addgene (<https://www.addgene.org/>) käuflich erworben.

4.6.1 Klonierung

Da die Plasmid-DNA mit der Sequenz für HsCatB aufgrund der Restriktionsschnittstellen nicht direkt für einen Verdau und anschließende Ligation in den Vektor pFastBac 1 verwendet werden konnte, wurde mit den Primern (3.1.6) eine PCR nach dem Protokoll für die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (3.2.1.1) mit einer Annealing Temperatur von 53°C und einer Elongationszeit von 2 min durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde aus einem Agarose-Gel (3.1.9.1) gereinigt (Abb. 15). Das Gen wurde wie eingangs beschrieben weiter kloniert und dann mit den Restriktionsenzymen BamHI und

XhoI verdaut. Anschließend wurde das Produkt per Gelextraktion aus einem Agarosegel gereinigt (Abb. 16).

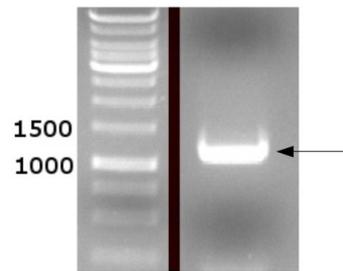


Abbildung 15: Agarosegel der PCR von HsCatB. Die erwartete Bande hat eine Größe von 1020 bp.

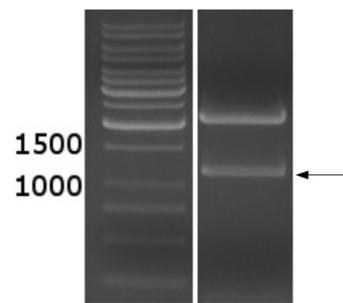


Abbildung 16: Verdau des Vektors pJet1.2-HsCatB mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI. Die erwarteten Banden haben eine Größe von 2974 bp und 1020 bp.

4.6.1.1 Ligation und Transformation

Nach der Reinigung der DNA aus dem Gel und anschließender Ligation, konnte das HsCatB-Gen durch Transformation in DH10Bac-Zellen durch homologe Rekombination in das Bacmid eingeführt werden. Nach einer PCR waren im Agarosegel eine Bande bei 3320 bp zu sehen (Abb. 17).

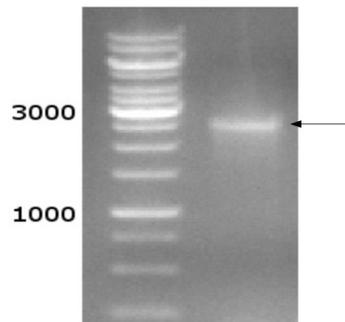


Abbildung 17: Agarosegel der PCR von HsCatB-Bacmid. Die erwartete Bande hat eine Größe von 3320 bp.

4.6.2 Transfektion in Sf9-Zellen

Die isolierte DNA wurde wie eingangs beschrieben für eine Transfektion verwendet. Anschließend wurde der P1-Virenstock isoliert und weiterverwendet um wie oben beschrieben einen P2- und P3-Virenstock herzustellen.

Für eine Identifikation von HsCatB wurde das Protein in Insektenzellen exprimiert und anschließend aus den Sf9 Zellen mit I-PER Insect Cell Protein Extraction Reagent nach Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend wurde HsCatB mittels Western Blot und Massenspektrometrie identifiziert.



Abbildung 18: Western Blot von HsCatB isoliert aus Insektenzellen.

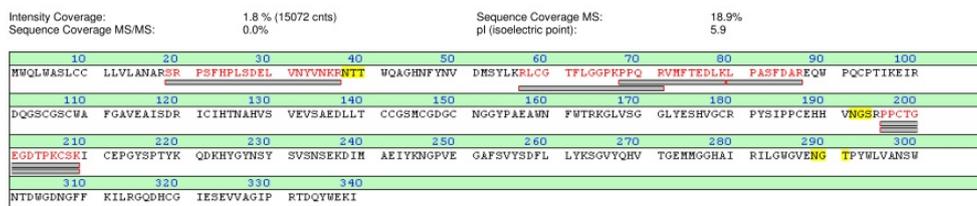


Abbildung 19: Sequenz von HsCatB. Graue Balken: Durch MALDI-TOF detektierte Peptide nach Trypsin-Verdau. Rot: abgedeckte Sequenzen (18,9 %) durch die gefundenen Peptide. Gelb: Potentielle Glycosylierungstellen.

4.7 Expression von acriflavin resistance protein b unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle

In der Genom-Datenbank von ecogene (<http://www.ecogene.org/refseq/refseq/genomes>) findet sich das 3168 bp lange Gen mit der Gene ID 5776365. Die DNA wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Peschel zur Verfügung gestellt. Dieses Gen wurde in Sf9 Insektenzellen exprimiert.

4.7.1 Klonierung

Für die Expression von acriflavin resistance protein b aus *Staphylococcus aureus* (Sa-crB) in Sf9 Insektenzellen, wurden die unter 3.1.6 genannten Primer für eine Phusion-High-Fidelity-PCR 3.2.1.1 mit einer Annealing Temperatur von 53°C und einer Elongationszeit von 4 min verwendet. Anschließend wurde der PCR-Ansatz in einem Agarose-Gel (3.1.9.1) gereinigt (Abb. 17) dann aus dem Gel isoliert (3.2.1.3) und danach für eine Clonejet-Subklonierung nach Angaben des Herstellers verwendet. Danach wurde das isolierte Plasmid sequenziert (3.2.1.12). Das sequenzierte Genfragment wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII aus dem pJET1.2 Vektor ausgeschnitten und über Gelextraktion gereinigt (Abb. 20)

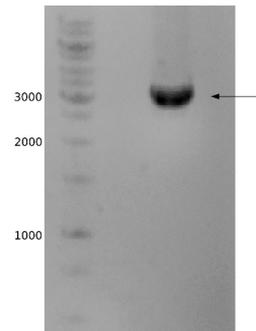


Abbildung 20: Agarosegel der PCR von SaAcrB. Die erwartete Bande hat eine Größe von 3168 bp.

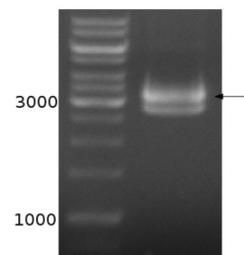


Abbildung 21: Verdau des Vektors pJet1.2-SaAcrB mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII. Die erwarteten Banden sind bei 2974 bp und 3168 bp zu sehen.

4.7.1.1 Ligation und Transformation

Nach der Reinigung im Gel und anschließender Ligation, konnte das SaAcrB-Gen durch Transformation in DH10Bac-Zellen durch homologe Rekombination in das Bacmid eingeführt werden. Nach einer PCR waren im Agarosegel eine Bande bei 5468 bp (1) zu sehen für SaAcrB ohne His-Tag. Eine weitere Bande (2) war bei 5598 bp für SaAcrB mit His-Tag zu erkennen (Abb. 22).

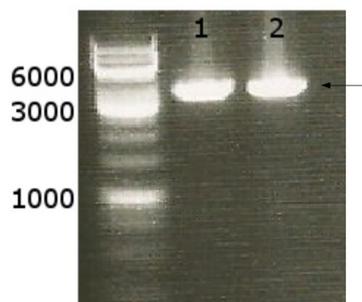


Abbildung 22: Agarosegel der PCR von SaAcrB-Bacmid. Die erwarteten Banden haben eine Größe von 5468 (1) und 5598 (2).

4.7.2 Transfektion in Sf9-Zellen

Die isolierte DNA wurde wie eingangs beschrieben für eine Transfektion verwendet. Anschließend wurde der P1-Virenstock isoliert und weiterverwendet um wie oben beschrieben einen P2- und P3-Virenstock herzustellen.

4.7.2.1 Auftreten von Kristallartigen Strukturen während der Expression

Der P3-SaAcrB-Virenstock wurde für eine Infektion einer etwa 60 % konfluenten Monolayerkultur von Sf9 Insektenzellen verwendet. Dazu wurden die Zellen mit einer MOI von 0,025 pfu/Zelle infiziert. Die MOI wurde wie bei [Koopmann, 2010] niedrig gewählt um die Möglichkeit der Kristallbildung zu optimieren. Nach etwa 9 Tagen konnten erste stäbchenförmige Strukturen im Lichtmikroskop beobachtet werden (Abb. 23). Im weiteren Verlauf werden diese Strukturen als Kristalle bezeichnet. Die AcrB-Kristalle haben eine Länge von bis zu 35 μm und einen Durchmesser von 1 - 1,5 μm .

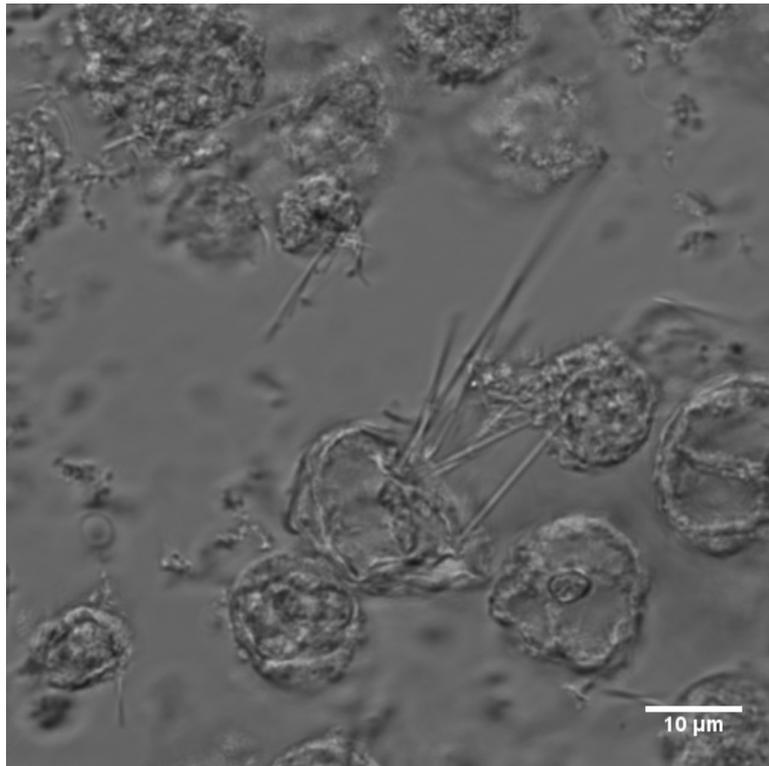


Abbildung 23: Konfokalmikroskopische Aufnahme von einer mit SaAcrB infizierten Sf9 Zellen nach 9 Tagen pi.

4.7.3 Isolierung und Solubilisierung der Kristalle

Die Kristalle wurden wie oben erwähnt isoliert und gereinigt. Es wurden jeweils 30 µl einer Lösung mit etwa $2,5 \times 10^6$ Kristalle/ml durch 10 M Natronlauge solubilisiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen und dann für einen Western-Blot verwendet.

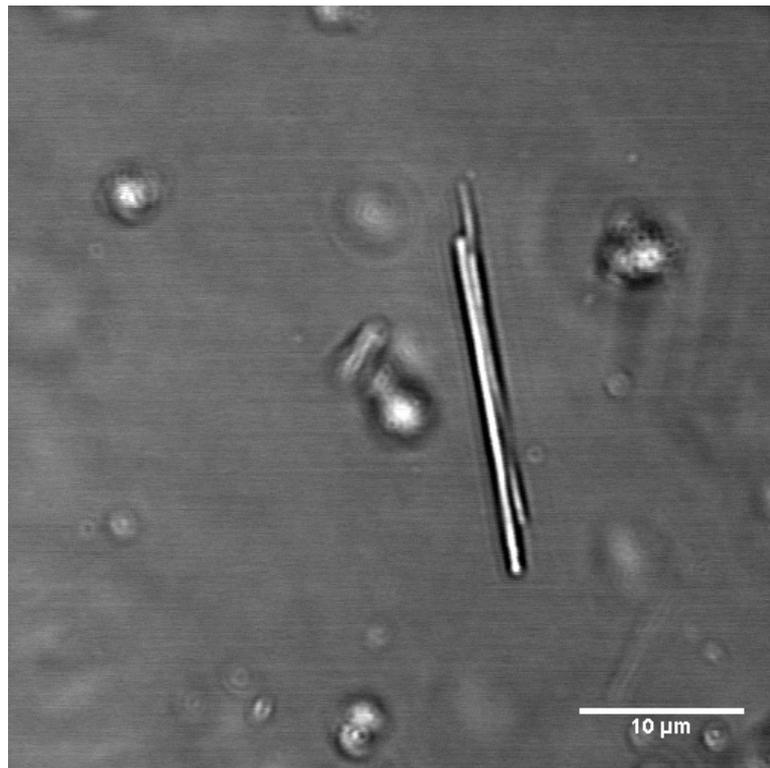


Abbildung 24: konfokalmikroskopische Aufnahme isolierter SaAcrB Kristalle.

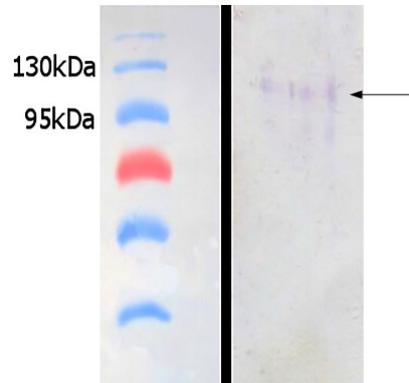


Abbildung 25: Western Blot resolubilisierte SaAcrB Kristalle. Eine Bande bei etwa 115 kDa ist zu sehen.

4.8 Expression von Pottwahl Myoglobin

Ein weiteres Protein, dass in Betracht gezogen wurde, *in vivo* Kristalle zu bilden, war das Myoglobin aus dem Pottwal (*Physeter macrocephalus*). In der Genom-Datenbank

von NCBI findet sich das 507 bp lange Gen mit der Gene ID: 102975021. Ein Plasmid mit der DNA von Myoglobin wurde bei addgene (<https://www.addgene.org/>) käuflich erworben.

4.8.1 Klonierung

Das von addgene erhaltene Plasmid konnte direkt mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI verdaut (Abb.26) und dann das Myoglobin-Gen in die Vektoren pFastBac 1 und pFastBac HTb ligiert werden. Dazu wurde im Verhältnis 3:1 von Fragment zu Plasmid eine Ligation nach 3.2.1.8 durchgeführt und so das Gen in die Vektoren pFastBac 1 und pFastBac HTb ligiert.

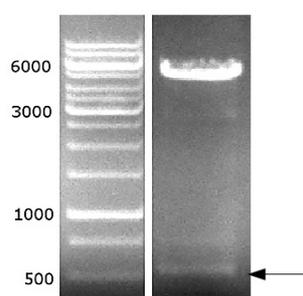


Abbildung 26: Verdau des Vektors pUC19-Myoglobin mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI. Die erwarteten Banden sind bei 5646 bp und 507 bp zu sehen.

4.8.1.1 Transformation

Nach der Reinigung im Gel und anschließender Ligation, konnte das Myoglobin-Gen durch Transformation in DH10Bac-Zellen durch homologe Rekombination in das Bacmid eingeführt werden. Nach einer PCR waren im Agarosegel eine Bande bei 2807 bp (2) zu sehen für Myoglobin ohne His-Tag. Eine weitere Banden (1) war bei 2937 bp für Myoglobin mit His-Tag zu erkennen (Abb. 27).

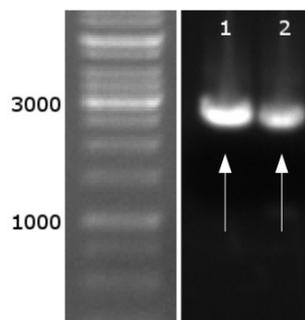


Abbildung 27: Agarosegel der PCR von Myoglobin-Bacmid. Die erwarteten Banden haben eine Größe von 2937 bp (1) und 2807 bp (2).

4.8.2 Transfektion in Sf9-Zellen

Die isolierte DNA wurde wie eingangs beschrieben für eine Transfektion verwendet. Anschließend wurde der P1-Virenstock isoliert und weiterverwendet um wie oben beschrieben einen P2- und P3-Virenstock herzustellen.

4.8.2.1 Expression in Sf9 Insektenzellen

Der P3-Myoglobin-Virenstock wurde für eine Infektion einer etwa 60 % konfluenten Monolayerkultur von Sf9 Insektenzellen verwendet. Dazu wurden die Zellen mit verschiedener MOI infiziert. Es wurden jedoch keine kristallinen Strukturen beobachtet.

4.8.2.2 Identifikation von Myoglobin mittels Massenspektrometrie

Für eine Identifikation von Myoglobin wurde das Protein in Insektenzellen exprimiert und anschließend aus den Sf9 Zellen mit I-PER Insect Cell Protein Extraction Reagent nach Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend wurde Myoglobin mittels Massenspektrometrie identifiziert.

New sequence		Intensity Coverage: 3.0% (15614 cnts)		Sequence Coverage MS: 37.0%	
Sequence Coverage MS/MS: 0.0%				pI (isoelectric point): 9.3	
10	20	30	40	50	60
110	120	130	140	150	160

NVLSEGEWQL VLHVWAKVEA DVAGHGQDIL IRLFKSHPET LEKFDKFKHL KTEAEMKASE DLKKGVTVL TALGAILKKK GHHEELKPL AQSHATKHKI
 PIKYLEFISE AIIHVLHSRH PGDFGADAQG AMNKALELFR KDIAAKYKEL GYQG

Abbildung 28: Sequenz von Pottwahl Myoglobin. Graue Balken: Durch MALDI-TOF detektierte Peptide nach Trypsin-Verdau. Rot: abgedeckte Sequenzen (37 %) durch die gefundenen Peptide.

4.9 Expression von variant surface glycoprotein 221 unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle

Ein weiteres Protein, dass in Betracht gezogen wurde, *in vivo* Kristalle zu bilden, war das Variant Surface Glycoprotein 221 (TbVSG221) aus *Trypanosoma brucei*. In der Genom-Datenbank von uniprot (<http://www.uniprot.org>) findet sich das 1431 bp lange Gen mit der Gene ID P26332. Dieses Gen wurde in Sf9 Insektzellen exprimiert.

4.9.1 Klonierung

Für die Expression von Variant Surface Glycoprotein (TbVSG221) in Sf9 Insektzellen, wurden die unter 3.1.6 genannten Primer für eine Phusion-High-Fidelity-PCR 3.2.1.1 mit einer Annealing Temperatur von 53°C und einer Elongationszeit von 2 min verwendet. Anschließend wurde der PCR-Ansatz in einem Agarose-Gel (3.1.9.1) gereinigt (Abb. 29) dann wurde die Bande bei etwa 1431 bp aus dem Gel isoliert (3.2.1.3) und danach für eine Clonejet-Subklonierung nach Angaben des Herstellers verwendet. Danach wurde das isolierte Plasmid sequenziert (3.2.1.12). Das sequenzierte Genfragment wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI aus dem pJET1.2 Vektor ausgeschnitten und über Gelextraktion gereinigt (Abb.30).

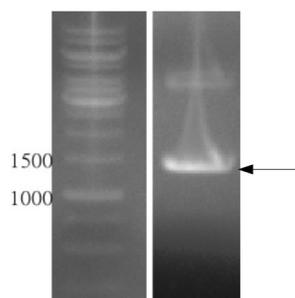


Abbildung 29: Agarosegel der PCR von TbVSG221. Die erwartete Bande hat eine Größe von 1431 bp.

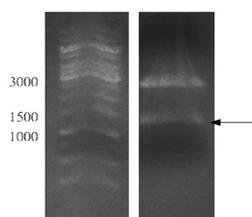


Abbildung 30: Verdau des Vektors pJet1.2-TbVSG221 mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI. Die erwarteten Banden haben eine Größe von 2974 bp und 1431 bp.

4.9.1.1 Ligation und Transformation

Nach der Reinigung im Gel und anschließender Ligation, konnte das TbVSG221-Gen durch Transformation in DH10Bac-Zellen durch homologe Rekombination in das Bacmid eingeführt werden. Nach einer PCR waren im Agarosegel eine Bande bei 2731 bp zu sehen (Abb. 31).

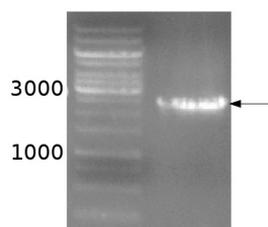


Abbildung 31: Agarosegel der PCR von TbVSG221-Bacmid. Die erwartete Bande hat eine Größe von 2731 bp.

4.9.2 Transfektion in Sf9-Zellen

Die isolierte DNA wurde wie eingangs beschrieben für eine Transfektion verwendet. Anschließend wurde der P1-Virenstock isoliert und weiterverwendet um wie oben beschrieben einen P2- und P3-Virenstock herzustellen.

4.9.3 Auftreten von Kristallartigen Strukturen während der Expression

Der P3-TbVSG221-Virenstock wurde für eine Infektion einer etwa 60 % konfluenten Monolayerkultur von Sf9 Insektenzellen verwendet. Dazu wurden die Zellen mit einer MOI von 0,025 pfu/Zelle infiziert. Die MOI wurde wie bei [Koopmann, 2010] niedrig gewählt um die Möglichkeit der Kristallbildung zu optimieren. Nach etwa 9 Tagen konnten erste stäbchenförmige Strukturen im Lichtmikroskop beobachtet werden (Abb. 32). Im weiteren Verlauf werden diese Strukturen als Kristalle bezeichnet. Die TbVSG221-Kristalle haben eine Länge von bis zu 30 μm und einen Durchmesser von 1 μm .

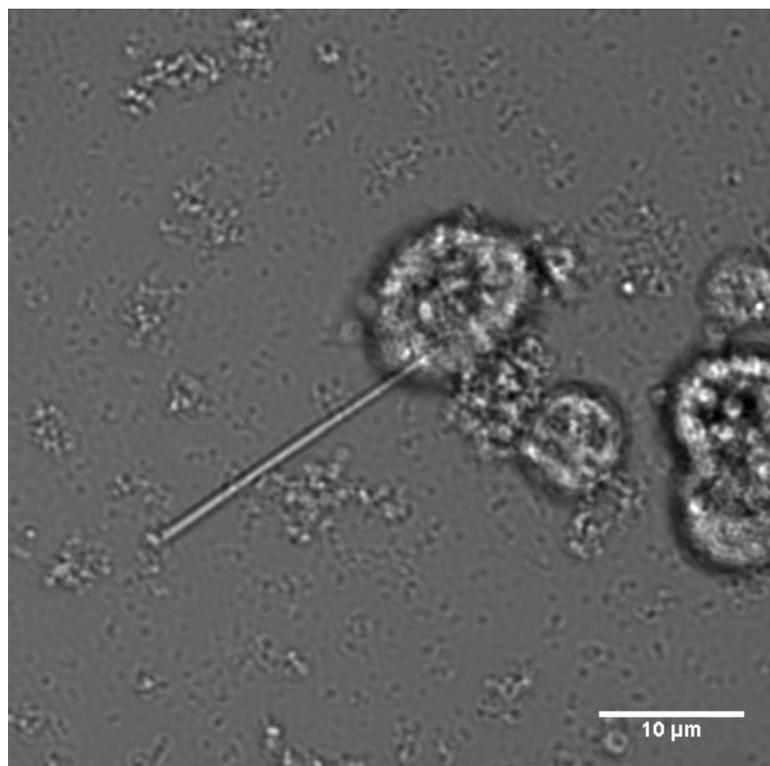


Abbildung 32: Konfokalmikroskopische Aufnahme von einer mit TbVSG221 infizierten Sf9 Zellen nach 9 Tagen pi.

4.9.4 Isolierung und Solubilisierung der Kristalle

Die Kristalle wurden wie oben erwähnt isoliert und gereinigt. Es wurden jeweils 30 μ l einer Lösung mit etwa $3,5 \times 10^6$ Kristalle/ml solubilisiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen und aus diesen dann nach einer Silber- bzw. Coomassie-Färbung aus dem Gel ausgeschnitten und für eine weitere Massenspektrometrische Untersuchung verwendet. Alternativ konnte das Gel auch für einen Western-Blot verwendet werden.

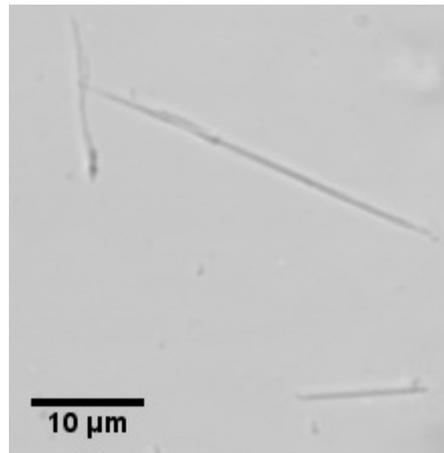


Abbildung 33: Konfokalmikroskopische Aufnahme von isolierten TbVSG221 Kristallen

VSG
Intensity Coverage: 9.0 % (63268 cnts)
Sequence Coverage MS/MS: 0.0%

Sequence Coverage MS: 45.6%
pI (isoelectric point): 6.9

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MPSNQEARLF	LAVLVLAQVL	PILVDSAAEK	GFRQAFWQPL	CVVSEELDDQ	PKGALFTLQA	AASKIQMRD	AALRASIIYAE	INHGTNRARA	AVIVANHYAM
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
RADSGLEALK	QTLSSQEVTA	TATASYLRGR	IDEYLNLLQ	TKESGTSQCH	MDTSGTIVT	KAGGTIGGVP	CKLQLSPIQP	KRPAATYLGK	AGYVGLTRQA
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
DAANNFHDND	AECRLASGHN	TNGLGKSGQL	SAAVTHAAGY	VTVANSQTAV	TVQALDALQE	ASGAHQPI	DAWKAKKALT	GAETAEPFRNE	TAGIAGRTGV
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
TKLVEEALLK	KKDSEASEIQ	TELKKYFSGH	ENEQWTAIEK	LISEQPVAQN	LVGDNQPTKL	GELEGNAKLT	TILAYYRMET	AGKFEVLTQK	HKPAESQQQA
410	420	430	440	450	460	470	480		
AETEGSCNKK	DQNECKSPCK	WHNDAENKCC	TLDKEEAKKV	ADETAKDGKT	GNTNITGSSN	SFVISKTPW	LAVLLF		

Abbildung 34: Sequenz von TbVSG221. Graue Balken: Durch MALDI-TOF detektierte Peptide nach Trypsin-Verdau. Rot: abgedeckte Sequenzen (45,6 %) durch die gefundenen Peptide. Gelb: Potentielle Glycosylierungsstellen.

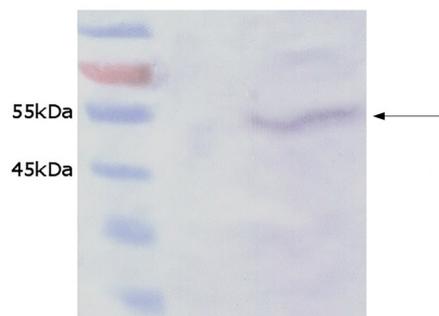


Abbildung 35: Western Blot resolubilisierte TbVSG221 Kristalle. Eine Bande bei etwa 55 kDa ist zu sehen.

4.10 Expression von TbTubulin unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle

Ein weiteres Protein, das in Betracht gezogen wurde, *in vivo* Kristalle zu bilden, ist α -Tubulin (TbTubulin) aus *Trypanosoma brucei*. In der Genom-Datenbank von Tritryp (<http://tritrypdb.org>) findet sich das 1356 bp lange Gen mit der Gene ID Tb427.01.2340. Dieses Gen wurde in Sf9 Insektenzellen exprimiert.

4.10.1 Klonierung

Für die Expression von TbTubulin in Sf9 Insektenzellen, wurden die unter 3.1.6 genannten Primer für eine Phusion-High-Fidelity-PCR 3.2.1.1 mit einer Annealing Temperatur von 53°C und einer Elongationszeit von 2 min verwendet. Anschließend wurde der PCR-Ansatz in einem Agarose-Gel (3.1.9.1) gereinigt (Abb. 36) dann wurde die Bande bei etwa 1356 bp aus dem Gel isoliert (3.2.1.3) und danach für eine Clonejet-Subklonierung nach Angaben des Herstellers verwendet. Danach wurde das isolierte Plasmid sequenziert (3.2.1.12). Das sequenzierte Genfragment wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII aus dem pJET1.2 Vektor ausgeschnitten und über Gelextraktion gereinigt (Abb.30).

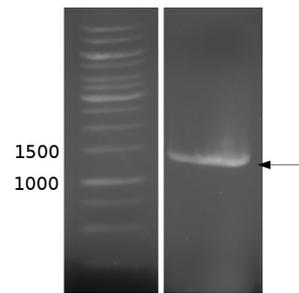


Abbildung 36: Agarosegel der PCR von TbTubulin. Die erwartete Bande hat eine Größe von 1356 bp.

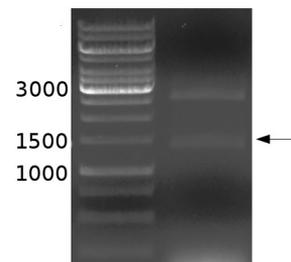


Abbildung 37: Verdau des Vektors pJet1.2-TbTubulin mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII. Die erwarteten Banden sind bei 2974 bp und 1356 bp zu sehen.

4.10.1.1 Ligation und Transformation

Nach der Reinigung im Gel und anschließender Ligation, konnte das TbTubulin-Gen durch Transformation in DH10Bac-Zellen durch homologe Rekombination in das Bacmid eingeführt werden. Nach einer PCR waren im Agarosegel eine Bande bei 3656 bp (1) zu sehen für TbTubulin ohne His-Tag. Eine weitere Bande (2) war bei 3786 bp für TbTubulin mit His-Tag zu erkennen (Abb. 38).

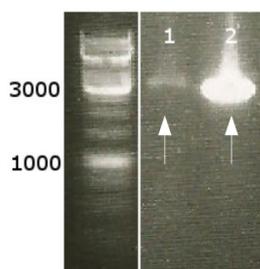


Abbildung 38: Agarosegel der PCR von TbTubulin-Bacmid. Die erwarteten Banden haben eine Größe von 3656 bp (1) und 3786 bp (2).

4.10.2 Transfektion in Sf9-Zellen

Die isolierte DNA wurde wie eingangs beschrieben für eine Transfektion verwendet. Anschließend wurde der P1-Virenstock isoliert und weiterverwendet um wie oben beschrieben einen P2- und P3-Virenstock herzustellen.

4.10.3 Auftreten von Kristallartigen Strukturen während der Expression

Der P3-TbTubulin-Virenstock wurde für eine Infektion einer etwa 60 % konfluenten Monolayerkultur von Sf9 Insektenzellen verwendet. Dazu wurden die Zellen mit einer MOI von 0,025 pfu/Zelle infiziert. Die MOI wurde wie bei [Koopmann, 2010] niedrig gewählt um die Möglichkeit der Kristallbildung zu optimieren. Nach etwa 9 Tagen konnten erste stäbchenförmige Strukturen im Lichtmikroskop beobachtet werden (Abb. 39). Im weiteren Verlauf werden diese Strukturen als Kristalle bezeichnet. Die TbTubulin-Kristalle haben eine Länge von bis zu 25 μm und einen Durchmesser von 1 μm .

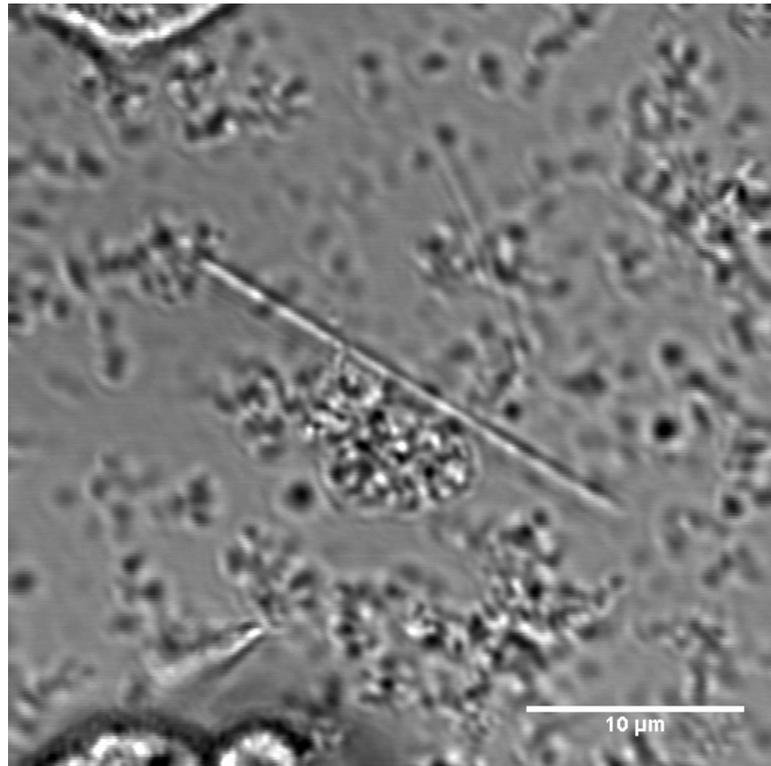


Abbildung 39: Konfokalmikroskopische Aufnahme einer mit TbTubulin infizierten Sf9 Zelle nach 9 Tagen pi.

4.10.4 Isolierung und Solubilisierung der Kristalle

Die Kristalle wurden wie oben erwähnt isoliert und gereinigt. Es wurden jeweils 30 µl einer Lösung mit etwa $2,5 \times 10^6$ Kristalle/ml solubilisiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen und aus diesen dann nach einer Silber- bzw. Coomassie-Färbung aus dem Gel ausgeschnitten und für eine weitere Massenspektrometrische Untersuchung verwendet. Alternativ konnte das Gel auch für einen Western-Blot verwendet werden.

Tubulin T brucei

Intensity Coverage: 8.0 % (40393 crnts)
Sequence Coverage MS/MS: 0.0%

Sequence Coverage MS: 30.8%
pI (isoelectric point): 4.8

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MREAICIHIG	QAGCQVGNAC	WELFCLEHGI	OPDGAMPSDK	TIGVEDDAFN	TFFSETGAGK	HVPRAVFLDL	EPTVVDEVRT	GTYROLFHPE	QLISGKEDAA
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
NNYARGHYTI	GKEIVDLCLD	RIRKLADNCT	GLQGFLVYHA	VGGGTGSLG	ALLLERLSVD	YGKSKLGYT	VYSPQVSTA	VVEPYNVLS	THSLEHTDV
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AAMLDNEAIY	DLTRRNLDIE	RPTYTNLNL	IGQVSSSLTA	SLRFDGALNV	DLTEFQTNLV	PYPRIHFVLT	SYAPVISA EK	AYHEQLSVSE	ISNAVFEPAS
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
NMTKCDPRHG	KYMACCLMYR	GDVVPKDVNA	AVATIKTKRT	IQFVDSPTG	FKCGINYQPP	TVVPGDLAK	VQRAVCHIAN	STAIAEVFAR	IDHKFDLMYS
410	420	430	440	450	460				
KRAFVHWVYG	EGMEEGFSE	AREDLAALEK	DYEEVGAESA	DMDGEEDVEE	Y				

Abbildung 40: Sequenz von TbTubulin. Graue Balken: Durch MALDI-TOF detektierte Peptide nach Trypsin-Verdau. Rot: abgedeckte Sequenzen (30,8 %) durch die gefundenen Peptide.

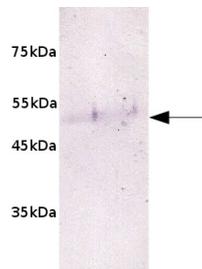


Abbildung 41: Western Blot resolubilisierte TbTubulin Kristalle. Eine Bande bei etwa 50 kDa ist zu sehen.

4.11 Expression von einer um neun Aminosäuren gekürzten Version von TbIMPDH

Von der IMPDH aus *Trypanosoma brucei* (TbIMPDH) gibt es zwei Varianten. Während die lange Form *in vivo* Kristalle in Sf9 Insektenzellen bildet, führt die Expression der am N-Terminus um 65 Aminosäuren kürzeren, aber sonst völlig identischen, kurzen Form nicht zur Kristallisation *in vivo*. Eine Betrachtung der Kristallstruktur legte die Vermutung nahe, dass die ersten neun Aminosäuren für die *in vivo* Kristallisation nicht erforderlich sind. Es sollte nun untersucht werden, ob eine Expression der um neun Aminosäuren gekürzte in Sf9 Insektenzellen zu *in vivo* Kristallen führt. Dazu wurde das in der in der Genom-Datenbank von tritryp (<http://tritrypdb.org>) mit der Gene ID Tbg972.10.19740 hinterlegte 1539 bp lange Gen so modifiziert, dass die ersten 27 Nukleotide in der PCR nicht vervielfältigt wurden. Anschließend wurde das Gen in Sf9 Insektenzellen exprimiert.

4.11.1 Klonierung

Für die Expression der gekürzten Version von TbIMPDH (TbIMPDH-9AS) in Sf9 Insektenzellen, wurden die unter 3.1.6 genannten Primer für eine Phusion-High-Fidelity-PCR 3.2.1.1 mit einer Annealing Temperatur von 53°C und einer Elongationszeit von 2 min verwendet. Anschließend wurde der PCR-Ansatz in einem Agarose-Gel (3.1.9.1) gereinigt (Abb. 42) dann wurde die Bande bei etwa 1512 bp aus dem Gel isoliert (3.2.1.3) und danach für eine Clonejet-Subklonierung nach Angaben des Herstellers verwendet. Danach wurde das isolierte Plasmid sequenziert (3.2.1.12). Das sequenzierte Genfragment wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI aus dem pJET1.2 Vektor ausgeschnitten und über Gelextraktion gereinigt (Abb. 43).

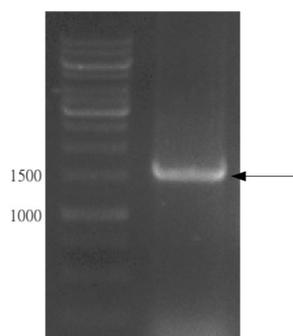


Abbildung 42: Agarosegel der PCR von IMPDH-9AS. Die erwartete Bande hat eine Größe von 1512 bp.

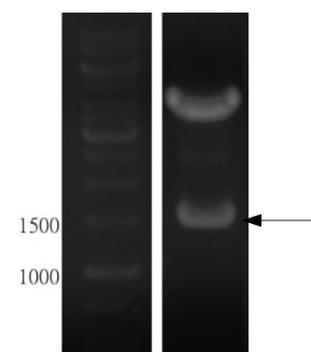


Abbildung 43: Verdau des Vektors pJet1.2-IMPDH-9AS mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI. Die erwarteten Banden sind bei 2974 bp und 1512 bp zu sehen.

4.11.1.1 Ligation und Transformation

Nach der Reinigung im Gel und anschließender Ligation, konnte das IMPDH-9AS-Gen durch Transformation in DH10Bac-Zellen durch homologe Rekombination in das Bacmid eingeführt werden. Nach einer PCR waren im Agarosegel eine Bande bei 3812 bp (1) zu sehen für IMPDH-9AS ohne His-Tag. Eine weitere Banden (2) war bei 3942 bp für IMPDH-9AS mit His-Tag zu erkennen (Abb. 44).

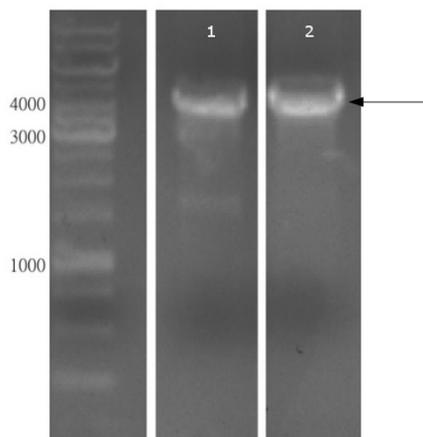


Abbildung 44: Agarosegel der PCR von IMPDH-9AS-Bacmid. Die erwarteten Banden haben eine Größe von 3812 bp (1) und 3942 bp (2).

4.11.2 Transfektion in Sf9-Zellen

Die isolierte DNA wurde wie eingangs beschrieben für eine Transfektion verwendet. Anschließend wurde der P1-Virenstock isoliert und weiterverwendet um wie oben beschrieben einen P2- und P3-Virenstock herzustellen.

4.11.2.1 Expression von IMPDH-9AS in Sf9 Insektenzellen

Der P3-IMPDH-9AS-Virenstock wurde für eine Infektion einer etwa 60 % konfluenten Monolayerkultur von Sf9 Insektenzellen verwendet. Dazu wurden die Zellen mit verschiedener MOI infiziert. Es wurden jedoch keine kristallinen Strukturen beobachtet.

4.11.2.2 Identifikation von IMPDH-9AS mittels Western Blot

Für eine Identifikation von IMPDH-9AS wurde das Protein in Insektenzellen exprimiert

und anschließend aus den Sf9 Zellen mit I-PER Insect Cell Protein Extraction Reagent nach Angaben des Herstellers isoliert. Danach wurde IMPDH-9As mittels Western Blot identifiziert.

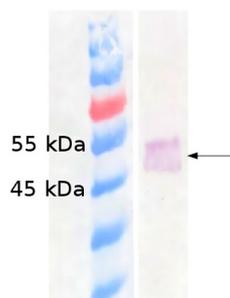


Abbildung 45: Western Blot von IMPDH-9AS. Eine Doppelbande bei etwa 55 kDa ist zu sehen.

4.12 Expression von TbCatB ohne Propeptid

Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression von TbCatB in Sf9 Insektenzellen zur Kristallisation *in vivo* führte. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob TbCatB auch ohne das Propeptid kristallisiert. Dazu wurde das in der Genom-Datenbank von *trityp* (<http://tritypdb.org>) hinterlegte, 1023 bp lange Gen mit der Gene ID Tb927.6.560, in der PCR so vervielfältigt, dass das Propeptid nicht mitkopiert wurde. Anschließend wurde das Protein in Sf9 Insektenzellen exprimiert.

4.12.1 Klonierung

Für die Expression von TbCatB ohne Propeptid (TbCatB-Prop) in Sf9 Insektenzellen, wurden die unter 3.1.6 genannten Primer für eine Phusion-High-Fidelity-PCR 3.2.1.1 mit einer Annealing Temperatur von 53°C und einer Elongationszeit von 2 min verwendet. Anschließend wurde der PCR-Ansatz in einem Agarose-Gel (3.1.9.1) gereinigt (Abb. 46) dann wurde die Bande bei etwa 810 bp aus dem Gel isoliert (3.2.1.3) und danach für eine Clonejet-Subklonierung nach Angaben des Herstellers verwendet. Danach wurde das isolierte Plasmid sequenziert (3.2.1.12). Das sequenzierte Genfragment wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI aus dem pJET1.2 Vektor ausgeschnitten und über Gelextraktion gereinigt (Abb. 47).

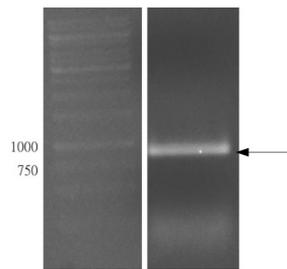


Abbildung 46: Agarosegel der PCR von TbCatB ohne Propeptid. Die erwartete Bande hat eine Größe von 810 bp.

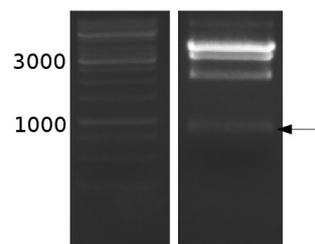


Abbildung 47: Verdau des Vektors pJet1.2-TbCatB-Prop mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI. Die erwarteten Banden sind bei 2974 bp und 810 bp zu sehen. Es sind weitere unerwartete Banden zu sehen, die nicht weiter untersucht wurden.

4.12.1.1 Ligation und Transformation

Nach der Reinigung im Gel und anschließender Ligation, konnte das TbCatB-Prop-Gen durch Transformation in DH10Bac-Zellen durch homologe Rekombination in das Bacmid eingeführt werden. Nach einer PCR waren im Agarosegel eine Bande bei 3110 bp zu sehen (Abb. 48).

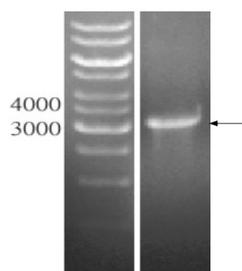


Abbildung 48: Agarosegel der PCR von TbCatB-Prop-Bacmid. Die erwartete Bande hat eine Größe von 3110 bp.

4.12.2 Transfektion in Sf9-Zellen

Die isolierte DNA wurde wie eingangs beschrieben für eine Transfektion verwendet. Anschließend wurde der P1-Virenstock isoliert und weiterverwendet um wie oben beschrieben einen P2- und P3-Virenstock herzustellen. Der Virus-Titer wurde nach 3.2.2.9 bestimmt ($6,2 \times 10^7$).

4.12.2.1 Expression von TbCatB-Prop in Sf9 Insektenzellen

Der P3-TbCatB-Prop-Virenstock wurde für eine Infektion einer etwa 60 % konfluenten Monolayerkultur von Sf9 Insektenzellen verwendet. Dazu wurden die Zellen mit verschiedener MOI infiziert. Es wurden jedoch keine kristallinen Strukturen beobachtet.

4.12.2.2 Identifikation von TbCatB-Prop mittels Western Blot

Für eine Identifikation von TbCatB-prop wurde das Protein in Insektenzellen exprimiert und anschließend aus den Sf9 Zellen mit I-PER Insect Cell Protein Extraction Reagent nach Angaben des Herstellers isoliert. Danach wurde TbCatB-Prop mittels Western-Blot identifiziert.

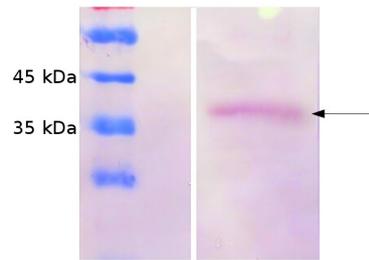


Abbildung 49: Western Blot von TbCatB-Prop

4.13 Zusammenfassung

Hier sollen die Ergebnisse nochmal zusammengefasst werden um ein deutlicheres Bild abzugeben.

Tabelle 14: Zusammensetzung der erhaltenen Ergebnisse

Protein	MOI-Bereich [pfu/ml]	Temperatur-Bereich [°C]	Konfluenz [%]	Inkubationszeit	Kristalle pro Zelle
Lysozym	2,0 - 0,001	16 - 33	30 - 100*	bis zu 14 Tage	0,4 - 0,6
HsCatB	2,0 - 0,001	16 - 33	30 - 100*	bis zu 14 Tage	Keine
SaAcrB	2,0 - 0,001	16 - 33	30 - 100*	bis zu 14 Tage	0,7
Myoglobin	2,0 - 0,001	16 - 33	30 - 100*	bis zu 14 Tage	Keine
TbVSG221	2,0 - 0,001	16 - 33	30 - 100*	bis zu 14 Tage	0,7
TbTubulin	2,0 - 0,001	16 - 33	30 - 100*	bis zu 14 Tage	0,4 - 0,6
TbIMPDH-9AS	0,2 - 0,01	23 und 28	60**	bis zu 14 Tage	Keine
TbCatB-Prop	0,2 - 0,01	23 und 28	60**	bis zu 14 Tage	Keine

* Die Zellen wurden bei verschiedenen Konfluenzen kultiviert. Im Bereich von 30, 40, 50, bis 100 % konfluenter Zellen. Dabei hat sich herausgestellt, dass die besten Ergebnisse bei etwa 60 % Konfluenz erzielt wurden.

** Hier wurden die optimierten Bedingungen angewendet und die Zellen mit einer Konfluenz von 60 % eingesetzt.

Eine zu hohe MOI von über 0,5 pfu/ml führt zur Lyse der Zellen, bevor die Zellen Kristalle bilden können. Der optimale MOI Bereich liegt zwischen 0.1 und 0.01. Die Insektenzellen wurden Temperaturen über 28°C nicht kontinuierlich ausgesetzt sondern als Hitzeschock von 15 min sowie von 2 und 4 Stunden. Es hat sich herausgestellt, dass die besten Temperatur-Bedingungen für die *in vivo* Kristallisation bei 28°C liegen. Die optimale Konfluenz der Zellen liegt bei etwa 60%. Nach neun Tagen konnten Kristalle im Lichtmikroskop beobachtet werden. Während Lysozym und TbTubulin immer recht unterschiedlich viele Kristalle produzierten, waren bei SaAcrB und TbVSG221 immer etwa gleich viele Kristalle zu beobachten. Wobei auch hier kleine Schwankungen im Einzelfall zu beobachten waren. Bei den anderen Proteinen konnten unter keinen der untersuchten Bedingungen *in vivo* Kristalle beobachtet werden.

5 Diskussion

Die *in vivo* Kristallisation ist bis heute wenig erforscht und wurde kaum beachtet [Axford et al., 2014]; [Koopmann et al., 2012]. Dabei gab es in den letzten Jahren große Fortschritte auf diesem Gebiet. Es wurden bereits 11 *in vivo* Kristalle in der Literatur beschrieben.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und wie es möglich ist weitere Proteine *in vivo* zu kristallisieren. Dazu wurden acht verschiedene Proteine in Sf9 Insektenzellen exprimiert und der Einfluss der MOI, der Zelldichte, der Temperatur und der Inkubationszeit untersucht. Es ist gelungen, vier neue *in vivo* Kristalle herzustellen und zu charakterisieren. Die optimalen Bedingungen für die *in vivo* Kristallisation sind, eine Temperatur von 28°C, von Insektenzellen geringerer Generationszahl, die auf eine Dichte von 8×10^5 Zellen/ml verdünnt wurden. Höhere oder niedrigere Temperaturen führen zu einer geringeren Anzahl an Kristallen. Auch ein Hitzeschock führt zu weniger Kristallen. Die optimale MOI liegt zwischen 0,1 und 0,01. Eine höhere MOI führte zu schnell zur Lyse der Insektenzellen und somit zu einer geringeren Kristallzahl. Eine niedrigere MOI kann die Infektion so sehr verzögern, dass die nicht infizierten Zellen weiterwachsen und so konfluent werden, dass die Kristallbildung erschwert wird. Die optimale Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Infektion liegt bei etwas 60%.

Auffällig ist, dass die bereits kristallisierten Proteine TbIMPDH und TbCatB in ihrer gekürzten Version nicht mehr kristallisieren. Schon kleine Veränderungen führen offen-

sichtlich dazu, dass die Proteine ihre Fähigkeit *in vivo* Kristalle zu bilden verlieren. Darauf deutet auch hin, dass das humane Cathepsin B in Sf9 Insektenzellen keine *in vivo* Kristalle bildete. Humanes Cathepsin B und trypanosomales Cathepsin B haben nur eine 39 %ige Übereinstimmung in ihrer Sequenz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch TbIMPDH Kristalle hergestellt. Dabei wurden in einer Versuchsreihe Sf9 Insektenzellen infiziert und mit 3-Methyladenin, einem Autophagie-Inhibitor, versetzt und mit TbIMPDH infiziert. Die so behandelten Insektenzellen bildeten keine TbIMPDH-Kristalle mehr. Dies deutet darauf hin, dass sich der Kristallisationsmechanismus für TbIMPDH von TbCatB unterscheidet. Hier kristallisieren die Proteine im rauen ER [Koopmann, 2010], [Redecke et al., 2013].

5.1 Charakterisierung der *in vivo* Kristalle

Die beobachteten *in vivo* Kristalle entstehen in infizierten Sf9 Insektenzellen und sind ab ca. 9 Tagen im Lichtmikroskop als nadelförmige Strukturen sichtbar. Die Schädigung der Zelle durch das Baculovirus führt zur Lyse der Zellen, so dass mit zunehmender Zeit immer mehr Kristalle im Medium frei vorliegen, wo sie auch über längere Zeit stabil bleiben.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Betzel am DESY, Hamburg, wurden die isolierten Kristalle untersucht. Bis dato ist es aber noch nicht gelungen eine Strukturaufklärung erfolgreich abzuschließen, außer für die Proteine TbCatB und TbIMPDH [Koopmann, 2010]. So wurden die Kristalle mittels Western Blot und Massenspektrometrie untersucht und es konnten für alle *in vivo* Kristalle positive Ergebnisse erzielt werden. Nur für SaAcrB konnte keine positiven massenspektrometrischen Daten erzeugt werden.

Leichte Detergentien konnten die Kristalle nicht auflösen, eine Veränderung des pH-Wertes führte dagegen zur Solubilisierung. Die *in vivo* Kristalle sind bei verschiedenen pH-Werten löslich. So sind die SaAcrB Kristalle bei pH-Werten von über 10, Tubulin und Lysozy von unter 2 und VSG Kristalle von unter 3 löslich. Durch wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen war es ebenfalls möglich die Kristalle zu solubilisieren. Durch Resolubilierung der Kristalle konnte das entsprechende Protein näher untersucht werden. Massenspektrometrische- sowie Western Blot Analysen zeigen, dass die Kristalle

aus dem Protein bestehen.

Die Proteine für die kein spezifischer Antikörper vorhanden war (Lysozym, SaAcrB, Myoglobin, Tubulin und TbIMPDH), wurden mit und ohne His-Tag exprimiert. Interessanter Weise hatte der His-Tag keinen Einfluss auf die Fähigkeit des Proteins *in vivo* Kristalle zu bilden.

5.2 Mögliche Ursachen der *in vivo* Kristallbildung

Um zu Verstehen, warum manche Proteine *in vivo* kristallisieren, ist es wichtig sich vor Augen zu führen, in welchem Zusammenhang die Kristallisation in freier Natur bzw. im Labor von statten geht.

In der Landwirtschaft werden Baculoviren dazu genutzt Pflanzen vor Schädlingen zu schützen. Dazu werden Wildtyp Baculoviren vom Typ Nucleopolyhedrovirus, die von einer Schutzschicht aus Polyhedrin umgeben sind auf Pflanzen aufgetragen. Die Viruspartikel können dank der Polyhedrinschicht auch widrige Umweltbedingungen überleben, da die Schutzschicht kristalliner Natur ist. Wenn Insektenlarven kommen, um die Pflanzen zu fressen, gelangen die Viren in die Larve und werden im alkalischen Milieu des Mitteldarms aus der Polyhedrinschicht befreit und können die Insekten infizieren [Vogel, 1986]. Die Insektenzellen bilden in Kombination mit dem Baculovirus einen intrazellulären Kristallisationsmechanismus [Koopmann, 2010]. Die Bildung von Proteinkristallen in Insekten- oder anderen Zelllinien ist ein in den letzten Jahren immer häufiger beobachtetes Phänomen. Ein Vergleich der Proteine, die *in vivo* Kristalle bilden ist schwierig, da sie unterschiedliche Funktionen haben und auch keinerlei Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz. Ein Vergleich des N-Terminalen Teils der Proteine, der sich für die *in vivo* Kristallisation als wichtig erwiesen hat, in einem Multiplen Sequenz Alignment der kristallbildenden Proteine, ist in Abb. 50 und 51 dargestellt. Es zeigt, dass zwar einzelne Aminosäuren übereinstimmen, ein bestimmtes kristallbildendes Motiv konnte aber nicht gefunden werden. Auch ein Vergleich der Sekundärstruktur führt nicht zu dem Schluss, dass ein bestimmtes Motiv zur Kristallisation führt. Wichtiger scheint zu sein, dass das Protein in einem geschlossenem Kompartiment der Zelle gebildet oder gebracht wird. Diese Besonderheit der Proteine wird besonders deutlich an den Beispielen TbIMPDH und TbCatB. TbIMPDH ist ein cytosolisches Protein und hat kein Signalpeptid. Trotzdem finden sich bei TEM-Aufnahmen mit TbIMPDH infizierter Sf9 Zellen, eine Membran um die Kristalle. Dies deutet darauf hin, dass sich Autophagosomen bil-

den und das Protein in diesen Vesikeln kristallisiert [Duszenko et al., 2015]. TbCatB dagegen wird direkt im rauen ER gebildet und kristallisiert, sobald die Konzentration des Proteins groß genug ist [Koopmann et al., 2012]. Ein weiteres interessantes Beispiel für ein Protein, dass erst in Autophagosomen zur Kristallisation kommt ist Xpa [Tsutsui et al., 2015]. In allen Fällen, in denen der Kristallisationsmechanismus bekannt ist, muss das Protein in einem Kompartiment gebracht werden, so dass es eine hohe lokale Konzentration erreichen kann um so *in vivo* Kristalle bilden zu können. Bei diesem Vorgang muss Wasser von der äußeren Umgebung jedes einzelnen Protein-Moleküls verdrängt werden und ein Kontakt zu einem anderen Protein-Molekül hergestellt werden.



Abbildung 50: Alignment des N-Terminus der kristallbildenden Proteine: Vergleich der Sekundärstruktur. Grau unterlegt: α -Helix. Schwarzer Rahmen: β -Faltblatt.

```

Calcineurin      --MG--NNTTS---SVLDNIVQGSNFDREED-----R-LRKRFMKLD----
Polyhedrin      -----MP-----D---YSY-RPTIG--RTYVYDNKY YKN-LD-AV IKN-----AKRKK
IgG              -----MKH-----LWFFL-----LVAAPRWLSQVQLQESGPGLVK-
TbCatB          -----MHLMRACI---TFCIA-STAVVAVNAALVAED-APVLS--KAFV-----DR-VN
TbIMPDH         ME---NTNLRKTLRDGTTAEELFSQDGLSFND-----FI-ILPGFIDFD-----
Neuraminidase   --MLPSTV---QT-----L-----TLLLTS-GGVL--SLYVSASLSYLLYSYD-VLLK
CPV17           ---MA-----DLSLARQRLTDES VNEA-----PRAY-----DA-----NMELVIVA
XPA             -----MVSVITSEMKIETLRMEGAVNGHKFVITGKGSQPFEGIQNVDLTVIEGGPLPFA
GFP-μNS        MRSRVSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYQKLTCLKFI-CTTGKLPVP
Luciferase      ---ME-----DAKNIMHGAPFPYLEDGTAGEQLHKAMKRYAQVPGTI-
Lysozym         -MKV---FGRC-----ELAA-AMKRHGLDNY-RGYSI--GNWVCAAKFESNFNTQ
SaAcrB          MIKKLLQFS-LGNKF--AIFLMVV-----LVVLGGVYASAKLKI-ELLPNVQN---
TbVSg221        MPSNQ-EARLF---LAVLVLAQVLPILVDSAAEKGFQAFWQPLCQVSEELDDQPKGAL
TbTubulin       -----MREAIC IHI-GQAGCQVGNACWELFCL EHG---IQPDGAMPSPDKTI-----GVE

Calcineurin      KNSGTI---EREEFLSLPQIST-----NPLARMIAIFDED-GGGVDFQEFVSG
Polyhedrin      HF--AV IKN-----AKRKKHF--AVYDNKY YKN-LD-AV IKN-----AKRKKHF--AEH
IgG              --PSE-----TLS-----LCTVSGGST---SSHY-----WSWIRQSPGKGLQ-WIG
TbCatB          -RL--N RGIWKAKYDGMQNIITLREAKRLNGVIKNNNASILPKRRFTEEEAR-APLPS
TbIMPDH         SSKVNVSGQF---TKNILLHLPLVSPMDTVTE---SSMARAMALMG---GIGVIH---
Neuraminidase   SSTKTTA---PTMSLECTNASNAQTV--NHSATKEMTFPPPEPEWTYPRLSC-----
CPV17           EYPEGQC---KSFHFANPFVIK---GVIKSSE-----LMWDIDNGHQ-----MSEYELQ
XPA             FDILTAFHY---GNRVFVEYPEEI--VDYFKQSFPEGYSWERSMSYED-GGICLATNNI
GFP-μNS        WPTLVITLTY---GVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKD-DGNYKTRAEV
Luciferase      --AFTDA---PLEDGTAGEQLHKAMKRYAQVPGTI--AFTA-H---AEVNITYSEYFE
Lysozym         ATNRNTDGS TDYGI LQINSRWNCNDG----RTPGSRN-----VCAAKFESNFNTQATNRN
SaAcrB          ---PV---IS-----VTTMPGATPQSTQ-----DEISSKIDNQVRIS---VT
TbVSg221        FTLQAASKI-----QKMR-----DA-----ALRASIYAEINHGTNRKAQAV
TbTubulin       DD-----AF-NTFSETGAGKHVPRAVFLDLEP-TVV---DEVRTGT---Y-----R

```

Abbildung 51: Alignment des N-Terminus der kristallbildenden Proteine: Farblich unterlegt sind die übereinstimmenden Proteine.

5.3 Ausblick

Leider ist es bis heute noch nicht gelungen die Struktur, der in dieser Arbeit kristallisierten Proteine aufzuklären. Über die entwickelte Methode müssten sich jedoch genügend Kristalle erzeugen lassen, um die Struktur aufzuklären.

Ein wichtiges Ziel ist die Aufklärung des Mechanismus der *in vivo* Kristallbildung. Dabei stellt sich auch die Frage, ob es einen Unterschied zwischen der *in vivo* Kristallisation von rekombinant exprimierten Proteinen und homolog exprimierten Proteinen wie der Alkoholoxidase in Hefe [Jakobi et al., 2016] gibt. Dazu können durch gezielte Mutationsstudien die Stellen identifiziert werden, die für die *in vivo* Kristallisation wichtig sind. Auch der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen auf die *in vivo* Kristallisation kann in diesem Zusammenhang untersucht werden. Auch ist es fraglich, ob es nur einen Mechanismus für die *in vivo* Kristallisation gibt. Neben den Messungen am Freien-Elektron-Laser können die Kristalle auch für eine *in cellulo* Untersuchung an einer Synchrotron-Strahlungsquelle eingesetzt werden. Erste Ergebnisse dazu sind bereits veröffentlicht [Axford et al., 2014].

5.4 Zusammenfassung

Neben der etablierten *in vitro* Kristallisation hat die *in vivo* Kristallisation in den letzten Jahren für immer mehr Aufsehen gesorgt. Ob es gelingen wird die *in vivo* Kristallisation als alternative Methode in der Forschung zu verankern ist noch nicht abschließend geklärt. Vieles deutet aber darauf hin, dass die *in vivo* Kristallisation ein großes Potential hat.

Als die ersten Proteine *in vivo* Kristallisiert wurden, erschien dies Phänomen noch wie ein Zufall. Die *in vivo* Kristallisation wird noch nicht so beachtet wie die etablierte *in vitro* Kristallisation [Axford et al., 2014]; [Koopmann et al., 2012]. Die Produktion neuer *in vivo* Kristalle führte dazu, dass es gelungen ist, die Struktur der Proteine aus denen diese Kristalle bestehen aufzuklären [Koopmann et al., 2012]; [Coulibaly et al., 2007]; [Tsutsui et al., 2015]. Nachdem in der Literatur immer mehr *in vivo* Kristalle beschrieben wurden 1.2, sollte ein systematischer Ansatz gefunden werden, nachdem es möglich ist, Proteine *in vivo* zu kristallisieren. Dazu wurden die Kristallisationsbedingungen optimiert und der Einfluss der MOI, der Zelldichte, der Temperatur und der Generationszahl der Insektenzellen bestimmt. So sollten die Insektenzellen mit einer MOI von 0,1 bis 0,01 pfu/ml infiziert werden. Die Zellen sollten etwa 60% konfluent sein, die Temperatur sollte bei 28°C liegen und die Zellen höchstens aus Passage 15 sein.

Neben diesen Einflüssen, hat auch die Beschaffenheit des Proteins selbst einen großen Einfluss darauf, ob es kristallisiert. Schon kleine Veränderungen in der Aminosäure-Zusammensetzung können die Kristallisationseigenschaften stark verändern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Proteine auf ihre Fähigkeit untersucht *in vivo* Kristalle bilden zu können. Dabei wurde gezielt unterschiedliche Proteine genommen, um ein möglichst breites Spektrum an Proteinen zu untersuchen und so idealer Weise allgemeingültige Bedingungen zu finden, die für die *in vivo* Kristallisation wichtig sind. So wurden Lysozym, Myoglobin, SaAcrB, humanes Cathepsin B und die beiden trypanosomalen Proteine TbVSG221 und TbTubulin untersucht. Außerdem wurden gekürzte Varianten der bereits kristallisierten Proteine TbCatB und TbIMPDH in Sf9 Zellen exprimiert. Von diesen Proteinen kristallisieren unter den optimierten Bedingungen Lysozym, SaAcrB, TbVSG221 und TbTubulin.

Die *in vivo* Kristalle konnten resolubilisiert und mittels Western Blot untersucht werden.

Es ist gelungen, für alle diese Proteine einen positiven Nachweis zu erbringen. Außerdem wurden noch von Lysozym, TbVSG221 und TbTubulin positive Massenspektrometrische Daten erzeugt.

6 Abkürzungsverzeichnis

AcrB	Acriflavin resistance protein B
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	base pair
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
FAO	Food and Agriculture Organization
FEL	Freie-Elektronen-Laser
HCL	Salzsäure
HEWL	hen egg white lysozyme
His	Histidine
HsCatB	Cathepsin B aus Homo sapiens
IgG	Immunglobulin G
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
kDa	kilo dalton
LB	Luria-Bertani
MCS	multiple cloning site
N-Terminus	Amino-Terminus
NaOH	Natriumhydroxid
NP40	Nonidet P40
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
pi	post infection
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
Sa	Staphylococcus aureus
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
TbCatB	Cathepsin B aus T.brucei
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
°C	Grad Celsius

Literatur

- [Air and Laver, 1989] Air, G. and Laver, W. (1989). The neuraminidase of influenza virus. *Proteins*, 6:341–356.
- [Aitcheson et al., 2005] Aitcheson, N., Talbot, S., Shapiro, J., Hughes, K., Adkin, C., Butt, T., Sheader, K., and Rudenko, G. (2005). Vsg switching in trypanosoma brucei: antigenic variation analysed using rnai in the absence of immune selection. *Molecular Microbiology*, 57(6):1608–1622.
- [Ambudkar et al., 2006] Ambudkar, S. V., Kim, I.-W., and Sauna, Z. E. (2006). The power of the pump: Mechanisms of action of p-glycoprotein (abcb1). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(5):392 – 400. Drug Transporters: Integration in Understanding {ADME}.
- [Asherie, 2004] Asherie, N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, 34(3):266 – 272. Macromolecular Crystallization.
- [Axford et al., 2014] Axford, D., Ji, X., Stuart, D. I., and Sutton, G. (2014). In cellulo structure determination of a novel cypovirus polyhedrin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70:1435–1441.
- [Baldwin, 1996] Baldwin, T. O. (1996). Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure*, 4(3):223 – 228.
- [Barrett, 1994] Barrett, A. J. (1994). Classification of peptidases. In Barrett, A. J., editor, *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases*, volume 244 of *Methods in Enzymology*, pages 1 – 15. Academic Press.
- [Barty et al., 2012] Barty, A., Caleman, C., Aquila, A., Timneanu, N., Lomb, L., White, T. A., Andreasson, J., Arnlund, D., Bajt, S., Barends, T. R. M., Barthelmeß, M., Bogan, M. J., Bostedt, C., Bozek, J. D., Coffee, Ryan Coppola, N., Davidsson, J., DePonte, D. P., Doak, R. B., Ekeberg, T., Elser, V., Epp, S. W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Fromme, P., Graafsma, H., Gumprecht, L., Hajdu, J., Hampton, C. Y., Hartmann, R., Hartmann, A., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Hunter, M. S., Johansson, L., Kassemeyer, S., Kimmel, N., Kirian, R. A., Liang, M., Maia, F. R. N. C., Malmerberg, E., Marchesini, S., Martin, A. V., Nass, K., Neutze, R., Reich, C., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., scott, H., Schlichting, I., Schulz, J., Seibert, M. M., Shoeman, R. L., Sierra, R. G., Soltau, H., Spence, J. C. H., Stellato, F., Stern, S., Struder, L., Ullrich, J., X, W., Weidenspointner, G., Weierstall, U., Wunderer, C. B., and Chapman, H. N. (2012). Self-terminating diffraction gates femtosecond x-ray nanocrystallography measurements. *Nat Photon*, 6:35–40.
- [Bergh et al., 2008] Bergh, M., Huldt, G., Timneanu, N., Maia, F. R. N. C., and Hajdu, J. (2008). Feasibility of imaging living cells at subnanometer resolutions by ultrafast x-ray diffraction. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 41:181–204.

- [Bergh et al., 2004] Bergh, M., Tîmneanu, N. m. c., and van der Spoel, D. (2004). Model for the dynamics of a water cluster in an x-ray free electron laser beam. *Phys. Rev. E*, 70:051904.
- [Berman, 2007] Berman, H. M. (2007). The protein data bank: a historical perspective. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of crystallography*, A64:88–95.
- [Berriman et al., 2005] Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renault, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wicks-tead, B., Alsmark, U. C. M., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.-J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M. C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., MacLeod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M. A., Morgan, G. W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M. R., Tait, A., Tivey, A. R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., Melville, S. E., and El-Sayed, N. M. (2005). The genome of the african trypanosome *trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733):416–422.
- [Bessho et al., 2013] Bessho, T., Morii, S., Kusumoto, T., Shinohara, T., Noda, M., Uchiyama, S., Shuto, S., Nishimura, S., Djikeng, A., Duszenko, M., Martin, S. K., Inui, T., and Kubata, K. B. (2013). Characterization of the novel *trypanosoma brucei* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Parasitology*, 140:735–745.
- [Bill et al., 2011] Bill, R. M., Henderson, P. J. F., Iwata, S., Kunji, E. R. S., Michel, H., Neutze, R., Newstead, S., Poolman, B., Tate, C. G., and Vogel, H. (2011). Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nat Biotech*, 29:335–340.
- [Black et al., 2010] Black, S. J., Guirnalda, P., Frenkel, D., Haynes, C., and Bockstal, V. (2010). Induction and regulation of *trypanosoma brucei* vsg-specific antibody responses. *Parasitology*, 137:2041–2049.
- [Blake et al., 1965] Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., and Sarma, V. R. (1965). Structure of hen egg-white lysozyme. a three-dimensional fourier synthesis at 2 angstrom resolution. *Nature*, 206:757–761.
- [Bolder, 1997] Bolder, N. (1997). Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science & Technology*, 8(7):221 – 227.

- [Bradford, 1976] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1):248 – 254.
- [Brewer and Hendershot, 2005] Brewer, J. W. and Hendershot, L. M. (2005). Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response. *Nature immunology*, 6:23–29.
- [Burns, 1995] Burns, R. G. (1995). Identification of two new members of the tubulin family. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 31(4):255–258.
- [Caleman et al., 2011] Caleman, C., Huldt, G., Maia, F. R., Ortiz, C., Parak, F., Hajdu, J., Van der Spoel, D., Chapman, H. N., and Timneanu, N. (2011). On the feasibility of nanocrystal imaging using intense and ultrashort x-ray pulses. *ACS Nano*, 5:139–146.
- [Chapman et al., 2011] Chapman, H. N., Fromme, P., Barty, A., White, T. A., Kirian, R. A., Aquila, A., Hunter, M. S., Schulz, J., DePonte, D. P., Weierstall, U., Doak, R. B., Maia, F. R. N. C., Martin, A. V., Schlichting, I., Lomb, L., Coppola, N., Shoeman, R. L., Epp, S. W., Hartmann, R., Rolles, D., Rudenko, A., Foucar, L., Kimmel, N., Weidenspointner, G., Holl, P., Liang, M., Barthelmess, M., Caleman, C., Boutet, S., Bogan, M. J., Krzywinski, J., Bostedt, C., Bajt, S., Gumprecht, L., Rudek, B., Erk, B., Schmidt, C., Hömke, A., Reich, C., Pietschner, D., Strüder, L., Hauser, G., Gorke, H., Ullrich, J., Herrmann, S., Schaller, G., Schopper, F., Soltau, H., Kühnel, K.-U., Messerschmidt, M., Bozek, J. D., Hau-Riege, S. P., Frank, M., Hampton, C. Y., Sierra, R. G., Starodub, D., Williams, G. J., Hajdu, J., Timneanu, N., Seibert, M. M., Andreasson, J., Rocker, A., Jönsson, O., Svenda, M., Stern, S., Nass, K., Andritschke, R., Schröter, C.-D., Krasniqi, F., Bott, M., Schmidt, K. E., Wang, X., Grotjohann, I., Holton, J. M., Barends, T. R. M., Neutze, R., Marchesini, S., Fromme, R., Schorb, S., Rupp, D., Adolph, M., Gorkhover, T., Andersson, I., Hirsemann, H., Potdevin, G., Graafsma, H., Nilsson, B., and Spence, J. C. H. (2011). Femtosecond x-ray protein nanocrystallography. *Nature*, 470:73–77.
- [Chen et al., 2013] Chen, Y.-R., Zhong, S., Fei, Z., Hashimoto, Y., Xiang, J. Z., Zhang, S., and Blissard, G. W. (2013). The transcriptome of the baculovirus autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus in trichoplusia ni cells. *Journal of Virology*, 87(11):6391–6405.
- [Colman et al., 1980] Colman, P. M., Suzuki, E., and Van Donkelaar, A. (1980). The structure of cucurbitin: Subunit symmetry and organization in situ. *European Journal of Biochemistry*, 103(3):585–588.
- [Coulibaly et al., 2007] Coulibaly, F., Chiu, E., Ikeda, K., Gutmann, S., Haebel, P. W., Schulze-Briese, C., Mori, H., and Metcalf, P. (2007). The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature*, 446(7131):97–101.

- [Cunningham et al., 1991] Cunningham, F., Proctor, V., and Goetsch, S. (1991). Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. *World's Poultry Science Journal*, 47:141–163.
- [Cygler et al., 1996] Cygler, M., Sivaraman, J., Grochulski, P., Coulombe, R., Storer, A. C., and Mort, J. S. (1996). Structure of rat procathepsin b: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure*, 4(4):405 – 416.
- [DeLeo et al., 2010] DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N., and Chambers, H. F. (2010). Community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus. *The Lancet*, 375(9725):1557 – 1568.
- [Digits and Hedstrom, 1999] Digits, J. A. and Hedstrom, L. (1999). Kinetic mechanism of tritrichomonas foetus inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 38(8):2295–2306. PMID: 10029522.
- [Dinh et al., 1994] Dinh, T., Paulsen, I. T., and Saier, M. H. (1994). A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 176(13):3825–3831.
- [Dissemond et al., 2005] Dissemond, J., Körber, A., Lehnen, M., and Grabbe, S. (2005). Methicillin-resistenter staphylococcus aureus (mrsa) in chronischen wunden: Therapeutische optionen und perspektiven. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 3(4):256–262.
- [Dodson and Steiner, 1998] Dodson, G. and Steiner, D. (1998). The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(2):189 – 194.
- [Doye and Poon, 2006] Doye, J. P. and Poon, W. C. (2006). Protein crystallization in vivo. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(1):40 – 46.
- [Durbin and Feher, 1986] Durbin, S. D. and Feher, G. (1986). Crystal growth studies of lysozyme as a model for protein crystallization. *Journal of crystal growth*, 76:583–592.
- [Duszenko et al., 2015] Duszenko, M., Redecke, L., Mudogo, C. N., Sommer, B. P., Mogk, S., Oberthuer, D., and Betzel, C. (2015). In vivo protein crystallization in combination with highly brilliant radiation sources offers novel opportunities for the structural analysis of post-translationally modified eukaryotic proteins. *Acta Crystallographica Section F*, F71:929–937.
- [El-Nimr et al., 1981] El-Nimr, A., Hardee, G. E., and Perrin, J. H. (1981). A fluorimetric investigation of the binding of drugs to lysozyme. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 33(1):117–118.
- [Englund, 1993] Englund, P. T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.*, 62:121–138.

- [Fan et al., 1996] Fan, G., Maldonado, F., Zhang, Y., Kincaid, R., Ellisman, M. H., and Gastinel, L. N. (1996). In vivo calcineurin crystals formed using the baculovirus expression system. *Microscopy Research and Technique*, 34(1):77–86.
- [Faustman et al., 1996] Faustman, C., Chan, W. K. M., Lynch, M. P., and Joo, S. T. (1996). Strategies for increasing oxidative stability of fresh meat color. *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, pages 79–79.
- [Faustman and Phillips, 2001] Faustman, C. and Phillips, A. (2001). *Measurement of Discoloration in Fresh Meat*. John Wiley & Sons, Inc.
- [Ferguson et al., 1986] Ferguson, M. A., Duszenko, M., Lamont, G. S., Overath, P., and Cross, G. A. (1986). Biosynthesis of trypanosoma brucei variant surface glycoproteins. n-glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. *Journal of Biological Chemistry*, 261(1):356–62.
- [Fändrich et al., 2001] Fändrich, M., Fletcher, M. A., and Dobson, C. M. (2001). Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*, 410:165–166.
- [Frey, 2012] Frey, C. (2012). *Analyse der Gehirninfection bei Schlafkrankheit*. PhD thesis, Eberhard Karls Universität zu Tübingen.
- [Gallat et al., 2014] Gallat, F.-X., Matsugaki, N., Coussens, N. P., Yagi, K. J., Boudes, M., Higashi, T., Tsuji, D., Tatano, Y., Suzuki, M. ., Mizohata, E., Tono, K., Joti, Y., Kameshima, T., Park, J., Song, C., Hatsui, T., Yabashi, M., Nango, E., Itoh, K., Coulbaly, F., Tobe, S., Ramaswamy, S., Stay, B., Iwata, S., and Chavas, L. M. G. (2014). In vivo crystallography at x-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369:20130497.
- [Gard, 1994] Gard, D. L. (1994). gamma-tubulin is asymmetrically distributed in the cortex of xenopus oocytes. *Developmental Biology*, 161(1):131 – 140.
- [Giddings and Hultin, 2009] Giddings, G. G. and Hultin, H. O. (2009). Reduction of ferrimyoglobin in meat. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 5:143–173.
- [Ginn et al., 2015] Ginn, H. M., Messerschmidt, M., Ji, X., Zhang, H., Axford, D., Gildea, R. J., Winter, G., Brewster, A. S., Hattne, J., Wagner, A., Grimes, J. M., Evans, G., Sauter, N. K., Sutton, G., and Stuart, D. I. a. (2015). Structure of cpv17 polyhedrin determined by the improved analysis of serial femtosecond crystallographic data. *Nature communications*, 6:1–8.
- [Gnottke et al., 2009] Gnottke, C., Saalman, U., and Rost, J. M. (2009). Ionization and charge migration through strong internal fields in clusters exposed to intense x-ray pulses. *Phys. Rev. A*, 79:041201.
- [Grace, 1962] Grace, T. D. C. (1962). Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature*, 195:788–789.

- [Habisov and Kirkin, 2015] Habisov, S. and Kirkin, V. (2015). Caging the elephant: Selective autophagy tackles giant intracellular protein crystals. *Molecular Cell*, 58(1):5 – 7.
- [Hammond et al., 2008] Hammond, J. W., Cai, D., and Verhey, K. J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(1):71 – 76. Cell structure and dynamics.
- [Hasegawa et al., 2014] Hasegawa, H., Forte, C., Barber, I., Turnbaugh, S., Stoops, J., Shen, M., and Lim, A. C. (2014). Modulation of in vivo igg crystallization in the secretory pathway by heavy chain isotype class switching and n-linked glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(7):1325 – 1338.
- [Hasegawa et al., 2011] Hasegawa, H., Wendling, J., He, F., Trilisky, E., Stevenson, R., Franey, H., Kinderman, F., Li, G., Piedmonte, D. M., Osslund, T., Shen, M., and Ketchum, R. R. (2011). In vivo crystallization of human igg in the endoplasmic reticulum of engineered chinese hamster ovary (cho) cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22):19917–19931.
- [Hau-Riege et al., 2007] Hau-Riege, S. P., London, R. A., Chapman, H. N., and Bergh, M. (2007). Soft-x-ray free-electron-laser interaction with materials. *Phys. Rev. E*, 76:046403.
- [Hau-Riege et al., 2004] Hau-Riege, S. P., London, R. A., and Szoke, A. (2004). Dynamics of biological molecules irradiated by short x-ray pulses. *Phys. Rev. E*, 69:051906.
- [Henderson, 1995] Henderson, R. (1995). The potential and limitations of neutrons, electrons and x-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 28:171–193.
- [Hiepe et al., 2006] Hiepe, T., Lucius, R., and Gottstein, B. (2006). *Allgemeine Parasitologie: mit den Grundzügen der Immunbiologie, Diagnostik und Bekämpfung*. Georg Thieme Verlag.
- [Hill et al., 1999] Hill, C. L., Booth, T. F., Prasad, B. V. V., Grimes, J. M., Mertens, P. P. C., Sutton, G. C., and Stuart, D. I. (1999). The structure of a cypovirus and the functional organization of dsrna viruses. *Nat Struct Mol Biol*, 6:565–568.
- [Hughey et al., 1989] Hughey, V. L., Wilger, P. A., and Johnson, E. A. (1989). Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *listeria monocytogenes* scott a in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3):631–638.
- [Inouye, 2010] Inouye, S. (2010). Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67:387–404.
- [Jakobi et al., 2016] Jakobi, A. J., Passon, D. M., Knoops, K., Stellato, F., Liang, M., White, T. A., Seine, T., Messerschmidt, M., Chapman, H. N., and Wilmanns, M.

- (2016). In cellulo serial crystallography of alcohol oxidase crystals inside yeast cells. *IUCrJ*, 3:1–8.
- [Jayaram et al., 1982] Jayaram, H. N., Dion, R. L., Glazer, R. I., Johns, D. G., Robins, R. K., Srivastava, P. C., and Cooney, D. A. (1982). Initial studies on the mechanism of action of a new oncolytic thiazole nucleoside, 2-beta-d-ribofuranosylthiazole-4-carboxamide nsc 286193). *Biochemical Pharmacology*, 31(14):2371 – 2380.
- [Jolles and Jolles, 1984] Jolles, P. and Jolles, J. (1984). What’s new in lysozyme research? always a model system, today as yesterday. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 63:165–189.
- [Jones, 2000] Jones, R. C. (2000). Avian reovirus infections. *Revue Scientifique et Technique*, 19:614–625.
- [Kallen et al., 2010] Kallen, A. J., Mu, Y., Bulens, S., Reingold, A., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L. H., Lynfield, R., Dumyati, G. and Townes, J. M., Schaffner, W., Patel, P. R., and Fridkin, S. (2010). Health care-associated invasive mrsa infections, 2005-2008. *JAMA*, 304(6):641–647.
- [Kang et al., 2002] Kang, X., Szallies, A., Rawer, M., Echner, H., and Duszenko, M. (2002). Gpi anchor transamidase of trypanosoma brucei: in vitro assay of the recombinant protein and vsg anchor exchange. *Journal of Cell Science*, 115(12):2529–2539.
- [Keeling and Doolittle, 1996] Keeling, P. J. and Doolittle, W. F. (1996). Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Molecular Biology and Evolution*, 13(10):1297–1305.
- [Kendrew, 1963] Kendrew, J. C. (1963). Myoglobin and the structure of proteins. *Science*, 139:1259–1266.
- [Kendrew et al., 1958] Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., and Wyckoff, H. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, 181:662–666.
- [Kendrew et al., 1960] Kendrew, J. C., Kickerson, R. E., Strandberg, B. E., and Hart, R. G. (1960). Structure of myoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 2 a. resolution. *Nature*, 185:422–427.
- [Kendrew et al., 1954] Kendrew, J. C., Marrack, J. R., and Orlans, E. S. (1954). The species specificity of myoglobin. *Nature*, 174:946–949.
- [Klevens et al., 2007] Klevens, R. M., Edwards, J. R., Richards, C. L., Horan, T. C., Gaynes, Robert P. and Pollock, D. A., and Cardo, D. M. (2007). Estimating health care-associated infections and deaths in u.s. hospitals, 2002. *Public Health Reports*, 122:160–166.

- [Knipe et al., 2001] Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., and Fields, B. N. (2001). *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- [Kohlbrenner et al., 2005] Kohlbrenner, E., Aslanidi, G., Nash, K., Shklyae, S., Campbell-Thompson, M., Byrne, B. J., Snyder, R. O., Muzyczka, N., Warrington, K. H., and Zolotukhin, S. a. (2005). Successful production of pseudotyped raav vectors using a modified baculovirus expression system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 12:1217–1225.
- [Kool et al., 1991] Kool, M., Voncken, J., Lier, F. V., Tramper, J., and Vlak, J. (1991). Detection and analysis of autographa californica nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology*, 183(2):739 – 746.
- [Koopmann, 2010] Koopmann, R. (2010). *Untersuchungen zur Autophagie bei Trypanosomen unter besonderer Berücksichtigung von autophagierelevanten Proteinen und deren in vivo-Kristallbildung*. PhD thesis, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- [Koopmann et al., 2012] Koopmann, R., Cupelli, K., Redecke, L., Nass, K., DePonte, D. P., , White, T. A., Stellato, F., Rehders, D., Liang, M., Andreasson, J., Aquila, A., Bajt, S., Barthelmess, M., Barty, A., Bogan, M. J., Bostedt, C., Boutet, S., Bozek, J. D., Caleman, C., Coppola, N., Davidsson, J., Doak, R. B., Ekeberg, T., Epp, S. W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Graafsma, H., Gumprecht, L., Hajdu, J., Hampton, C. Y., Hartmann, A., Hartmann, R., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Hunter, M. S., Kassemeyer, S., Kirian, R. A., Lomb, L., Maia, F. R. N. C., Kimmel, N., Martin, A. V., Messerschmidt, M., Reich, C., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schlichting, I., Schulz, J., Seibert, M. M., Shoeman, R. L., Sierra, R. G., Soltau, H., Stern, S., Struder, L., Timneanu, N., Ullrich, J., Wang, X., Weidenspointner, G., Weierstall, U., Williams, G. J., Wunderer, C. B., Fromme, P., Spence, J. C. H., Stehle, T., Chapman, H. N., Betzel, C., and Duszynski, M. (2012). In vivo protein crystallization opens new routes in structural biology. *Nature methods*, 9:259–262.
- [Laemmli, 1970] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 15:680–685.
- [Lajoie-Mazenc et al., 1994] Lajoie-Mazenc, I., Tollon, Y., Detraves, C., Julian, M., Moisan, A., Gueth-Hallonet, C., Debec, A., Salles-Passador, I., Puget, A., and Mazaranguil, H. (1994). Recruitment of antigenic gamma-tubulin during mitosis in animal cells: presence of gamma-tubulin in the mitotic spindle. *Journal of Cell Science*, 107(10):2825–2837.
- [Leitão and da Silva, 2010] Leitão, J. M. and da Silva, J. C. E. (2010). Firefly luciferase inhibition. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101(1):1 – 8.
- [LeMarbre et al., 1981] LeMarbre, P., Rinehart, J. J., Kay, N. E., Vesella, R., and Jacob, H. S. (1981). Lysozyme enhances monocyte-mediated tumoricidal activity: a potential amplifying mechanism of tumor killing. *Blood*, 58:994–999.

- [Li et al., 2011] Li, H., Rao, A., and Hogan, P. G. (2011). Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends in Cell Biology*, 21(2):91 – 103.
- [Li and Nikaido, 2004] Li, X.-Z. and Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64(2):159–204.
- [Livingston and Brown, 1982] Livingston, D. J. and Brown, W. (1982). The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technology*, 35:244–252.
- [Lomovskaya et al., 2007] Lomovskaya, O., Zgurskaya, H. I., Totrov, M., and Watkins, W. J. (2007). Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria. *Nature reviews. Drug discovery*, 6:56–65.
- [Lowden and O'Brien, 1979] Lowden, J. A. and O'Brien, J. S. (1979). Sialidosis: a review of human neuraminidase deficiency. *American journal of human genetics*, 31:1–18.
- [Lowy, 1998] Lowy, F. D. (1998). Staphylococcus aureus infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8):520–532. PMID: 9709046.
- [Ma et al., 1994] Ma, D., Cook, D. N., Hearst, J. E., and Nikaido, H. (1994). Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology*, 2(12):489 – 493.
- [Mackey et al., 2004] Mackey, Z. B., O'Brien, T. C., Greenbaum, D. C., Blank, R. B., and McKerrow, J. H. (2004). A cathepsin b-like protease is required for host protein degradation in trypanosoma brucei. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46):48426–48433.
- [Maeda et al., 1985] Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y., and Furusawa, M. (1985). Production of human [alpha]-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 315:592–594.
- [Mandanas et al., 1993] Mandanas, R., Leibowitz, D., Gharehbaghi, K., Tauchi, T., Burgess, G., Miyazawa, K., Jayaram, H., and Boswell, H. (1993). Role of p21 ras in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood*, 82(6):1838–1847.
- [Markham et al., 1999] Markham, G. D., Bock, C. L., and Schalk-Hihi, C. (1999). Acid–base catalysis in the chemical mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 38(14):4433–4440. PMID: 10194364.
- [Markham and Neyfakh, 2001] Markham, P. N. and Neyfakh, A. A. (2001). Efflux-mediated drug resistance in gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5):509 – 514.
- [Marques and Esteves da Silva, 2009] Marques, S. M. and Esteves da Silva, J. C. G. (2009). Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life*, 61(1):6–17.

- [Matsumoto, 2004] Matsumoto, M. (2004). Advanced chemistry of dioxetane-based chemiluminescent substrates originating from bioluminescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 5(1):27 – 53.
- [McCapra, 2000] McCapra, F. (2000). Chemical generation of excited states: The basis of chemiluminescence and bioluminescence. In *Bioluminescence and Chemiluminescence Part C*, volume 305 of *Methods in Enzymology*, pages 3 – 47. Academic Press.
- [McConnell et al., 1981] McConnell, J., Gurnett, A. M., Cordingley, J. S., Walker, J. E., and Turner, M. J. (1981). Biosynthesis of trypanosoma brucei variant surface glycoprotein. i. synthesis, size, and processing of an n-terminal signal peptide. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 4(3):225 – 242.
- [McPherson, 1999] McPherson, A. (1999). *Crystallization of Biological Macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1 edition.
- [Mehlert et al., 2002] Mehlert, A., Bond, C. S., and Ferguson, M. A. (2002). The glycoforms of a trypanosoma brucei variant surface glycoprotein and molecular modeling of a glycosylated surface coat. *Glycobiology*, 12(10):607–612.
- [Miller, 1988] Miller, L. K. (1988). Baculoviruses as gene expression vectors. *Annual Review of Microbiology*, 42(1):177–199. PMID: 3059993.
- [Mine, 1995] Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7):225 – 232.
- [Mine et al., 2004] Mine, Y., Ma, F., and Lauriau, S. (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5):1088–1094. PMID: 14995103.
- [Moor, 1967] Moor, H. (1967). Der feinbau der mikrotubuli in hefe nach gefrierätzung. *Protoplasma*, 64:89–103.
- [Mort and Buttle, 1997] Mort, J. S. and Buttle, D. J. (1997). Cathepsin b. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(5):715 – 720.
- [Murakami, 2008] Murakami, S. (2008). Multidrug efflux transporter, acrb—the pumping mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(4):459 – 465. Membranes / Engineering and design.
- [Murakami et al., 2006] Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A. (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*, 443:173–179.
- [Murakami et al., 2002] Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter acrb. *Nature*, 419:587–593.

- [Musil et al., 1991] Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R. A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., Katunuma, N., and Bode, W. (1991). The refined 2.15 Å x-ray crystal structure of human liver cathepsin b: the structural basis for its specificity. *The EMBO journal*, 10:2321–30.
- [Nakamura et al., 1990] Nakamura, S., Kato, A., and Kobayashi, K. (1990). Novel bi-functional lysozyme–dextran conjugate that acts on both gram-negative and gram-positive bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54:3057–3059.
- [Neutze et al., 2000] Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E., and Hajdu, J. (2000). Potential for biomolecular imaging with femtosecond x-ray pulses. *Nature*, 406:752–757.
- [Oakley et al., 1990] Oakley, B. R., Oakley, C., Yoon, Y., and Jung, M. (1990). gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in aspergillus nidulans. *Cell*, 61(7):1289 – 1301.
- [Oakley and Oakley, 1989] Oakley, C. E. and Oakley, B. R. (1989). Identification of [gamma]-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipa gene of aspergillus nidulans. *Nature*, 338:662–664.
- [Okusu et al., 1996] Okusu, H., Ma, D., and Nikaido, H. (1996). Acrab efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of escherichia coli multiple-antibiotic-resistance (mar) mutants. *Journal of Bacteriology*, 178(1):306–8.
- [Ordway and Garry, 2004] Ordway, G. A. and Garry, D. J. (2004). Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *Journal of Experimental Biology*, 207(20):3441–3446.
- [Ossermann et al., 1974] Ossermann, E. F., Klockars, M., Halper, J., and Fischer, R. E. (1974). *Lysozyme*. Ossermann.
- [Palomares et al., 2015] Palomares, L. A., Realpe, M., and Ramirez, O. T. (2015). *Animal Cell Culture*, volume 9.
- [Pan et al., 2006] Pan, W., Ogunremi, O., Wei, G., Shi, M., and Tabel, H. (2006). {CR3} (cd11b/cd18) is the major macrophage receptor for igm antibody-mediated phagocytosis of african trypanosomes: Diverse effect on subsequent synthesis of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Microbes and Infection*, 8(5):1209 – 1218.
- [Parandoosh et al., 1989] Parandoosh, Z., Robins, R. K., Belei, M., and Rubalcava, B. (1989). Tiazofurin and selenazofurin induce depression of cgmp and phosphatidylinositol pathway in {L1210} leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164(2):869 – 874.
- [Parandoosh et al., 1990] Parandoosh, Z., Rubalcava, B., Matsumoto, S. S., Jolley, W. B., and Robins, R. K. (1990). Changes in diacylglycerol and cyclic gmp during

- the differentiation of human myeloid leukemia k562 cells. *Life Sciences*, 46(4):315 – 320.
- [Paulsen et al., 1997] Paulsen, I. T., Park, J. H., and Choi, P. S. Saier, M. H. J. (1997). A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 156:1–8.
- [Payne and Mertens, 1983] Payne, C. and Mertens, P. (1983). *In the Reoviridae*. Academic press.
- [Poole, 2001] Poole, K. (2001). Multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5):500 – 508.
- [Poole, 2004] Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 10:12–26.
- [Poole et al., 1993] Poole, K., Krebes, K., McNally, C., and Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa: evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of Bacteriology*, 175(22):7363–7372.
- [Pos, 2009] Pos, K. M. (2009). Drug transport mechanism of the acrb efflux pump. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(5):782 – 793. Mechanisms of Drug Efflux and Strategies to Combat Them.
- [Potier et al., 1990] Potier, M., Lamontagne, S., Michaud, L., and Tranchemontagne, J. (1990). Human neuraminidase is a 60 kda-processing product of prosaposin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(1):449 – 456.
- [Rawlings and Barrett, 1993] Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290:205–218.
- [Redecke et al., 2013] Redecke, L., Nass, K., DePonte, D. P., White, T. A., Rehders, D., Barty, A., Stellato, F., Liang, M., Barends, T. R., Boutet, S., Williams, G. J., Messerschmidt, M., Seibert, M. M., Aquila, A., Arnlund, D., Bajt, S., Barth, T., Bogan, M. J., Caleman, C., Chao, T.-C., Doak, R. B., Fleckenstein, H., Frank, M., Fromme, R., Galli, L., Grotjohann, I., Hunter, M. S., Johansson, L. C., Kassemeyer, S., Katona, G., Kirian, R. A., Koopmann, R., Kupitz, C., Lomb, L., Martin, A. V., Mogk, S., Neutze, R., Shoeman, R. L., Steinbrener, J., Timneanu, N., Wang, D., Weierstall, U., Zatsepin, N. A., Spence, J. C. H., Fromme, P., Schlichting, I., Duszynski, M., Betzel, C., and Chapman, H. N. (2013). Natively inhibited trypanosoma brucei cathepsin b structure determined by using an x-ray laser. *Science*, 339(6116):227–230.
- [Reed and Muench, 1938] Reed, L. J. and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cell endpoints. *American journal of epidemiology*, 27:493–497.

- [Reuner et al., 1997] Reuner, B., Vassella, E., Yutzy, B., and Boshart, M. (1997). Cell density triggers slender to stumpy differentiation of trypanosoma brucei bloodstream forms in culture. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 90(1):269 – 280.
- [Riekkel, 2004] Riekkel, C. (2004). Recent developments in microdiffraction on protein crystals. *J. Synchrotron Rad.*, 11:4–6.
- [Roccor, 2011] Roccor, R. (2011). Untersuchung der inosinmonophosphatdehydrogenase aus trypanosoma brucei unter besonderer berücksichtigung der in vivo kristallisierung in insektenzellen. Master’s thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard Karls Universität Tübingen.
- [Rohrmann, 1986] Rohrmann, G. F. (1986). Polyhedrin structure. *J. Gen Virol.*, 67:1499–1513.
- [Rohrmann, 2013] Rohrmann, G. F. (2013). Baculovirus molecular biology: Third edition [internet]. *Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)*.
- [Rowan et al., 1992] Rowan, A. D., Mason, P., Mach, L., and Mort, J. S. (1992). Rat procathepsin b. proteolytic processing to the mature form in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22):15993–15999.
- [Rusnak and Mertz, 2000] Rusnak, F. and Mertz, P. (2000). Calcineurin: Form and function. *Physiological Reviews*, 80(4):1483–1521.
- [Saier et al., 2001] Saier, M. H., Jr, and Paulsen, I. T. (2001). Phylogeny of multidrug transporters. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 12(3):205 – 213.
- [Sajid and McKerrow, 2002] Sajid, M. and McKerrow, J. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120(1):1 – 21.
- [Sambrook and Russell, 2001] Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3 edition.
- [Samuelson et al., 1985] Samuelson, K. J., Rupnow, J. H., and Froning, G. W. (1985). The effect of lysozyme and ethylenediaminetetraacetic acid on salmonella on broiler parts. *Poultry Science*, 64(8):1488–1490.
- [Saridakis et al., 1994] Saridakis, E. E. G., Shaw Stewart, P. D., Lloyd, L. F., and Blow, D. M. (1994). Phase diagram and dilution experiments in the crystallization of carboxypeptidase G₂. *Acta Crystallographica Section D*, 50(3):293–297.
- [Sava et al., 1988] Sava, G., Ceschia, V., and Zabucchi, G. (1988). Evidence for host-mediated antitumor effects of lysozyme in mice bearing the {MCA} mammary carcinoma. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 24(11):1737 – 1743.
- [Schmidt and Hall, 2002] Schmidt, A. and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for rho gtpases: turning on the switch. *Genes & Development*, 16(13):1587–1609.

- [Schönherr et al., 2015] Schönherr, R., Klinge, M., Rudolph, J. M., Fita, K., Rehders, D., Lübber, F., Schneegans, S., Majoul, I. V., Duszenko, M., Betzel, C., Betzel, C., Brandariz-Nuñez, A., Martinez-Costas, J., Duden, R., and Redecke, L. (2015). Real-time investigation of dynamic protein crystallization in living cells. *Struct. Dyn.*, 2:041712.
- [Sherwin et al., 1987] Sherwin, T., Schneider, A., Sasse, R., Seebeck, T., and Gull, K. (1987). Distinct localization and cell cycle dependence of cooh terminally tyrosinolated alpha-tubulin in the microtubules of trypanosoma brucei brucei. *The Journal of Cell Biology*, 104(3):439–446.
- [Sintchak and Nimmesgern, 2000] Sintchak, M. D. and Nimmesgern, E. (2000). The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology*, 47(2–3):163 – 184.
- [Smith et al., 1983a] Smith, G. E., Fraser, M. J., and Summers, M. D. (1983a). Molecular engineering of the autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome: Deletion mutations within the polyhedrin gene. *Journal of Virology*, 46(2):584–593.
- [Smith et al., 1983b] Smith, G. E., Summers, M. D., and Fraser, M. J. (1983b). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell Biol.*, 3:2156–2165.
- [Southworth-Davies et al., 2007] Southworth-Davies, R. J., Medina, M. A., Carmichael, I., and Garman, E. F. (2007). Observation of decreased radiation damage at higher dose rates in room temperature protein crystallography. *Structure*, 15(12):1531 – 1541.
- [Spence, 2014] Spence, J. C. H. (2014). X-ray lasers and crystallography. *IUCrJ*, 1:151–152.
- [Sulavik et al., 2001] Sulavik, M. C., Houseweart, C., Cramer, C., Jiwani, N., Murgolo, N., Greene, J., DiDomenico, B., Shaw, K. J., Miller, G. H., Hare, R., and Shimer, G. (2001). Antibiotic susceptibility profiles of escherichia coli strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4):1126–1136.
- [Tikhonova and Zgurskaya, 2004] Tikhonova, E. B. and Zgurskaya, H. I. (2004). Acrb, acrb, and tolc of escherichia coli form a stable intermembrane multidrug efflux complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31):32116–32124.
- [Tsutsui et al., 2015] Tsutsui, H., Jinno, Y., Shoda, K., Tomita, A., Matsuda, M., Yamashita, E., Katayama, H., Nakagawa, A., and Miyawaki, A. (2015). A diffraction-quality protein crystal processed as an autophagic cargo. *Molecular Cell*, 58(1):186 – 193.
- [Tsutsui et al., 2005] Tsutsui, H., Karasawa, S., Shimizu, H., Nukina, N., and Miyawaki, A. (2005). Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *EMBO reports*, 6:233–238.

- [Turk et al., 1998] Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M., and Turk, B. (1998). Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem.*, 379:137–47.
- [Turk et al., 1996] Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M., and Turk, V. (1996). Crystal structures of human procathepsin b at 3.2 and 3.3 Å resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *{FEBS} Letters*, 384(3):211 – 214.
- [Tweeten et al., 1980] Tweeten, K. A., Bulla, L. A., and Consigli, R. A. (1980). Characterization of an extremely basic protein derived from granulosus virus nucleocapsids. *Journal of Virology*, 33(2):866–876.
- [Udenfriend and Kodukula, 1995] Udenfriend, S. and Kodukula, K. (1995). How glycosylphosphatidylinositolanchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.*, 64:563–591.
- [Varghese et al., 1983] Varghese, J. N., Laver, W. G., and Colman, P. M. (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 [angst] resolution. *Nature*, 303:35–40.
- [Veesler et al., 2008] Veesler, D., Blangy, S., Cambillau, C., and Sciara, G. (2008). There is a baby in the bath water: Acrb contamination is a major problem in membrane-protein crystallization. *Acta crystallographica section F*, F64:880–885.
- [Vickerman, 1969] Vickerman, K. (1969). On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *Journal of Cell Science*, 5(1):163–193.
- [Viviani, 2002] Viviani, V. R. (2002). The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59:1833–1850.
- [Vlak, 2007] Vlak, J. M. (2007). Professor shang yin gao (1909–1989): His legacy in insect cell culture and insect virology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95(3):152 – 160. Special Issue for {SIP} 2007SIP 2007.
- [Vogel, 1986] Vogel, S. (1986). Baculo-viren: Biologische insektizide - werkzeuge der molekularbiologie. *Chemie in unserer Zeit*, 3:77–83.
- [Volkman, 1986] Volkman, L. E. (1986). The 64k envelope protein of budded autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 131:103–118.
- [Wang and Hedstrom, 1997] Wang, W. and Hedstrom, L. (1997). Kinetic mechanism of human inosine 5′-monophosphate dehydrogenase type ii: random addition of substrates and ordered release of products. *Biochemistry*, 36(28):8479–8483. PMID: 9214292.
- [WHO, 2015] WHO (2015). factsheets 259. <http://www.who.int>.

- [Wiener et al., 1989] Wiener, J. R., Bartlett, J. A., and Joklik, W. K. (1989). The sequences of reovirus serotype 3 genome segments m1 and m3 encoding the minor protein my2 and the major nonstructural protein myns, respectively. *Virology*, 169(2):293 – 304.
- [Wittenberg and Wittenberg, 1989] Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B. (1989). Transport of oxygen in muscle. *Annual Review of Physiology*, 51:857–878.
- [Yamamoto et al., 2010] Yamamoto, T., Nishiyama, A., Takano, T., Yabe, S., Higuchi, W., Razvina, O., and Shi, D. (2010). Community-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 16(4):225 – 254.
- [Zardecki et al., 2016] Zardecki, C., Dutta, S., Goodsell, D. S., Voigt, M., and Burley, S. K. (2016). Rcsb protein data bank: A resource for chemical, biochemical, and structural explorations of large and small biomolecules. *Journal of Chemical Education*, 93(3):569–575.
- [Zemansky, 1997] Zemansky, M. W. (1997). *Heat and Thermodynamics*. McGraw-Hill, Boston, 7 edition.
- [Zgurskaya and Nikaido, 1999] Zgurskaya, H. I. and Nikaido, H. (1999). Bypassing the periplasm: Reconstitution of the acrab multidrug efflux pump of escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13):7190–7195.
- [Zgurskaya and Nikaido, 2000] Zgurskaya, H. I. and Nikaido, H. (2000). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology*, 37(2):219–225.
- [Zheng et al., 1991] Zheng, Y., Jung, M. K., and Oakley, B. R. (1991). gamma-tubulin is present in drosophila melanogaster and homo sapiens and is associated with the centrosome. *Cell*, 65(5):817 – 823.