

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Expression und Aufreinigung des großen
Merkelzell Polyomavirus Tumorantigens mit
bekannten Bindungspartnern**


Bachelorarbeit
im Rahmen des Studiengangs
Biotechnologie

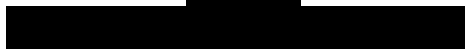
vorgelegt von
Jana Krützmann

Hamburg, 30. September 2019

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Martinistraße 52
20251 Hamburg

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Department Biotechnologie
Ulmenliet 20
21033 Hamburg

Autorin: Jana Krützmann
Matrikel-Nr.: 



Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Noll (HAW Hamburg)
Zweigutachterin: Prof Dr. rer. nat. Nicole Fischer (UKE)

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Bachelor-Thesis mit dem Titel:

Expression und Aufreinigung des großen Merkelzell Polyomavirus Tumorantigens mit bekannten Bindungspartnern

selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasst habe. Alle Passagen, die ich wörtlich aus der Literatur oder aus anderen Quellen wie z. B. Internetseiten übernommen habe, habe ich deutlich als Zitat mit Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Hamburg, den 30. September 2019

Jana Krützmann

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 ZUSAMMENFASSUNG	12
2 EINLEITUNG	14
2.1 POLYOMAVIREN	14
2.1.1 <i>Humane Polyomaviren</i>	14
2.1.2 <i>Das Genom der Polyomaviren</i>	15
2.2 MERKELZELLKARZINOM	17
2.3 MERKELZELL POLYOMAVIRUS	18
2.3.1 <i>Genom des Merkelzell Polyomavirus</i>	18
2.3.2 <i>Lebenszyklus des Merkelzell Polyomavirus</i>	19
2.3.3 <i>Tumorantigene des Merkelzell Polyomavirus</i>	21
2.3.4 <i>Bekannte Bindungspartner des LT Antigens</i>	23
2.3.5 <i>Strukturanalyse der Tumorantigene</i>	26
3 ZIEL DIESER ARBEIT	28
4 MATERIAL	30
4.1 GERÄTE	30
4.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	31
4.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	32
4.4 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	34
4.5 REAGENZSYSTEME	39
4.6 BAKTERIENSTÄMME UND BAKTERIENKULTURMEDIEN	39
4.7 ZELLINIEN UND ZELLKULTURMEDIEN	40
4.9 PLASMIDE UND PRIMER	41
4.10 ENZYME	42
4.11 STANDARDMARKER	42
4.12 ANTIKÖRPER	43
5 METHODEN	44
5.1 MIKROBIELLE METHODEN	44
5.1.1 <i>Kultivierung von E. coli</i>	44
5.1.2 <i>Blau-Weiß Selektion</i>	44
5.1.3 <i>Produktion von Baculoviren</i>	45
5.2 ZELLKULTURTECHNIKEN	46
5.2.1 <i>Kultivierung Insektenzellen</i>	46

5.2.2	<i>Transfektion von Insektenzellen</i>	46
5.2.3	<i>Infektion von Insektenzellen mit Baculovirusüberständen</i>	47
5.2.4	<i>Viral Plaque Assay</i>	48
5.3	DNA TECHNIKEN	49
5.3.1	<i>Hitzeschock-Transformation</i>	49
5.3.2	<i>Präparative Plasmidaufreinigung</i>	50
5.3.3	<i>Bestimmung der Nukleinsäuren-Konzentration</i>	51
5.3.4	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	51
5.3.5	<i>Restriktionsverdau</i>	52
5.3.6	<i>Aufreinigung von DNA aus PCR Reaktionen und Agarose-Gelen</i>	52
5.3.7	<i>Gibson Klonierung</i>	53
5.3.8	<i>Sanger Sequenzierung</i>	53
5.3.9	<i>Polymerasekettenreaktion</i>	54
5.3.10	<i>Ortsspezifische Mutagenese</i>	56
5.4	PROTEIN-TECHNIKEN	56
5.4.1	<i>Herstellung von Zelllysaten</i>	56
5.4.2	<i>Zellaufschluss</i>	57
5.4.3	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	57
5.4.4	<i>SDS-PAGE</i>	58
5.4.5	<i>Färbung von SDS-Gelen</i>	59
5.4.6	<i>Western Blot</i>	60
5.4.7	<i>Aufkonzentrierung von Proteinlösung mit Pufferwechsel</i>	61
5.5	CHROMATOGRAPHIEN	62
5.5.1	<i>Nickel Affinitätschromatographie</i>	62
5.5.2	<i>Größenausschlusschromatographie</i>	63
6	ERGEBNISSE	64
6.1	GIBSON KLONIERUNG	64
6.2	TITERBESTIMMUNG	65
6.3	TESTEXPRESSION IN INSEKTENZELLEN	65
6.3.1	<i>Testexpression von tLT-Rb AB Box</i>	66
6.3.2	<i>Testexpression von tLT-USP7 TRAF</i>	69
6.4	NICKELAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE UND PUFFEROPTIMIERUNG	71
6.4.1	<i>Imidazolkonzentration</i>	72
6.4.2	<i>Salzkonzentration</i>	75
6.5	AUFREINIGUNGEN	77
6.5.1	<i>Aufreinigung von tLT-Rb AB Box</i>	78
6.5.2	<i>Aufreinigung von tLT-USP7 TRAF</i>	85
6.6	KOEXPRESSION VON TLT-RB AB BOX UND Rb AB BOX	89

6.6.1 Testexpression.....	89
6.6.2 Nickel Affinitätschromatographie	91
7 DISKUSSION.....	93
7.1 EXPRESSION VON TLT UND SEINEN BINDUNGSPARTNERN	93
7.2 NI-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE VON TLT KOMPLEXEN	95
7.3 GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE VON TLT KOMPLEXEN	96
7.4 SCHLUSSFOLGERUNG	97
7.5 AUSBLICK	98
8 LITERATURVERZEICHNIS	99
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	110
10 TABELLENVERZEICHNIS.....	113
A ANHANG	114
A.1 PLASMIDKARTEN	114

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
57kT	57 kDA T-Antigen
A	Ampere
ALTO	<i>Alternative frame of the Large T Open reading frame</i>
Amp	Ampicillin
BKV	BK Polyomavirus
bp	Basenpaare
Brd4	Bromodomain-haltiges Protein 4
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDC20	<i>cell division cycle protein 20</i> (Zellteilungszyklusprotein 20)
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DDR	<i>DNA damage response</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Disoxyribonukleosid-Triphosphate
DOC	Desoxycholol
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dpi	<i>days post infection</i> (Tage nach Infektion)
dsDNA	Doppelstrand-DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA1	<i>Epstein-Barr nuclear antigen 1</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EP400	E1A Bindeprotein p400
ER	<i>Early Region</i> (frühe Region des MCPyV Genoms)

<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
FGFR2	FGF Rezeptor 2
Genta	Gentamycin
GST	Glutathion-S-Transferase
H5	High Five
HAUSP	<i>Herpes Virus-Associated Ubiquitin-Specific Protease</i> (Herpesvirus assoziierte Ubiquitin spezifische Protease)
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney cells</i> (menschliche embryonale Nierenzellen)
His	Histidin
HIV	Humane Immundefizienz Virus
HPyV	Human Polyomavirus
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1
Ig	Immunglobulin
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (Metallchelat-Chromatographie)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JC	Initialen des Patienten in dem das JC Polyomavirus gefunden wurde
JCV	JC Polyomavirus
Kana	Kanamycin
kbp	Kilo Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KSHV	Karposi-Sarkom-Herpesvirus
LANA	<i>Latency-associated nuclear antigen 1</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LSD	<i>LT Stabilization Domain</i> (LT stabilisierenden Domäne)
LT-Ag	<i>Large</i> (großes) Tumorantigen
LZ	Leucin-Zipper Domäne
M	Mol
MCC	<i>Merkel cell carcinoma</i> (Merkelzellkarzinom)
MCPyV	Merkelzell Polyomavirus
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minuten
miRNA	microRNA
mL	Milliliter
mM	Millimol
Mpa	Megapascal
MPyV	Murine Polyomavirus (Mauspolyomavirus)
mRNA	messenger RNA
MUR	<i>MCPyV unique region</i>
NaCl	Natrium Chlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCCR	<i>Non Coding Control Region</i> (nichtkodierende Kontrollregion)
ng	Nanogramm
Ni	Nickel
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
NTA	Nitrilotriessigsäure
OBD	<i>Origin binding domain</i>
ori	<i>Origin of Replication</i> (Replikationsursprung)
P1, P2	Passage 1, Passage 2
p53	Tumorsupressorprotein p53
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS-Tween
PCR	<i>Polymerase Chain Reaktion</i> (Polymerasekettenreaktion)
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehy
pfu	<i>Plaque forming units</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Proteinphosphatase 2
PTM	posttranslationale Proteinmodifikationen

PVDF	Polyvinylidenfluorid
PyV	Polyomavirus
Rb	Retinoblastom
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RISC	RNA-induzierten silencing-Komplex
RNA	Ribonucleic acid
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
S-Phase	Synthese-Phase
SCFFbw7	E3-Ubiquitinligase-Komplex aus SKP1-CUL1-F-Box-Protein und der Substrat-Erkennungskomponente FBW7
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	size exclusion chromatography (Größenausschlusschromatographie)
sek.	Sekunden
sT-Ag	<i>Small</i> (kleines) Tumorantigen
SV40	<i>simian vacuolating Virus 40</i> (Makakenvirus Simian Virus 40)
T	Tumor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tetra	Tetracyclin
tLT	<i>truncated</i> (verkürztes) LT
TRAF	Tumornekrosefaktor -Rezeptor-assoziiierter Faktoren TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktoren
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
TSPyV	Trichodysplasia spinulosa Polyomavirus
U	<i>unified atomic mass</i> (Unit)
Ubl	<i>Ubiquitin like domains</i>
Usp7	Ubiquitin spezifische Protease 7
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VP	Hüllprotein von Polyomaviren

W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Westernblot
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ZN	Zinkfinger Motiv
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter

1 Zusammenfassung

Die ersten Polyomaviren (PyV) wurden in den 1950er Jahren entdeckt. Seitdem sind im Laufe der Jahre immer mehr Viren dieser Familie dazugekommen, deren Genomsequenzen zum Teil schon entschlüsselt wurden.

Das Merkelzell Polyomavirus (MCPyV) ist eines von 14 humanen Polyomaviren (HPyV) und ist unter diesen das einzige tumorassoziierte Virus [1]. Die Sequenz des MCPyV wurde 2008 von Feng *et al.* in einem Merkelzellkarzinom (MCC) nachgewiesen [2].

Bei dem MCC handelt es sich um einen sehr aggressiven, malignen neuroendokrinen Tumor der Haut. In den meisten Fällen sind ältere Personen und Menschen mit einer Immunsuppression von diesem Tumorleiden betroffen. Im Fall der Ausbildung von Metastasen liegt die Fünf-Jahres-Überlebenschance bei nur etwa 50 % [3].

Nahezu 80 % der Bevölkerung haben Antikörper gegen das MCPyV, womit das Virus hochprävalent ist. Die Entstehung eines MCC allerdings sehr selten [4].

Charakteristisch für PyV ist die Expression des kleinen und großen Tumorantigens (sT und LT Antigen). Diese spielen eine zentrale Rolle in der Tumorgenese von MCC.

In MCPyV positiven MCC kommt es zu verschiedenen Mutationen in der frühen Region des MCPyV Genoms, die eine Expression einer verkürzten Form des LT, truncated LT (tLT), hervorruft. Die zellulären Interaktionen der T-Antigene des MCPyV sind essentiell für die Transformation der Zelle und somit auch eine wichtige Grundlage für das Verständnis der Tumorgenese.

Zur Zeit gibt es nur ungenügend wirksame Therapien gegen MCC [5]. Besonders die Struktur der T-Antigene ist essentiell zur Entwicklung neuer gezielter Inhibitoren, da es im Gegensatz zu anderen Tumorarten nur zu wenigen Anhäufungen von Mutationen im Wirtsgenom kommt [6].

Ziel ist die Aufklärung der tLT Struktur, da diese eine große Bedeutung für die Entwicklung antiviraler Therapien hat. Aktuell ist lediglich die *Original Binding Domain* des LT Antigens bekannt [7].

Die Kristallisation des LTs in vorangegangene Kristallisationsansätzen scheiterte aufgrund der Aggregationseigenschaft des LT Antigens. Kürzlich konnten verschiedene Bindungspartner des LT Antigens identifiziert werden, von denen vor allem die Ubiquitin spezifische Protease 7 (Usp7) zu einer Stabilisierung des Antigens führen könnte [8].

In dieser Arbeit wurde tLT mit den bekannten zellulären Bindungspartnern Usp7 und Retinoblastom (Rb) Protein in Insektenzellen exprimiert und eine Aufreinigung des Antigens unternommen. Das Insektenzellexpressionssystem wurde aufgrund der zahlreich möglichen Posttranslationalen Modifikationen gewählt, wobei Baculoviren für die Infektion dieser eingesetzt wurden [9].

Es gelang eine Aufreinigung des tLT Antigens aus den aufgeschlossenen Zellen, mit den Bindungspartnern, über Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Affinitätschromatographie (IMAC).

Obgleich tLT mit Hilfe der Bindungspartner Rb und Usp7 aufgereinigt werden konnte, gelang keine weitere Aufreinigung dieser Komplexe über eine Gelfiltration. Grund dafür waren Aggregationsausbildungen des tLT Antigens mit den Bindungspartnern.

2 Einleitung

2.1 Polyomaviren

PyV sind nicht-behüllte Viren mit einer Größe von 40 bis 45 nm und gehören zur Familie der *Polyomaviridae*. Sie besitzen ein etwa 5 kbp großes, zirkuläres doppelsträngiges DNA Genom, welches für die viralen Proteine codiert. Das Kapsid ist aus 72 Kapsomeren aufgebaut, die eine ikosaedrische Form bilden [1]. Eingeschlossen in das Kapsid ist die mit Histonen besetzte virale DNA [10].

Das International Committee on Taxonomy of Viruses hat die PyV in fünf Gattungen, die Alphapolyomaviren, Betapolyomaviren, Deltapolyomaviren, Gammapolyomaviren und eine fünfte, nicht benannte Gattung, unterteilt.

Zu den Wirten dieser fünf doppelsträngigen, zirkulären DNA Viren gehören neben den Säugetieren auch Fische und Vögel [11].

Zusammengesetzt aus den griechischen Wörtern *poly* („viele“) und *oma* („Tumor“), bezieht sich der Name der Viren auf das erste entdeckte Polyomavirus, dem Murine Polyomavirus (MPyV) [12]. Dieses Virus bewirkte die Entstehung von Tumoren in neugeborenen Mäusen [13].

Das Makakenvirus Simian Virus 40 (SV40), welches in den 1960er Jahren als zweites der Familie der Polyomaviren zugeordnet wurde, dient heute als Modellsystem für viele molekulare Zellprozesse in eukaryotischen Zellen und deren Transformation [14].

2.1.1 Humane Polyomaviren

Das JC Virus (JCV) und das BK Virus (BKV) waren die ersten zwei, der insgesamt heute 13 bekannten, humanen Polyomaviren (HPyV), welche 1971 erstmals beschrieben wurden [15], [16].

In Abbildung 1 ist der phylogenetische Stammbaum der humanen und ihrer am nächsten verwandten tierischen Polyomaviren an Hand der LT Antigene abgebildet. Serologische Untersuchungen konnten zeigen, dass HPyV hochprävalent in der Normalbevölkerung sind. Bis zu 80 % der Erwachsenen sind infiziert, wobei die verschiedenen HPyV Spezies eine unterschiedliche Seroprävalenz zeigen.

Die Primärinfektion der meisten humanen Polyomaviren findet in der frühen Kindheit statt und verläuft ohne spezifische Symptome [10], [17].

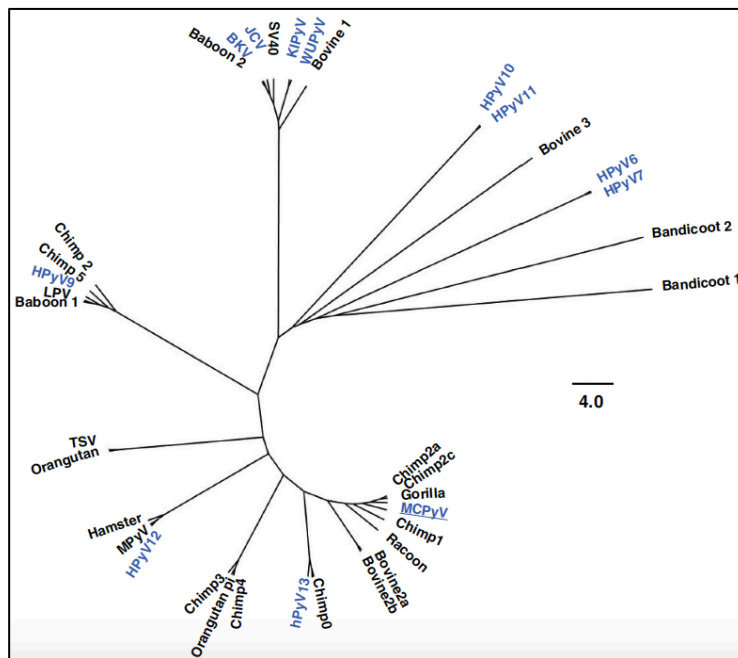


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der humanen Polyomaviren mit ihren am nächsten verwandten animalischen Polyomaviren, auf Grundlage der großen LT-AG Aminosäuresequenz. In Blau dargestellt sind die humanen Polyomaviren während die nicht-humanen Polyomaviren in Schwarz abgebildet sind. [18]

Menschen mit Immunsuppression sind am häufigsten von Erkrankungen durch HPyV betroffen.

Vier der HPyV, BKV, JCV, MCPyV und *Trichodysplasia spinulosa* (TS PyV), sind besonders bei immunsuppressiven Patienten klinisch relevant.

Das MCPyV ist als einziges HPyV mit Tumoren assoziiert und ist an der Entstehung von MCC beteiligt [19].

PyV assoziierte Erkrankungen sind generell eher seltene Erkrankungen, deren Häufigkeit jedoch durch die Einnahme von Immunsuppressiva kontinuierlich ansteigt [20].

2.1.2 Das Genom der Polyomaviren

Die Familie der Polyomaviren zeichnet sich durch ein etwa 5 kbp großes Genom aus, welches in drei funktionelle Bereiche eingeteilt ist. Dazu gehören die frühe Region, die für regulatorische Proteine codiert, die späte Region, welche die Codierung der Kapsidproteine zur Aufgabe hat und die dritte Domäne, die nichtcodierende Kontrollregion (NCCR). Die NCCR beinhaltet neben dem Replikationsursprung (ori), auch die für die virale Gentranskription notwendigen Promotoren und Enhancer [10]. Abgebildet ist die Genomorganisation der PyV in Abbildung 2.

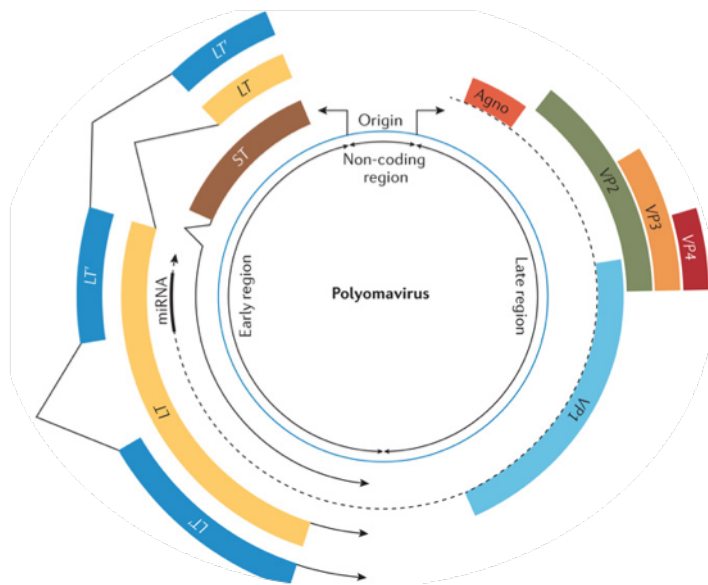


Abbildung 2: Genomorganisation der PyV. Die Kapsidproteine VP1 bis VP4 (Dunkelrot, Orange, Grün und Hellblau) werden in der späten Region (*Late region*) codiert. Ebenso das Agno Protein (Hellrot), welches durch einen alternativen Leserahmen entstehen kann. Die frühe Region (*Early region*) hingegen codiert die T-Antigene sT (Braun) und LT (Dunkelblau) und zusätzlich eine microRNA in antisenärer Richtung. Durch Mutation der frühen Region kann es ebenfalls zur Expression eines verkürzten LT Antigens kommen (LT'), hier in Gelb dargestellt. Zusätzlich können alternative Spleißprodukte entstehen. Die nichtkodierende Kontrollregion (*Non-coding region*) enthält den Replikationsursprung (*Origin*). [10]

Während der Initiationsphase einer Infektion werden hauptsächlich die in der frühen Region codierten T-Antigene transkribiert. Zusätzlich können neben den T-Antigenen, sT und LT, alternative Produkte durch Spleißen und anderer Leserahmen in den verschiedenen PyV Spezies entstehen [2].

Ebenfalls in der frühen Region codiert ist die microRNA (miRNA), die nur in einigen PyV Spezies enthalten ist [21]. Die zur codierenden DNA Sequenz komplementäre miRNA kann die Expression der frühen Genprodukte regulieren und somit die Replikation der DNA begrenzen [22].

Die Gene der späten Region des PyV Genoms werden in der späten Phase einer Infektion transkribiert. Die Strukturproteine VP1 bis VP3 entstehen durch alternatives Spleißen während dieser Phase und bilden das Kapsid des PyV, wobei VP1 das Hauptkapsidprotein ist [10].

Für SV40 und BKV konnte neben der Existenz eines weiteren Kapsidproteins, VP4, auch die Transkription des Agnoproteins durch alternatives Spleißen gezeigt werden [30]. Die Funktion des Agnoproteins ist jedoch bisher nicht bekannt [10].

Im Falle des MCPyV wird das virale Strukturprotein VP3 nicht exprimiert [22], [24].

2.2 Merkelzellkarzinom

Das MCC ist eine sehr maligne und aggressive Form des neuroendokrinen Hautkrebses [25]. Diese seltene Krebsform betrifft hauptsächlich ältere Menschen und Personen mit einer Immunsuppression [26]. In der Entstehung von MCC ist, neben MCPyV, auch ultraviolette (UV) Strahlung eine Hauptursache [27].

Das MCC zeigt sich durch die Bildung von rot-violetten Knoten und Ausbuchtungen der Haut, was in Abbildung 3 dargestellt ist [28]. Mit einer Mortalitätsrate, des stark metastasierenden MCC, von etwa 33 %, liegt diese über der von Melanomen [29].



Abbildung 3: Merkelzellkarzinom hinter dem rechten Ohr [30]

Das virale Genom des MCPyV wurde in 60 bis 80 % aller MCC monoklonal integriert in das Wirtsgenom gefunden, wobei das Verständnis über die Tumorgenese MCPyV positiver und negativer MCC noch nicht weitreichend ist [2].

Die Mutationslast in MCPyV positiven und MCPyV negativen Tumoren unterscheidet sich stark. MCPyV negative MCC weisen eine deutlich höhere Mutationslast auf, wobei viele UV-strahlentypische Mutationen präsent sind. Eine Mutation des für p53 codierende Tumorsuppressorgens tritt vermehrt auf [31], sowie Mutationen von NOTCH, NF1, FGF Rezeptor 2 (FGFR2), und des PI3K/AKT Signalwegs [32]. MCPyV positive MCC hingegen zeigen eine geringere Mutationslast, die meistens durch Zellalterungsprozesse hervorgerufen werden.

Daraus lassen sich Unterschiede in den Entstehungsmechanismus von MCPyV positiven und MCPyV negativen MCC schließen [32], [33].

Bei den MCPyV positiven MCC wurde das virale Genom monoklonal integriert in die DNA des Wirtsgenoms im Primärtumor sowie den Metastasen gefunden [2]. Jedoch konnte ein Unterschied der MCPyV Integrationsmuster in verschiedenen isolierten MCC Tumoren festgestellt werden [34].

Die aus MCC isolierten MCPyV Sequenzen zeigen alle Mutationen in der Gensequenz des LT Antigens. Die Mutation des LT führt zu einer verkürzten Form des Antigens, zum tLT, bei der der C-Terminus verloren geht. Der Verlust der ATPase und Helikase Funktion bewirkt eine Replikationsunfähigkeit des Virus [2], [25].

Die Behandlung eines MCC ist stark abhängig von dessen Tumorstadium. Dabei schließt sich nach der Entfernung des Primärtumors häufig eine Radiotherapie an. Der Einsatz von Chemotherapeutika zeigte bisher keinen positiven Effekt bei der Behandlung von MCC [35]. Neue Therapieansatzpunkte beschäftigen sich mit der Verwendung von Immuntherapien, wie zum Beispiel den Immun Checkpoint Inhibitoren PD-L1. Viele Therapieansätze sind jedoch zur Zeit noch in der klinischen Testphase [36].

Avelumab gehört zu den PD-L1 Inhibitoren und wurde bereits 2017 zur Behandlung von MCC zugelassen. Etwa 50 % der Patienten profitierten von dieser Behandlung [37].

Da es bisher keine genauen Aufklärungen der Ursprungszellen von MCC, der Tumorentwicklung und der Auswirkung von MCPyV auf die Metastasierung gibt, besteht ein großer Forschungsbedarf, um neue Ansatzpunkte zu finden [18].

2.3 Merkelzell Polyomavirus

Die Primärinfektion mit dem MCPyV findet, wie bei anderen PyV, bereits in der frühen Kindheit statt und verläuft in den meisten Fällen ohne Symptome. Das Virus persistiert in der Hautflora infizierter Personen lebenslänglich [38].

Es wurde von dem International Committee on Taxonomy of Viruses der Alphapolyomaviruspezies des Humanen Polyomavirus 5 untergeordnet [39].

2.3.1 Genom des Merkelzell Polyomavirus

Das doppelsträngige DNA Genom des MCPyV, mit einer Größe von 5,4 kbp, wird wie die meisten Viren der Familie der *Polyomaviridae* in drei Bereichen aufgeteilt [18]. Dargestellt ist die Genomorganisation in Abbildung 4. Die NCCR, die späte und frühe Region voneinander teilt, enthält den Ori, sowie die Promotorelemente für die virale Proteintranskription. Die frühe Region codiert die viralen T-Antigene sT und LT, sowie das 57k Protein [2]. Zusätzlich kann durch Verschiebung des Leserasters ein *alternate frame of the large T open reading frame* (Alto) Protein entstehen, dessen Funktion, wie die des 57k Proteins, bisher nicht bekannt ist [40]. Zusätzlich enthält die frühe Region in antisense Richtung eine zur DNA Sequenz

komplementäre microRNA, die mcv-miR-M1 codiert. Die mcv-miR-M1 reguliert die Expression von LT und kann über dessen Absenkung die Replikation des MCPyV Genoms verringern [41], [42].

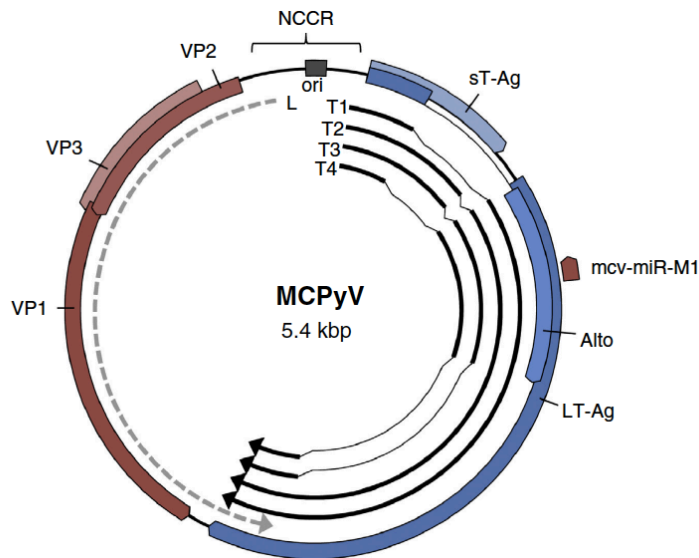


Abbildung 4: Genomorganisation des MCPyV. In Blau dargestellt ist die frühe Region mit den Genen für die viralen T-Antigene sT, LT und 57k, sowie in antisense Richtung die zum Genom komplementäre microRNA (mcv-miR-M1). Die späte Region in Rot dargestellt, enthält die Gene für die Kapsidproteine VP1 und VP2 sowie möglicherweise VP3. Die nichtkodierende Kontrollregion (NCCR) unterteilt diese beiden Regionen und beinhaltet den Replikationsursprung (Ori) und virale Promotorelemente. [18]

Die späte Region des MCPyV Genoms codiert das Hauptstrukturprotein VP1. Durch alternatives Spleißen oder einen ORF kann das Strukturprotein VP2 entstehen. Die Strukturproteine bilden das Kapsid der MCPyV Viren. Jedoch wurde die Proteinstruktur der späten Transkripte noch nicht vollständig aufgeklärt [18].

Die mögliche Sequenz für ein drittes Strukturprotein, VP3, konnte bisher über MCPyV infizierte Zellen nicht belegt werden.

Die viralen Strukturproteine bilden ein unbehülltes, ikosaedrisches Viruskapsid, welches das Genom umschließt [24],[2].

2.3.2 Lebenszyklus des Merkelzell Polyomavirus

PyV zeichnen sich durch eine hohe Wirtsspezifität aus, was auf eine gute Adaption an ihren Wirt schließen lässt [43]. Zusätzlich liegt bei PyV ein hoher Zelltropismus vor, wodurch *in vitro* Versuche sowie das Arbeiten in Kleintiermodellen zu einer Herausforderung werden [44].

Bis heute ist die Wirtszelle von MCPyV noch nicht bekannt, weshalb noch kein permissives Zellsystem entwickelt werden konnte. Es wird jedoch vermutet, dass humane dermale

Fibroblasten zu den Wirtszellen von MCPyV gehören [45]. Genaue Mechanismen der Tumorgenese von MCPyV positiven MCC sind ebenfalls noch nicht vollständig geklärt, was den Ort der Replikation der Viren ebenfalls offen lässt.

Bisher besteht kein permissives Zellkultursystem zur Untersuchung der viralen Infektion, Replikation und Genexpression.

Der virale Eintritt des MCPyV in die Wirtszelle gelingt über eine Anheftung des Virus an die Wirtszelle über Glykosaminoglykane, wie Heparan- und Chondroitinsulfate [46].

Vermutlich unterzieht sich das MCPyV einem zweistufigen Anheftungs- und Eintrittsvorgang, bei dem es zunächst zu einer Bindung des Virons an einen Glykosaminoglykan-Rezeptoren kommt, gefolgt von einer Bindung des Virons über die Neu5Ac- α 2,3-Ga Bindungsdomäne des VP1 an einen Neu5Ac-Rezeptor [46], [47].

Über Endozytose gelangt das MCPyV in die Wirtszelle und wird über nicht endosomale zytosolische Zellorganellen zum endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo eine Kapsidfreisetzung ins Zytoplasma stattfindet. Es kann ein Transport des Genoms zum Nucleus über Importine stattfinden, wo die Replikation des viralen Genoms abläuft [48].

Die Transkription und Replikation des viralen Genoms ist stark abhängig von Wirtszellfaktoren. In der frühen Phase der Infektion, direkt nach Eintritt des Genoms in den Nucleus, werden die Gene der frühen Region exprimiert. Die Expression von sT und LT bewirkt den Eintritt in die Synthese-Phase (S-Phase) der Zellen, wodurch die virale Replikation ermöglicht wird [46].

Die Interaktion des LT Antigens mit dem Rb bewirkt den Eintritt in die S-Phase [49]. Das LT Antigen ist hauptsächlich für die virale Replikation zuständig.

Sobald ein ausreichendes Level der T-Antigene sT und LT besteht, ist eine Transkription der mcv-miR-M1 möglich. Diese reguliert in der späten Phase der Infektion die Transkription des LT Antigens und initiiert die späte Transkription, sodass es zur viralen Replikation kommt [41]. Im Zellkern werden die MCPyV-Partikel zusammengesetzt, wobei der Freisetzungsprozess dieser MCPyV-Partikel bisher nicht bekannt ist [48].

2.3.3 Tumorantigene des Merkelzell Polyomavirus

In der Tumorgenese von MCC tragen die T-Antigene des MCPyV eine entscheidende Rolle. Die Proliferation der MCC Tumorzellen ist abhängig von den T-Antigenen, den viralen Onkoproteinen [50].

Neben dem LT Antigen ist das sT Antigen ein weiteres Onkogene des MCPyV. Es konnte gezeigt werden, dass 92 % aller MCC Tumorproben sT positiv waren. Hingegen wiesen nur etwa 75 % eine Expression von LT auf [1], [2].

Dies lässt vermuten, dass sT eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese, insbesondere während der Zelltransformation spielt [46].

Versuche ergaben, dass die Arbeit mit dem sT Antigen durch eine schlechte Expression und Instabilitäten, die zum Ausfall des Antigens führen, erschwert wird [52].

Aus diesen Gründen lag der Fokus dieser Arbeit auf dem LT Antigen.

2.3.3.1 LT Antigen

Das LT Antigen des MCPyV ist aus 816 Aminosäuren aufgebaut [46]. Der Großteil der Struktur des MCPyV LT Antigens ist bisher noch unbekannt [53]. In Abschnitt 2.3.5 wird näher auf den bisher bekannten Strukturteil, der OBD, des LT Antigens eingegangen.

Das LT Antigen enthält verschiedene Bindemotive und -domänen, die für den viralen Lebenszyklus des MCPyV essentiell sind. Abgebildet ist der Aufbau des LT Antigens mit seinen funktionellen Motiven und Domänen (Abbildung 5).

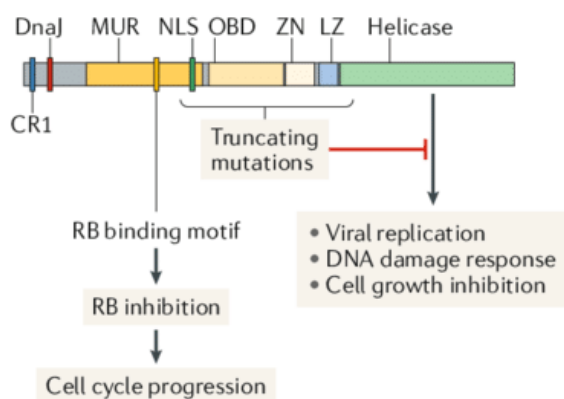


Abbildung 5: Aufbau und zelluläre Funktion des MCPyV LT Antigens. Die N-terminale Struktur (Grau) des LT Antigens enthält die DnaJ Domäne (Dunkelrot), die eine wichtige Funktion in der viralen Replikation übernimmt. Die *MCPyV unique region* (MUR) (Gelb) beinhaltet die Rb Bindedomäne (Orange). Über die Bindung von Rb kann eine Zellzyklus Progression hervorgerufen werden. Der C-Terminus (Grün) setzt sich aus *Origin binding domain* (OBD) (Hellgelb), Zinkfinger Motiv (ZN) (Beige), Leucin-Zipper Domäne (LZ) (Hellblau) und Helikase Domäne (Grün) zusammen. Die Helikase Domäne ist für die virale Replikation notwendig, kann jedoch auch eine *DNA damage response* (DDR) hervorrufen und das Zellwachstum inhibieren. Mutationen des LT Antigens treten im Bereich zwischen der Rb Bindedomäne und der OBD (Rot) auf. [54]

Die N-terminale DnaJ Domäne des LT Antigens, welche die Hsc70 Bindedomäne beinhaltet, ist für die Replikation des MCPyV notwendig [55].

Im Gegensatz zum SV40 LT Antigen, ist das LT Antigen des MCPyV nicht so stark in die Transformation der Wirtszelle involviert, wie das sT Antigen [51].

In der *MCPyV unique region* (MUR) ist ein Rb Bindemotiv (LxCxE Motiv) enthalten. Die Bindung des LT Antigens an Rb über das LxCxE Motiv bewirkt eine Deregulation der E2F-abhängigen Transkription, sodass der Eintritt in die S-Phase ablaufen kann [49].

Houben *et al.* konnte zeigen, dass die Interaktion zwischen LT und Rb essentiell für das Wachstum von MCPyV positiven Zellen ist [56].

Die MUR ist eine von mehreren unstrukturierten Domänen des LT Antigens, welche die Kristallisation zur Herausforderung macht [57].

Das sT Antigen stabilisiert das LT Antigen, wodurch die virale DNA Replikation verstärkt wird. Es interagiert über die LT stabilisierende Domäne (LSD) mit dem E3-Ubiquitinligase-Komplex SCFFbw7, wodurch das LT Antigen vor dem proteasomalen Abbau geschützt wird.

Der C-Terminus des LT Antigens enthält verschiedene, zur viralen Replikation notwendige Elemente. Die *Origin binding domain* (OBD) ermöglicht während der Initiation der viralen Replikation eine Bindung an die NCCR [53]. Die OBD des MCPyV zeigt eine etwa 8-fach schwächere Bindungsaffinität zur GAGGC DNA Sequenz der NCCR, als die ebenfalls aufgeklärte Struktur der OBD des SV40. Das LT Antigen kann über das pentamerisch GAGGC Bindemotive sich an die OBD anlagern, sodass es zur Initiation der Replikation kommt [53].

In der C-terminalen Sequenz ist zudem das Zinkfinger Motiv (ZN) und die Leucin-Zipper Domäne (LZ) enthalten. Außerdem wird der C-Terminus durch die Helikase und ATPase Domäne ergänzt. Diese ermöglichen die LT Oligomerisierung und die Initiation der Replikation [58].

Die zur Replikationsinkompetenz führenden Mutationen des LT Antigens in MCCs liegen immer im Bereich nach der Rb Bindedomäne bis zum Anfang der OBD vor. Helikase und ATPase werden nicht mehr exprimiert [49].

Im Gegensatz zu dem LT Antigen des SV40 PyV zeigt das MCPyV LT Antigen keine direkte Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53 [59]. Die Inhibition von p53 erfolgt über einen bislang ungeklärten Mechanismus [59]. Der C-Terminus kann über unbekannte Mechanismen DNA Schäden hervorrufen, die zu einer *DNA damage response* (DDR) und einem Zelltod führen können [49].

Das in dieser Arbeit betrachtete tLT Antigen mit einer Länge von 244 Aminosäuren, stellt den N-Terminus des MCPyV LT Antigens dar. Über das Programm ProtParam von ExpASy lassen

sich Vorhersagen über das Molekulargewicht und den isoelektrischen Punkt (pI) von Aminosäuresequenzen treffen. Für tLT wird ein Molekulargewicht von 26,7 kDa vorhergesagt und ein pI von 6,19 [60].

2.3.4 Bekannte Bindungspartner des LT Antigens

Das LT Antigen des MCPyV besitzt viele verschiedene Bindungspartner. Ein Teil dieser Bindungspartner ist bereits in Abschnitt 2.3.3.1 aufgeführt.

2.3.4.1 Ubiquitin spezifische Protease 7

Die Ubiquitin spezifische Protease 7 (Usp7), die auch als Herpesvirus assoziierte Ubiquitin spezifische Protease (HAUSP) bekannt ist, konnte als Bindungspartner von MCPyV LT identifiziert werden [61].

Usp7 ist ein 1997 entdecktes deubiquitinierendes Enzym, welches das Substrat durch Deubiquitinierung vor dem Abbau durch das Proteasom schützt [62], [63].

Das Molekulargewicht des Volllängen Usp7 mit einer Aminosäuresequenz von 1102 Aminosäuren wird auf ca. 135 kDa geschätzt [64], [65].

Die Struktur des deubiquitinierenden Enzyms ist in Abbildung 6 zu erkennen. Die *Ubiquitin like domains* Ubl1 bis Ubl5 übernehmen regulatorische Funktionen und können die katalytische Aktivität des Proteins steigern. Das C-terminale Ende kann an die Aktivierungsdomäne der katalytischen Einheit binden und somit die Stabilität der katalytisch aktiven Konformation erhalten [66]. Proteine, die an die Ubl Einheit gebunden sind, können ebenfalls den Erhalt der katalytisch aktiven Form des Enzyms regulieren [65]. Verbunden ist die regulatorische Einheit über eine α -Helix mit der katalytischen Einheit.

Die Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktoren (TRAF) Domäne ist für die Substratbindung zuständig. Dabei werden die Substrate über ein P/A-x-x-S Motiv gebunden [67], [68]. Die Struktur des USP Fingers ist N-terminal gelegen.

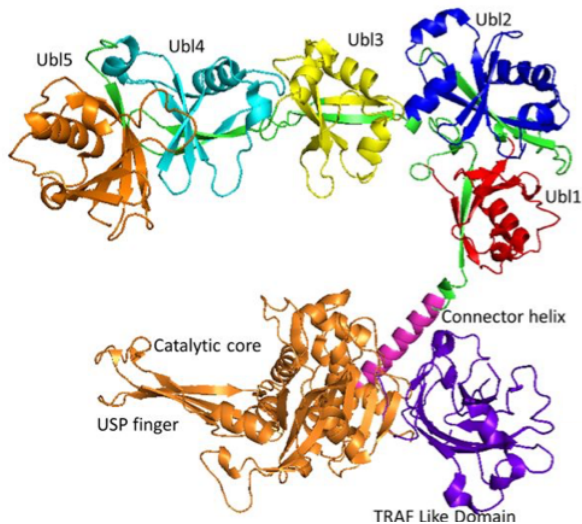


Abbildung 6: Kristallstruktur von Usp7. Die fünf *Ubiquitin like domains* (Ubl) von Usp7, Ubl1 bis Ubl5, liegen am C-Terminus des Proteins und übernehmen regulatorische Funktionen. Die Connector α -Helix verbindet die katalytische Domäne mit Ubl1. N-terminal gelegen sind die TRAF (Tumornekrosefaktor - Rezeptor-assoziiierter Faktoren) Domäne und der USP Finger. [69]

Zu den zellulären Interaktionspartnern von Usp7 gehören unter anderem der Tumorsuppressor p53 und das Maus-Doppel-Minute-2-Homolog (Mdm2), einem negativem Regulator des p53 Tumorsuppressors [70]. Diese können durch die Bindung an das P/A-x-x-S Motiv der TRAF Domäne gebunden und somit stabilisiert werden [71].

Usp7 zeigt ebenfalls Wechselwirkungen mit viralen Interaktionspartnern.

Es konnte gezeigt werden, dass Usp7 mit seiner Ubl2 Untereinheit an das K-x-x-x-K Motiv von ICP0 des Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) bindet [62].

Auch das Protein E1B-55k des Adenovirus Typ 5 (AdV5) [72], das *Latency-associated nuclear antigen 1* (LANA) des Karposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) [73], sowie das *Epstein-Barr nuclear antigen 1* (EBNA1) des Epstein-Barr-Virus (EBV) [74] gehören zu den viralen Interaktionspartnern von Usp7.

Auch das LT Antigen des MCPyV ist ein viraler Bindungspartner von Usp7. Czech-Sioli *et al.* konnten zeigen, dass in der MUR sowohl das Bindemotiv P/A-x-x-S, welches für die Bindung der TRAF Domäne notwendig ist, als auch das E-x-x-S Motiv enthalten sind [8]. Letzteres ähnelt dem E-G-P-S Motiv des EBNA1, über das die Usp7 Bindung zustande kommt [71].

Das LT Antigen enthält insgesamt 16 P/A-x-x-S, neun E-x-x-S und sieben K-x-x-x-K Motive. Die meisten dieser Bindemotive sind auch in der verkürzten Form des LT, dem tLT enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl LT als auch tLT mit der N-terminalen TRAF-Domäne von Usp7 interagieren, da die beiden Motive P/A-x-x-S und E-x-x-S innerhalb dieser Domäne liegen.

Durch die zahlreichen Usp7 Bindemotive innerhalb der MUR ist Usp7 ein idealer Bindungspartner zur Koaufräumung und Kokristallisation des LT Antigens.

2.3.4.2 Retinoblastom Protein

Rb ist ein wichtiger Tumorsuppressor innerhalb des Zellzyklus. Über die Interaktion mit dem E2F Transkriptionsfaktor kann die Rekrutierung der Promotoren von Koaktivatoren für die Transkription verhindert oder die Rekrutierung von Korepressoren zur Transkription aktiviert werden. Der Übergang der Zelle in die S-Phase wird somit reguliert [75].

Das zur Familie der pocket-Proteine gehörende Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 100 bis 110 kDa ist in Abbildung 7 abgebildet [76]. Das Protein besitzt zwei Bindungsdomänen, die E2F Transaktivierungsdomäne und die LxCxE Bindedomäne. Die E2F Transaktivierungsdomäne liegt zwischen den Subdomänen Cyclin Box A und Cyclin Box B. Die LxCxE Bindedomäne hingegen ist C-terminal hinter der Cyclin Box B gelegen. Die Subdomänen A und B sind über einen ungeordneten Pocket Linker verbunden [77].

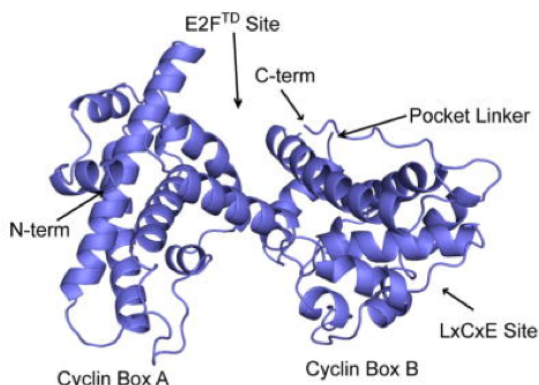


Abbildung 7: Struktur des ungebundenen Rb. Die E2F Transaktivierungsdomäne liegt zwischen den Subdomänen Cyclin Box A und Cyclin Box B. Die Bindedomäne für das LxCxE Motiv ist hingegen C-terminal gelegen. Die Subdomänen A und B werden von dem ungeordneten Pocket Linker zusammengehalten. [77]

Das LT Antigen des MCPyV zeigt eine starke Erhaltung des in Exon 2 codierten LxCxE Motivs, auch in den mutierten Formen des Antigens, welche eine hoch affine Bindung von Rb zulässt.

Die Mutationen des LT Antigens, welche zum tLT führt, führen zu einer Herunterregulation des LxCxE Motivs. Diese Regulationserscheinung lässt vermuten, dass die Inaktivierung von Rb durch tLT eine wichtige Rolle in der MCC Pathogenese spielt [59].

Mit Hilfe einer ortsspezifische Mutagenese des LxCxE Motivs konnte gezeigt werden, dass kein Rb an das mutierte LxCxE Motiv bindet. Es handelt sich somit um eine hochspezifische

Bindung von Rb an das LxCxE Motiv. Es konnte gezeigt werden, dass das LxCxE Motiv von LT oder tLT zur Rb Bindung benötigt wird [49].

2.3.5 Strukturanalyse der Tumorantigene

Die Struktur der T-Antigene ist, wie bereits erwähnt, ein wichtiger Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer antiviraler Therapien.

Die Herstellung von Proteinkristallen zur Röntgenstrukturanalyse ist von vielen Faktoren abhängig, die einen Einfluss auf dessen Erfolg haben können [78].

Für die Entstehung von Proteinkristallen sind physische, chemische und biochemische Faktoren, wie zum Beispiel der pH Wert, die Temperatur, Kofaktoren, Inhibitoren, posttranslationale Proteinmodifikationen (PTM) und Aggregationsneigungen von Makromolekülen entscheidend [79].

Die Wahl eines geeigneten Expressionssystems ist demnach grundlegend für die Analyse von Proteinen. Je nach Zielprotein ist die Ausbildung einer funktionsfähigen Proteinstruktur nur durch PTM möglich. Viele eukaryotische Expressionssysteme unterstützen PTM [9], [80], wohingegen nicht, beziehungsweise nur zum Teil mögliche PTM von Proteinen eine große Limitierung von bakteriellen Expressionssystemen darstellen [81].

Für die T-Antigene von SV40 als auch MCPyV sind PTM wie Phosphorylierungen [82], Acetylierungen [83] und Methylierungen [84] wichtig zur Regulation der Proteinfunktionen.

Aktuell ist ausschließlich die Struktur der OBD des MCPyV LT Antigens bekannt [7]. Diese konnte im Komplex mit einem DNA Fragment des MCPyV Ori aufgeklärt werden [53].

Abbildung 8 zeigt eine Vorhersage der LT Antigen Struktur basierend auf bekannten Strukturen anderer Proteine.

Allerdings bestehen für die Antigene LT und sT des MCPyV keine starke Verwandtschaft zu anderen LT und sT Antigenen [85]. Die Aminosäuresequenz des MCPyV LT Antigens zeigt nur etwa eine 30 %ige Übereinstimmung zu SV40 LT, BKV LT oder JCV LT.

Die fehlende Übereinstimmung macht die Strukturvorhersage äußerst schwierig. Zeitgleich macht die Tatsache der fehlenden Strukturübereinstimmung auch die Analyse des MCPyV interessant, da daraus die Fähigkeit zur Tumorgenese beim Menschen hervorgeht [86].

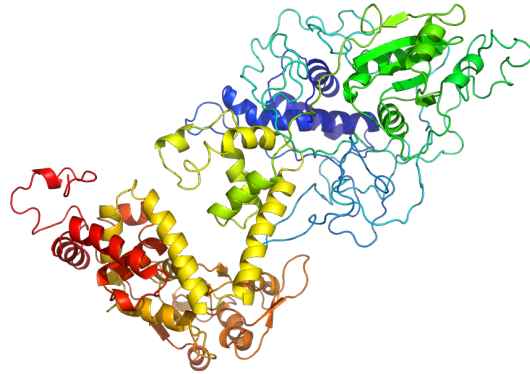


Abbildung 8: Vorhersage der MCPyV LT Struktur. Als Pfeile dargestellt sind β -Faltblätter und als Spiralen dargestellt sind α -Helices. Die als Linie abgebildeten Bereiche stellen unstrukturierte Bereiche dar. Der N-Terminus ist in Blau dargestellt, während der C-Terminus Rot gezeigt wird. Erstellt wurde die Vorhersage mit Phyre2. [87]

Die Kristallstruktur des N-Terminus des SV40 LT Antigens konnte über die Bindung mit Rb entschlüsselt werden [88, p. 40]. Die erfolgreiche Verwendung von Rb zur Strukturaufklärung des N-terminalen SV40 LT Antigens dient als Grundlage dieser Arbeit.

MCPyV LT zeigt, wie erwähnt, keine nennenswerte Homologie in Bezug auf das gesamte Protein zu LT Antigenen anderer Polyomaviren. Die fehlende Homologie erschwert die Strukturanalyse, aber erhöht auch deren Relevanz. Durch andere Aminosäuresequenzen geht wahrscheinlich eine andere Struktur hervor, die andere Funktionen mit sich bringen könnte.

Im Gegensatz zum LT Antigen konnte bisher keine Struktur des sT Antigens oder Teilbereichen davon aufgeklärt werden [85]. Durch die mangelnde Übereinstimmung zu anderen sT Antigenen ist die Strukturvorhersage schwer.

3 Ziel dieser Arbeit

Das LT Antigen des MCPyV ist einer der Hauptfaktoren in der Tumorgenese von MCC. Um bisher ungeklärte Mechanismen der Tumorgenese des MCPyV genauer verstehen zu können, ist die Strukturanalyse des LT Antigens notwendig.

Für die Aufklärung der Struktur des MCPyV LT Antigens über Röntgenstrukturanalysen ist dessen Expression in einer hohen Konzentration und Aufreinigung gefolgt von einem Kristallisationsansatz notwendig.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Expressions- und Aufreinigungsverfahrens von MCPyV tLT als Grundlage für spätere Kristallisationsansätze. Die Strukturaufklärung des LT Antigens bietet möglicherweise einen Ansatzpunkt zur Entwicklung antiviraler Therapien.

Dafür wurde hier eine verkürzte Form des LT Antigens, tLT mit einer Aminosäurekettenlänge von 244 in Kombination mit Domänen der beiden bekannten Bindungspartnern Rb und Usp7 verwendet. Die Expression mit den Bindungspartnern sollte der Stabilisierung von tLT dienen. Das tLT Konstrukt besitzt neben der DnaJ Domäne auch die MUR Domäne, welche die Rb Bindedomäne, sowie diverse Usp7 Bindemotive einschließt.

Zunächst sollte über eine Gibson Klonierung [89] die tLT Sequenz in FastBac Dual Expressionsvektoren, die eine Expression in Insektenzellen über das Baculovirussystem erlauben, eingebracht werden. Die Vektoren enthalten neben einem dualen Promotorsystem, einem 6x His-Tag und die Sequenz für den jeweiligen Bindungspartner Rb oder Usp7 (tLT-Rb AB Box und tLT-USP7 TRAF). Die Bindungspartner und tLT werden auf demselben Vektor codiert, wobei es sich dabei nicht um Fusionsproteine handelt, da die Expression von verschiedenen Promotoren kontrolliert wird.

Die Identifikation der optimalen Baculoviruskonzentration zu Infektion von Insektenzellen erfolgt über eine Testexpression in Sf9 Zellen.

Die in High Five (H5) Insektenzellen exprimierten Proteinkomplexe werden mit einem Ultraschallaufschluss aufgeschlossen und über den His-Tag der Bindungspartner Rb und Usp7 mit einer Nickel Affinitätschromatographie (Ni-NTA IMAC) aufgereinigt.

Nach erfolgter Pufferoptimierung der Ni-NTA IMAC werden die Proteinansätze aufkonzentriert, umgepuffert und einer Gelfiltration unterzogen.

Zusätzlich sollte ein Versuch der Expression und Aufreinigung einer Koexpression von tLT-Rb AB Box und einem FastBac Vektor, der alleine für RB codierte, unternommen werden.

Ziel war es möglichst reine Proteinkomplex Fraktionen mit einer hohen Ausbeute zu erhalten, die für spätere Kristallisationsansätze eingesetzt werden können.

4 Material

4.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Accu-jet®pro	Brand (Wertheim)
Agarose-Elektrophoresekammer	PeqLab (Erlangen)
ÄKTAprime plus	GE Healthcare (Freiburg)
ÄKTApurifier 100	GE Healthcare (Freiburg)
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss (Jena)
Branson Digital Sonifier 450	Emerson (Missouri, USA)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Curix 60 Röntgenfilmentwickler	Agfa (Köln)
Eclipse ts 100 Mikroskop	Nikon Metrology Europe
Electrophoresis power supply EPS301	Pharmacia Biotec Inc. (Piscataway, NJ, USA)
Electrophoresis power supply EPS3500 XL	Pharmacia Biotec Inc. (Piscataway, NJ, USA)
Electrophoresis power supply EPS600	Pharmacia Biotec Inc. (Piscataway, NJ, USA)
Electrophoresis power supply peqlab EV231	PeqLab (Erlangen)
Elektrophoresekammer Mini Protean® Tetra System	BioRad (München)
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 0,1 – 2,5 µL, 0,5 – 10 µL, 2 – 20 µL, 10 – 100 µL, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Zentrifuge 5417R, Rotor F 45-30-11	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Zentrifuge 5810R, Rotor A-4-81	Eppendorf (Hamburg)
Gel Doc™ XR System	BioRad (München)
Gelschneidetisch	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Hera Freeze -80°C	Heraeus (Hanau)
Hera Safe Zellkulturbank Class II	Heraeus (Hanau)
Heraeus™ Fresco™ 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
HI2211 Basic pH / Redox / °C Meter	Hanna Instruments (Vöhringen)
Horizontal Elektrophoresekammer aus Plexiglas (PMMA)	A. Hartenstein (Würzburg)
Kühlschränke, Tiefkühler -20°C	Liebherr (Hamburg)
Longlife Gastight 500 µL	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)

Multitron Pro	Infors HAT (Bottmingen, Schweiz)
Nanodrop ND-1000	PeqLab (Erlangen)
Neubauer-improved (Tiefe 0,1 mm)	Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Bank	LTF Labortechnik (Wasserburg)
Photometer Untrospec® 3100 Pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
Pipetman P2G, P10G, P100G, P200G, P1000G	Gilson (Middleton, WI, USA)
Powersupply Power Pac Universal	BioRad (München)
Präzisionswaage PCB 1000-2	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Präzisionswaage 440-47N	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
RCT basic Magnetrührer	IKA ® (Staufen im Breisgau)
Rotilabo®-Blockthermostat Modell H 250	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotor-Gene Q	Qiagen (Hilden)
Sanyo™ MIR-154 gekühlter Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Schüttelinkubator Certomat® BS-1	Sartorius (Göttingen)
Semi-dry Transferblot Kammer Typ SD18	A. Hartenstein (Würzburg)
Sigama 3-18K Zentrifuge, Rotor 19776-H	Bram Biotech International
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
12-Well Zellkulturplatte	Sarstedt (Nürnbrecht)
Amicon® Ultra 4, 30K MWCO	Merck Millipore (Darmstadt)
BD Discardit™ II Spritze (10 mL und 20 mL)	Becton Dickinson (New Jersey, USA)
CryoPure Tubes 1,6 mL, violett	Sarstedt (Nürnbrecht)
Disposable Columns (1 mL, 10 mL)	Qiagen (Hilden)
Nunc™ Cryo Color Coders	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 200 µL und 1000 µL)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Proteus X-Spinner, 20 kDa MWCO	Generon (Slough, UK)
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL und 2 mL)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsröhrchen (15 mL und 50 mL)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Röntgenfilme	Fuji-Film Europe (Düsseldorf)
Roti®-PVDF-Membran Porengröße 0,45 µm	Roth (Karlsruhe)
Serologische Pipetten (2 mL, 5 mL, 10 mL und 25 mL)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Sterilfilter Millex-GP 0,22 µm	Merck Millipore (Darmstadt)

Whatman Filter Paper 3MM	A. Hartenstein (Würzburg)
Zellkulturflasche (T75, T175)	Sarstedt (Nürnberg)
Zellschaber mit 2-Positionen-Klinge	Sarstedt (Nürnberg)

4.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acryl-Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
Aminohexansäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Bovine Serum Albumin (BSA)	GE Healthcare (Freiburg)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure 99,9 %	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycerol (86 %)	Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Fluka (Neu-Ulm)
Isopropanol (2-Propanol)	Th. Geyer (Renningen)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker (Waltham, MA, USA)
Natriumfluorid (NaF)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma (München)
Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Merck (Darmstadt)
Neutralred	Merck (Darmstadt)
Nonidet™ P 40 (NP-40)	Sigma (München)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck (Darmstadt)
Silbernitrat (AgNO_3)	Merck (Darmstadt)
Sodium Deoxycholat (DOC)	Merck (Darmstadt)
Tris-HCl	Sigma (München)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Merck (Darmstadt)

β -Mercaptoethanol Sigma (München)

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
10x FastDigest Buffer	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
10x FastDigest Green Buffer	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
6x DNA Loading Dye	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
AccuStart™ II PCR SuperMix (2x)	Quanta Biosciences (Utha, USA)
Ampicillin Sodium Salt	Sigma (München)
Aqua	B. Braun (Melsungen)
Benzonase® Nuclease	Sigma (München)
Biozym Plaque GeneticPure Agarose	Biozym® Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Color Prestained Protein Standard Broad Range	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Color Protein Standard Broad Range	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Mini	Roche Diagnostics (Mannheim)
Deoxynucleotide (dNTP)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Dimethylsulfoxid (DMSO) (100%)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (München)
GeneRuler 1 kb DNA-Ladder	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Gentamycin	Sigma (München)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Kanamycin	Fluka (Neu-Ulm)
LB-Agar	Roth (Karlsruhe)
LB-Medium	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
NEBuilder HiFi DNA Assembly Mix	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
OptiMEM™ Reduced Serum Medium	Gibco® by Life Technologies (Waltham, MA, USA)

Paraformaldehyd (PFA) (16 %)	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL)	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Roti®-GelStain	Roth (Karlsruhe)
Sodium Pyruvate 100 mM (100x)	Gibco®by Life Technologies (Waltham, MA, USA)
Tetracyclin Hydrochlorid	Roth (Karlsruhe)
UltraPure™ Agarose	Invitrogen (Darmstadt)
X-tremeGENE™ Transfection Reagent	Roche (Basel, Schweiz)

4.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen

Verwendung	Name	Zusammensetzung
Western Blot	Blot-Puffer A, pH 10,4	0,3 M Tris 10 % (v/v) Methanol
	Blot-Puffer B, pH 10,4	0,025 M Tris 10 % (v/v) Methanol
	Blot-Puffer C, pH 9,4	0,025 M Tris 0,025 M Aminohexansäure 10 % (v/v) Methanol
SDS-PAGE	4 x Protein Ladepuffer	12 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerol (86 %) 0,2 M Tris HCl, pH 7,0 0,004 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
	Elektrophoresepuffer (1x)	25 mM Tris 192 mM Glycin 3,5 mM SDS
Agarose- Gelelektrophorese	TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA- Puffer), pH 7,8	40 mM Tris HCl 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
Silberfärbung	Fixierlösung	50 % (v/v) H ₂ O 40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
	Waschlösung	70 % (v/v) H ₂ O 30 % (v/v) Ethanol
	Sensitizer-Lösung	0,02 % (w/w) Na ₂ S ₂ O ₃
	Silberlösung	0,1 % (w/v) AgNO ₃ 0,02 % (v/v) Formaldehyd

	Entwicklerlösung	2 % (w/w) Na ₂ CO ₃ 0,04 % (v/v) Formaldehyd
Coomassiefärbung	Coomassie Färbelösung	2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 in 450 mL Methanol 100 mL Essigsäure (100 %) 450 mL H ₂ O
	Coomassie Entfärbelösung	450 mL Methanol 100 mL Essigsäure (100 %) 450 mL H ₂ O
	PBS (phosphate buffered saline), pH 7,5	140 mM NaCl 25 mM KCl 0,5 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 10 mM Na ₂ HPO ₄
	PBS-Tween	1x PBS 0,05 % (v/v) Tween 20
Allgemein	RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer)	50 mM Tris HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1 % (v/v) NP-40 0,5 % (v/v) DOC 0,1 % (v/v) SDS 2 mM β-Glycerolphosphat 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,4 mM PMSF 1 mM NaF 1 mM EGTA cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Mini (1 Tablette auf 50 ml)
	Gelchromatographie	Gelchromatographiepuffer pH 7,5
		50 mM Tris 250 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol

Tabelle 6: Verwendete Puffer der Ni-NTA IMAC

Versuch	Puffer	Zusammensetzung
	Lysepuffer, pH 7,5	50 mM TRIS 250 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 8 U/mL Benzonase 10 mM Imidazol Complete Protease Inhibitor (1 Tablette auf 50 ml)
	Waschpuffer I, pH 7,5	50 mM Tris 500 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 15 mM Imidazol
Pufferoptimierung Imidazolkonzentration	Waschpuffer II, pH 7,5	50 mM Tris 500 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 20 mM Imidazol
	Waschpuffer III, pH 7,5	50 mM Tris 500 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 30 mM Imidazol
	Elutionspuffer, pH 7,5	50 mM Tris 250 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 250 mM Imidazol

	50 mM TRIS 75 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 8 U/mL Benzonase 10 mM Imidazol Complete Protease Inhibitor (1 Tablette auf 50 ml)
	50 mM Tris 50 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 30 mM Imidazol
Pufferoptimierung Natriumchlorid Konzentration	50 mM Tris 100 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 30 mM Imidazol
	50 mM Tris 200 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 30 mM Imidazol
	50 mM Tris 500 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 30 mM Imidazol
	50 mM Tris 75 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 250 mM Imidazol

	50 mM TRIS 250 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 8 U/mL Benzonase 10 mM Imidazol Complete Protease Inhibitor (1 Tablette auf 50 ml)
Scale up I	
Waschpuffer, pH 7,5	50 mM Tris 500 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 30 mM Imidazol
Elutionspuffer, pH 7,5	50 mM Tris 250 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 250 mM Imidazol
Lysepuffer, pH 7,5	50 mM TRIS 75 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 8 U/mL Benzonase 10 mM Imidazol Complete Protease Inhibitor (1 Tablette auf 50 ml)
Scale up II und Koexpression	
Waschpuffer, pH 7,5	50 mM Tris 100 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 30 mM Imidazol
Elutionspuffer, pH 7,5	50 mM Tris 75 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT 250 mM Imidazol

4.5 Reagenzsysteme

Tabelle 7: Verwendete Reagenzsysteme

System	Hersteller
Biorad Protein Assay	Biorad (München)
DNA Plasmid Purification Kit NucleoBond® PC100	Macherey & Nagel (Düren)
NucleoSpin® Gel & PCR Clean-Up	Macherey & Nagel (Düren)
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB (Erlangen)
Western Lightning® Plus ECL	Perkin Elmer (Massachusetts, USA)

4.6 Bakterienstämme und Bakterienkulturmedien

Antibiotika zur Selektion wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 50 mg/L Kanamycin, 7 mg/mL Gentamycin, 10 mg/mL Tetramycin und 100 mg/L Ampicillin.

Tabelle 8: Verwendete *E. coli* Stämme

Bakterienstamm	Hersteller
DH10Bac™ <i>E. coli</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Top 10 <i>E. coli</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 9: Verwendete Medien für die Bakterienkultur

Name	Hersteller
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Luria-Broth-Medium (LB-Medium)	Luria/ Miller (Roth, Karlsruhe) Einwaage von 25 g/L

4.7 Zelllinien und Zellkulturmedien

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Kulturmedium	Beschreibung
High Five (H5)	ESF 921	Insektenzelllinie, Ovar-Zellen aus <i>Trichoplusia ni</i> , Suspensionszellen, jedoch adhärent wachsend in Zellkulturflaschen
Sf-9	EX-Cell 420	Insektenzelllinie, Ovar-Zellen aus <i>Spodoptera frugiperda</i> , Suspensionszellen, jedoch adhärent wachsend in Zellkulturflaschen

Tabelle 11: Verwendete Zellkulturmedien

Name	Hersteller und Zusammensetzung
ESF 921	<i>Insect cell cultur medium, Protein free</i> (Expression Systems (Kalifornien, USA)) 1 U/mL Penicillin/Streptomycin
EX-Cell 420	<i>Insect cell cultur medium + L-Glutamin, Serum free</i> (Sigma Life Science (München)) 0,25 % Penicillin/Streptomycin
Sf-900™ 1,3x	<i>Insect cell culture medium + L-Glutamin, Serum free</i> (Gibco BRL (Eggstein))

4.9 Plasmide und Primer

Tabelle 12: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Insert	Beschreibung
p676.M	pFastBac Dual	His_Rb AB Box: tLTaa244	pFastBac Dual Vektor mit MCPyV tLT mit einer Länge von 244 Aminosäuren und Rb AB Box mit His Tag. Enthält eine Amp Resistenz, einem Polyhedrin- und P10-Promotor
p750	pFastBac Dual	His_USP7 TRAF: tLTaa344	pFastBac Dual Vektor mit MCPyV tLT mit einer Länge von 244 Aminosäuren und USP7 TRAF Domäne mit His Tag. Enthält eine Amp Resistenz, einem Polyhedrin- und P10-Promotor
p773	pFastBac I	His_Rb AB Box	pFastBac I Vektor mit Rb AB Box und His Tag. Enthält eine Amp Resistenz und einen Polyhedrinpromotor
p490	pcDNA	Myc_USP7	pcDNA Vektor mit USP7 Domäne und Myc Tag. Enthält eine Amp Resistenz
p661	pFastBac Dual	His_Rb AB Box	pFastBac Dual Vektor mit Rb AB Box mit His Tag. Enthält eine Amp und eine Genta Resistenz

Tabelle 13: Verwendete Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
FastBac-for	TACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG	Sanger Sequenzierung
FastBac-rev	CATTTTATGTTTCAGGTTTCAGG	Sanger Sequenzierung
p676 forward	CAGGGCGCCAGCTGGATCCGGAATTC	Ortsspezifische Mutagenese
p676 reverse	GAATTCGGATCCAGCTGGCGCCCTG	Ortsspezifische Mutagenese
p750 forward	CAGGGCGCCAGCTGGATCCGGAACC ACCAGCAGCAGCAGCAG	PCR
p750 reverse	GTCGACGTAGGCCTTTGAATTTTCAGC CTGTGTGCTTCTTTGAATC	PCR
pUC/M13 forward	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	Kontroll-PCR der Bacmidproduktion
pUC/M13 reverse	AGCGGATAACAATTTTCACACAGG	Kontroll-PCR der Bacmidproduktion

4.10 Enzyme

Tabelle 14: Verwendete Enzyme

Name	Hersteller
DpnI	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
EcoRI	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)

4.11 Standardmarker

Tabelle 15: Verwendete Standardmarker

Marker	Einsatz	Hersteller
Color Protein Standard, Broad Range	WB Protein- Größenstandard	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
GeneRuler™ 1kb PlusDNALadder	Agarose- Gelelektrophorese	Fermentas (St. Leon- Rot)

4.12 Antikörper

Tabelle 16: Verwendete Primärantikörper

Name	Beschreibung	Anwendung	Hersteller
Anti- α -Aktin	Maus monoklonaler Antikörper IgG, gerichtet gegen Aktin	WB Verdünnung 1:10000	Chemicon (Billerica, MA, USA)
CM2B4	MCPyV large T-antigen Antikörper, Maus monoklonaler Antikörper, gerichtet gegen das LT sowie das 57k T-Antigen des MCPyV	WB Verdünnung 1:1000	Santa Cruz Bio- technology (Kalifornien, USA)
Anti-His Tag	Maus monoklonaler Antikörper IgG, gerichtet gegen 6x bis 8x His	WB Verdünnung 1:10000	BioLegend (Kalifornien, USA)

Tabelle 17: Verwendeter Sekundärantikörper

Name	Beschreibung	Anwendung	Hersteller
mouse-anti- rabbit IgG-HRP	Maus monoklonaler Sekundärantikörper konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP)	WB Verdünnung 1:10000	Santa Cruz Bio- technology (Kalifornien, USA)

5 Methoden

5.1 Mikrobielle Methoden

5.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* auf LB-Agarplatten mit dem entsprechendem Antibiotikazusatz fand bei 37 °C im Brutschrank über Nacht statt.

Bei Flüssigkulturen wurde ein Volumen von 2 mL LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt und mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Die Flüssigkultur wurde im Schüttelinkubator bei 37 °C mit einer Schüttelfrequenz von 250 rpm über Nacht inkubiert.

Der Antibiotikazusatz wurde nach den Resistenzgenen der transformierten Vektoren (Abschnitt 5.3.1) ausgewählt. Die verwendeten Bakterien sind in Tabelle 8 aufgeführt.

5.1.2 Blau-Weiß Selektion

Die Blau-Weiß Selektion ist eine Methode zur Identifikation rekombinanter Bakterien. Dabei werden Plasmide als Vektoren eingesetzt, die in der *Multiple Cloning Site* (MCS) das *lacZ* Gen für das Enzym β -Galactosidase tragen. Über die Klonierung eines Inserts in die MCS des Vektors, entsteht eine Verschiebung des Leserasters des Plasmids, wodurch die Expression der β -Galactosidase verhindert wird. Die intakte β -Galactosidase kann 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (Xgal), welches ein farbloses Substrat ist, zu einem blauen Produkt umwandeln. Rekombinante *E. coli* erscheinen weiß, während Zellen, die nicht das rekombinante Plasmid enthalten eine blaue Kolonie bilden. Zusätzlich zu Xgal wird Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) als artifizieller Induktor des *lac*-Operons eingesetzt, sodass das *lacZ* Gen transkribiert wird [90].

Für die Identifikation der erfolgreich transformierten *E. coli* DH10Bac Zellen mit dem rekombinanten Plasmid, wurden 100 μ L des Transformationsansatzes auf vorbereitete LB-Agarplatten ausgestrichen. Die LB-Agarplatten enthielten 50 μ g/mL Kanamycin (Kana), 10 μ g/mL Tetramycin (Tetra) und 7 μ g/mL Gentamycin (Genta). Des Weiteren wurden 50 μ L IPTG (0,1 M) und 50 μ L Xgal (40 mg/mL) eine Stunde vor Ausplattierung der Zellen, auf der LB-Agarplatte ausgestrichen.

Die ausplattierten Zellen wurden bei 37 °C für 48 h im Brutschrank inkubiert.

5.1.3 Produktion von Baculoviren

Das gewünschte Insert wurde über eine Gibson Klonierung (Abschnitt 5.3.7) in einen pFastBac™ Vektor eingebracht. Die durch Sanger Sequenzierung (Abschnitt 5.3.8) bestätigte Sequenz wurde über eine Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH10Bac Zellen eingebracht (Abschnitt 5.3.1.1).

Bei dieser Methode wird das Zielgen aus einem Spender-Plasmid auf ein kloniertes Bacmid über homologe Rekombination übertragen. Bei dem Bacmid handelt es sich um rekombinante baculovirale DNA, die ein mini-F-Replikon, einen Antibiotika-Resistenzmarker und die Zielnukleinsäuresequenz attTn7 des Transposons Tn7 enthält. Die Transposition geschieht innerhalb der *E. coli* DH10Bac Zellen durch ein Helfer-Plasmid, welches die Tn7 *in trans* Transpositionsfunktion zur Verfügung stellt. Das auf dem Spender-Plasmid enthaltene Gen mit dem notwendigen Promotor, beziehungsweise den notwendigen Promotoren, ist an beiden Seiten von je einem Tn7 Transposon umschlossen. Über die Tn7 Transposons kann das Gen inklusive Promotor/en in die attTn7 Zielnukleinsäuresequenz transponiert werden. Das Bacmid ist in der Lage eine Plasmid Replikation in *E. coli* durchzuführen und Sf9 Zellen zu infizieren [91].

Die Bacmid enthaltenden Bakterienzellen wurden einer Blau-Weiß Selektion unterzogen (Abschnitt 5.1.2). Mit vier positiven Klonen wurde jeweils eine 2 mL Flüssigkultur angeimpft (Abschnitt 5.1.1). Die gleichen Klone wurden einer erneuten Blau-Weiß-Selektion unterzogen (Abschnitt 5.1.2). Die Plasmide der vier Flüssigkulturen wurden über eine präparative Plasmidaufreinigung durch alkalische Lyse isoliert (Abschnitt 5.3.2.2) und anschließend einer Kontroll PCR unterzogen (Abschnitt 5.3.9.1). Die amplifizierten DNA Produkte wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abschnitt 5.3.4). Die zu erwartenden PCR Produkte sind in Tabelle 18 abgebildet.

Tabelle 18: Zu erwartende PCR Produkte bei der Agarose-Gelelektrophorese nach Klonierung in pFastBac™ Bacimdvektor

PCR Produkt	Größe [bp]
Bacmid	~300
Bacmid mit pFastBac™ Dual	~2560
Bacmid mit pFastBac™ Dual und p750	~4300
p750	~1740

Nach erfolgreicher Bacmidproduktion wurde eine Transfektion von Sf9 Zellen mit dem klonierten Konstrukt vorgenommen (Abschnitt 5.2.2).

Der P1 Virusüberstand wurde anschließend zur Infektion (Abschnitt 5.2.3.1) ebenfalls von Sf9 Zellen zur Produktion des P2 Virusüberstandes eingesetzt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

5.2 Zellkulturtechniken

5.2.1 Kultivierung Insektenzellen

In den hier beschriebenen Versuchen wurde ausschließlich mit den Insektenzelllinien H5 und Sf9 gearbeitet (siehe Tabelle 10).

H5 Zellen wurden in ESF 921 Medium mit 1 % (v/v) PenStrep bei 27 °C im Inkubator (100 rpm) oder im Brutschrank kultiviert. Sf9 Zellen wurden hingegen in EX-Cell 420 Medium mit 0,25 % PenStrep unter gleichen Bedingungen kultiviert.

Adhärenz wachsende Kulturen wurden durch Abkratzen der Zellen mit einem Zellschaber, einer Zentrifugation bei 200 xg für 5 min. und eine Aufnahme in frisches Medium passagiert.

Bei den Suspensionskulturen hingegen wurde die Zellzahl über eine Neubauer Zählkammer ermittelt und anhand der Zellzahl die Zellen in frisches Medium passagiert.

Zur Ernte von Zellkulturen, adhärenz Kulturen, sowie Suspensionskulturen, wurde die Zellkultur in ein Zentrifugationsgefäß überführt und bei 200 xg für 5 min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand verworfen und das Zellpellet bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

5.2.2 Transfektion von Insektenzellen

Eine Transfektion ist die Einbringung von DNA oder RNA in eine eukaryotische Zelle. Dabei unterscheidet man physikalische, biologische und chemische Transfektionsmethoden. In den beschriebenen Versuchen kamen lediglich chemische Transfektionsreagenzien zum Einsatz.

In den meisten Fällen wird DNA in Form eines zirkulären Plasmids in die eukaryotische Zelle eingebracht [92].

5.2.2.1 X-tremeGENE™ Transfektion

Das Transfektionsreagenz X-tremeGENE™ Transfection wurde in der Produktion von Baculovirusüberständen zur Infektion von Sf9 Zellen eingesetzt. Das Transfektionsreagenz bildet mit der negativ geladenen DNA einen Komplex und wird wahrscheinlich durch Endozytose von der Zelle aufgenommen [93].

X-tremeGENE™ Transfection Reagenz wurde zur Transfektion von $5 \cdot 10^5$ Zellen/mL in einem Volumen von 1 mL verwendet. Die Zellen wurden 1 h vor Transfektion in einer 12-Well Platte ausgesät und bei 27 °C im Brutschrank inkubiert, bis sie adhärent waren.

Der Transfektionsansatz, bestehend aus 100 µL OptiMEM™, 1,5 µg Bacmid DNA und 8 µL X-tremeGENE™ Transfection Reagenz, wurde invertiert und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben und diese für mindestens 72 h bei 27 °C inkubiert. Der Zustand der Zellmorphologie wurde täglich begutachtet.

5.2.3 Infektion von Insektenzellen mit Baculovirusüberständen

Eine Infektion beschreibt den Prozess des Einbringens von viraler DNA in eine Wirtszelle. Das Baculosystem wird zur Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen verwendet und ermöglicht oft eine sehr hohe Proteinausbeute [94].

5.2.3.1 Infektion zur P2 Virusüberstandproduktion

Für die Produktion des P2 Virusüberstandes wurden 20 mL Sf9 Zellkultur mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL in eine T175 Zellkulturflasche ausgesät und eine Stunde bei 27 °C im Brutschrank zur Adhäsion inkubiert. Transduziert wurde mit einem P1 Virusüberstandsvolumen von 500 µL. Die adhärent wachsende Zellkultur wurde für drei bis sechs Tage bei 27 °C inkubiert.

Geerntet wurde der P2 Virusüberstand durch abkratzen der Zellen und Überführen der Zellkultur in ein 50 mL Zentrifugationsgefäß, gefolgt von einer Zentrifugation bei 500 xg für 5 min. (RT).

5.2.3.2 Infektion von Suspensionskulturen

Die Infektion von Suspensionskulturen fand sowohl bei Sf9, als auch bei H5 Zellen jeweils mit einer Konzentration von $7 \cdot 10^5$ Zellen/mL statt. Es fand jeweils eine Infektion mit P2 Virusüberstand in einer Konzentration von 0,2 %, 0,5 %, 0,7 % oder 0,8 % (v/v) statt.

Die infizierten Suspensionskulturen wurden bei 27 °C im Schüttelinkubator inkubiert.

5.2.4 Viral Plaque Assay

Das Viral Plaque Assay bietet eine Möglichkeit der Titerbestimmung von infektiösen Virusüberständen mit einem cytopathischem Effekt. Der Titer entspricht der Viruspartikelanzahl pro Milliliter Virusüberstand [95].

Bei diesem Assay wird eine Monolayerschicht der Wirtszellen mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Virusüberstandes infiziert und anschließend mit einer immobilisierenden (festen oder halbfesten) Übersichtung beaufschlagt. Die infizierten Zellen lysieren, das heißt die Viren werden innerhalb der Wirtszellen repliziert und hinterlassen Plaques. Anhand der ausgebildeten Plaques kann der Titer des Virusüberstandes bestimmt werden [96].

Zur Durchführung eines solchen Assays wurden 2 mL einer Zellkultur mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Sf9 Zellen/mL pro Well in zwei 6-Well Platten ausgesät und eine Stunde bei 27 °C inkubiert.

Für die Titerbestimmung des Virusüberstandes wurde eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-8} erstellt. Nach Inkubationszeit der Sf9 Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 mL der Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-8} jeweils in Doppelbestimmung infiziert. Des Weiteren wurde ein Well der 6-Well Platte mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} als Positivkontrolle infiziert und ein weiteres Well mit Medium als Negativkontrolle. Die Inkubation der Sf9 Zellen mit den Virusverdünnungen erfolgte bei 27 °C für eine Stunde.

Anschließend wurde der Virusüberstand abgenommen und die Wells mit 2 mL Plaquing Medium, bestehend aus 19,5 mL Sf-900™ 1,3x und 6,5 mL 4 %iger Biozym Plaque Agarose, bedeckt. Zur Aushärtung der Agarose wurden die 6-Well Platten eine Stunde bei RT stehen gelassen.

Im Anschluss wurden diese für sieben bis zehn Tage bei 27 °C im Brutschrank inkubiert.

Eine Färbung der Plaques wurde nur durchgeführt, wenn diese nicht eindeutig sichtbar waren. Dazu wurde eine Färbelösung aus 8,9 mL EX-Cell 420 Medium, 3,25 mL erhitzter 4 %iger Biozym Plaque Agarose und 813 µL Neutral Red Lösung (1 mg/mL) hergestellt und die Wells mit 1 mL dieser Lösung bedeckt.

Es fand eine erneute Inkubation bei 27 °C für zwei bis drei Tage statt.

Zur Bestimmung des Titers in *Plaque forming units* (pfu) pro Milliliter wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Titer} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{mL}} \right) = \text{Anzahl der Plaques} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \frac{1}{\text{Volumen der Virusverdünnung/Well}}$$

5.3 DNA Techniken

5.3.1 Hitzeschock-Transformation

Transformation ist die Aufnahme von DNA durch Bakterienzellen. Dies wird häufig über künstlich Prozesse hervorgerufen, jedoch geschieht dies auch selten unter natürlichen Bedingungen. Die Bakterienzellen müssen bei einem solchen Prozess die elektrische oder chemische Kompetenz besitzen, DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen [97].

5.3.1.1 *E. coli* Top10 und *E. coli* DH10Bac

Chemisch kompetente *E. coli* Top10 Zellen wurden zur Transformation von Plasmiden verwendet. Dazu wurden 10 µg bis 100 µg Plasmid DNA zu 100 µL Top10 *E. coli* gegeben und für 30 min. auf Eis inkubiert.

Die Transformation der *E. coli* DH10Bac Zellen wurde zur Produktion des rekombinanten Bacmids eingesetzt, auf die im Anschluss eine Blau-Weiß Selektion (Abschnitt 5.1.2) folgte. Dazu wurden 100 ng des klonierten Plasmids mit 100 µL chemisch kompetenten DH10Bac *E. coli* Zellen vorsichtig gemischt und ebenfalls für 30 min. auf Eis inkubiert.

Der darauffolgende Hitzeschock wurde jeweils bei 42 °C für 45 sec. durchgeführt, bei dem die Plasmide über Poren durch Fusion der inneren und äußeren Bakterienzellmembran in die Zelle gelangten [98].

Darauf folgte eine Inkubation auf Eis für 2 bis 5 min.

Dem *E. coli* Top10 Transformationsansatz wurden 500 µL LB-Medium zugeführt und dieser unter schütteln bei 37 °C im Heizblock für 1 h bis 1,5 h inkubiert. 100 µL der transformierten Top10 *E. coli* wurden auf einer LB-Agarplatte mit Zusatz des entsprechenden Selektionsantibiotikas bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Der Zusatz des Selektionsantibiotikums lässt nur das Wachstum von transformierten *E. coli* zu, die das Plasmid mit der entsprechenden Resistenz tragen. Zur Kontrolle des transformierten Plasmids wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt (Abschnitt 5.3.5).

Der Transformationsansatz der *E. coli* DH10Bac Zellen wurde hingegen nach Komplettierung mit 900 µL SOC Medium für 4 h bei 37 °C im Heizblock schüttelnd inkubiert.

50 µL des Ansatzes wurde zur Blau-Weiß Selektion ausgestrichen (Abschnitt 5.1.2).

5.3.2 Präparative Plasmidaufreinigung

Grundlage für die Plasmidisolierung aus Bakterienansätzen ist die alkalische Lyse der Bakterienzellen. Bei diesem Schritt wird sowohl die chromosomale DNA als auch die Plasmid DNA denaturiert. Die anschließende Verschiebung des pH Wertes vom alkalischen Bereich in den sauren Bereich ermöglicht eine Renaturierung der Plasmid DNA, während die chromosomale DNA denaturiert bleibt. Über Säulen oder verschiedene Zentrifugationsschritte kann die Plasmid DNA im Anschluss gebunden, gewaschen und isoliert werden [99].

5.3.2.1 Miniprep Kit

Für die Plasmidisolierung und -aufreinigung von Plasmiden aus Klonierungen wurden 2 mL LB-Flüssigkulturen mit entsprechendem Antibiotikazusatz mit einer transformierten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Abschnitt 5.1.1). Am nächsten Tag erfolgte die Plasmidaufreinigung aus der Flüssigkultur nach Herstellerangaben mit dem Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab). Die DNA Konzentration wurde anschließend mit dem NanoDrop gemessen (Abschnitt 5.3.3).

5.3.2.2 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

Die Plasmidpräparation für die Produktion von Baculovirusüberständen (Abschnitt 5.1.3) erfolgte ohne kommerziell erhältliches Präparationskit, jedoch unter der Verwendung der Miniprep Kit I Puffer (PeqLab). Das Miniprep Kit konnte hier nicht verwendet werden, da die Aufreinigung über eine Säule des Präparationskits die große Bacmid-DNA zerstören würde. Dazu wurde hier ebenfalls eine 2 mL LB-Flüssigkultur (mit Antibiotikazusatz) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert (Abschnitt 5.1.1). Am darauffolgenden Tag wurde die Bakteriensuspension für 10 min. bei 6000 xg (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand (ÜS) wurde verworfen, während das Zellpellet in 300 µL S1 Lösung resuspendiert wurde. Anschließend wurden 300 µL S2 Lösung hinzugegeben und der Lösungsansatz sechs bis acht mal invertiert. Darauf erfolgte eine Zugabe von ebenfalls 300 µL S3 Lösung und eine erneute Invertierung für sechs bis acht Mal und eine Inkubation für 5 min. auf Eis.

Anschließend wurde der Ansatz bei 11000 xg für 10 min. (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und erneut für 5 min. bei 11000 xg (4 °C) zentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurde der ÜS erneut in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 700 µL Isopropanol (100 %) invertiert, sodass eine Fällung der Plasmid DNA erfolgte. Es wurde erneut bei 11000 xg für 10 min. zentrifugiert (4 °C).

Der ÜS wurde verworfen, während das Pellet in 200 µL Ethanol (70 %) resuspendiert wurde. Dieser Schritte diente dem Waschen der Plasmid DNA.

Der Ansatz wurde erneut bei 11000 xg für 10 min. (4°C) zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgenommen und das Pellet in 50 µL AE Puffer resuspendiert.

Auch hier erfolgte im Anschluss eine Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten Plasmids mittels NanoDrop (Abschnitt 5.3.3).

5.3.3 Bestimmung der Nukleinsäuren-Konzentration

Die Bestimmung der DNA Konzentration in einer Probe ist durch eine photometrische Messung möglich. DNA zeigt ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, wohingegen Proteine bei 280 nm vermessen werden. Über den Quotienten von 260 nm zu 280 nm ist es möglich eine Aussage über die Reinheit der DNA zu erheben. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 spiegelt eine reine DNA in der Probe wieder [100].

Gemessen wurde die DNA Konzentration von Plasmidpräparationen in einem Volumen von 1 µL am NanoDrop (PeqLab).

5.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Trennung unterschiedlich großer DNA Fragmente verwendet. Mit dieser Methode können Nukleinsäure-Stränge aufgrund ihrer Größe und somit ihrer unterschiedlichen Ladung über die Poren des Agarosegels in einem elektrischen Feld getrennt werden. Große DNA Fragmente wandern langsamer durch das Gel, als kleine. Über einen Größenstandard können Rückschlüsse auf die jeweilige Größe der aufgetrennten DNA Fragmente gezogen werden [101].

Eingesetzt wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele mit 0,05 % (v/v) Roti®-GelStain in TAE-Puffer. Das Roti®-GelStain Reagenz enthält ein Fluorophor als Farbstoff, der an die DNA bindet und bei Anregung durch UV-Licht grün emittiert [102].

Somit konnten die Banden der mit 6x DNA-Ladepuffer versetzten Proben sichtbar gemacht werden.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in TAE-Puffer bei 90 V für etwa 1 h durchgeführt. Die Zusammensetzung des TAE-Puffers ist in Tabelle 5 abgebildet. Bildhaft festgehalten werden

konnten die detektierten Banden mit der Gel Doc™ (BioRad). Eine Präparation der DNA Banden aus dem Agarosegel war mit dem Gelschneidetisch (Vilber Lourmat) möglich.

5.3.5 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde zur Kontrolle von Klonierungen, zu deren Säuberung und zur Herstellung von geschnittenen Vektoren für Klonierungen eingesetzt. Ein Verdau durch Restriktionsendonukleasen in Kombination mit einer Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine Kontrolle der Richtigkeit und Reinheit der Plasmide. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Schnittstellen in der DNA erkennen und diese dort schneiden [103].

Der Ansatz für den Restriktionsverdau der Vektoren für die Klonierung bestand aus 5 µL 10x FastDigest Green Buffer, 2,5 µg Plasmid DNA, 2,5 µL Restriktionsenzym und 50 µL dH₂O. Dieser Ansatz wurde für 30 min. bei 37 °C und 400 rpm inkubiert.

Der Restriktionsverdau wurde im Anschluss über eine Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 5.3.4) analysiert.

Zur Säuberung der ortsspezifischen Mutagenese (Abschnitt 5.3.10) wurden 15 µL des zuvor erstellten PCR Ansatzes mit 4 µL 10x FastDigest Buffer, 2 µL DpnI und 19 µL dH₂O für 30 min. bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. Das Restriktionsenzym DpnI erkennt methylierte DNA und schneidet somit lediglich noch vorhandene *E. coli* DNA, während das PCR Produkt nicht verdaut wird.

5.3.6 Aufreinigung von DNA aus PCR Reaktionen und Agarose-Gelen

Für enzymatische Reaktionen ist es in vielen Fällen notwendig die DNA, die für diese Reaktion notwendig ist, in möglichst reiner Form vorliegen zu haben. Reste von vorherigen enzymatischen Reaktion, zum Beispiel Restriktionsverdauen, oder Puffer können diese Reaktion stören.

Zur Aufreinigung der DNA aus Agarose-Gelen oder PCR Reaktionen wurde das NucleoSpin® Gel & PCR Clean-Up von Macherey & Nagel nach Herstellerangaben verwendet.

5.3.7 Gibson Klonierung

Die Klonierung der verwendeten DNA-Konstrukte wurde über eine Gibson Klonierung durchgeführt. Die in der isothermal verlaufenden Klonierung assemblierten Inserts und Vektoren müssen eine passende DNA-Sequenz Überlappung aufweisen. Dies sollte beim Primerdesign der vorangehenden PCR zur Amplifizierung des Inserts beachtet werden. Eine solche Überlappung sollte 15 bis 25 Nukleotide umfassen. Durch die überlappenden DNA-Sequenzen ist ein zusätzlicher Ligationsschritt zur Verbindung von Insert und Vektor nicht notwendig [104].

Für die Klonierung wurde ein 20 μ L Ansatz aus 100 ng Vektor, 200 ng Insert, 10 μ L NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix in Millipore Wasser für 30 min. im Heizblock bei 50 °C inkubiert. Während der Inkubation bei 50 °C werden die zwei DNA Fragmente zusammengefügt.

Anschließend wurde eine Transformation von Top10 *E. coli* mit 2 μ L des Klonierungsansatzes über einen Hitzeschock durchgeführt (Abschnitt 5.3.1.1).

5.3.8 Sanger Sequenzierung

Die Kontrolle der klonierten pFBac Plasmide mittels Gibson Klonierung (Abschnitt 5.3.7) erfolgte über eine Sanger Sequenzierung, die von der Firma Microsynth (Seqlab, Göttingen) durchgeführt wurde.

Als Probe wurden ca. 1,5 μ g Plasmid DNA mit dH₂O auf 12 μ L aufgefüllt. Zur Sequenzierung wurde der FastBac-for Primer aus der Liste der Standardprimer ausgewählt.

Bei der Sanger Sequenzierung handelt es sich um ein Kettenabbruchverfahren. Dafür muss die Plasmid DNA zunächst als Einzelstrang vorliegen. Die Hybridisierung des Sequenzierungsprimers sorgt für die Synthese des komplementären DNA Strangs durch die DNA-Polymerase, bei der der DNA Einzelstrang als Matrix dient.

Die für die Synthese benötigten Disoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) und Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) liegen in dem Sequenzierungsansatz vor. Durch den Einbau eines ddNTPs kommt es zum Abbruch der Synthese des komplementären DNA Strangs. Den vier ddNTPs fehlt die 3'-Hydroxygruppe, wodurch das Anfügen von neuen Nukleotiden nicht möglich ist. Die vier ddNTPs sind zusätzlich mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Dies ermöglicht die Detektion der Kettenabbruchprodukte nach einer Auftrennung über ein Polyacrylamidgel mittels laseroptischen Systems und der damit verbundenen Analyse der Basenabfolge [105].

5.3.9 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung von spezifischen Basenabfolgen einer DNA Matrize. Dabei werden DNA Polymerasen zur Synthese eines komplementären DNA Strangs zur Matrize eingesetzt. Passend zum DNA Template muss der PCR Ansatz Primer enthalten, sodass durch die DNA Polymerase die passenden Nukleotide anfügt werden können. Während der PCR werden die Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation durchlaufen.

Während der Denaturierung bei 94 bis 96 °C wird der DNA Doppelstrang in zwei Einzelstränge, durch Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen, getrennt. Im Anschluss erfolgt die Primerhybridisierung. Die spezifische Anlagerung der Primer an die DNA Einzelstränge erfolgt 5 bis 10 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer. Während der Elongation fügt die DNA-Polymerase, beginnend beim 3'-Ende des angelagerten Primer, komplementär Nukleotide zur Matrize an. Die Temperatur ist hierbei abhängig vom Arbeitsoptimum der eingesetzten Polymerase.

Mit der PCR ist über eine Wiederholung dieser Schritte eine exponentielle Amplifizierung des DNA Templates möglich [106].

Die PCR wurde zur Amplifizierung von Klonierungsvektoren und -inserts verwendet, sowie zur Kontrolle von Klonierungsprodukten.

5.3.9.1 Phusion Polymerase und Accustart Polymerase

Zur Amplifizierung von Vektoren und Inserts für die Klonierung neuer Plasmide wurde die Phusion DNA Polymerase des Phusion® High-Fidelity PCR Kits (New England Biolabs) verwendet. Die Phusion Polymerase besitzt eine *Proofreading* Funktion, sodass mögliche Fehler eingeschränkt werden.

Der PCR Ansatz, bestehend aus 1,5 µL DMSO, 0,5 µL 5x Phusion HF Buffer, 10 µL dNTPs, 1 µL Primer forward, 1 µL Primer reverse, < 250 ng DNA Template und wurde mit DNase/RNase freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µL gebracht. Der verwendete Puffer und die dNTPs wurden aus dem Phusion® High-Fidelity PCR Kit verwendet. Das in Tabelle 19 aufgeführte Programm wurde für 35 Zyklen durchlaufen. Die amplifizierten PCR Produkte wurden im Anschluss über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und analysiert (Abschnitt 5.3.4 und 5.3.6).

Tabelle 19: PCR-Programm der Phusion Polymerase

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
Initiale Denaturierung	98	30 sec.
Denaturierung	98	10 sec.
Primerhybridisierung	53	30 sec.
Elongation	72	45 sec.
Finale Elongation	72	10 min.
Lagerung	4	∞

PCR Produkte, die für Klonierungen eingesetzt werden sollten, wurden zunächst durch Restriktionsendonukleasen (Abschnitt 5.3.5) verdaut und anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt und isoliert (Abschnitt 5.3.6).

Die Kontrolle der aus der Blau-Weiß-Selektion (Abschnitt 5.1.2) aufgereinigten (klonierten) Plasmide für die Produktion von Baculovirus Expressionssystemen (Abschnitt 5.1.3) erfolgte mit der Taq-Polymerase und einer Kolonie-PCR. Es wurden daher keine aufgereinigte Plasmid-DNA verwendet, sondern einzelne Bakterienkolonien wurden direkt in den PCR-Ansatz gegeben.

Dazu wurden vier Ansätze mit einem Gesamtvolumen von je 25 µL, bestehend aus 12,5 µL AccuStart™ II PCR SuperMix (2x), 1 µL pFastBac Primer forward, 1 µL pFastBac Primer reverse und H₂O, je ein Klon der zweiten Blau-Weiß-Selektion (Abschnitt 5.1.2) hinzugefügt. Der PCR-Ansatz durchlief 30 Zyklen des in Tabelle 20 aufgeführten Programms. Eine Analyse der PCR Produkte fand durch Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 5.3.4) statt.

Tabelle 20: PCR-Programm der Accustart Polymerase

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec.]
Initiale Denaturierung	93	10 min.
Denaturierung	94	45 sec.
Primerhybridisierung	55	45 sec.
Elongation	72	4 min.
Finale Elongation	72	7 min.
Lagerung	4	∞

5.3.10 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese ist eine molekularbiologische Methode zur spezifischen Änderung der Basenabfolge einer DNA-Sequenz. Dabei können über Primer, die die spezifische Zielmutations-Sequenz enthalten, neue Plasmide in der PCR synthetisiert werden. Die neu synthetisierten Plasmide enthalten die mutierte DNA-Sequenz. Über einen anschließenden Restriktionsverdau können die Ursprungsplasmide mit der nicht mutierten Sequenz verdaut werden [107].

Die ortsspezifische Mutagenese wurde zur Mutagenese von rekombinanten Plasmiden, die eine ungewollte Verschiebung des Leserasters in Protein codierenden Abschnitten hatten, eingesetzt. Über die Mutagenese konnte das gewollte Leseraster wieder hergestellt werden, sodass später das Protein in Zellen exprimiert werden konnte.

Für die PCR Reaktion (Abschnitt 5.3.9) wurde das Phusion® High-Fidelity PCR Kit (New England Biolabs) mit einer Temperatur von 60 °C zur Primerhybridisierung eingesetzt.

Der PCR Ansatz wurde im Anschluss einem DpnI Verdau (Abschnitt 5.3.5) unterzogen, um noch vorhandenes Ursprungsplasmid, für eine weitere Transformation (Abschnitt 5.3.1.1) zu verdauen.

Nach dem Verdau erfolgte eine Plasmidaufreinigung mit dem NucleoSpin® Gel & PCR Clean-Up Kit von Macherey & Nagel (Abschnitt 5.3.6).

5.4 Protein-Techniken

5.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Analyse von Proteinen aus eukaryotischen Zellen über SDS-PAGE (Abschnitt 5.4.4) und Western Blot (Abschnitt 5.4.6) wurden die Zellen lysiert.

Dazu wurden die geernteten Zellpellets in RIPA Puffer aufgenommen. Dieses Puffersystem enthält neben Tensiden als chaotrope Reagenzien, die die Solubilität der Proteine verbessern, auch Proteaseinhibitoren und Reduktionsmittel. Durch die Proteaseinhibitoren wird der Proteinabbau verhindert, während die Reduktionsmittel oxidativen Stress, der während der Zelllyse an Proteinen entsteht, reduzieren [108].

Das Volumen an RIPA Puffer richtete sich dabei nach der Größe des Zellpellets und betrug für $1 \cdot 10^6$ Zellen 200 μ L. Die Zusammensetzung des RIPA-Puffers ist in Tabelle 5 dargestellt.

Das resuspendierte Zellpellet wurde für 30 min. auf Eis inkubiert. Die anschließende Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 min. bei 4 °C diente zur Abtrennung von Zelltrümmern.

Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert.

Für den Fall, dass das Zellpellet ebenfalls analysiert werden sollte, wurde dieses in der gleichen Menge an RIPA Puffer aufgenommen und ebenfalls bei 4 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration in Pellet und Lysat konnte über ein Bradford-Assay (Abschnitt 5.4.3) bestimmt werden. Für die SDS-PAGE (Abschnitt 5.4.4) wurden je nach Protein und Anforderung 10 µg bis 100 µg Protein eingesetzt.

5.4.2 Zellaufschluss

Die zur Ni-NTA IMAC verwendeten Zellkulturen wurden zunächst geerntet und die Zellpellets im Anschluss aufgeschlossen. Der Aufschluss sollte einer möglichst hohen Proteinausbeute im Lysat dienen.

Verwendet wurde dazu ein Lysepuffer in Kombination mit einem Ultraschallaufschluss.

Das Zellpellet wurde dazu in Lysepuffer resuspendiert und für 10 min. auf Eis inkubiert. Für das Pellet einer 50 mL Zellkultur wurden 8 mL Lysepuffer verwendet, wohingegen das Pellet einer 300 mL Kultur in 30 mL resuspendiert wurde.

Anschließend wurde der Ultraschallaufschluss bei einer Amplitude von 30 % für dreimal 10 sec. auf Eis durchgeführt. Zwischen der Einwirkung des Ultraschalls wurde die Zellsuspension für 30 sec. auf Eis gelagert.

Der Ultraschallaufschluss ist eine physikalische Aufschlussmethode, bei der durch die Entstehung von Kavitationsblasen und deren Zusammenfall, Scherkräfte auf die Zellen einwirken und für deren mechanische Zerstörung sorgen [109].

Die Zellsuspension wurde anschließend für 10 min bei 10000 xg (4 °C) zentrifugiert, um Zelltrümmer aus der Lösung zu entfernen.

Das Lysat wurde steril filtriert und über eine Ni-NTA IMAC (Abschnitt 5.5.1) aufgereinigt. Das Pellet wurde im gleichen Volumen, wie das ursprüngliche Zellpellet, an Lysepuffer aufgenommen und ebenfalls über eine SDS-PAGE (Abschnitt 5.4.4) analysiert.

5.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten erfolgte über ein Bradford-Assay. Zur Herstellung des Bradford-Reagenzes wurde Protein Assay Lösung (Biorad) in einer Verdünnung von 1:5 in dH₂O verwendet.

Das Bradford-Reagenz enthält Coomassie Brilliant Blue G-250, welches unspezifisch kationische, nichtpolare und hydrophobe Seitenketten von Proteinen in Lösung bindet und somit für eine Verschiebung des Absorptionsspektrums sorgt. Das Absorptionsmaximum des

Farbstoffes wird von 465 nm zu 595 nm verschoben [110]. Über eine ebenfalls bei 595 nm vermessene BSA Standardreihe kann die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden.

Für die Standardreihe wurden je 1 mL des Bradford-Reagenzes mit 1, 5, 10 und 25 µg BSA in Küvetten versetzt und gemischt. Die Probe wurde ebenfalls in einem Volumen von 1 mL Bradford-Reagenz in einer Küvette vermessen, wobei 2 µL Probe eingesetzt wurden. Auch diese wurde gut vermischt.

Die Absorption der Standardreihe und der Probe wurde bei 595 nm im Photometer (Amersham Biosciences) gemessen und der Nullwert, in Form von reinem Bradford-Reagenz, von diesen Werten abgezogen.

Über eine lineare Regression der Absorptionswerte der BSA Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden.

5.4.4 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld. Die Proteinprobe wird dazu mit SDS versetzt.

SDS bewirkt eine Denaturierung der Proteine und lagert sich an die linearisierten Proteine an und verleiht ihnen somit eine negative Nettoladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist.

Im elektrischen Feld bewegen sich große Proteine langsamer durch die Poren des Polyacrylamidgels als kleinere, in Richtung der Anode.

Die Verwendung eines Größenstandards, der ebenfalls auf das Polyacrylamidgel aufgetragen wurde, ist ein Rückschluss auf die Molekülmasse der aufgetrennten Proteine möglich [111].

Für die Auftrennung von Proteinproben wurden hier ausschließlich Polyacrylamidgele mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % verwendet. Dazu wurde zunächst das Trenngel angefertigt und nach dessen Aushärtung das Sammelgel darauf gegossen.

Vor der Auftragung der Proteinproben auf das Gel wurden diese mit 4x Proteinladepuffer versetzt und für 10 min. bei 95 °C denaturiert.

Die SDS-PAGE fand in einer Gelelektrophoresekammer in 1x Elektrophoresepuffer bei 180 V statt. Die Proben wurden so lange über das Polyacrylamidgel aufgetrennt, bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreichte (ca. 50 min.).

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Gele über eine Coomassie Färbung (Abschnitt 5.4.5.1) oder eine Silberfärbung (Abschnitt 5.4.5.2) eingefärbt oder für eine weitere Analyse über einen Western Blot (Abschnitt 5.4.6) verwendet.

Für die SDS-PAGE eingesetzten Puffer sind in Tabelle 5 aufgeführt.

5.4.5 Färbung von SDS-Gelen

5.4.5.1 Coomassie Blue Färbung

Eine Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie Blue ermöglicht es die aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen. Das Prinzip ist dabei das gleiche wie beim Bradford-Assay (Abschnitt 5.4.3).

Hier wurde Coomassie Brilliant Blue R-250 als Farbstoff eingesetzt. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,1 µg [112].

Für diese Färbemethode wurde das SDS-Gel in Coomassie Färbelösung kurz in der Mikrowelle erhitzt (etwa 1 min. bei 400 W) und anschließend für 15 min. schüttelnd bei RT inkubiert.

Zur Entfärbung wurden zwei Schritte mit der Coomassie Entfärbelösung durchgeführt, wobei auch hier zu Beginn das Gel kurz erhitzt wurde. Die Zusammensetzung der Färbe- und Entfärbelösung lässt sich in Tabelle 5 finden.

Im Anschluss erfolgte eine Entfärbung mit H₂O bis zur gewünschten Farbintensität des Polyacrylamidgels, bei der das Wasser regelmäßig ausgetauscht wurde.

5.4.5.2 Silberfärbung

Eine weitere Färbemethode von SDS-Gelen ist die Silberfärbung. Diese zeichnet sich durch ihre besonders hohe Sensitivität aus. Es ist möglich Proteinmengen in einem Polyacrylamidgel in Höhe von 0,1 ng nachzuweisen [113].

Diese Methode basiert auf der Bindung von positiv geladenen Silberionen an die negativen Seitenketten von Proteinen. Die gebundenen Silberionen können mit Formaldehyd reduziert werden, sodass diese als elementares Silber ausfallen. Die Proteinbanden des Polyacrylamidgels erscheinen so gefärbt [114].

Das SDS-Gel wurde 30 min. in Fixierlösung geschwenkt, wobei nach 20 min. ein Wechsel der Lösung stattfand. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit Waschlösung für jeweils 20 min ebenfalls unter Schwenken des Gels.

Danach wurde das Gel in dH₂O für 30 min. geschwenkt. Das Wasser wurde nach 10 min gewechselt.

Das Gel wurde im Anschluss für 1 min. in Sensitizer-Lösung geschwenkt, gefolgt von zwei Waschschritten mit dH₂O für jeweils 30 sec.. Es erfolgte eine Inkubation des Gels mit Silberlösung für 30 min. unter Schwenken. Die Silberlösung wurde vollständig entfernt für drei Waschschrritte in dH₂O für jeweils 15 sec.. Die Entwicklung mit der Entwicklerlösung fand bis zur gewünschten Farbintensität statt. Die Reaktion wurde mit 96 %iger Essigsäure abgestoppt. Das Gel wurde in dH₂O gelagert.

Verwendete Lösungen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

5.4.6 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Übertragung von Proteinen aus einer SDS-PAGE (Abschnitt 5.4.4) auf eine Membran. Genutzt wird dafür die Auftrennung von Proteinen einer Lösung nach ihrem Molekulargewicht durch die SDS-PAGE. Die auf die Membran transferierten Zielproteine können über spezifische Antikörper detektiert werden [115].

Für die hier beschriebenen Versuche wurde das halb-trockene Western Blot Verfahren angewendet. Dabei wurde zum Transfer der Proteine aus den SDS-Gelen eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran eingesetzt. Die Proteine werden während des Transfers unter anderem über hydrophobe Wechselwirkungen an die PVDF-Membran gebunden [116].

Zur Durchführung des Western Blots wurden die Filterpapiere in den in Tabelle 5 beschriebenen Puffern getränkt. In der Blotkammer (A. Hartenstein) wurden zwei Filterpapiere mit Blot-Puffer A, ein Filterpapier mit Blot-Puffer B, die PVDF-Membran, darauf das SDS-Gel und abschließend drei Filterpapiere mit Blot-Puffer C gestapelt. Bei 200 mA bis 600 mA wurde für 35 min. bis 60 min. ein elektrisches Feld erzeugt, welches zum Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran führte.

Zur Verhinderung unspezifischer Wechselwirkungen des indirekten Immunnachweises, wurde die Membran im Anschluss für 30 min. schüttelnd in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) geblockt.

Die Membran wurde bei 4 °C über Nacht mit dem spezifischen Primärantikörper in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für das Zielprotein schüttelnd inkubiert. Die verwendeten Antikörperverdünnungen sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Am Folgetag wurde die Membran dreimal 5 min. in PBS-T gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper ebenfalls in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h schüttelnd bei RT inkubiert. Der mit Meerrettichperoxidase konjugierte Sekundärantikörper, welcher in der in Tabelle 17 aufgeführten Verdünnung eingesetzt wurde, bindet mehrfach an den Primärantikörper, was zu einer Signalverstärkung führt.

Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min. in PBS-T gewaschen und anschließend mit dem Western Lightning® Plus ECL Reagenzsystem entwickelt. Das Luminol der Entwicklerlösung wird durch die Meerrettichperoxidase des Sekundärantikörpers oxidiert [117]. Die entstehende Lumineszenz der Proteinbanden kann über Röntgenfilme detektiert werden.

Über den auf das Polyacrylamidgel aufgetragenen Proteinmarker kann die Molekülmasse des spezifisch nachgewiesenen Proteins ermittelt werden.

Zur Detektion verschiedener Proteine auf der gleichen Membran, müssen die an die Proteinbanden gebundenen Antikörper nach der Detektion eines Proteins von der Membran entfernt werden.

Die trockene PVDF-Membran wurde dafür kurz in Methanol aktiviert und anschließend für 5 min. in PBS-T gewaschen. Anschließend wurde diese in 0,1 M HCl für 30 min. geschwenkt. Nach einem 5 minütigen Waschschrift mit dH₂O, wurde die Membran für 30 min. in 0,1 M NaOH schwenkend inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit dH₂O für 5 min., gefolgt von zwei Waschschriften in PBS-T für ebenfalls 5 min..

Abschließend wurde die Membran für 30 min. in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) blockiert. Ein weiterer Proteinnachweis, wie oben beschrieben, konnte erfolgen.

5.4.7 Aufkonzentrierung von Proteinlösung mit Pufferwechsel

Für viele weitere Aufreinigungsmethoden, wie zum Beispiel die Größenausschlusschromatographie (SEC), ist eine Aufkonzentrierung der aufgereinigten Proteinlösungen notwendig.

Neben des zu großen Volumens der Proteinlösung, spielt auch der Puffer, in dem die Proteine vorliegen, eine wichtige Rolle.

Eine Aufkonzentrierung und ein Pufferwechsel wurde für Proben der Ni-NTA IMAC (Abschnitt 5.5.1) zur Vorbereitung auf die Größenausschlusschromatographie (SEC) (Abschnitt 5.5.2) vorgenommen.

5.4.7.1 Amicon® Ultra und Proteus X-Spinner

Die Amicon® Ultra 4 Zentrifugationsröhrchen mit einem *Molecular weight cut off* (MWCO) von 30K und das Ultrafiltrationsröhrchen Proteus X-Spinner von Generon mit einem MWCO von 20 kDa wurde jeweils zum Umpuffern von aufgereinigten Proteinlösungen eingesetzt. Die Probe wurde nach Herstellerangaben in das jeweilige Röhrchen gegeben und bei 2000 g bis 5000 g für 4,5 min. bis 10 min. zentrifugiert bis das gewünschte Zielvolumen erreicht wurde. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde das Amicon® Ultra 4 Zentrifugationsröhrchen invertiert, um ein Ausfallen des Proteins zu verhindern.

Die aufkonzentrierte Probe wurde bei 4 °C für kurze Zeit gelagert.

5.5 Chromatographien

5.5.1 Nickel Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine, die über einen Ultraschallaufschluss (Abschnitt 5.4.2) aus den Insektenzellpellet gewonnen werden konnten, wurde die Nickel Affinitätschromatographie verwendet.

Proteine mit einem oder mehreren C- oder N-terminalen His-Tags können an Nitrilotriessigsäure (NTA) immobilisierte Nickelionen binden. Die Agarose dient dabei als Matrix für die Bindung. Für eine Bindung zwischen Ni²⁺ und Protein ist es ausreichend, wenn zwei Histidinreste mit den Nickelionen eine Wechselwirkung eingehen. Die gebundenen Proteine können durch die starke Wechselwirkung mit Ni²⁺ in mehreren Schritten gewaschen werden, bevor eine Elution über Imidazol hervorgerufen wird. Liegt eine Imidazolkonzentration von 100 bis 250 mM vor, werden die gebundenen Proteine durch eine kompetitive Bindung des Imidazols an die Nickelionen, eluiert [118], [119].

Die Proteinkonzentration der Lysate nach dem Ultraschallaufschluss (Abschnitt 5.4.2) wurde über ein Bradford-Assay (Abschnitt 5.4.3) bestimmt. Die verwendeten Ni-NTA Agarose Beads besaßen eine Bindungskapazität von 5 bis 10 mg Protein/mL [118]. Die benötigte Menge an Ni-NTA Agarose wurde mit dem 10-fachen Volumen an Lysepuffer bei 500 xg für 5 min. (4 °C) equilibriert. Der Überstand wurde verworfen und die Ni-NTA Beads mit dem Lysat für mindestens 1 h bei 4 °C auf dem Rotationsmischer inkubiert. Es wurde mit einem Proteinüberschuss von 20 % gearbeitet um eine spezifische Bindung zu gewährleisten.

Zur Aufreinigung der gebundenen Proteine wurde eine Einmalsäule (Qiagen) verwendet. Nach der Inkubation wurden die Ni-NTA Beads in die Einmalsäule gegeben und bei RT stehengelassen, bis sich diese abgesetzt hatten.

Nachdem der Durchfluss aufgefangen wurde, fanden drei bis acht Waschschritte mit 1 bis 2 mL Waschpuffer statt. Der Puffer wurde jeweils für 2 bis 5 min. mit den Beads inkubiert, bevor die Fraktionen aufgefangen wurden.

Die Elution erfolgt in vier bis sechs Elutionsschritten mit einem Elutionsvolumen von jeweils 200 µL. Auch hier wurden die Beads für 2 bis 5 min. mit dem Elutionspuffer inkubiert. Die Lagerung der Fraktionsproben fand bei 4 °C statt.

Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgelistet.

5.5.2 Größenausschlusschromatographie

Die SEC diente zur Aufreinigung des Zielproteinkomplexes aus der aufkonzentrierten und umgepufferten Proteinlösung (Abschnitt 5.4.7).

Die SEC ist eine Methode, bei der Proteine oder Proteinkomplexe über eine poröse Matrix aufgrund ihres hydrodynamischen Radius getrennt werden. Kleine Proteine haben einen kleineren hydrodynamischen Radius und werden länger auf der Säule gehalten, während große Proteine ein geringeres Matrixvolumen nutzen können und früher eluieren [28].

Eingesetzt wurde eine Superdex 200 10/300 Säule (GE Healthcare Bio-Sciences AB) in der ÄKTAprime plus oder ÄKTApurifier. Die angewendeten Parametereinstellungen sind in Tabelle 21 abgebildet.

Tabelle 21: Verwendete Einstellungsparameter für die SEC mit der ÄKTApurifier und der ÄKTAprime

Parameter	Gelfiltrationsanalyse	
	ÄKTApurifier	ÄKTAprime
Flussrate [mL/min]	0,25	0,1
maximaler Druck [MPa]	1,4	1
Fraktionsvolumen [mL]	0,5	0,5
Probenschleife [mL]	0,5	0,5

Die aufgetragenen Proben lagen in dem in Tabelle 5 beschriebenen Gelfiltrationspuffer vor und hatten ein maximales Volumen von 500 µL.

Durchgeführt wurde die SEC bei 4 °C.

6 Ergebnisse

6.1 Gibson Klonierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte tLT-Rb AB Box und tLT-USP7 TRAF wurden über eine Klonierung nach Gibson hergestellt (Abschnitt 5.3.7). Als Vektor wurden pFastBac Dual Vektoren mit einem dualen Promotorsystem aus Polyhedrin- und P10-Promotor eingesetzt. Zusätzlich enthielten die Vektoren bereits die aus 244 Aminosäuren bestehende Sequenz für das MCPyV tLT Antigen. In dieser Arbeit wurde mit der verkürzten Form des tLT Antigens mit einer Länge von 244 Aminosäuren gearbeitet, da diese häufig in Tumoren gefunden wurde.

Als Insert wurde die Sequenz der verwendeten Domäne der Bindungspartnern in den Vektor kloniert. Die Insertionsstelle enthielt außerdem N-terminal die Sequenz für einen His-Tag.

Die Proteinkonstrukte sind in Abbildung 9 dargestellt. Mit den eingesetzten Konstrukten tLT-Rb AB Box und tLT-USP7 TRAF, werden Rb und Usp7 nicht in ihrer vollständigen Länge exprimiert, sondern nur der gezeigte Bereich.

Die erfolgreiche Klonierung der Konstrukte konnte über eine Sanger Sequenzierung bestätigt werden (Abschnitt 5.3.8).

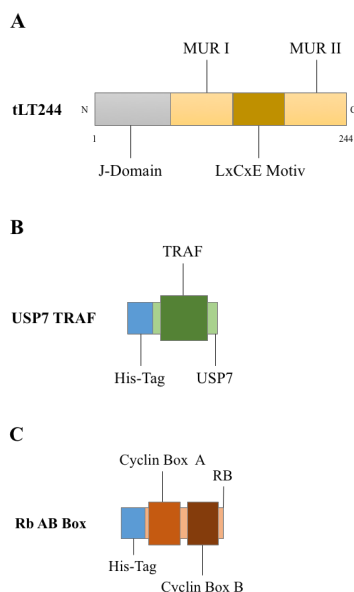


Abbildung 9: Proteinkonstrukte der Gibson Klonierung. tLT244 mit einer Länge von 244 Aminosäuren, aufgebaut aus J-Domän, sowie den Teilen der *MCPyV unique region* (MUR) MUR I, LxCxE Motiv und MUR II. (B) Das USP7 TRAF Proteinkonstrukt besitzt einen N-terminalen His-Tag und enthält die Usp7 TRAF Domäne. (C) Neben dem N-terminalen His-Tag besitzt das Rb AB Box Konstrukt die Cyclin Box A Domäne, sowie die Cyclin Box B Domäne des Rb Proteins.

Die spezifische Expressions- und Aufreinigungsanalyse der einzelnen Proteinkonstrukte erfolgte über einen Western Blot. Die Bindungspartner Rb und Usp7 des tLT Antigens konnten

über die Verwendung eines His Primärantikörpers nachgewiesen werden. Dieser bindet den N-Terminalen 6x His-Tag der Proteine.

Das tLT Antigen hingegen könnte über den Cm2b4 Primärantikörper detektiert werden, der spezifisch an die MUR des MCPyV LT Antigens bindet [121].

6.2 Titerbestimmung

Die Titerbestimmung über ein Viral Plaque Assay (Abschnitt 5.2.4) ermöglicht eine Aussage zur Infektiosität der produzierten Baculovirusüberstände, sowie deren Vergleich. Über die Ausbildung von Plaques der infektiösen, cytopathischen Baculoviren, kann die Konzentration in pfu pro mL bestimmt werden [122].

Die Titerbestimmung des in Doppelbestimmung durchgeführten Viral Plaque Assays ergab mit einem Titer von $5,7 \cdot 10^6$ pfu/mL des P2 Baculovirusüberstand von tLT-USP7 TRAF einen höheren Titer als der P2 Baculovirusüberstand von tLT-Rb AB Box.

Dieser fiel mit $0,7 \cdot 10^6$ pfu/mL um ca. 88 % Prozent geringer aus als der Titer für tLT-USP7 TRAF.

6.3 Testexpression in Insektenzellen

Zur Identifikation der richtigen Baculoviruskonzentration für die Expression von tLT und dessen Bindungspartnern wurde eine Testexpression in H5 Zellen durchgeführt. Dafür wurde jeweils eine 50 mL Zellkultur mit den Baculovirusüberständen in den Konzentrationen 0,2 %, 0,5 % und 0,8 % infiziert (Abschnitt 5.2.3.2).

Es erfolgte eine tägliche Entnahme von $1 \cdot 10^6$ Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen nach Infektion (dpi). Analysiert wurde die Proteinexpression nach einer Zellyse der Zellpellets mit RIPA Puffer (Abschnitt 5.4.1). Dabei wurden sowohl die Zellpellets, als auch die Lysate über Western Blots (Abschnitt 5.4.6) zur Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes für eine möglichst hohe Proteinausbeute untersucht.

Der für die Detektion des tLT in den Western Blots eingesetzte Cm2b4 Primärantikörper zeigt zum Teil unspezifische Banden [50]. Um diese von den tLT Banden der Testexpression unterscheiden zu können, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Dazu wurden Sf9 Zellen mit einem Baculovirusüberstand infiziert, der nur für den FastBac Dual Vektor ohne Insert codierte. Unspezifische Banden sind deutlich bei ca. 48 kDa und bei ca. 75 kDa zu erkennen (Abbildung 10).

Cm2b4

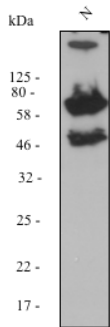


Abbildung 10: Western Blot einer Negativkontrolle (N). Die Expression des FastBac Dual Vektors fand in einer 50 mL Sf9 Zellkultur mit den Viruskonzentrationen von 0,5 % (v/v) statt. Es wurde eine Zellzahl von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingesetzt. Die Ernte erfolgte 3 dpi. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt.

6.3.1 Testexpression von tLT-Rb AB Box

Abbildung 11 bis 13 zeigen die Westernblots der Testexpression von tLT und dem Bindungspartner Rb gegen His-Tag und tLT.

Es kann deutlich gezeigt werden, dass bei der Zellyse mit RIPA Puffer ein Großteil des tLT im Zellpellet verbleibt (Abbildung 11).

Eine Expression von tLT kann ab 2 Tagen nach Infektion (dpi) detektiert werden. Neben der eigentlichen Band des tLT, die bei etwa 35 kDa verläuft können ab 3 dpi starke Abbauprodukte nachgewiesen werden, die sowohl im Pellet, als auch im Lysat auftreten (Abbildung 11 und 12). An Tag 5 nach Infektion konnte die stärkste Expression an tLT detektiert werden, allerdings sind die Banden der Abbauprodukte von tLT hier ebenso am stärksten (Abbildung 12).

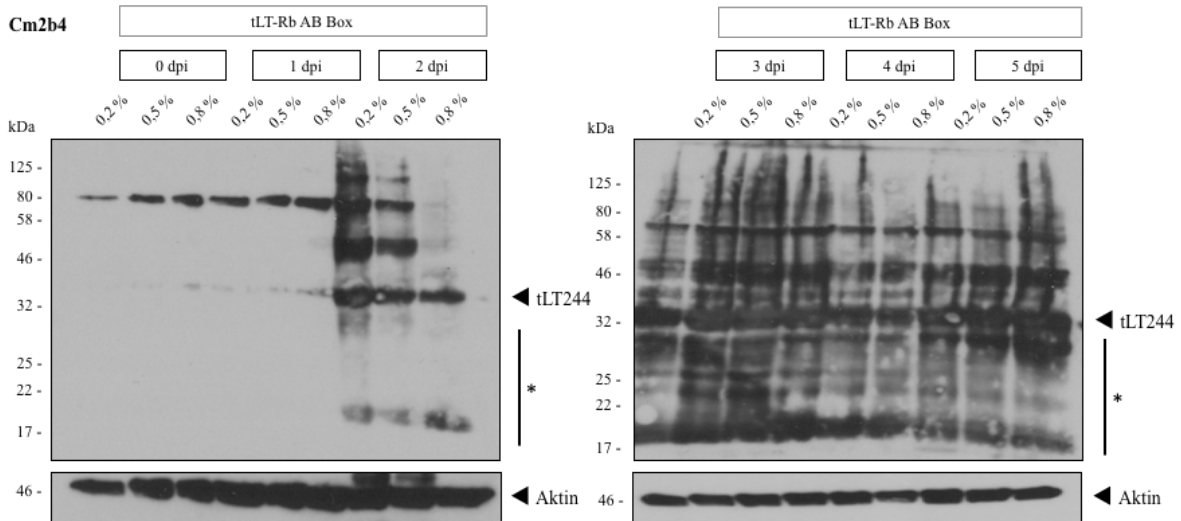


Abbildung 11: Western Blot der Pellets der Testexpression von tLT-Rb AB Box in H5 Zellen

Die Testexpressionen einer 50 mL Zellkultur mit den Viruskonzentrationen 0,2 %, 0,5 % und 0,8 % wurden über einen Zeitraum von 5 dpi betrachtet. Es wurde eine anfängliche Zellzahl von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingesetzt. Es erfolgte eine Entnahme von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Tag. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Die Banden der Abbauprodukte sind mit * markiert.

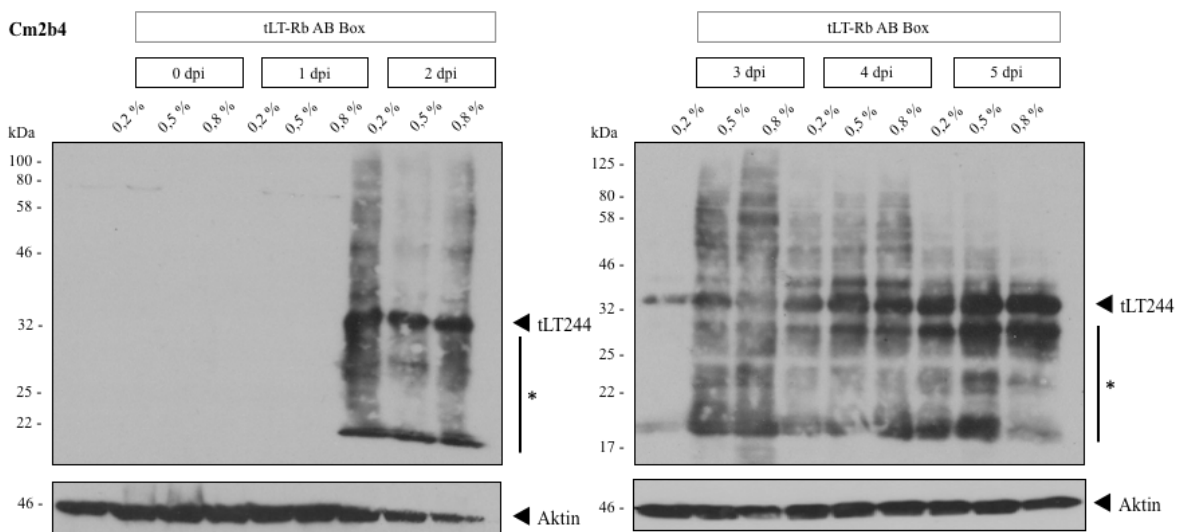


Abbildung 12: Western Blot der Lysate der Testexpression von tLT-Rb AB Box in H5 Zellen

Die Testexpressionen einer 50 mL Zellkultur mit den Viruskonzentrationen 0,2 %, 0,5 % und 0,8 % wurden über einen Zeitraum von 5 dpi betrachtet. Es wurde eine anfängliche Zellzahl von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingesetzt. Es erfolgte eine Entnahme von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Tag. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Die Banden der Abbauprodukte sind mit * markiert.

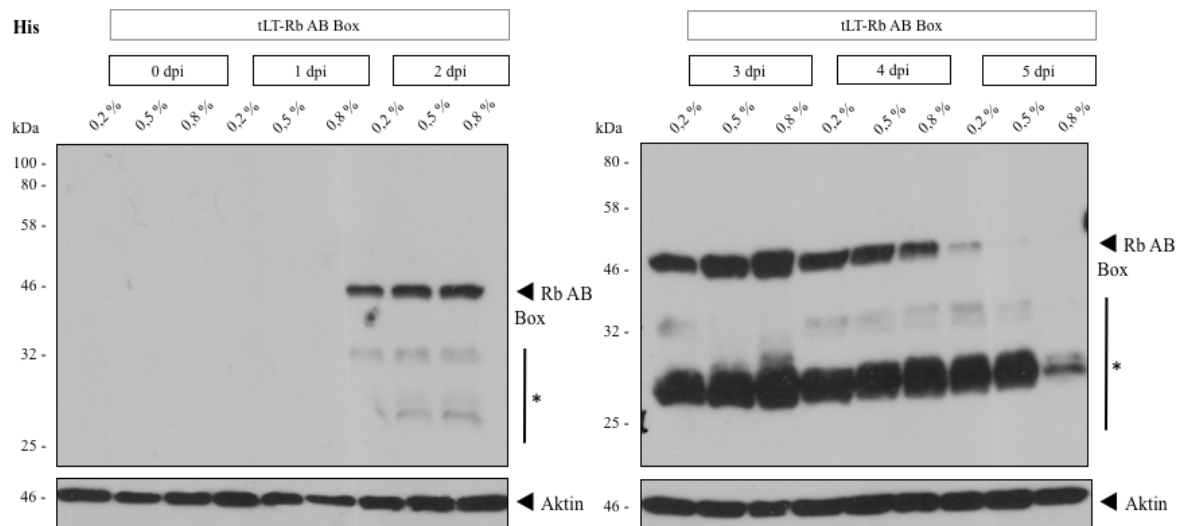


Abbildung 13: Western Blot der Lysate der Testexpression von tLT-Rb AB Box in H5 Zellen

Die Testexpressionen einer 50 mL Zellkultur mit den Viruskonzentrationen 0,2 %, 0,5 % und 0,8 % wurden über einen Zeitraum von 5 dpi betrachtet. Es wurde eine anfängliche Zellzahl von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingesetzt. Es erfolgte eine Entnahme von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Tag. Der His Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Die Banden der Abbauprodukte sind mit * markiert.

Der Western Blot zur Analyse der Rb Expression, bei dem ein His Antikörper als Primärantikörper verwendet wurde, wurde ausschließlich für die Lysate durchgeführt. Wie bei tLT ist in Abbildung 13 eine Expression der Rb AB Box ab 2 dpi zu erkennen. Bereits 2 dpi sind leichte Abbauproduktbanden bei ca. 28 kDa zu erkennen, welche ab 3 dpi eine deutlich höhere Intensität zeigen. An Tag 5 nach Infektion ist bei allen drei Testexpressionen Rb kaum mehr nachzuweisen, sondern nur noch das Abbauprodukt.

Für die nachfolgenden Expressionen von tLT-Rb Ab Box wurde ein Endzeitpunkt von 3 dpi mit einer verwendeten Baculoviruskonzentration von 0,5 % (v/v) gewählt, da unter diesen Bedingungen eine relativ hohe Expression an Rb erreicht werden kann und zusätzlich eine stärkere Expression an tLT als 2 dpi.

6.3.2 Testexpression von tLT-USP7 TRAF

Die Abbildungen 14 und 15 zeigen die Western Blots der Testexpression von tLT mit dem Bindungspartner Usp7 unter der Verwendung eines tLT Primärantikörpers (Cm2b4). Die stärkste Expression an tLT konnte 2 dpi sowohl im Pellet, als auch im Lysat nachgewiesen werden. Davor ist keinerlei Expression an tLT zu detektieren.

Wie bereits bei der Expression von tLT und Rb gezeigt werden konnte, verbleibt auch hier bei der Zellyse mit dem RIPA Puffer ein Großteil des tLTs im Pellet. Zusätzlich zeigen sowohl die Lysate, als auch die Pellets bereits 2 dpi deutliche Abbauproduktbanden von tLT (Abbildung 14 und 15).

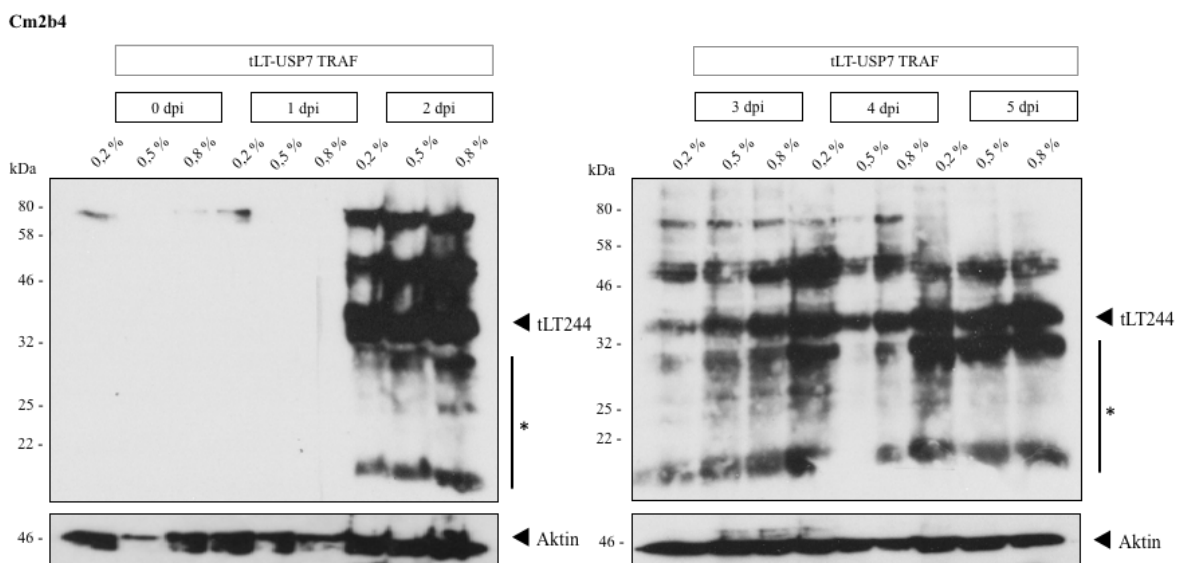


Abbildung 14: Western Blot der Pellets der Testexpression von tLT-USP7 TRAF in H5 Zellen

Die Testexpressionen einer 50 mL Zellkultur mit den Viruskonzentrationen 0,2 %, 0,5 % und 0,8 % wurden über einen Zeitraum von 5 dpi betrachtet. Es wurde eine anfängliche Zellzahl von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingesetzt. Es erfolgte eine Entnahme von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Tag. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Die Banden der Abbauprodukte sind mit * markiert.

Cm2b4

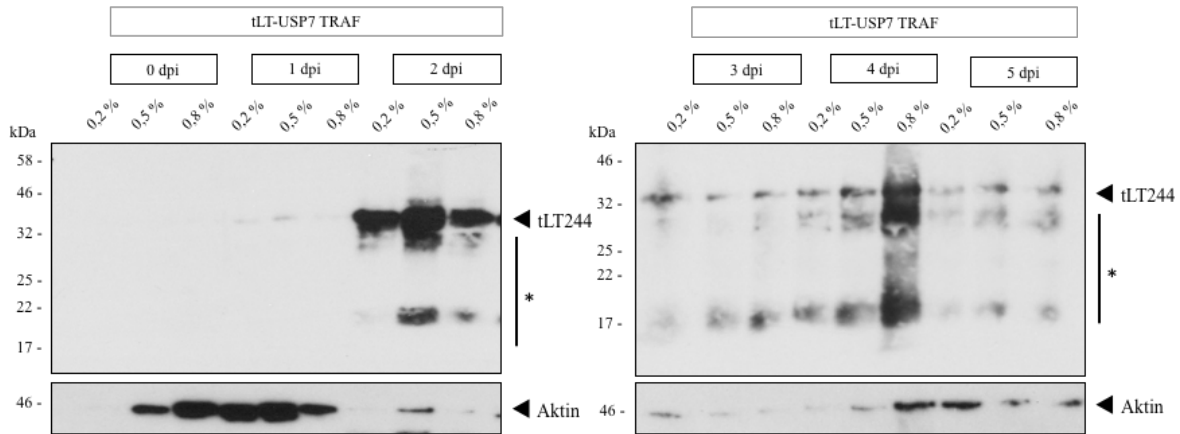


Abbildung 15: Western Blot der Lysate der Testexpression von tLT-USP7 TRAF in H5 Zellen

Die Testexpressionen einer 50 mL Zellkultur mit den Viruskonzentrationen 0,2 %, 0,5 % und 0,8 % wurden über einen Zeitraum von 5 dpi betrachtet. Es wurde eine anfängliche Zellzahl von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingesetzt. Es erfolgte eine Entnahme von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Tag. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Die Banden der Abbauprodukte sind mit * markiert.

Die mit dem His Primärantikörper inkubierten Western Blots der Pellets und Lysate (Abbildung 16 und 17), in denen der Bindungspartner Usp7 nachgewiesen werden konnte, zeigen im Gegensatz zu den Western Blots mit dem tLT Primärantikörper keine Abbauproduktbanden.

Eine Expression von Usp7 ist ab 2 dpi zu detektieren, wobei die stärkste Expression an den Tagen 3 und 4 nach Infektion nachgewiesen werden konnte.

Die Blots der Lysate zeigen bereits ab 1 dpi eine Expression an Usp7, wie in Abbildung 17 zu erkennen ist.

His

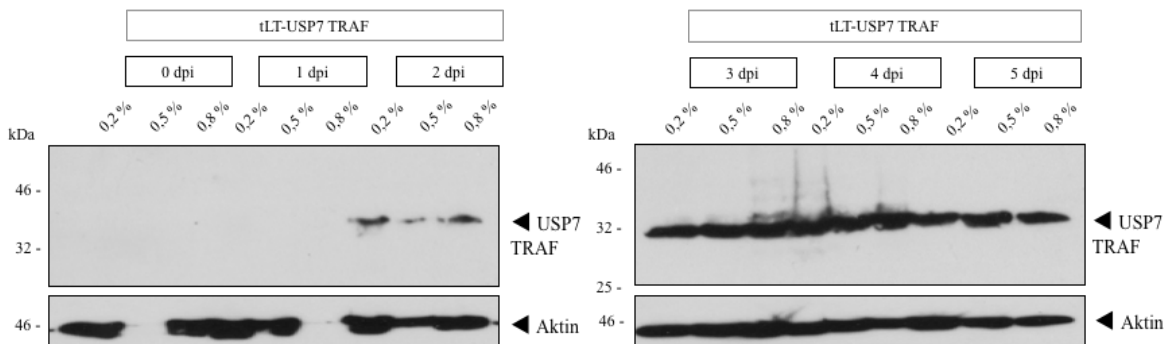


Abbildung 16: Western Blot der Pellets der Testexpression von tLT-USP7 TRAF in H5 Zellen

Die Testexpressionen einer 50 mL Zellkultur mit den Viruskonzentrationen 0,2 %, 0,5 % und 0,8 % wurden über einen Zeitraum von 5 dpi betrachtet. Es wurde eine anfängliche Zellzahl von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingesetzt. Es erfolgte eine Entnahme von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Tag. Der His Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt.

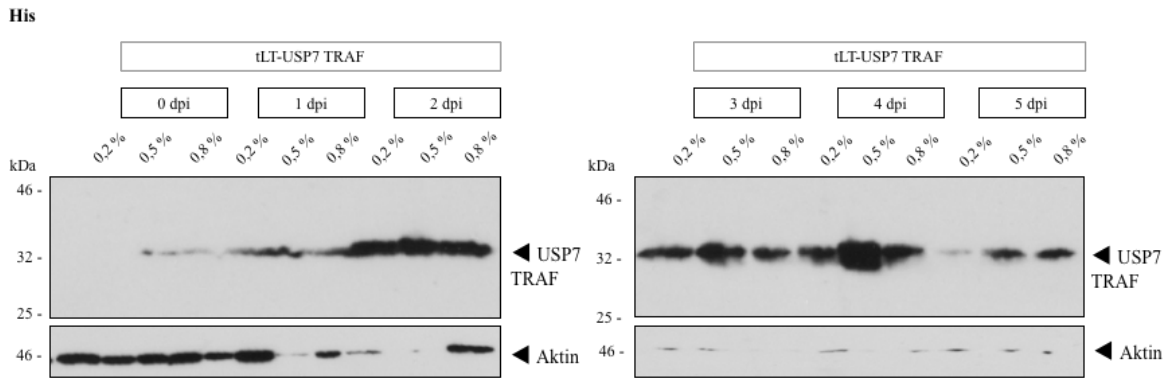


Abbildung 17: Western Blot der Lysate der Testexpression von tLT-USP7 TRAF in H5 Zellen

Die Testexpressionen einer 50 mL Zellkultur mit den Viruskonzentrationen 0,2 %, 0,5 % und 0,8 % wurden über einen Zeitraum von 5 dpi betrachtet. Es wurde eine anfängliche Zellzahl von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingesetzt. Es erfolgte eine Entnahme von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Tag. Der His Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt.

Die mit Aktin Primärantikörper inkubierten Western Blots, besonders die der Lysate, die als Ladekontrolle durchgeführt wurden, zeigen sehr unterschiedlich starke Banden. Auffallend ist, dass die Banden zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion nur noch schwach zu detektieren sind.

Für die nachfolgenden Versuche wurde für die Expression von tLT mit dessen Bindungspartner Usp7 eine Ernte zwei Tage nach Infektion gewählt. Als Viruskonzentration wurde hier ebenfalls eine Konzentration von 0,5 % (v/v) gewählt.

Die Testexpression mit 0,5 % Baculovirusüberstand zeigte 2 dpi die größte Expression an tLT. An Tag vier nach Infektion wurde zwar eine größere Proteinexpression von Usp7 unter der gleichen Viruskonzentration gezeigt als an Tag 2, jedoch wurde an Tag vier nach Infektion auch die stärkste Band der Abbauprodukte von tLT nachgewiesen.

6.4 Nickelaffinitätschromatographie und Pufferoptimierung

Zur Optimierung der Puffer für die Ni-NTA IMAC wurden Zellpellets von 50 mL H5 Zellkulturen mit einer Zellkonzentration von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingesetzt, die mit den unter 6.2 bestimmten Baculoviruskonzentrationen infiziert wurden.

Eine erfolgreiche Ni-NTA IMAC konnte sowohl für die Expression von tLT mit dem Bindungspartner Rb, als auch für tLT mit Usp7 durchgeführt werden.

Die Ni-NTA IMAC zur Aufreinigung von tLT gelang über dessen Komplexbildung mit den Bindungspartnern (Abschnitt 2.3.4), welche einen His-Tag trugen.

Zur Optimierung der IMAC wurden sowohl verschiedene Imidazolkonzentrationen, als auch Salzkonzentrationen im Waschpuffer getestet um unspezifische Bindungen zu lösen, ohne den Proteinkomplex zu zerstören.

Durchgeführt wurden diese Optimierungen mit tLT und dessen Bindungspartner Rb.

6.4.1 Imidazolkonzentration

Abbildung 18 zeigt die Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer. Es wurden drei Waschschrte mit steigender Imidazolkonzentration gewählt. Die verwendeten Imidazolkonzentrationen sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Verwendete Imidazol- und NaCl Konzentrationen bei der Ni-NTA IMAC zur Optimierung der Imidazolkonzentration

Imidazolkonzentration [mM]	NaCl Konzentration [mM]	Aufreinigungsschritt
10	250	Lyse
15	500	Waschschritt 1
20	500	Waschschritt 2
30	500	Waschschritt 3
250	250	Elution

Es ist zu erkennen, dass die Fraktionen der drei Waschschrte nahezu keine Unterschiede in ihren Banden in der SDS-PAGE zeigen. Die Elutionsfraktion drei zeigt deutliche Rb Banden, wohingegen die tLT Bande in dieser Fraktionen deutlich schwächer ausfällt.

Ähnliche Ergebnisse liefern die Westernblots, die mit His und tLT Primärantikörpern inkubiert wurden (Abbildung 19 und 20).

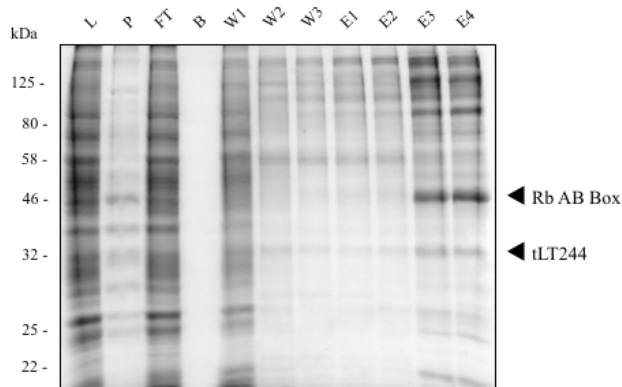


Abbildung 18: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer. Die in einer 50 mL H5 Zellkultur ($0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL) exprimierten Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Dem Lysepuffer wurden 10 mM Imidazol zugesetzt. Die Waschschrte wurden mit steigender Imidazolkonzentration von 15 mM, 20 mM und 30 mM durchgeführt. Eluiert wurde mit 250 mM Imidazol im Elutionspuffer. Aufgetragen sind Lysat (L), Pellet (P), Flow-through (FT), Ni-NTA Agarose Beads (B), Waschschrte 1 bis 3 (W1 bis W3) und Elutionsfraktionen 1 bis 4 (E1 bis E4). Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Abbildung 19 zeigt den mit His Primärantikörper inkubierten Western Blot der Ni-NTA IMAC des Komplexes aus tLT und Rb. Zu erkennen ist, dass die Waschschrte mit den verschiedenen Waschpufferzusammensetzungen nahezu gleich starke Rb Banden zeigen. Dies korreliert mit den Ergebnissen des mit tLT Primärantikörper inkubierten Western Blots (Abbildung 20).

Die Bandenstärke des Western Blots, in dem der tLT Primärantikörper eingesetzt wurde, ist in allen drei Waschschrten gleich, wobei der dritte Waschschrte keine Abbauproduktbande von tLT zeigt.

Die Banden sowohl von Rb, als auch von tLT sind in den Elutionsfraktionen deutlich stärker als in den Waschschrten.

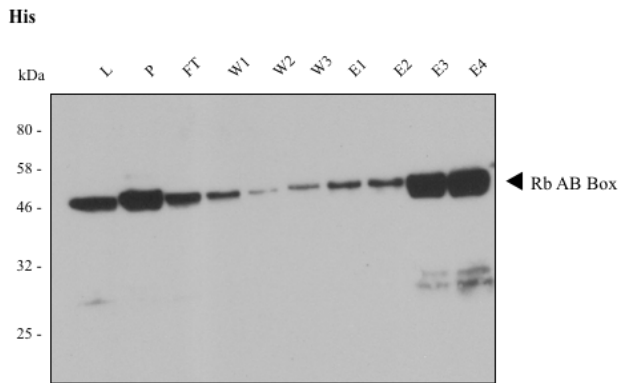


Abbildung 19: Western Blot der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer Die Expression von tLT-Rb AB Box fand nach einer Infektion mit 0,5 % (v/v) Baculovirus in einer 50 mL H5 Zellkultur mit einer Konzentration von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL statt. Dem Lysepuffer wurden 10 mM Imidazol zugesetzt. Die Waschschrte wurden mit steigender Imidazolkonzentration von 15 mM, 20 mM und 30 mM durchgeföhrt. Eluiert wurde mit 250 mM Imidazol im Elutionspuffer. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeföhrt. Der His Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Aufgetragen sind Lysat (L), Pellet (P), Flow-through (FT), Ni-NTA Agarose Beads (B), Waschschrte 1 bis 3 (W1 bis W3) und Elutionsfraktionen 1 bis 4 (E1 bis E4).

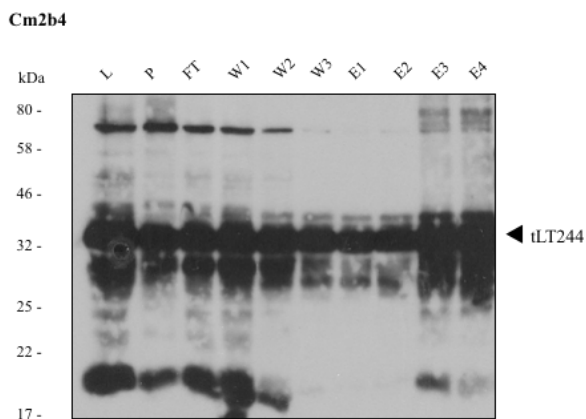


Abbildung 20: Western Blot der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer Die Expression von tLT-Rb AB Box fand nach einer Infektion mit 0,5 % (v/v) Baculovirus in einer 50 mL H5 Zellkultur mit einer Konzentration von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL statt. Dem Lysepuffer wurden 10 mM Imidazol zugesetzt. Die Waschschrte wurden mit steigender Imidazolkonzentration von 15 mM, 20 mM und 30 mM durchgeföhrt. Eluiert wurde mit 250 mM Imidazol im Elutionspuffer. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeföhrt. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Aufgetragen sind Lysat (L), Pellet (P), Flow-through (FT), Ni-NTA Agarose Beads (B), Waschschrte 1 bis 3 (W1 bis W3) und Elutionsfraktionen 1 bis 4 (E1 bis E4).

Für die darauffolgenden Ni-NTA IMAC wurde eine Konzentration von 30 mM Imidazol im Waschpuffer gewählt.

Eine erhöhte Imidazolkonzentration im Waschpuffer trägt jedoch nicht zur erhöhten Lösung von unspezifischen Bindungen bei.

6.4.2 Salzkonzentration

Die Optimierung der Salzkonzentration, hier bezogen auf die Natriumchlorid (NaCl) Konzentration, wurde anhand von Western Blots analysiert (Abbildungen 21 und 22). Die NaCl Konzentration der verwendeten Puffer für die einzelnen Schritte der Ni-NTA IMAC ist in Tabelle 23 abgebildet.

Tabelle 23: Verwendete Imidazol- und NaCl Konzentrationen bei der Ni-NTA IMAC zur Optimierung der Salzkonzentration

Imidazolkonzentration [mM]	NaCl Konzentration [mM]	Aufreinigungsschritt
10	75	Lyse
30	50	Waschschritt 1 & 2
30	100	Waschschritt 3 & 4
30	200	Waschschritt 5 & 6
30	500	Waschschritt 7 & 8
250	75	Elution

Der mit tLT Primärantikörper inkubierte Western Blot zeigt deutlich, dass in allen acht Waschschritten nahezu identisch starke tLT Banden erreicht wurden. Diese fallen nur geringfügig schmaler aus, als die Banden der sechs Elutionsschritte.

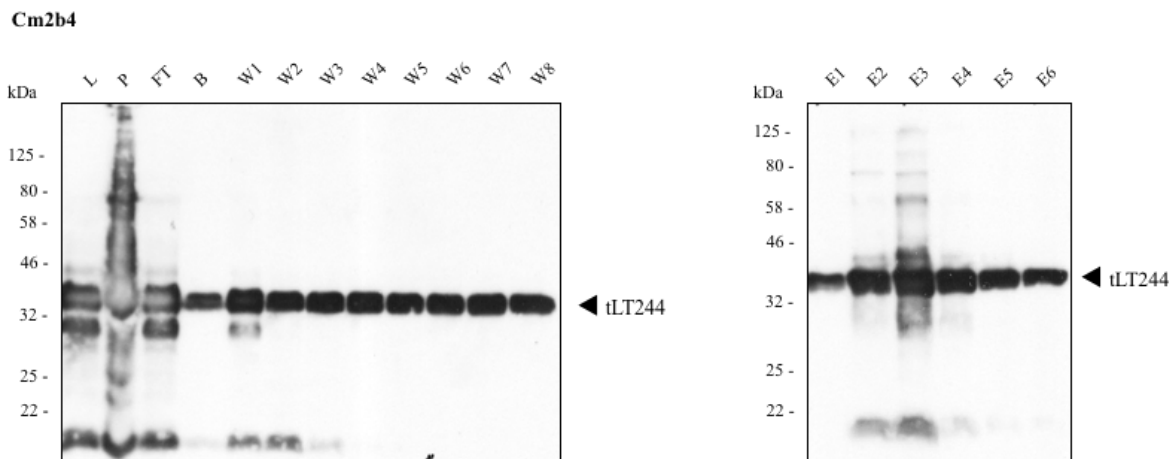


Abbildung 21: Western Blot der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box mit unterschiedlichen NaCl Konzentrationen im Waschpuffer Die Expression von tLT-Rb AB Box fand in einer 50 mL H5 Zellenzellkultur mit einer Konzentration von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL statt. Es wurde eine Viruskonzentration von 0,5 % (v/v) eingesetzt. Die Zellernte wurde 3 dpi durchgeführt. Dem Lysepuffer wurden 10 mM Imidazol und 75 mM NaCl zugesetzt. Die Waschschritte wurden mit steigender Salzkonzentration von 50 mM, 100 mM, 200 mM und 500 mM jeweils in doppelter Verwendung durchgeführt. Eluiert wurde mit 250 mM Imidazol und 75 mM NaCl im Elutionspuffer. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Aufgetragen sind Lysat (L), Pellet (P), Flow-through (FT), Ni-NTA Agarose Beads (B), Waschschritte 1 bis 8 (W1 bis W8) und Elutionsfraktionen 1 bis 6 (E1 bis E6).

Der in Abbildung 21 gezeigte Western Blot, bei dem eine Inkubation mit dem His Primärantikörper stattfand, zeigt für die Waschschriffe ähnliche Ergebnisse. Die Rb Banden zeigen, bis auf Waschschriff eins, ähnliche Intensitäten. Im Gegensatz zum Western Blot, der mit tLT Primärantikörper inkubiert wurde, fallen die Banden der Elutionsschriffe deutlich intensiver aus, als die der Waschschriffe (Abbildung 22).

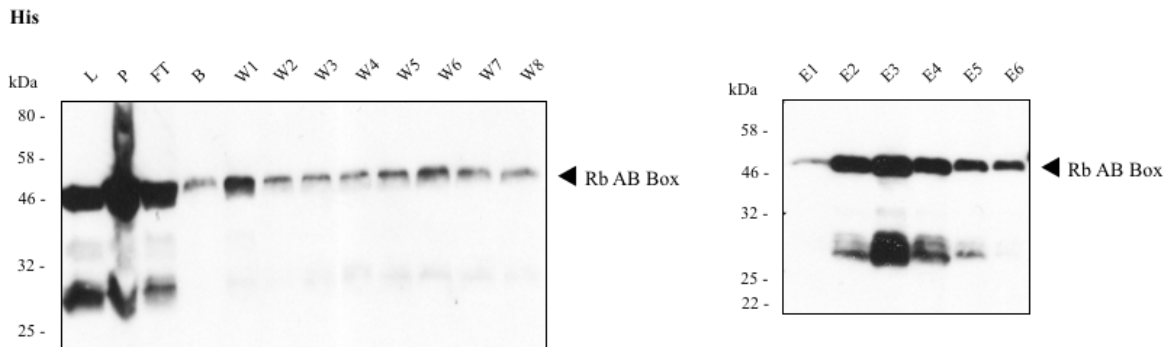


Abbildung 22: Western Blot der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box mit unterschiedlichen NaCl Konzentrationen im Waschpuffer Die Expression von tLT-Rb AB Box fand in einer 50 mL H5 Zellenzellkultur mit einer Konzentration von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL statt. Es wurde eine Viruskonzentration von 0,5 % (v/v) eingesetzt. Die Zellernte wurde 3 dpi durchgeführt. Dem Lysepuffer wurden 10 mM Imidazol und 75 mM NaCl zugesetzt. Die Waschschriffe wurden mit steigender Salzkonzentration von 50 mM, 100 mM, 200 mM und 500 mM jeweils in doppelter Verwendung durchgeführt. Eluiert wurde mit 250 mM Imidazol und 75 mM NaCl im Elutionspuffer. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Der His Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Aufgetragen sind Lysat (L), Pellet (P), Flow-through (FT), Ni-NTA Agarose Beads (B), Waschschriffe 1 bis 8 (W1 bis W8) und Elutionsfraktionen 1 bis 6 (E1 bis E6).

Die nachfolgenden Ni-NTA IMAC wurden mit einer Salzkonzentration von 100 mM NaCl im Waschpuffer durchgeführt.

Die Erhöhung der Salzkonzentration im Waschpuffer trägt ebenfalls nicht zur erhöhten Lösung unspezifischer Bindungen bei.

6.5 Aufreinigungen

Zum Erhalt größerer Expressionsausbeuten von tLT und dessen Bindungspartnern Rb und Usp7 wurde ein *Scale up* vorgenommen. Die Expression unter den in Abschnitt 6.3 beschriebenen Bedingungen wurde in 300 mL H5 Zellkulturen durchgeführt.

Insgesamt wurden drei *Scale up* Versuche unternommen. Zwei dieser Versuche wurden mit tLT-Rb AB Box und ein Versuch mit tLT-USP7 TRAF gemacht.

Die erste Ni-NTA IMAC des Komplexes aus tLT und Rb wurde mit den in Tabelle 24 beschriebenen Imidazol- und Salzkonzentrationen durchgeführt.

Tabelle 24: Verwendete Imidazol- und NaCl Konzentrationen für den *Scale up* Ansatz der ersten Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box

Ni-NTA IMAC Puffer	Imidazolkonzentration [mM]	NaCl Konzentration [mM]
Lysepuffer	10	250
Waschpuffer	30	500
Elutionspuffer	250	250

Die zweite Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box und die Ni-NTA IMAC von tLT-USP7 TRAF wurde unter den in Abschnitt 6.3 festgelegten Bedingungen durchgeführt, welche noch einmal in Tabelle 25 zusammengefasst sind.

Tabelle 25: Verwendete Imidazol- und NaCl Konzentrationen für die *Scale up* Ansätze der zweiten tLT-Rb AB Box Ni-NTA IMAC und der Ni-NTA IMAC von tLT-USP7 TRAF

Ni-NTA IMAC Puffer	Imidazolkonzentration [mM]	NaCl Konzentration [mM]
Lysepuffer	10	75
Waschpuffer	30	100
Elutionspuffer	250	75

6.5.1 Aufreinigung von tLT-Rb AB Box

Für die *Scale up* Expression von tLT mit dem Bindungspartner Rb in H5 Zellen wurden zwei Aufreinigungsversuche unternommen. Der erste Ansatz ist in den Abbildungen 23 bis 26 dokumentiert.

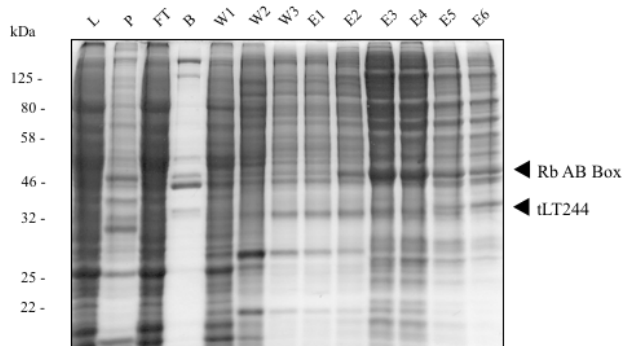


Abbildung 23: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box. Die in 300 mL H5 Zellkultur exprimierte Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Dem Lysepuffer wurden 10 mM Imidazol und 75 mM NaCl zugesetzt. Es wurden drei Waschschrte mit einem Waschpuffer durchgeführt, der 30 mM Imidazol und 100 mM NaCl enthielt. Eluiert wurde in 6 Elutionsschritten mit 250 mM Imidazol und 75 mM im Elutionspuffer. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Aufgetragen sind Lysat (L), Pellet (P), Flow-through (FT), Ni-NTA Agarose Beads (B), Waschschrte 1 bis 3 (W1 bis W3) und Elutionsfraktionen 1 bis 6 (E1 bis E6).

Die in Abbildung 23 gezeigte SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC von tLT und dessen Bindungspartner Rb weist besonders in den Elutionsfraktionen drei und vier deutlich starke Rb Banden auf. Rb konnte somit besonders in diesen Elutionsfraktionen aufkonzentriert werden. Die Banden von tLT hingegen zeigen sowohl im dritten Waschschrte, als auch in den sechs Elutionsschritten eine ähnliche Intensität. Es fand somit keine Aufkonzentrierung von tLT in den Elutionsfraktionen statt.

Die Aufkonzentration und Umpufferung der gepoolten Elutionsfraktionen drei bis fünf wurde mittels Amicon® Ultra Zentrifugationsröhrchen durchgeführt und im Anschluss über eine SEC weiter aufgereinigt. Das Chromatogramm ist in Abbildung 24 zu erkennen.

Der Komplex aus tLT und Rb wäre rein nach deren Molekulargewichten von 26,8 kDa und 46 kDa bei etwa 73 kDa zu erwarten, jedoch zeigen die Komplexe in der Regel aufgrund PTM ein größeres Molekulargewicht.

Der zu erwartende Peak müsste demnach zwischen dem ersten Peak und dem Peak bei 67 kDa liegen. Allerdings ist in dem Molekulargewichtsbereich kein Peak zu erkennen. Der Peak bei etwa 35 kDa könnte dem nicht komplexierten tLT entsprechen.

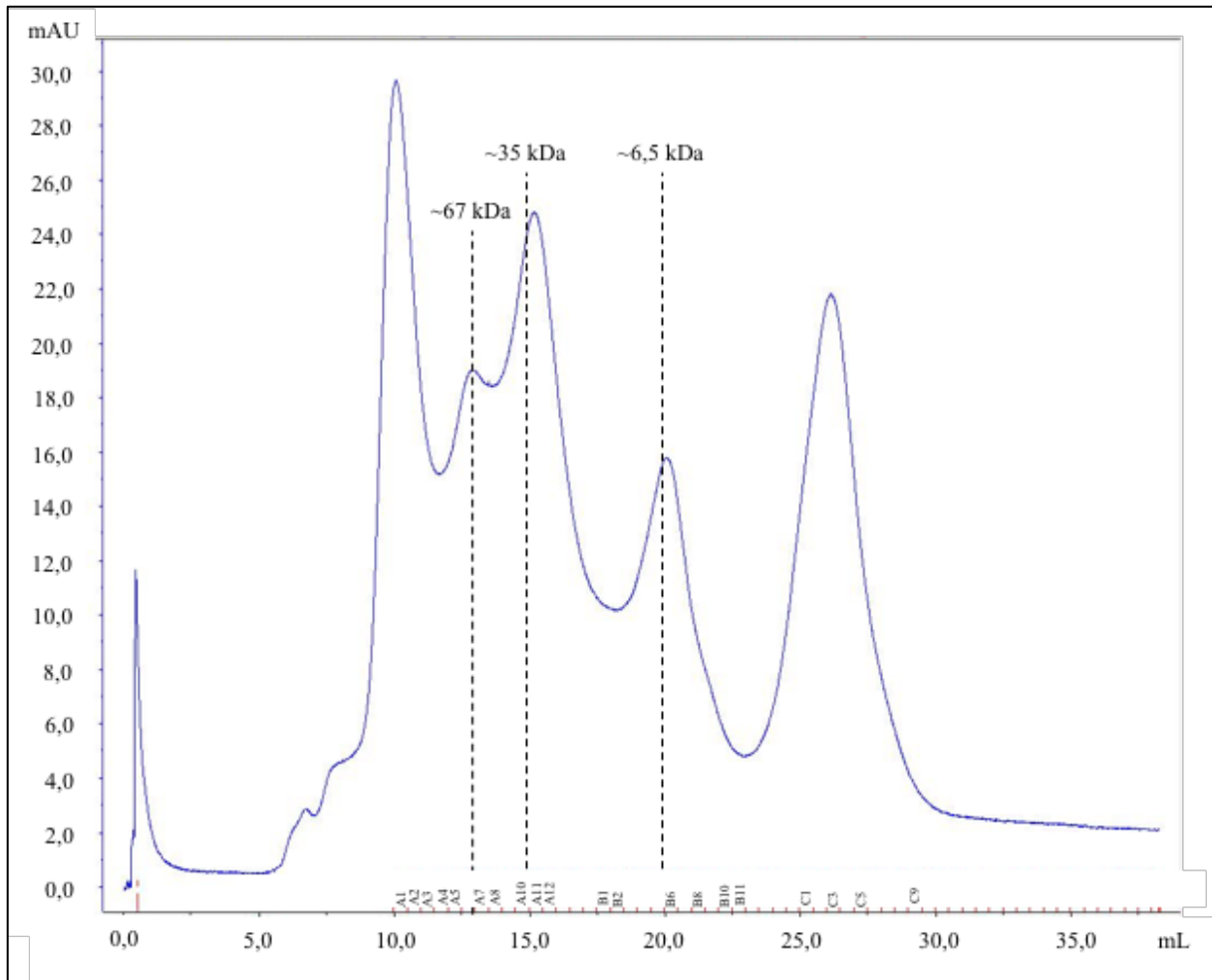


Abbildung 24: Chromatogramm der SEC von tLT-Rb AB Box I. SEC mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule. Der verwendete Gelfiltrationspuffer ist in Tabelle 5 aufgeführt. Die SEC wurde mit einer Flussrate von 0,25 mL/min. bei 4 °C mit der ÄKTApurifier durchgeführt. Es wurde ein Probenvolumen von 0,5 mL amplifiziert und Fraktionen mit einem Volumen von 0,5 mL gesammelt. Es wurde die Absorption der UV-Messung bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die gestrichelten Linien stellen das ungefähre MW der bei diesem Elutionsvolumen erwarteten Proteine dar.

Die Überprüfung der SEC Peaks fand mittels SDS-PAGE und Western Blot statt. Dafür wurden Fraktionen der einzelnen Peaks analysiert.

Die Coomassie Färbung der SDS-PAGE zeigte keine erkennbaren Banden, weshalb eine Silberfärbung durchgeführt wurde. Diese ist in Abbildung 25 zu erkennen.

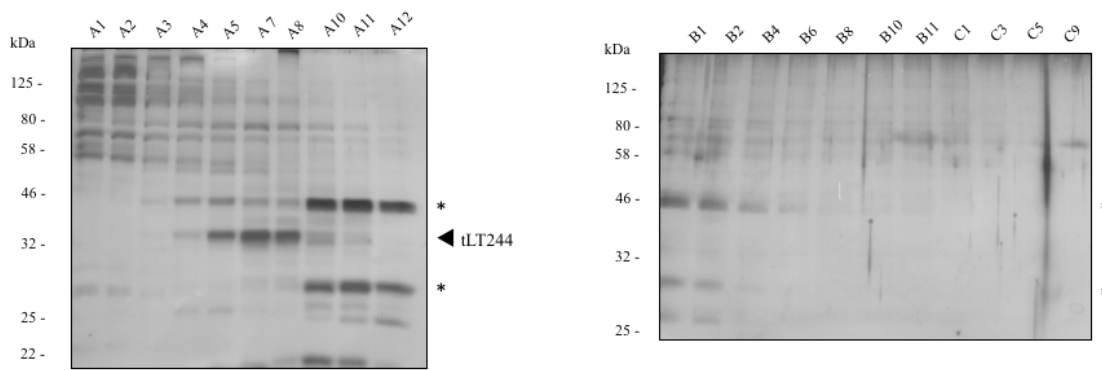


Abbildung 25: Silberfärbung der SDS-PAGE der SEC von tLT-Rb AB Box. Die in 300 mL H5 Zellkultur exprimierte Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Die SEC wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Mit * gekennzeichnet sind unbekannte Proteine, die über die SEC aufgereinigt wurden.

Die Fraktionen A3 bis A11 zeigen eine Bande im Bereich von 35 kDa, die tLT entsprechen könnte. Dies konnte durch die durchgeführten Western Blots mit dem tLT Primärantikörper bestätigt werden (Abbildung 26).

Neben den Banden für tLT zeigen die SDS Gele noch viele weitere Banden sowohl im Bereich zwischen 45 kDa und 180 kDa, als auch unterhalb von 35 kDa. Die Fraktionen B8 bis C9 zeigen nur noch schwache Banden oberhalb von 58 kDa.

Die in Abbildung 25 markierten unbekannt Proteinbanden könnten eventuell Bindungspartner des tLT Antigens darstellen, da sie mit dem gleichen Elutionsvolumen wie tLT eluieren.

Ein Nachweis von Rb über die SDS-PAGE, noch über den mit His Primärantikörper inkubierten Western Blot war möglich.

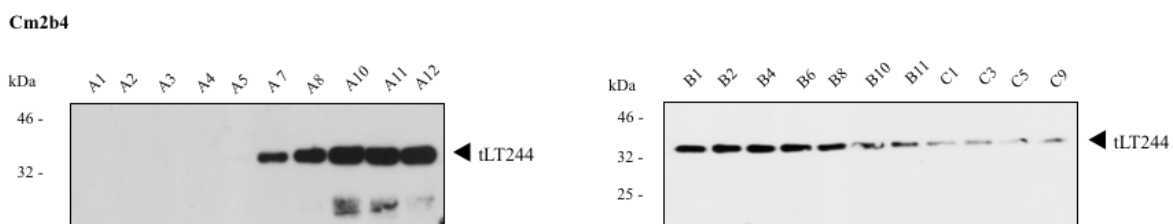


Abbildung 26: Western Blot der SEC von tLT-Rb AB Box. Die in 300 mL H5 Zellkultur exprimierte Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Die SEC wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule durchgeführt. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt.

Die mit dem tLT Primärantikörper inkubierten Western Blots ermöglichten den Nachweis von tLT in den Fraktionen der SEC (Abbildung 24). Es konnte in den Fraktionen A7 bis C9 tLT nachgewiesen werden. Die stärksten Banden sind in den Fraktionen A7 bis A12 zu erkennen, die den Peak bei ~35 kDa widerspiegeln und somit die Elution von tLT bestätigen.

Die Intensität der tLT Bande nimmt im Verlauf der Fraktionen von B1 bis C9 ab.

Ein zusätzlicher Western Blot des Durchflusses des Amicon® Ultra Zentrifugationsröhrchens und von Abkratzen des Filters, der mit dem tLT und dem His Primärantikörper inkubiert wurde, konnten zeigen, dass der Großteil an Rb und tLT im Filter zurückgehalten wurde.

Es wurde ein zweiter Aufreinigungsversuch des Komplexes von tLT und Rb mit der SEC unternommen, da beim ersten Ansatz ein großer Verlust an Proteinmenge durch das Amicon® Ultra Zentrifugationsröhrchen nachgewiesen werden konnte.

Der zweite Ansatz zur Aufreinigung des Komplexes von tLT und Rb ist in den Abbildungen 27 bis 31 abgebildet.

Abbildung 27 zeigt die SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC, bei der mit sechs Wasch- und Elutionsschritten gearbeitet wurde.

Bereits in den Waschschrritten sind schwache tLT und Rb Banden erkennbar. Die stärksten Banden von tLT und Rb innerhalb der Elutionsschritte zeigen die Fraktionen drei bis sechs. Jedoch sind neben den Zielbanden noch diverse andere Proteinbanden deutlich erkennbar.

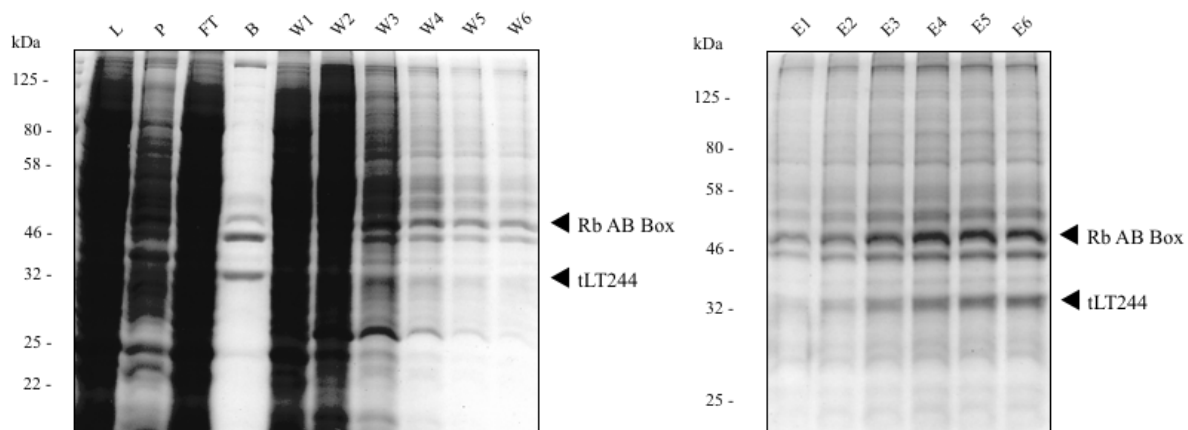


Abbildung 27: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box. Die in 300 mL H5 Zellkultur exprimierten Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Dem Lysepuffer wurden 10 mM Imidazol und 75 mM NaCl zugesetzt. Es wurden drei Waschschrte mit einem Waschpuffer durchgeführt, der 30 mM Imidazol und 100 mM NaCl enthielt. Eluiert wurde in 6 Elutionsschritten mit 250 mM Imidazol und 75 mM im Elutionspuffer. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Aufgetragen sind Lysat (L), Pellet (P), Flow-through (FT), Ni-NTA Agarose Beads (B), Waschschrte 1 bis 8 (W1 bis W8) und Elutionsfraktionen 1 bis 6 (E1 bis E6).

Zur Aufkonzentrierung und Umpufferung wurde im zweiten Ansatz statt des Amicon® Ultra Zentrifugationsröhrchen, ein Proteus X-Spinner Röhrchen verwendet. Dieses besitzt ein besonderes Design, durch das die Ultrafiltration entgegengesetzt zur Zentrifugalkraft abläuft und somit die Interaktion der Zielproteine mit der Membran verhindert werden soll [123].

Die Fraktionen zwei bis sechs der Elution wurden dazu gepoolt.

Zur Überprüfung dieses Schrittes wurde erneut eine SDS-PAGE angefertigt, welche in Abbildung 28 zu sehen ist. Am Ende der Aufkonzentrierung war im Zentrifugationsröhrchen ein Pellet sichtbar, welches resuspendiert wurde und ebenfalls auf die SDS-PAGE aufgetragen wurde.

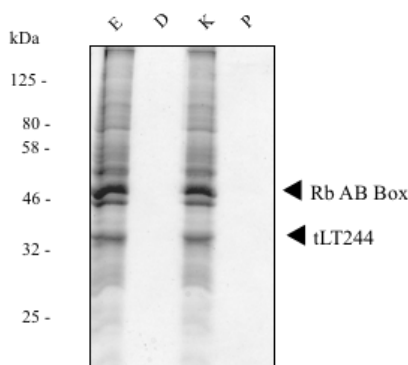


Abbildung 28: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Aufkonzentrierung und Umpufferung von tLT-Rb AB Box mittels Proteus X-Spinner. Die in 300 mL H5 Zellkultur exprimierte Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Die Aufkonzentrierung und Umpufferung wurde bei 4 °C und einer Zentrifugation bei 2000 g durchgeführt. Der verwendete Puffer ist in Tabelle 5 aufgeführt. Aufgetragen sind die gepoolte Elutionsfraktion (E), der Durchfluss nach der Aufkonzentrierung (D), die aufkonzentrierte Probe (K) und das resuspendierte Pellet nach der Umpufferung (P).

Die SDS-PAGE der aufkonzentrierten Probe zeigt deutlich, dass die Intensität der gepoolten Elutionsfraktionen vor der Aufkonzentrierung mit der, der aufkonzentrierten Probe identisch ist. Das bedeutet, dass die Proteine nicht vollständig durch Interaktionen mit der Membran verloren gehen, es jedoch auch zu keiner Aufkonzentration der Probe kommt. Dies wird durch die gleichbleibenden Intensitäten der Banden deutlich (Abbildung 28).

Im Anschluss daran erfolgte eine SEC der aufkonzentrierten Probe. Das Chromatogramm (Abbildung 29) zeigt einen ähnlichen Verlauf des zweiten und dritten Peaks, wobei der zweite Peak im erwartenden Molekulargewichtsbereich des Komplexes liegt. Ebenfalls ist in diesem Chromatogramm ein deutlicher Peak bei 35 bis 40 kDa zu erkennen.

Die Chromatogramme der beiden Aufreinigungsversuche des Komplexes von tLT und Rb lassen sich nur in ihrem Verlauf vergleichen, da die SEC mit unterschiedlichen Chromatographieanlagen durchgeführt wurde (Abschnitt 5.5.2). Die ÄKTAprime besitzt eine deutlich kleinere Messzelle, wodurch geringere Absorptionswerte erreicht werden, als mit der größeren Messzelle der ÄKTapurifier.

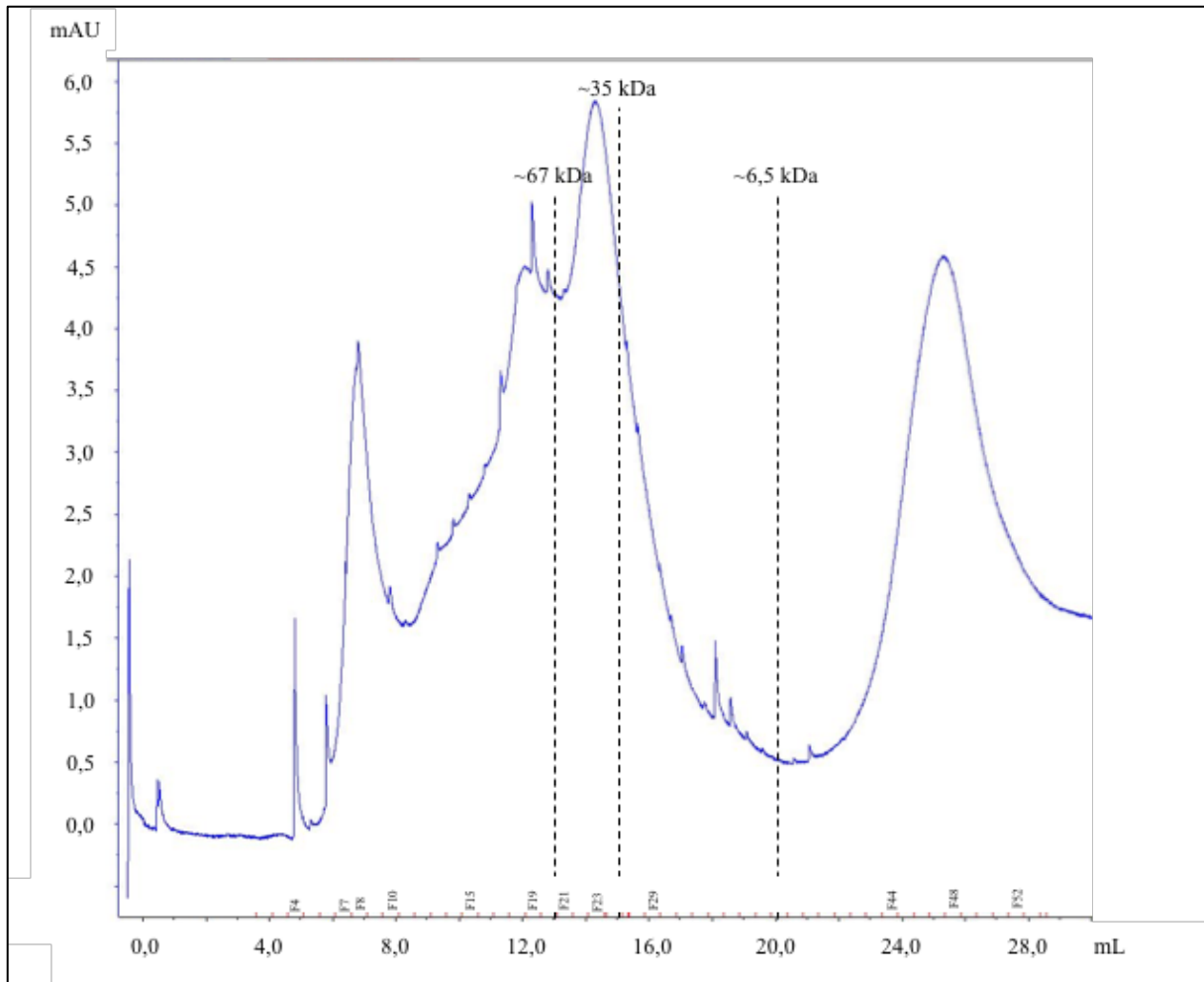


Abbildung 29: Chromatogramm der SEC von tLT-Rb AB Box II. SEC mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule. Der verwendete Gelfiltrationspuffer ist in Tabelle 5 aufgeführt. Die SEC wurde mit einer Flussrate von 0,1 mL/min. bei 4 °C mit der ÄKTAprime durchgeführt. Es wurde ein Probenvolumen von 0,5 mL amplifiziert und Fraktionen mit einem Volumen von 0,5 mL gesammelt. Es wurde die Absorption der UV-Messung bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die gestrichelten Linien stellen das ungefähre MW der bei diesem Elutionsvolumen erwarteten Proteine dar.

Die Analyse der SEC Peaks fand ebenfalls nach erfolgloser Coomassie gefärbter SDS-PAGE über eine Silberfärbung und Western Blots statt.

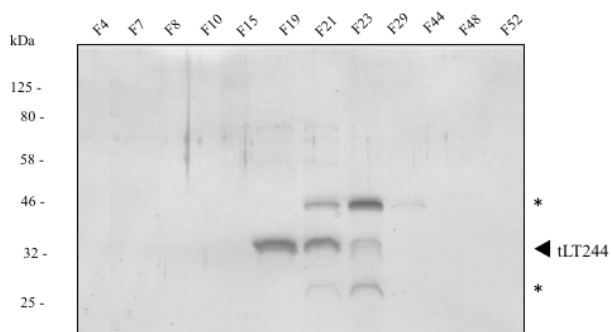


Abbildung 30: Silberfärbung der SDS-PAGE der SEC von tLT-Rb AB Box. Die in 300 mL H5 Zellkultur exprimierte Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Die SEC wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Mit * gekennzeichnet sind unbekannte Proteine, die über die SEC aufgereinigt wurden.

Die Silberfärbung der SDS-PAGE (Abbildung 30) zeigt im Vergleich zur ersten Aufreinigung des tLT und Rb Komplexes deutlich weniger Banden. Die Fraktionen F19 bis F23 zeigen Banden im Bereich von ca. 35 kDa, welche ein Nachweis für tLT sein könnten.

Für die Fraktionen F21 und F23, welche den Peak bei etwa 35 kDa widerspiegeln, konnte dies über sehr schwache Banden des, mit dem tLT Primärantikörper inkubierten, Western Blot bestätigt werden (Abbildung 31). Die zusätzlichen Banden der gefärbten SDS-PAGE bei etwa 46 kDa und 27 kDa könnten möglicherweise Bindungspartner von tLT darstellen, die zusammen mit tLT in der SEC eluieren (Abbildung 30).

Neben den eigentlichen Banden bei ca. 35 kDa zeigt der Western Blot sehr intensive Banden der Fraktionen F21 und F23 bei etwa 28 kDa (Abbildung 31). Diese Banden entsprechen Abbauprodukten von tLT.

Der Western Blot, für den der His Primärantikörper eingesetzt wurde, ergab hier ebenfalls keine Detektion des Proteinkomplexes oder von Rb.

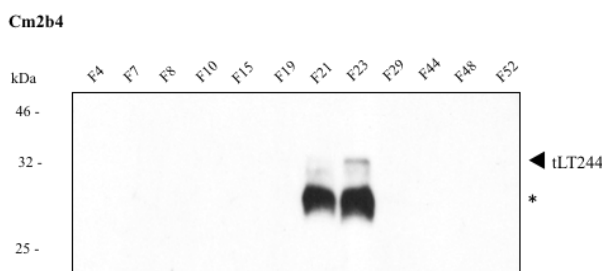


Abbildung 31: Western Blot der SEC von tLT-Rb AB Box. Die in 300 mL H5 Zellkultur exprimierten Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Die SEC wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule durchgeführt. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Mit * gekennzeichnet sind Abbauproduktbanden des tLT Antigens.

6.5.2 Aufreinigung von tLT-USP7 TRAF

Der Aufreinigung des Komplexes von tLT und Usp7 wurde in einem *Scale up* Versuch analysiert.

Die SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC ist in Abbildung 32 zu erkennen. Die Banden der beiden Proteine tLT und Usp7, die hier im Bereich von ca. 35 kDa übereinander laufen, fallen nur sehr schwach aus. Die Waschschrte eins bis sechs zeigen ebenfalls Banden mit einer schwachen Intensität im Bereich von 35 kDa.

Für den weiterführenden Schritt der Aufkonzentrierung und Umpufferung mit dem Proteus X-Spinner Röhrchen, wurden die Elutionsfraktionen zwei bis sechs gepoolt.

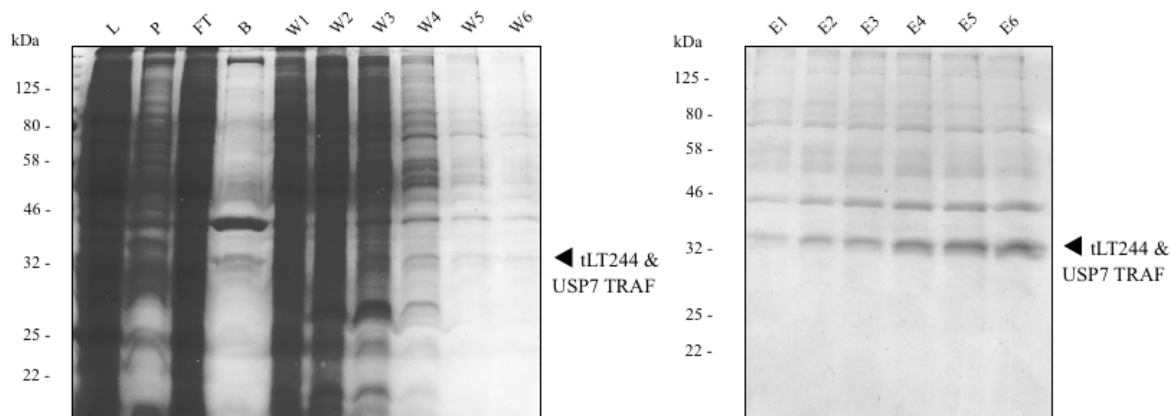


Abbildung 32: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC von tLT-USP7 TRAF. Die in 300 mL H5 Zellkultur exprimierten Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Dem Lysepuffer wurden 10 mM Imidazol und 75 mM NaCl zugesetzt. Es wurden drei Waschschrte mit einem Waschpuffer durchgeführt, der 30 mM Imidazol und 100 mM NaCl enthielt. Eluiert wurde in 6 Elutionsschrten mit 250 mM Imidazol und 75 mM im Elutionspuffer. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Aufgetragen sind Lysat (L), Pellet (P), Flow-through (FT), Ni-NTA Agarose Beads (B), Waschschrte 1 bis 8 (W1 bis W8) und Elutionsfraktionen 1 bis 6 (E1 bis E6).

Über eine SDS-PAGE wurde auch hier die Aufkonzentrierung überprüft, welche in Abbildung 33 abgebildet ist. Am Ende der Aufkonzentrierung und Umpufferung war hier ebenfalls ein Pellet erkennbar, welches resuspendiert und analysiert wurde.

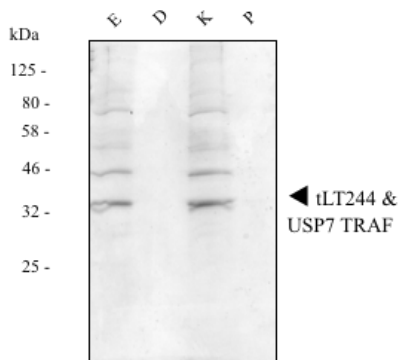


Abbildung 33: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Aufkonzentration und Umpufferung von tLT-USP7 TRAF mittels Proteus X-Spinner. Die in 300 mL H5 Zellkultur exprimierten Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Die Aufkonzentration und Umpufferung wurde bei 4 °C und einer Zentrifugation bei 2000 g durchgeführt. Der verwendete Puffer ist in Tabelle 5 aufgeführt. Aufgetragen sind die gepoolte Elutionsfraktion (E), der Durchfluss nach der Aufkonzentration (D), die aufkonzentrierte Probe (K) und das resuspendierte Pellet nach der Umpufferung (P).

Ähnlich wie bei dem zweiten Ansatz der Aufkonzentration von tLT-Rb AB Box ist hier auch keine Veränderung der Bandenintensität der aufkonzentrierten Probe bei Usp7 beziehungsweise tLT, im Vergleich zur nicht aufkonzentrierten Probe zu erkennen. Die Aufkonzentrierung geht also mit einem großen Proteinverlust einher.

Die aufkonzentrierte Proteinkomplexprobe wurde über eine SEC weiter aufgereinigt. Das Chromatogramm dieser ist in Abbildung 34 gezeigt. Wie in den vorherigen SEC Chromatogrammen des Komplexes von tLT und Rb lassen sich auch hier Peaks bei etwa 67 kDa und 35 kDa finden. Der Komplex von tLT (26,8 kDa) und Usp7 (27,4 kDa) würde ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 54 kDa besitzen, welches jedoch in der Realität aufgrund von PTM größer erwartet werden würde.

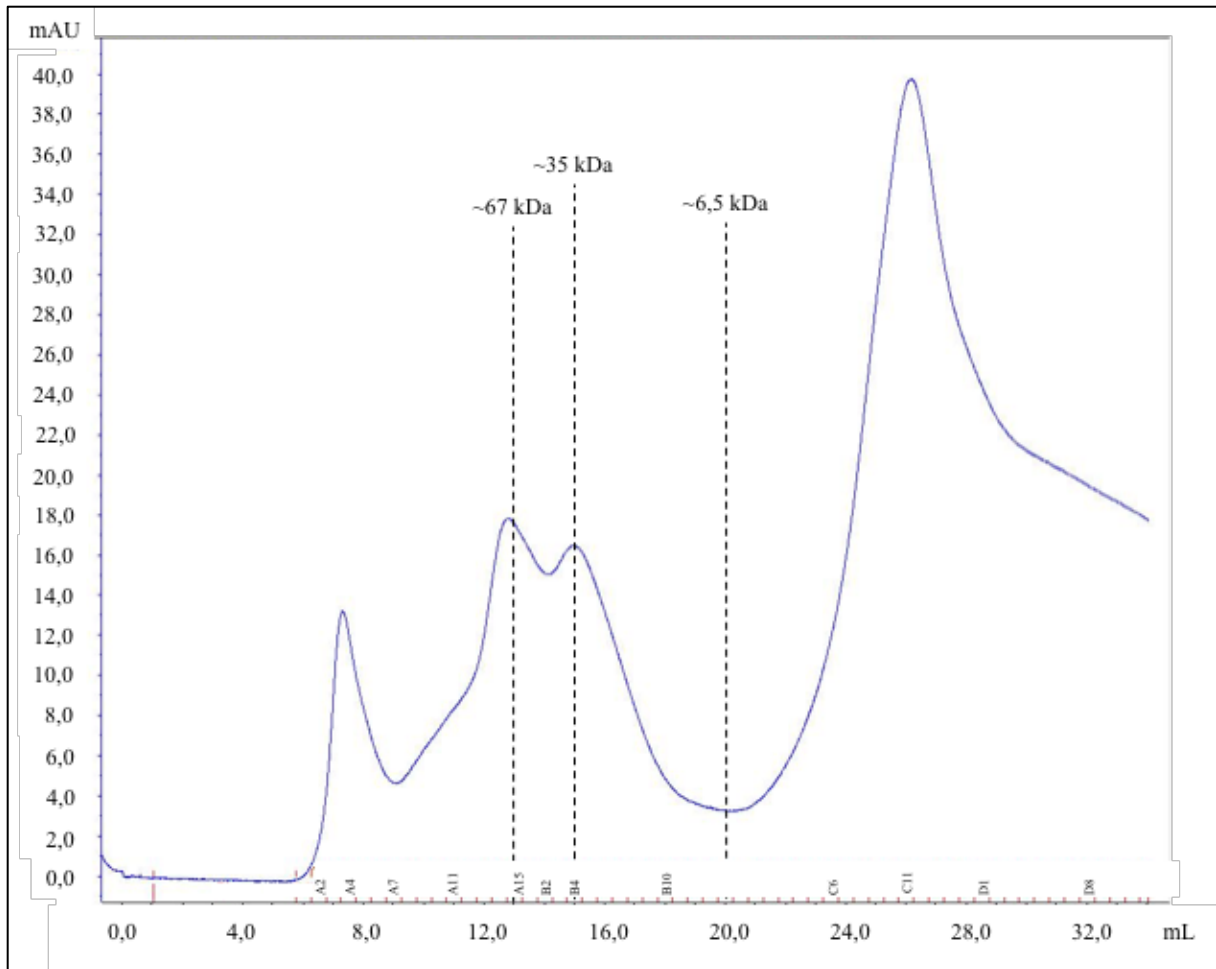


Abbildung 34: Chromatogramm der SEC von tLT-USP7 TRAF. SEC mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule. Der verwendete Gelfiltrationspuffer ist in Tabelle 5 aufgeführt. Die SEC wurde mit einer Flussrate von 0,25 mL/min. bei 4 °C mit der ÄKTApurifier durchgeführt. Es wurde ein Probenvolumen von 0,5 mL amplifiziert und Fraktionen mit einem Volumen von 0,5 mL gesammelt. Es wurde die Absorption der UV-Messung bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die gestrichelten Linien stellen das ungefähre MW der bei diesem Elutionsvolumen erwarteten Proteine dar.

Die Analyse der Peaks der erfolgten SEC fand erneut nach nicht ergebnisreicher Coomassie Färbung mit einer Silberfärbung statt. Zusätzlich wurden Western Blots zur weiteren Analyse erstellt.

Abbildung 35 zeigt die Silberfärbung der SEC Fraktionen nach erfolgter SDS-PAGE. Diese zeigt keinerlei passende Banden für tLT oder Usp7 im Bereich von 35 kDa. Die in Fraktion A15, B2 und B4 detektierten Banden laufen bei etwa 31 kDa zu niedrig für die erwarteten Proteine tLT und Usp7.

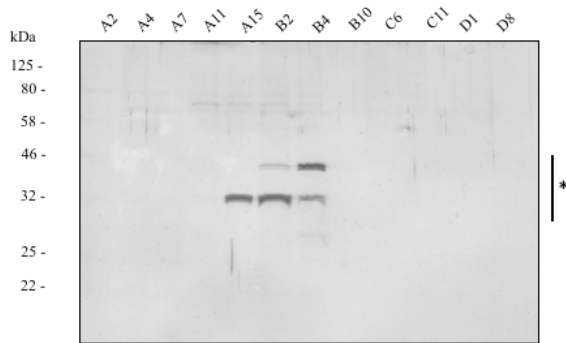


Abbildung 35: Silberfärbung der SDS-PAGE der SEC von tLT-USP7 TRAF. Die in 300 mL H5 Zellkultur exprimierten Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Die SEC wurde mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Mit * gekennzeichnet sind unbekannte Proteine, die über die SEC aufgereinigt wurden.

Das Ergebnis der Silberfärbung wurde durch die Western Blots, die mit den tLT und His Primärantikörpern inkubiert wurden, gestärkt. Ein Nachweis von tLT und Usp7 in den Fraktionen der SEC war nicht möglich.

Die Aufreinigung des Proteinkomplexes aus tLT und Usp7 war mit der SEC nicht möglich, da die gesamte Proteinausbeute während des Aufreinigungsprozesses verloren ging.

6.6 Koexpression von tLT-Rb AB Box und Rb AB Box

In der Testexpression von tLT und Rb konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu tLT eine geringere Menge an Rb exprimiert wird. Um eine effizientere Aufreinigung des Proteinkomplexes zu ermöglichen, wurde eine Koexpression durchgeführt. Dabei wurde die Zellkultur mit dem tLT-Rb AB Box Baculovirusüberstand und einem weiteren Baculovirusüberstand, der lediglich für die Rb AB Box codiert, angeimpft.

6.6.1 Testexpression

Die Testexpression der koexprimierten Konstrukte tLT-Rb AB Box und Rb Ab Box wurde über einen Zeitraum von 4 dpi durchgeführt.

Die infizierten Sf9 Zellen wurden täglich auf ihren Vitalitätszustand überprüft.

Am vierten Tag nach Infektion war der größte visuelle Unterschied zu erkennen, wie in Abbildung 36 dargestellt ist.

Die mit beiden Baculovirusüberständen infizierten Sf9 Zellen (Abbildung 36, oben) zeigen im Vergleich zu den Sf9 Kontrollzellen eine deutlich vergrößerte Zellform, wobei im Hintergrund Zelltrümmer zu erkennen sind. Dies ist ein Zeichen für eine erfolgreiche Zellinfektion. Die mit 0,5 % P2 tLT-Rb Ab Box Virusüberstand infizierten Zellen zeigen ein ähnliches Bild.

Wohingegen die mit 0,5 % P2 Rb Ab Box Virusüberstand infizierten Zellen eine mit den Kontrollzellen vergleichbare Morphologie zeigen.

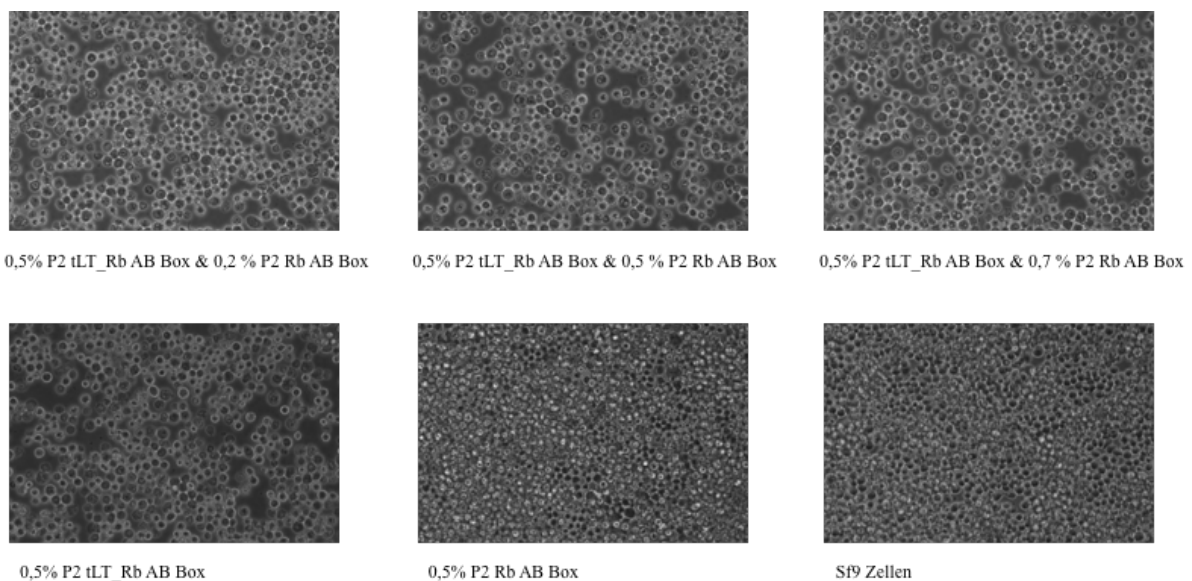


Abbildung 36: Testexpression der Koexpression von tLT-Rb AB Box und Rb AB Box in Sf9 Zellen.

$0,6 \cdot 10^6$ Sf9 Zellen/mL 4 dpi, 200x Vergrößerung. Von links nach rechts (oben): jeweils Infektion mit 0,5 % P2 tLT_Rb AB Box Überstand mit 0,2 % P2 Rb AB Box Überstand, mit 0,5 % P2 Rb AB Box Überstand und mit 0,7 % P2 Rb AB Box Überstand. Von links nach rechts (unten): 0,5 % P2 tLT-Rb AB Box Überstand, 0,5 % P2 Rb Ab Box Überstand und Sf9 Kontrollzellen.

Zusätzlich wurde eine Testexpression in H5 Zellen durchgeführt, bei der jeden Tag $1 \cdot 10^6$ Zellen der Koexpressionskulturen mit den Konzentrationen 0,5 % P2 tLT-Rb AB Box und 0,2 % P2 Rb AB Box, 0,5 % P2 tLT-Rb AB Box und 0,5 % P2 Rb AB Box und 0,5 % P2 tLT-Rb AB Box und 0,7 % P2 Rb AB Box zur Analyse entnommen wurden. Die nach der Zellyse (Abschnitt 5.4.1) und SDS-PAGE erfolgten Western Blots (Abschnitt 5.4.6) sind in den Abbildung 37 und 38 zu sehen.

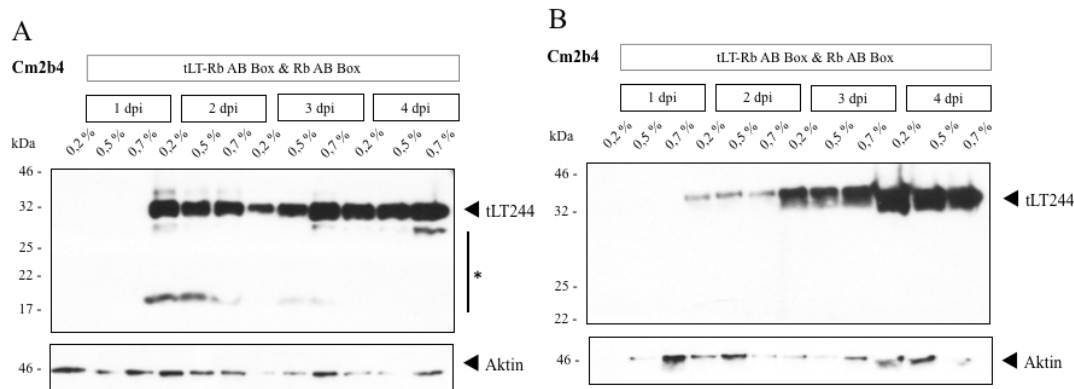


Abbildung 37: Western Blot der Lysate (A) und der Pellets (B) der Kotestexpression von tLT-Rb AB Box und Rb AB Box. Die Testexpressionen mit den Virusüberstandkonzentrationen an Rb AB Box von 0,2 %, 0,5 % und 0,7 % und einer jeweiligen Konzentration von 0,5 % P2 tLt-Rb AB Box wurden über einen Zeitraum von 4 dpi betrachtet. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Mit * gekennzeichnet sind Abbauproduktbanden.

Der mit dem tLT Primärantikörper inkubierte Western Blot zeigt für die Lysate bereits ab 2 dpi eine starke Expression an tLT. Wohingegen diese bei den Pellets nach 2 dpi nur schwach ausfällt. Ein Großteil verbleibt, ähnlich wie bei den anderen Zellysaten der Testexpressionen, im Zellpellt. Dies konnte ebenfalls durch die mit His Primärantikörper inkubierten Western Blots in Abbildung 38 bestätigt werden. Die Ergebnisse fallen hier noch deutlicher aus. In den Lysaten ist ab 3 dpi nur eine minimale Bande für Rb zu detektieren, wohingegen ab dem gleichen Zeitpunkt deutliche Banden im Pellet zu detektieren sind.

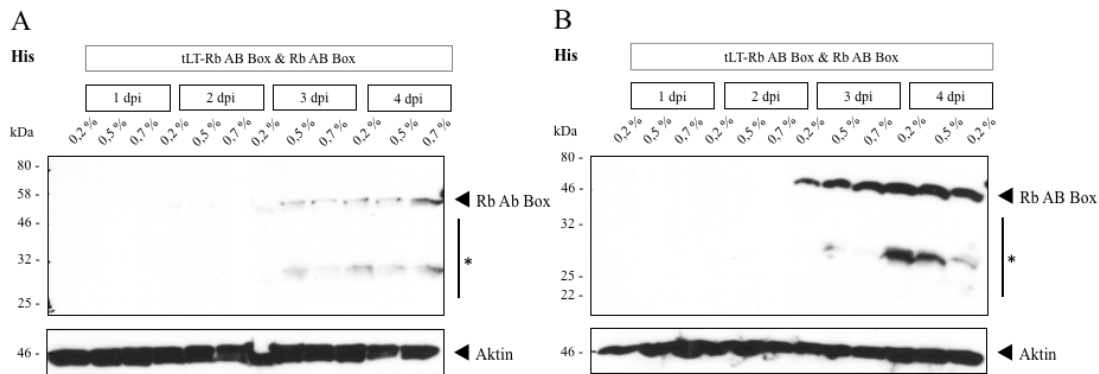


Abbildung 38: Western Blot der Lysate (A) und der Pellets (B) der Kotestexpression von tLT-Rb AB Box und Rb AB Box. Die Testexpressionen mit den Virusüberstandkonzentrationen an Rb AB Box von 0,2 %, 0,5 % und 0,7 % und einer jeweiligen Konzentration von 0,5 % P2 tLT-Rb AB Box wurden über einen Zeitraum von 4 dpi betrachtet. Der His Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Mit * gekennzeichnet sind Abbauproduktbanden.

6.6.2 Nickel Affinitätschromatographie

Zusätzlich zur Testexpression wurde eine Ni-NTA IMAC der Koexpression durchgeführt. Es wurde erwartet, dass durch die Koexpression der Konstrukte der Anteil an aufgereinigtem tLT über den Komplex mit Rb größer ausfällt.

Die Analyse der einzelnen Fraktionen wurde über Westernblots durchgeführt. Diese sind in den Abbildungen 39 und 40 dargestellt.

Cm2b4

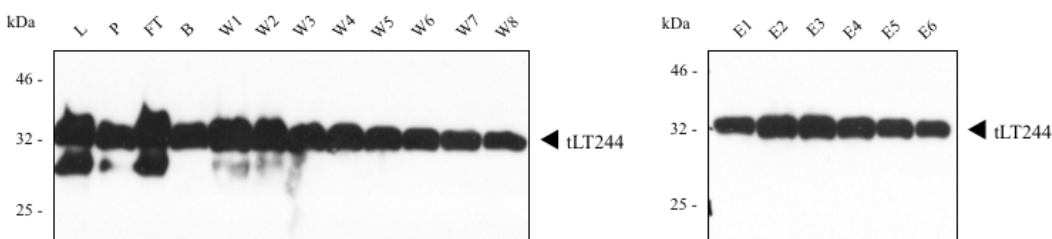


Abbildung 39: Western Blot der Ni-NTA IMAC der Koexpression von tLT-Rb AB Box und Rb AB Box. Die in 50 mL H5 Zellkultur exprimierten Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Es wurde eine Konzentration von 0,5 % tLT-Rb AB Box Virusüberstand und 0,5 % Rb AB Box Virusüberstand eingesetzt. Der Cm2b4 Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Aufgetragen sind Lysat (L), Pellet (P), Flow-through (FT), Ni-NTA Agarosebeads (B), Waschschrte 1 bis 8 (W1 bis W8) und Elutionsfraktionen 1 bis 6 (E1 bis E6).

Der Western Blot, der mit dem tLT Primärantikörper inkubiert wurde (Abbildung 39), zeigt für fast alle Wasch- und Elutionsfraktionen ähnlich starke tLT Banden. Die Waschschrte eins und zwei zeigen jedoch eine etwas höhere Intensität dieser Banden.

Der mit His Primärantikörper inkubierte Western Blot zeigt im Vergleich zum tLT inkubierten Western Blot deutlich schwächere Banden. Die Intensität der Rb Bande nimmt im Laufe der Waschschrirte deutlich ab. In den Elutionsfraktionen ist neben den eigentlichen Rb Banden in den Fraktionen zwei bis vier, bei etwa 46 kDa, eine zusätzliche Bande bei etwa 125 kDa sichtbar (Abbildung 40).

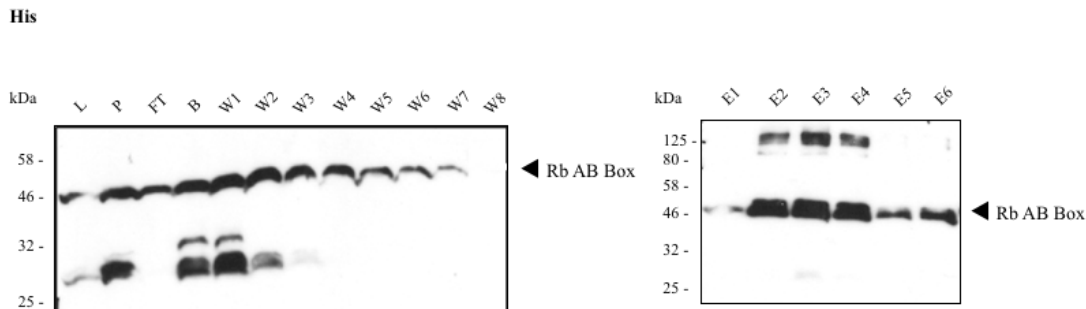


Abbildung 40: Western Blot der Ni-NTA IMAC der Koexpression von tLT-Rb AB Box und Rb AB Box. Die in 50 mL H5 Zellkultur exprimierte Proteine tLT und Rb wurden 3 dpi geerntet. Es wurde eine Konzentration von 0,5 % tLT_Rb Ab Box Virusüberstand und 0,5 % Rb AB Box Virusüberstand eingesetzt. Der His Antikörper wurde hier in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde α -mouse IgG HRP in einer 1:10000 Verdünnung in PBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) für 1,5 h eingesetzt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Aufgetragen sind Lysat (L), Pellet (P), Flow-through (FT), Ni-NTA Agarosebeads (B), Waschschrirte 1 bis 8 (W1 bis W8) und Elutionsfraktionen 1 bis 6 (E1 bis E6).

7 Diskussion

7.1 Expression von tLT und seinen Bindungspartnern

Für die Expression von tLT und seinen Bindungspartnern Rb und Usp7 wurde in dieser Arbeit ein Insektenexpressionssystem aufgrund der möglichen PTM gewählt [124].

Die PTM sind essentiell für die Funktion des MCPyV tLT. Besonders der Phosphorylierung des Serins an 220igster Aminosäurestelle des tLT wird eine besondere Aufgabe in der onkogenen Funktion des Antigens zugeschrieben [125]. Auch die Phosphorylierungen des volllängen LT Antigens tragen eine wichtige Rolle in der Funktion des Antigens. Durch diese Modifizierungen wird die Initiierung der viralen Replikation reguliert [126].

Möglicherweise wäre die Verwendung eines anderen Expressionssystems, wie zum Beispiel einem bakteriellen Expressionssystem, eine Alternative zu Expression der hier verwendeten Konstrukte. Beispielsweise könnte über die Expression des tLT Antigens mit seinem jeweiligen Bindungspartner in *E. coli* Stämmen eine deutlich höhere Expressionsrate ermöglicht werden [127].

Jedoch muss dabei beachtet werden, dass in einem solchen prokaryotischen Expressionsmodell nur wenige beziehungsweise zum Teil auch keine PTM möglich sind [128].

Diese sind besonders für die Struktur und somit die Funktion von Proteinen wichtig.

Die Testexpressionen von tLT-Rb AB Box und tLT-USP7 TRAF konnten zeigen, dass eine Expression von tLT und seinen Bindungspartnern in Insektenzellen möglich ist.

In beiden Testexpressionen wurde jedoch detektiert, dass die Expressionspartner nicht in gleichen Mengen exprimiert wurden. Die unterschiedlichen Expressionsmengen von tLT und den Bindungspartnern Rb und Usp7 erschweren die Komplexbildung.

Im Fall des tLT-USP7 TRAF Virusüberstandes wird die höherer Expression von tLT im Gegensatz zur geringen Usp7 Expression deutlich. Da tLT mehrere Bindungsmotive für Usp7 besitzt [8], wäre eine höhere Expression an Usp7 vorteilhaft für die Komplexbildung. Eine Stabilisierung von tLT durch die Bindung mehrerer Usp7 Proteine wäre somit möglich.

Auch bei der Expression von tLT zusammen mit Rb konnte eine geringere Expression des Bindungspartners von tLT festgestellt werden.

Im Versuch der Koexpression von tLT und Rb mit einem zusätzlichen Konstrukt, welches RB codierte, wurde versucht die Expressionsraten von Rb an tLT anzupassen.

Eine erfolgreiche Koexpression konnte jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Es fand zwar eine Infektion der Insektenzellen statt, jedoch ist unklar, ob es sich bei beiden

Baculovirusüberständen um funktionsfähige Virusüberstände handelt und es somit nur zur Infektion der Zellen durch einen dieser Virusüberstände kam.

Besonders die unterschiedlichen Zellvitalitäten, die in Abbildung 36 (Abschnitt 6.6.1) zu erkennen sind, lassen darauf schließen, dass es ausschließlich bei dem Virusüberstand tLT-Rb Ab Box zu einer erfolgreichen Infektion kam. Die alleinige Infektion mit dem Rb AB Box Virusüberstand führte zu keinerlei Zellvergrößerung oder Lyse von Zellen innerhalb des betrachteten Infektionsrahmen, welche während einer Infektion von Insektenzellen mit Baculovirusüberständen üblich ist.

Ein weiterer Hinweis für diese Vermutung sind die Ergebnisse der Testexpression der Koexpression. Während es zu einer gut detektierbaren Expression an tLT kommt, kann in den Lysaten nur ein sehr geringer Anteil an Rb nachgewiesen werden. Obwohl der Anteil an Rb im Zellpellet größer war, als im Lysat, lag die Expression trotzdem unterhalb der Expression von tLT (Abschnitt 6.6.1). Zur Bestätigung, dass es sich bei dem Rb AB Box Baculovirusüberstand, um keinen funktionsfähigen Virusüberstand handelt, müsste eine Testexpression in Insektenzellen mit anschließender Analyse der Rb Expression erfolgen.

Neben den unterschiedlichen Expressionsmengen der Expressionspartner, konnten weitere suboptimale Bedingungen beobachtet werden.

Allgemein ist zu sagen, dass bei der Zellyse mittels RIPA Puffer ein sehr großer Anteil der Zielproteine im Zellpellet verbleiben. Dies konnte bei allen Testexpressionen gezeigt werden. Der Anteil an tLT und den Bindungspartner Rb und Usp7, der im Zellpellet verbleibt, ist zum Teil sogar größer, als der Anteil, der im Lysat zu finden ist.

Der hohe Proteinverlust im Zellpellet ist ebenfalls bei den Ultraschallaufschlüssen der Zellpellets für die Ni-NTA IMAC zu erkennen. Die über Coomassie gefärbten SDS-Gele zeigen auch für die Pellets noch einen hohen Anteil an Zielprotein.

Der Ultraschallaufschluss ist in der Produktion rekombinanter Proteine eine weit eingesetzte Methode zum Aufschluss der Zellen [129]. Zu überlegen wäre, ob andere Aufschlussmethoden wie zum Beispiel der Einsatz der French Press oder eine andere Pufferzusammensetzung zu einer erhöhten Proteinausbeute im Lysat führen würden [130].

Eine weitere suboptimale Bedingung ist das Vorhandensein einer großen Menge von Abbauprodukten und möglicherweise von Spleißprodukten während der Expression.

Insektenzellen sind als eukaryotische Zellen in der Lage einen Spleißprozess durchzuführen [131]. Für die Expression des tLT bedeutet dies, dass nach erfolgter Infektion der Zellen eine

erhöhte Menge an Abbauprodukte und möglicherweise Spleißprodukten vorliegt, wodurch die Ausbeute des Antigens verringert wird.

Die in den Testexpressionen bestimmten Erntezeitpunkte stellen den Zeitraum nach der Infektion dar, in der noch eine relativ hohe Ausbeute des Zielproteins erreicht wird, unter einer möglichst geringen Abbauprodukttrate.

7.2 Ni-Affinitätschromatographie von tLT Komplexen

In den hier beschriebenen Versuchen gelang eine Aufreinigung von tLT des MCPyV über eine Komplexbildung mit dessen Bindungspartnern Rb und Usp7 (Abschnitt 6.4 und 6.5).

Die Interaktion des Komplexes über dessen His-Tag mit den immobilisierten Nickelionen der NTA ermöglichte eine leichte Aufreinigung über die IMAC des Komplexes, bei der jedoch noch ein Großteil an Verunreinigungen durch andere Proteine detektiert werden konnte (Abschnitt 6.5).

Ein möglicher Grund für den hohen Anteil an Verunreinigungen könnte sein, dass die Ni-NTA Agarose spezifisch His-Reste bindet. Für eine solche Wechselwirkung reichen bereits zwei dieser His-Reste aus [119]. Deshalb kommt es neben der Bindung des Zielproteinkomplexes auch zur Bindung von weiteren Proteinen oder Proteinkomplexen, die einen His-Rest aufweisen. Dazu gehören ebenfalls Abbau- und möglicherweise vorhandene Spleißprodukte von tLT, die mit Rb und Usp7 interagieren.

Rb und Usp7 sind beides Proteine, die mit vielen anderen Proteinen interagieren, wodurch es zur Aufreinigung anderer Bindungspartner kommt [132], [133].

Der Zusatz von Imidazol zum Waschpuffer erhöht dessen Stringenz und ermöglicht die Entfernung von unspezifischen Bindungen durch kompetitive Verdrängung [118].

Die Optimierung der Salzkonzentration im Waschpuffer konnte zeigen, dass für die hier betrachteten Komplexe, Salz nicht als Störfaktor der Komplexbindungen auftritt [134], jedoch auch keine erhöhte Lösung unspezifischer Bindungen stattfindet.

Ein weiterer limitierender Faktor der Ni-NTA IMAC zur Aufreinigung der tLT Komplexe ist die Tatsache, dass mit jedem durchgeführten Waschschrift, Zielproteine von den Ni-NTA Agarose Beads gewaschen wird und somit verloren gehen (Abschnitt 6.5). Die Wechselwirkung des tLT Antigens mit seinen Bindungspartnern ist nicht stark genug, um den Komplex ausreichend an die Beads zu binden und somit eine deutlichere Aufreinigung des Komplexes zu ermöglichen.

Trotz starker Verluste des tLT Zielkomplexes sowohl im Pellet, als auch durch die Waschschrte, ist eine leichte Aufreinigung der Komplexe über die Ni-NTA IMAC möglich.

7.3 Größenausschlusschromatographie von tLT Komplexen

Eine Aufreinigung des Komplexes von tLT mit Rb oder Usp7 konnte nicht gezeigt werden (Abschnitt 6.5).

Bereits die für die SEC notwendige Aufkonzentrierung und Umpufferung der Elutionsfraktionen der betrachteten Komplexe zeigte eine problematische Umsetzung.

Das Amicon® Ultra Zentrifugationsröhrchen führte zum Verlust nahezu der vollständigen Komplexausbeute. Mit dem Proteus X-Spinner Röhrchen hingegen gelang eine Umpufferung und Einengung des Probenvolumen, jedoch konnte keine Aufkonzentrierung nachgewiesen werden (Abbildung 28 und 33). Ein Teil der Komplexe muss auch hier während des Prozesses verloren gegangen sein.

Ein möglicher Grund für den Komplexverlust bereits während der Aufkonzentrierung und Umpufferung könnte die Neigung des tLT zur Aggregatbildung sein. Durch Aggregatbildung des tLT mit seinen Bindungspartnern kann es zur Bindung dieser Aggregate an die Filtermembran kommen und somit zum Verlust eines Teils des Proteinkomplexes [135].

Die Aufreinigung des Komplexes aus tLT und Rb zeigte im ersten Ansatz in den Western Blots der SEC Fraktionen ein Vorhandensein von tLT in den zu erwartenden Peak des ungebundenen tLT bei etwa 35 kDa. Zusätzlich konnte auch in allen darauf folgenden Fraktionen tLT nachgewiesen werden.

Ein Grund dafür könnte sein, dass tLT durch unbekannte Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix zurückgehalten wurde und nur langsam von der Säule gewaschen wurde. Auch der zweite Aufreinigungsversuch dieses Komplexes lieferte die nicht an Rb gebunden Form des tLT, welche in dem Peak bei ca. 35 kDa eluiert wurde.

Rb konnte in keinem der beiden Ansätze nachgewiesen werden.

Die SEC des Komplexes aus tLT und Usp7 führte ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis. Es konnte weder tLT, noch Usp7 in ungebundener Form detektiert werden.

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Ergebnisse wäre die Aggregation der Komplexe auf der Säule.

Möglicherweise aggregiert der Großteil des tLT mit den Bindungspartnern auf der Säule, sodass nur ein geringer Anteil an tLT im Fall des tLT-Rb AB Box Konstruktes nachgewiesen werden konnte. Dafür würde sprechen, dass die Bindungspartner Rb und Usp7 in keiner Fraktion der

SEC nachgewiesen werden können. Da diese in den Testexpressionen eine geringere Expressionsausbeute zeigten, wäre die vollständige Aggregation mit tLT eine mögliche Erklärung, dass kein Nachweis der Bindungspartner stattfinden kann.

Bei der SEC des tLT-USP7 TRAF Konstruktes ist es unter Umständen zur vollständigen Aggregation von sowohl tLT, als auch Usp7 im Komplex gekommen, wodurch keins der beiden Proteine nachgewiesen werden konnte.

Ein weiterer Hinweis für die Komplexaggregation wäre möglicherweise das Verhalten der Säule im Anschluss an die SEC. In allen drei SEC Versuchen benötigte die Säule ein großes Volumen an Waschpuffer, um die konstanten Absorptions- und Drucklevel wie vor der Probenaufgabe zu erreichen.

Die nachweisbare Elution des Proteinkomplexes wurde zusätzlich durch das geringe Anfangsprobenvolumen von 0,5 mL erschwert.

7.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte die tLT Expression des MCPyV mit dessen Bindungspartner Rb und Usp7 in Insektenzellen erfolgreich gezeigt werden.

Über die Bindung der Komplexe an Ni-NTA Agarose Beads konnte eine IMAC durchgeführt werden, die allerdings nur zu einer schwachen Aufreinigung führte.

Eine zusätzliche Aufreinigung der Komplexe über eine SEC konnte für die hier verwendeten Komplexe nicht gezeigt werden. Diese Methode führte zum Verlust der Komplexe und zur möglichen Aggregation des tLT und dessen Bindungspartnern auf der Säule. Die hier verwendeten Komplexe sind demnach nicht für eine SEC geeignet.

Die erreichten Ausbeuten nach der Expression in Insektenzellen und der drauf folgenden Ni-NTA IMAC sind zu gering, um diese für weitere Aufreinigungsschritte und für einen Kristallisationsansatz in Betracht zu ziehen.

7.5 Ausblick

Die Aufreinigung von tLT Komplexen mit dessen Bindungspartner Rb und Usp7 über einen His-Tag der Bindungspartner führte in den hier gezeigten Versuchen nicht zum erwünschten Aufreinigungsgrad. Die Verwendung eines anderen, spezifischeren Tags, würde die Aufreinigung über eine Affinitätschromatographie möglicherweise deutlich verbessern. Für tLT konnte bereits eine Aufreinigung über Glutathion-S-Transferase (GST) getaggt Usp7 gezeigt werden [8].

In den Western Blots der Testexpression konnte gezeigt werden, dass tLT nicht nur mit seinen bereits bekannten Bindungspartner Komplexe formt, sondern auch mit anderen, bisher eventuell unbekannt Proteinen (Abbildung 11). Diese Komplexbildung könnte genutzt werden, um weitere Bindungspartner von tLT herauszufinden, die möglicherweise stabilere Komplexe mit tLT bilden. Ein zusätzliches Spiken mit Rb oder Usp7 könnte die Komplexausbeute möglicherweise erhöhen.

Zur Identifikation dieser Bindungspartner müsste eine erneute SDS-PAGE der tLT Komplex zeigenden Fraktionen durchgeführt werden und unter Stützung des Nachweises dieser Komplexe über einen Western Blot, die Banden über eine Massenspektrometrie analysiert werden [136].

Die in dieser Arbeit gezeigte Expression und Aufreinigung des MCPyV tLT und dessen Bindungspartnern Rb und Usp7 ist möglicherweise nicht der richtige Grundlagenansatz zur Produktion von tLT Kristallisationsansätzen.

Die Verwendung eines anderen Expressionssystem, wie etwa eine Expression der Proteine in Bakterienzellen, würde möglicherweise zu deutlich höheren Proteinausbeuten führen. Jedoch muss bei einer solchen Expression bedacht werden, dass die PTM des tLT in prokaryotischen Zellen nicht ausgeführt werden können. Durch die nicht vorhandenen PTM könnte es im Anschluss einer erfolgreichen Aufreinigung zu anderen Kristallstrukturausbildungen der Komplexe kommen.

Die Frage ist jedoch, ob über die Röntgenstrukturanalyse dieser Kristalle, mit keinen oder nur wenigen PTM, nicht ein Rückschluss auf die Grundlegende Struktur oder einzelner Bereiche des tLT Antigens möglich wäre.

Eine solcher Aufschluss über die Struktur des tLT Antigens würde neue Ansatzpunkte für die Behandlung von MCC liefern, sowie einem weiteren Verständnis der Tumorgenese dienen.

8 Literaturverzeichnis

- [1] S. Calvignac-Spencer *et al.*, ‘A taxonomy update for the family Polyomaviridae’, *Arch Virol*, vol. 161, no. 6, pp. 1739–1750, Jun. 2016.
- [2] H. Feng *et al.*, ‘Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma’, *Science*, vol. 319, no. 5866, pp. 1096–1100, Feb. 2008.
- [3] K. Cogshall *et al.*, ‘Merkel cell carcinoma: An update and review: Pathogenesis, diagnosis, and staging’, *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 78, no. 3, pp. 433–442, Mar. 2018.
- [4] D. V. Pastrana *et al.*, ‘Quantitation of Human Seroresponsiveness to Merkel Cell Polyomavirus’, *PLoS Pathog*, vol. 5, no. 9, Sep. 2009.
- [5] J. C. Becker *et al.*, ‘S2k-Leitlinie Merkelzellkarzinom (MZK, MCC, neuroendokrines Karzinom der Haut) – Update 2018’, *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, vol. 17, no. 5, pp. 562–577, 2019.
- [6] J. A. Wendzicki *et al.*, ‘Large T and small T antigens of Merkel Cell Polyomavirus’, *Curr Opin Virol*, vol. 11, pp. 38–43, Apr. 2015.
- [7] U. Neu *et al.*, ‘Structures of Merkel Cell Polyomavirus VP1 Complexes Define a Sialic Acid Binding Site Required for Infection’, *PLoS Pathog*, vol. 8, no. 7, p. e1002738, Jul. 2012.
- [8] Manja Czech-Sioli, ‘Einfluss der Ubiquitin spezifischen Protease 7 auf den Lebenszyklus des Merkel Zell Polyomavirus’, Universität Hamburg, Hamburg, 2017.
- [9] D. L. Jarvis, ‘Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production’, *Virology*, vol. 310, no. 1, pp. 1–7, May 2003.
- [10] J. A. DeCaprio and R. L. Garcea, ‘A cornucopia of human polyomaviruses’, *Nat Rev Microbiol*, vol. 11, no. 4, pp. 264–276, Apr. 2013.
- [11] U. Moens *et al.*, ‘ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae’, *J Gen Virol*, vol. 98, no. 6, pp. 1159–1160, Jun. 2017.
- [12] S. Delbue *et al.*, ‘Review on the Relationship between Human Polyomaviruses-Associated Tumors and Host Immune System’, *Clin Dev Immunol*, vol. 2012, 2012.
- [13] S. E. Stewart *et al.*, ‘Neoplasms in Mice Inoculated with a Tumor Agent Carried in Tissue Culture²’, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 20, no. 6, pp. 1223–1243, Jun. 1958.
- [14] Janet S. Butel and John A. Lednicky, ‘Cell and Molecular Biology of Simian Virus 40: Implications for Human Infections and Disease’, *Journal of the National Cancer Institute*, no. Volume 91, Issue 2, pp. 119–134, 1999.

- [15] Sylvia D. Gardner *et al.*, ‘NEW HUMAN PAPOVAVIRUS (B.K.) ISOLATED FROM URINE AFTER RENAL TRANSPLANTATION’, *The Lancet*, vol. 297, no. 7712, pp. 1253–1257, Jun. 1971.
- [16] Billie L. Padgett *et al.*, ‘CULTIVATION OF PAPOVA-LIKE VIRUS FROM HUMAN BRAIN WITH PROGRESSIVE MULTIFOCAL LEUCOENCEPHALOPATHY’, *The Lancet*, vol. 297, no. 7712, pp. 1257–1260, Jun. 1971.
- [17] R. P. Viscidi *et al.*, ‘Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus’, *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 18, no. 10, pp. 1737–1743, Oct. 2011.
- [18] A. Grundhoff and N. Fischer, ‘Merkel cell polyomavirus, a highly prevalent virus with tumorigenic potential’, *Curr Opin Virol*, vol. 14, pp. 129–137, Oct. 2015.
- [19] I. W. G. on the E. of C. R. to Humans, *Malaria and Some Polyomaviruses (SV40, BK, JC, and Merkel Cell Viruses)*. International Agency for Research on Cancer, 2013.
- [20] National Cancer Institute, ‘Risk Factors: Immunosuppression - National Cancer Institute’, 2015. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/immunosuppression>. [Accessed: 06-Sep-2019].
- [21] F. Martelli *et al.*, ‘Polyomavirus microRNA in saliva reveals persistent infectious status in the oral cavity’, *Virus Res.*, vol. 249, pp. 1–7, 02 2018.
- [22] J. M. Theiss *et al.*, ‘A Comprehensive Analysis of Replicating Merkel Cell Polyomavirus Genomes Delineates the Viral Transcription Program and Suggests a Role for mcv-miR-M1 in Episomal Persistence’, *PLoS Pathog*, vol. 11, no. 7, Jul. 2015.
- [23] S. Raghava *et al.*, ‘The SV40 Late Protein VP4 Is a Viroporin that Forms Pores to Disrupt Membranes for Viral Release’, *PLoS Pathog*, vol. 7, no. 6, Jun. 2011.
- [24] R. M. Schowalter and C. B. Buck, ‘The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein’, *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 8, p. e1003558, 2013.
- [25] R. Houben *et al.*, ‘Molecular pathogenesis of Merkel cell carcinoma’, *Experimental Dermatology*, vol. 18, no. 3, pp. 193–198, 2009.
- [26] E. A. Engels *et al.*, ‘Merkel cell carcinoma and HIV infection’, *The Lancet*, vol. 359, no. 9305, pp. 497–498, Feb. 2002.
- [27] ‘UV-Associated Mutations Underlie the Etiology of MCV-Negative Merkel Cell Carcinomas | Cancer Research’. [Online]. Available: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/75/24/5228>. [Accessed: 08-Sep-2019].
- [28] M. Brady and A. M. Spiker, ‘Cancer, Merkel Cell Of The Skin’, in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.

- [29] J. C. Becker, 'Merkel cell carcinoma', *Annals of Oncology*, vol. 21, no. Supplement 7, pp. vii81–vii85, Oct. 2010.
- [30] E. Ramahi *et al.*, 'Merkel Cell Carcinoma', *Am J Clin Oncol*, vol. 36, no. 3, pp. 299–309, Jun. 2013.
- [31] H. Sihto *et al.*, 'Merkel cell polyomavirus infection, large T antigen, retinoblastoma protein and outcome in Merkel cell carcinoma', *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 14, pp. 4806–4813, Jul. 2011.
- [32] S. Q. Wong *et al.*, 'UV-Associated Mutations Underlie the Etiology of MCPyV-Negative Merkel Cell Carcinomas', *Cancer Res.*, vol. 75, no. 24, pp. 5228–5234, Dec. 2015.
- [33] G. Goh *et al.*, 'Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy', *Oncotarget*, vol. 7, no. 3, pp. 3403–3415, Dec. 2015.
- [34] D. Schrama *et al.*, 'Characterization of six Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma cell lines: Integration pattern suggest that large T antigen truncating events occur before or during integration', *Int. J. Cancer*, vol. 145, no. 4, pp. 1020–1032, Aug. 2019.
- [35] A. Villani *et al.*, 'Merkel Cell Carcinoma: Therapeutic Update and Emerging Therapies', *Dermatol Ther (Heidelb)*, vol. 9, no. 2, pp. 209–222, Feb. 2019.
- [36] M. Cook *et al.*, 'Differential Outcomes Among Immunosuppressed Patients With Merkel Cell Carcinoma: Impact of Immunosuppression Type on Cancer-specific and Overall Survival', *Am. J. Clin. Oncol.*, vol. 42, no. 1, pp. 82–88, Jan. 2019.
- [37] M. R. Gaiser *et al.*, 'PD-L1 Inhibition with Avelumab for Metastatic Merkel Cell Carcinoma', *Expert Rev Clin Pharmacol*, vol. 11, no. 4, pp. 345–359, Apr. 2018.
- [38] H. J. Kwun *et al.*, 'Protein-mediated viral latency is a novel mechanism for Merkel cell polyomavirus persistence', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, no. 20, pp. E4040–E4047, May 2017.
- [39] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 'Genus: Alphapolyomavirus', Sep-2019. [Online]. Available: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/polyomaviridae/628/genus-alphapolyomavirus. [Accessed: 09-Sep-2019].
- [40] J. C. M. Prado *et al.*, 'Human polyomaviruses and cancer: an overview', *Clinics (Sao Paulo)*, vol. 73, no. Suppl 1, 2018.
- [41] G. J. Seo *et al.*, 'Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression', *Virology*, vol. 383, no. 2, pp. 183–187, Jan. 2009.

- [42] S. Lee *et al.*, ‘Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas’, *J. Clin. Virol.*, vol. 52, no. 3, pp. 272–275, Nov. 2011.
- [43] N. F. Madinda *et al.*, ‘Assessing Host-Virus Codivergence for Close Relatives of Merkel Cell Polyomavirus Infecting African Great Apes’, *J Virol*, vol. 90, no. 19, pp. 8531–8541, Sep. 2016.
- [44] H. Barth *et al.*, ‘In Vitro and In Vivo Models for the Study of Human Polyomavirus Infection’, *Viruses*, vol. 8, no. 10, Oct. 2016.
- [45] W. Liu *et al.*, ‘Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection’, *Cell Host & Microbe*, vol. 19, no. 6, pp. 775–787, Jun. 2016.
- [46] G. Stakaitytė *et al.*, ‘Merkel Cell Polyomavirus: Molecular Insights into the Most Recently Discovered Human Tumour Virus’, *Cancers (Basel)*, vol. 6, no. 3, pp. 1267–1297, Jun. 2014.
- [47] R. M. Schowalter *et al.*, ‘Glycosaminoglycans and Sialylated Glycans Sequentially Facilitate Merkel Cell Polyomavirus Infectious Entry’, *PLoS Pathog*, vol. 7, no. 7, Jul. 2011.
- [48] S. Bhattacharjee and S. Chattaraj, ‘Entry, infection, replication, and egress of human polyomaviruses: an update.’, *Canadian journal of microbiology*, vol. 63, no. 3, pp. 193–211, 2017.
- [49] M. Shuda *et al.*, ‘T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 42, pp. 16272–16277, Oct. 2008.
- [50] R. Houben *et al.*, ‘Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens’, *J. Virol.*, vol. 84, no. 14, pp. 7064–7072, Jul. 2010.
- [51] M. Shuda *et al.*, ‘Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator’, *J Clin Invest*, vol. 121, no. 9, pp. 3623–3634, Sep. 2011.
- [52] H. J. Kwun *et al.*, ‘Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Controls Viral Replication and Oncoprotein Expression by Targeting the Cellular Ubiquitin Ligase SCFFbw7’, *Cell Host & Microbe*, vol. 14, no. 2, pp. 125–135, Aug. 2013.
- [53] C. J. Harrison *et al.*, ‘Asymmetric Assembly of Merkel Cell Polyomavirus Large T-antigen Origin Binding Domains at the Viral Origin’, *J Mol Biol*, vol. 409, no. 4, pp. 529–542, Jun. 2011.

- [54] K. L. Harms *et al.*, ‘The biology and treatment of Merkel cell carcinoma: current understanding and research priorities’, *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 15, no. 12, pp. 763–776, Dec. 2018.
- [55] H. J. Kwun *et al.*, ‘The Minimum Replication Origin of Merkel Cell Polyomavirus Has a Unique Large T-Antigen Loading Architecture and Requires Small T-Antigen Expression for Optimal Replication’, *J Virol*, vol. 83, no. 23, pp. 12118–12128, Dec. 2009.
- [56] Roland Houben *et al.*, ‘An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells’, *International Journal of Cancer*, no. 130, pp. 847–856, 2012.
- [57] N. Palopoli *et al.*, ‘Short linear motif core and flanking regions modulate retinoblastoma protein binding affinity and specificity’, *Protein Engineering, Design and Selection*, vol. 31, no. 3, pp. 69–77, Mar. 2018.
- [58] P. An *et al.*, ‘Large T Antigens of Polyomaviruses: Amazing Molecular Machines’, *Annual Review of Microbiology*, vol. 66, no. 1, pp. 213–236, 2012.
- [59] S. Borchert *et al.*, ‘High-Affinity Rb Binding, p53 Inhibition, Subcellular Localization, and Transformation by Wild-Type or Tumor-Derived Shortened Merkel Cell Polyomavirus Large T Antigens’, *J Virol*, vol. 88, no. 6, pp. 3144–3160, Mar. 2014.
- [60] E. Gasteiger *et al.*, ‘ExpASy - ProtParam tool’. [Online]. Available: <https://web.expasy.org/protparam/>. [Accessed: 20-Sep-2019].
- [61] Manja Czech-Sioli, ‘Identifizierung und Charakterisierung von Merkel Zell Polyomavirus (MCPyV) Large T-Antigen interagierenden Proteinen’. 2012.
- [62] R. D. Everett *et al.*, ‘A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein’, *EMBO J.*, vol. 16, no. 7, pp. 1519–1530, Apr. 1997.
- [63] S. M. B. Nijman *et al.*, ‘A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes’, *Cell*, vol. 123, no. 5, pp. 773–786, Dec. 2005.
- [64] Kwang-Hyun Baek and Suresh Ramakrishna, ‘USP7 (ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated))’, 2009. [Online]. Available: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_USP7.html. [Accessed: 19-Sep-2019].
- [65] R. Q. Kim and T. K. Sixma, ‘Regulation of USP7: A High Incidence of E3 Complexes’, *Journal of Molecular Biology*, vol. 429, no. 22, pp. 3395–3408, Nov. 2017.
- [66] L. Rougé *et al.*, ‘Molecular Understanding of USP7 Substrate Recognition and C-Terminal Activation’, *Structure*, vol. 24, no. 8, pp. 1335–1345, 02 2016.

- [67] J. M. Zapata *et al.*, ‘A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains’, *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 26, pp. 24242–24252, Jun. 2001.
- [68] M. N. Holowaty *et al.*, ‘Protein interaction domains of the ubiquitin-specific protease, USP7/HAUSP’, *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 48, pp. 47753–47761, Nov. 2003.
- [69] S. Bhattacharya *et al.*, ‘Emerging insights into HAUSP (USP7) in physiology, cancer and other diseases’, *Sig Transduct Target Ther*, vol. 3, no. 1, p. 17, Dec. 2018.
- [70] Christopher L. Brooks and Wei Gu, ‘p53 Ubiquitination: Mdm2 and Beyond’, *Molecular Cell*, no. 21, pp. 307–315, 2006.
- [71] Y. Sheng *et al.*, ‘Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP’, *Nat Struct Mol Biol*, vol. 13, no. 3, pp. 285–291, Mar. 2006.
- [72] W. Ching *et al.*, ‘A ubiquitin-specific protease possesses a decisive role for adenovirus replication and oncogene-mediated transformation’, *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 3, p. e1003273, Mar. 2013.
- [73] W. Jäger *et al.*, ‘The ubiquitin-specific protease USP7 modulates the replication of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus latent episomal DNA’, *J. Virol.*, vol. 86, no. 12, pp. 6745–6757, Jun. 2012.
- [74] V. Saridakis *et al.*, ‘Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization’, *Mol. Cell*, vol. 18, no. 1, pp. 25–36, Apr. 2005.
- [75] S. van den Heuvel and N. J. Dyson, ‘Conserved functions of the pRB and E2F families’, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 9, pp. 713–724, Sep. 2008.
- [76] J. M. Rotchell *et al.*, ‘Isolation and characterization of the retinoblastoma protein from fish’, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 130, no. 3, pp. 385–391, Oct. 2001.
- [77] E. R. M. Balog *et al.*, ‘Crystal Structure of the Unliganded Retinoblastoma Protein Pocket Domain’, *Proteins*, vol. 79, no. 6, pp. 2010–2014, Jun. 2011.
- [78] J. Holcomb *et al.*, ‘Protein crystallization: Eluding the bottleneck of X-ray crystallography’, *AIMS Biophys*, vol. 4, no. 4, pp. 557–575, 2017.
- [79] A. McPherson and J. A. Gavira, ‘Introduction to protein crystallization’, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, vol. 70, no. Pt 1, pp. 2–20, Dec. 2013.
- [80] F. Altmann *et al.*, ‘Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins’, in *Glycotechnology*, E. G. Berger, H. Clausen, and R. D. Cummings, Eds. Boston, MA: Springer US, 1999, pp. 29–43.

- [81] I. W. Dilweg and R. T. Dame, ‘Post-translational modification of nucleoid-associated proteins: an extra layer of functional modulation in bacteria?’, *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 46, no. 5, pp. 1381–1392, 19 2018.
- [82] J. Diaz, ‘Novel Regulatory Mechanisms by Which Large T Antigen Coordinates the Merkel Cell Polyomavirus Life Cycle’, *Publicly Accessible Penn Dissertations*, no. 1041, p. 165, 2015.
- [83] A.-Y. Xie *et al.*, ‘Stimulation of DNA Replication from the Polyomavirus Origin by PCAF and GCN5 Acetyltransferases: Acetylation of Large T Antigen’, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 22, no. 22, pp. 7907–7918, Nov. 2002.
- [84] N. Nwogu *et al.*, ‘Cellular sheddases are induced by Merkel cell polyomavirus small tumour antigen to mediate cell dissociation and invasiveness’, *PLoS Pathog*, vol. 14, no. 9, p. e1007276, Sep. 2018.
- [85] S. H. Tsang *et al.*, ‘The Oncogenic Small Tumor Antigen of Merkel Cell Polyomavirus Is an Iron-Sulfur Cluster Protein That Enhances Viral DNA Replication’, *J. Virol.*, vol. 90, no. 3, pp. 1544–1556, Feb. 2016.
- [86] W. Liu *et al.*, ‘Merkel Cell Polyomavirus Infection and Merkel Cell Carcinoma’, *Curr Opin Virol*, vol. 20, pp. 20–27, Oct. 2016.
- [87] L. A. Kelley *et al.*, ‘The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis’, *Nat Protoc*, vol. 10, no. 6, pp. 845–858, Jun. 2015.
- [88] H. Y. Kim *et al.*, ‘Structural basis for the inactivation of retinoblastoma tumor suppressor by SV40 large T antigen’, *EMBO J.*, vol. 20, no. 1–2, pp. 295–304, Jan. 2001.
- [89] A. Bordat *et al.*, ‘Gibson assembly: an easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg’, *Virol J*, vol. 12, Jun. 2015.
- [90] D. A. Julin, ‘Blue/White Selection’, in *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference*, R. D. Wells, J. S. Bond, J. Klinman, and B. S. S. Masters, Eds. New York, NY: Springer New York, 2018, pp. 72–73.
- [91] V. A. Luckow *et al.*, ‘Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli.*’, *J Virol*, vol. 67, no. 8, pp. 4566–4579, Aug. 1993.
- [92] ‘An Introduction to Transfection Methods - Technical Reference Guide’. Lonza Cologne GmbH, 2012.

- [93] ‘X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent High-performance polymer reagent for transfecting many cell lines | Sigma-Aldrich’, *X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent*. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/xtghpro?lang=de®ion=DE>. [Accessed: 08-Aug-2019].
- [94] D. R. O’Reilly *et al.*, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. Oxford University Press, 1994.
- [95] S. K. Dutta and A. C. Myrup, ‘Infectious Center Assay of Intracellular Virus and Infective Virus Titer for Equine Mononuclear Cells Infected in vivo and in vitro with Equine Herpesviruses’, *Can J Comp Med*, vol. 47, no. 1, pp. 64–69, Jan. 1983.
- [96] A. Baer and K. Kehn-Hall, ‘Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems’, *J Vis Exp*, no. 93, Nov. 2014.
- [97] JoVE Science Education Database, ‘Grundlegende Methoden in der Zell- und Molekularbiologie. Transformation von Bakterien: die Hitzeschock-Methode’, 2019. [Online]. Available: <https://www.jove.com/science-education/5059/transformation-von-bakterien-die-hitzeschock-methode?language=German>. [Accessed: 16-Aug-2019].
- [98] M. Rahimzadeh *et al.*, ‘Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency’, *Mol Biol Res Commun*, vol. 5, no. 4, pp. 257–261, Dec. 2016.
- [99] J. Regenbogen, *Herstellung und Analyse normalisierter cDNA-Banken*. Herbert Utz Verlag, 1997.
- [100] J. Arnemann, ‘DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung’, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A. M. Gressner and T. Arndt, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019, pp. 719–719.
- [101] P. Y. Lee *et al.*, ‘Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments’, *J Vis Exp*, no. 62, Apr. 2012.
- [102] Carl Roth GmbH + Co. KG, ‘Instructions for use - Roti®-GelStain’. 2018.
- [103] D. R. Smith, ‘Restriction endonuclease digestion of DNA’, *Methods Mol. Biol.*, vol. 18, pp. 427–431, 1993.
- [104] ‘NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix / NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit - Instruction Manual’. New England Biolabs Inc., 2017.
- [105] F. Sanger *et al.*, ‘DNA sequencing with chain-terminating inhibitors’, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467, Dec. 1977.
- [106] Hans-Joachim Müller and Daniel Ruben Prange, *PCR – Polymerase- Kettenreaktion, 2*. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum, 2016.

- [107] J. Bachman, 'Chapter Nineteen - Site-Directed Mutagenesis', in *Methods in Enzymology*, vol. 529, J. Lorsch, Ed. Academic Press, 2013, pp. 241–248.
- [108] E. I. Miskiewicz and D. J. MacPhee, 'Lysis Buffer Choices Are Key Considerations to Ensure Effective Sample Solubilization for Protein Electrophoresis', in *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols*, B. T. Kurien and R. H. Scofield, Eds. New York, NY: Springer New York, 2019, pp. 61–72.
- [109] Heinfried Barton *et al.*, *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry - Enols and Their O-Derivatives; Ene Diols (Reductones); Biosynthesis of Hydroxy Compounds*, Vol. VI/1d 4. Edition. Georg Thieme Verlag, 2014.
- [110] M. M. Bradford, 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1, pp. 248–254, May 1976.
- [111] A. A. Al-Tubuly, 'SDS-PAGE and Western Blotting', *Methods Mol. Med.*, vol. 40, pp. 391–405, 2000.
- [112] H. Y. Chen *et al.*, 'One-Step Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining of Proteins in Polyacrylamide Gel', *Analytical Biochemistry*, vol. 212, no. 1, pp. 295–296, Jul. 1993.
- [113] L.-T. Jin *et al.*, 'Sensitive silver staining of protein in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using an azo dye, calconcarboxylic acid, as a silver-ion sensitizer', *Electrophoresis*, vol. 25, no. 15, pp. 2494–2500, Aug. 2004.
- [114] M. Chevallet *et al.*, 'Silver staining of proteins in polyacrylamide gels', *Nat Protoc*, vol. 1, no. 4, pp. 1852–1858, 2006.
- [115] T. Mahmood and P.-C. Yang, 'Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting', *N Am J Med Sci*, vol. 4, no. 9, pp. 429–434, Sep. 2012.
- [116] L. Shen *et al.*, 'Surface modification of polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane via radiation grafting: novel mechanisms underlying the interesting enhanced membrane performance', *Sci Rep*, vol. 7, Jun. 2017.
- [117] Alexander F. Yakunin and Patrick C. Hallenbeck, 'A Luminol/Iodophenol Chemiluminescent Detection System for Western Immunoblots', *Analytical Biochemistry*, no. 258, pp. 146–149, 1998.
- [118] QIAGEN, 'The QIAexpressionist™ - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins'. Jun-2003.
- [119] J. Crowe *et al.*, 'One-Step Purification of Recombinant Proteins with the 6xHis Tag and Ni-NTA Resin', in *Basic DNA and RNA Protocols*, A. J. Harwood, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 1996, pp. 491–510.

- [120] L. Hagel, ‘Gel-Filtration Chromatography’, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 44, no. 1, pp. 10.9.1-10.9.2, 1998.
- [121] R. Houben *et al.*, ‘Characterization of functional domains in the Merkel cell polyoma virus Large T antigen’, *International Journal of Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E290–E300, 2015.
- [122] M. B. Gonzalez-Hernandez *et al.*, ‘Plaque Assay for Murine Norovirus’, *J Vis Exp*, no. 66, Aug. 2012.
- [123] ‘New Ultrafiltration Concentrator: Proteus X-Spinner’. [Online]. Available: <https://www.generon.co.uk/read/protein-studies-1120/new-ultrafiltration-concentrator-1586.html>. [Accessed: 20-Sep-2019].
- [124] D. L. Jarvis, ‘Chapter 14 Baculovirus–Insect Cell Expression Systems’, in *Methods in Enzymology*, vol. 463, R. R. Burgess and M. P. Deutscher, Eds. Academic Press, 2009, pp. 191–222.
- [125] S. Hesbacher *et al.*, ‘RB1 is the crucial target of the Merkel cell polyomavirus Large T antigen in Merkel cell carcinoma cells’, *Oncotarget*, vol. 7, no. 22, pp. 32956–32968, Apr. 2016.
- [126] J. Diaz *et al.*, ‘Phosphorylation of Large T Antigen Regulates Merkel Cell Polyomavirus Replication’, *Cancers (Basel)*, vol. 6, no. 3, pp. 1464–1486, Jul. 2014.
- [127] R. Chen, ‘Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond’, *Biotechnology Advances*, vol. 30, no. 5, pp. 1102–1107, Sep. 2012.
- [128] O. Khow and S. Suntrarachun, ‘Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system’, *Asian Pac J Trop Biomed*, vol. 2, no. 2, pp. 159–162, Feb. 2012.
- [129] L. A. Yates and R. J. C. Gilbert, ‘Efficient Production and Purification of Recombinant Murine Kindlin-3 from Insect Cells for Biophysical Studies’, *J Vis Exp*, no. 85, Mar. 2014.
- [130] J. M. Kavran and D. J. Leahy, ‘Lysis of Mammalian and Sf9 Cells’, *Methods Enzymol*, vol. 536, pp. 47–52, 2014.
- [131] PharMingen, ‘Baculovirus Expression Vector System’. 1999.
- [132] Z. Wang *et al.*, ‘USP7: Novel Drug Target in Cancer Therapy’, *Front Pharmacol*, vol. 10, Apr. 2019.
- [133] F. A. Dick and S. M. Rubin, ‘Molecular mechanisms underlying RB protein function’, *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 14, no. 5, pp. 297–306, May 2013.
- [134] S. S. Athavale *et al.*, ‘Effects of the Nature and Concentration of Salt on the Interaction of the HIV-1 Nucleocapsid Protein with SL3 RNA’, *Biochemistry*, vol. 49, no. 17, pp. 3525–3533, May 2010.

[135] Sophie Borchert, 'Strukturelle und biochemische Analyse der Funktion des Merkelzellpolyomavirus Large Tumor Antigens', Universität Hamburg, Hamburg, 2013.

[136] J. Zheng *et al.*, 'Combining blue native polyacrylamide gel electrophoresis with liquid chromatography tandem mass spectrometry as an effective strategy for analyzing potential membrane protein complexes of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin', *BMC Genomics*, vol. 12, p. 40, Jan. 2011.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der humanen Polyomaviren mit ihren am nächsten verwandten animalischen Polyomaviren, auf Grundlage der großen LT-AG Aminosäuresequenz	15
Abbildung 2: Genomorganisation der PyV	16
Abbildung 3: Merkelzellkarzinom hinter dem rechten Ohr	17
Abbildung 4: Genomorganisation des MCPyV	19
Abbildung 5: Aufbau und zelluläre Funktion des MCPyV LT Antigens	21
Abbildung 6: Kristallstruktur von USP7	24
Abbildung 7: Struktur des ungebundenen Rb	25
Abbildung 8: Vorhersage der MCPyV LT Struktur	27
Abbildung 9: Proteinkonstrukte der Gibson Klonierung	64
Abbildung 10: Western Blot einer Negativkontrolle	66
Abbildung 11: Western Blot der Pellets der Testexpression von tLT-Rb AB Box in H5 Zellen	67
Abbildung 12: Western Blot der Lysate der Testexpression von tLT-Rb AB Box in H5 Zellen	67
Abbildung 13: Western Blot der Lysate der Testexpression von tLT-Rb AB Box in H5 Zellen	68
Abbildung 14: Western Blot der Pellets der Testexpression von tLT-USP7 TRAF in H5 Zellen	69
Abbildung 15: Western Blot der Lysate der Testexpression von tLT-USP7 TRAF in H5 Zellen	70
Abbildung 16: Western Blot der Pellets der Testexpression von tLT-USP7 TRAF in H5 Zellen	70
Abbildung 17: Western Blot der Lysate der Testexpression von tLT-USP7 TRAF in H5 Zellen	71
Abbildung 18: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer	73
Abbildung 19: Western Blot der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer	74
Abbildung 20: Western Blot der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer	74

Abbildung 21: Western Blot der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box mit unterschiedlichen NaCl Konzentrationen im Waschpuffer.....	75
Abbildung 22: Western Blot der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box mit unterschiedlichen NaCl Konzentrationen im Waschpuffer.....	76
Abbildung 23: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box	78
Abbildung 24: Chromatogramm der SEC von tLT-Rb AB Box I	79
Abbildung 25: Silberfärbung der SDS-PAGE der SEC von tLT-Rb AB Box	80
Abbildung 26: Western Blot der SEC von tLT-Rb AB Box	80
Abbildung 27: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box	81
Abbildung 28: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Aufkonzentration und Umpufferung von tLT-Rb AB Box mittels Proteus X-Spinner	82
Abbildung 29: Chromatogramm der SEC von tLT-Rb AB Box II.....	83
Abbildung 30: Silberfärbung der SDS-PAGE der SEC von tLT-Rb AB Box	83
Abbildung 31: Western Blot der SEC von tLT-Rb AB Box.....	84
Abbildung 32: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Ni-NTA IMAC von tLT-USP7 TRAF.	85
Abbildung 33: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Aufkonzentration und Umpufferung von tLT-USP7 TRAF mittels Proteus X-Spinner.	86
Abbildung 34: Chromatogramm der SEC von tLT-USP7 TRAF.....	87
Abbildung 35: Silberfärbung der SDS-PAGE der SEC von tLT-USP7 TRAF.....	88
Abbildung 36: Testexpression der Koexpression von tLT-Rb AB Box und Rb AB Box in Sf9 Zellen.....	89
Abbildung 37: Western Blot der Lysate (A) und der Pellets (B) der Kotestexpression von tLT-Rb Ab Box und Rb AB Box.....	90
Abbildung 38: Western Blot der Lysate (A) und der Pellets (B) der Kotestexpression von tLT-Rb Ab Box und Rb AB Box.....	91
Abbildung 39: Western Blot der Ni-NTA IMAC der Koexpression von tLT-Rb AB Box und Rb AB Box	91
Abbildung 40: Western Blot der Ni-NTA IMAC der Koexpression von tLT-Rb AB Box und Rb AB Box	92
Abbildung 41: USP7 Domäne in pcDNA Vektor (Plasmidkarte).....	114
Abbildung 42: Rb AB Box mit His Tag in pFastBac Dual Vektor (Plasmidkarte)	115

Abbildung 43: tLT244 und Rb AB Box mit His Tag in pFastBac Dual Vektor (Plasmidkarte).....	115
Abbildung 44: tLT244 und USP7 TRAF Domäne in pFastBac Dual Vektor (Plasmidkarte)	116
Abbildung 45: Rb AB Box mit His Tag in pFastBac I Vektor (Plasmidkarte).....	116

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	30
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	32
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien	33
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen	34
Tabelle 6: Verwendete Puffer der Ni-NTA IMAC	36
Tabelle 7: Verwendete Reagenzsysteme	39
Tabelle 8: Verwendete Bakterienstämme	39
Tabelle 9: Verwendete Medien für die Bakterienkultur	39
Tabelle 10: Verwendete Zelllinien	40
Tabelle 11: Verwendete Zellkulturmedien	40
Tabelle 12: Verwendete Plasmide	41
Tabelle 13: Verwendete Primer	42
Tabelle 14: Verwendete Enzyme	42
Tabelle 15: Verwendete Standardmarker	42
Tabelle 16: Verwendete Primärantikörper	43
Tabelle 17: Verwendeter Sekundärantikörper	43
Tabelle 18: Zu erwartende PCR Produkte bei der Agarose-Gelelektrophorese nach Klonierung in pFastBac™ Bacimdvektor	45
Tabelle 19: PCR-Programm der Phusion Polymerase	55
Tabelle 20: PCR-Programm der Accustart Polymerase	55
Tabelle 21: Verwendete Einstellungsparameter für die SEC mit der ÄKTApurifier und der ÄKTAprime	63
Tabelle 22: Verwendete Imidazol- und NaCl Konzentrationen bei der Ni-NTA IMAC zur Optimierung der Imidazolkonzentration	72
Tabelle 23: Verwendete Imidazol- und NaCl Konzentrationen bei der Ni-NTA IMAC zur Optimierung der Salzkonzentration	75
Tabelle 24: Verwendete Imidazol- und NaCl Konzentrationen für den <i>Scale up</i> Ansatz der ersten Ni-NTA IMAC von tLT-Rb AB Box	77
Tabelle 25: Verwendete Imidazol- und NaCl Konzentrationen für die <i>Scale up</i> Ansätze der zweiten tLT-Rb AB Box Ni-NTA IMAC und der Ni-NTA IMAC von tLT-USP7 TRAF	77

A Anhang

A.1 Plasmidkarten

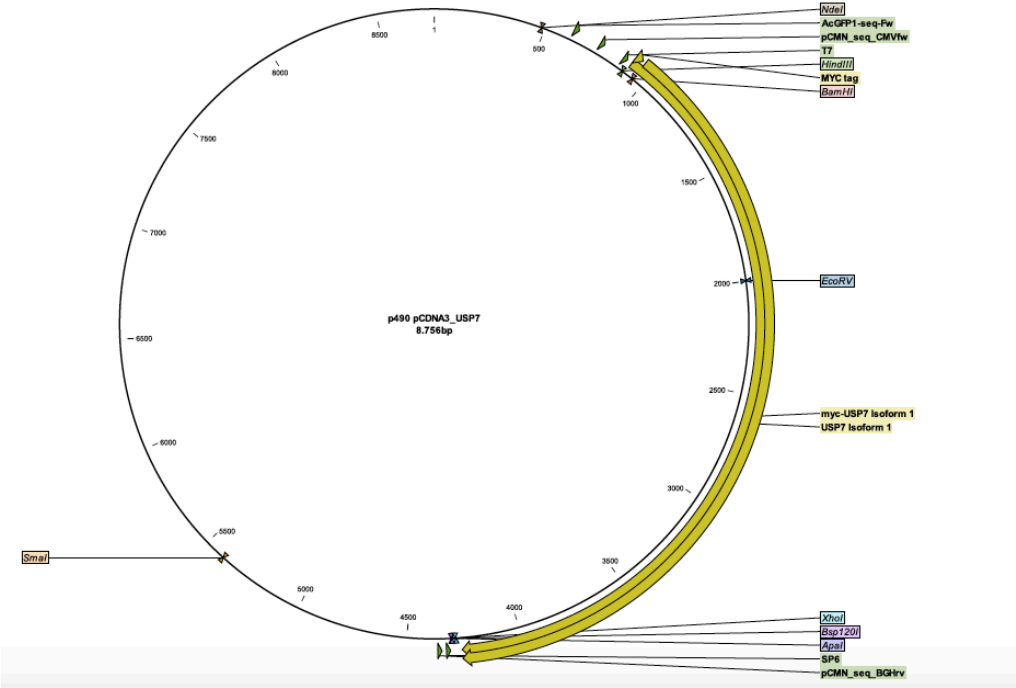


Abbildung 41: USP7 Domäne in pcDNA Vektor (Plasmidkarte)

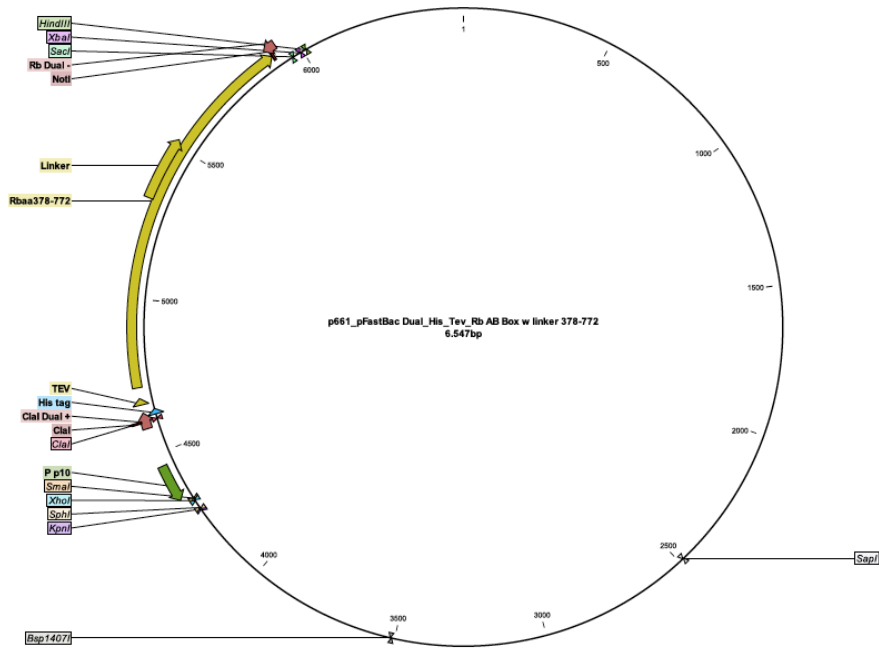


Abbildung 42: Rb AB Box mit His Tag in pFastBac Dual Vektor (Plasmidkarte)

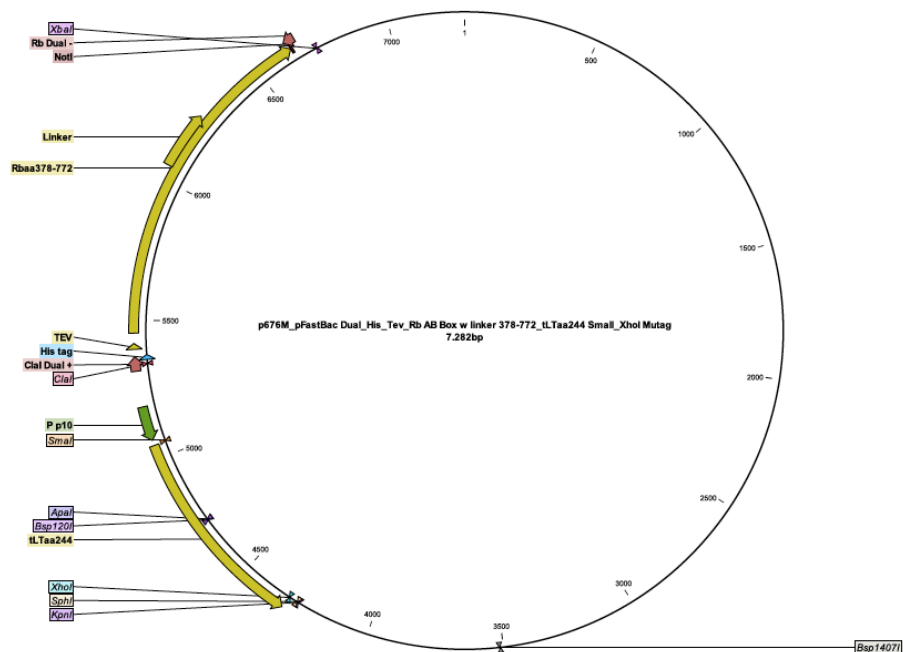


Abbildung 43: tLT244 und Rb AB Box mit His Tag in pFastBac Dual Vektor (Plasmidkarte)

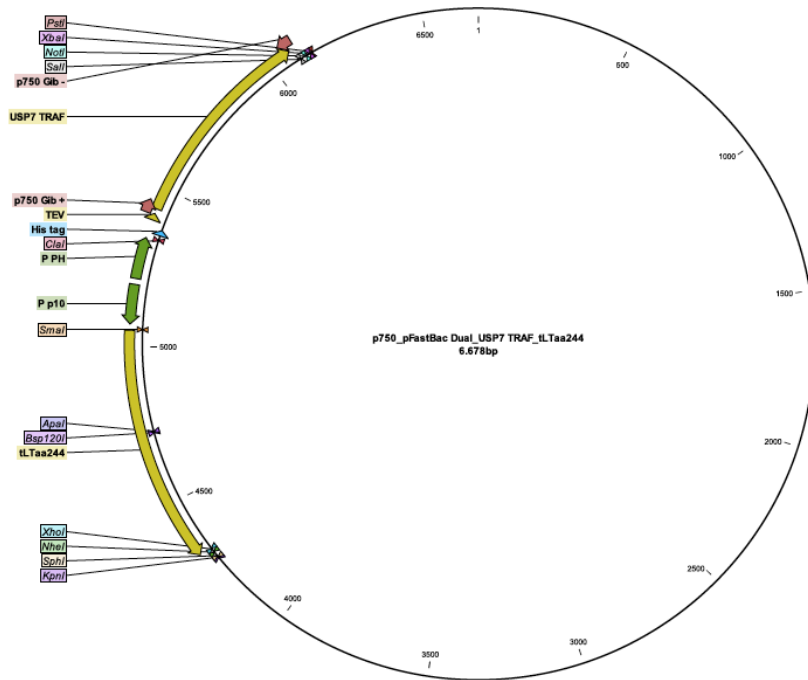


Abbildung 44: tLT244 und USP7 TRAF Domäne in pFastBac Dual Vektor (Plasmidkarte)

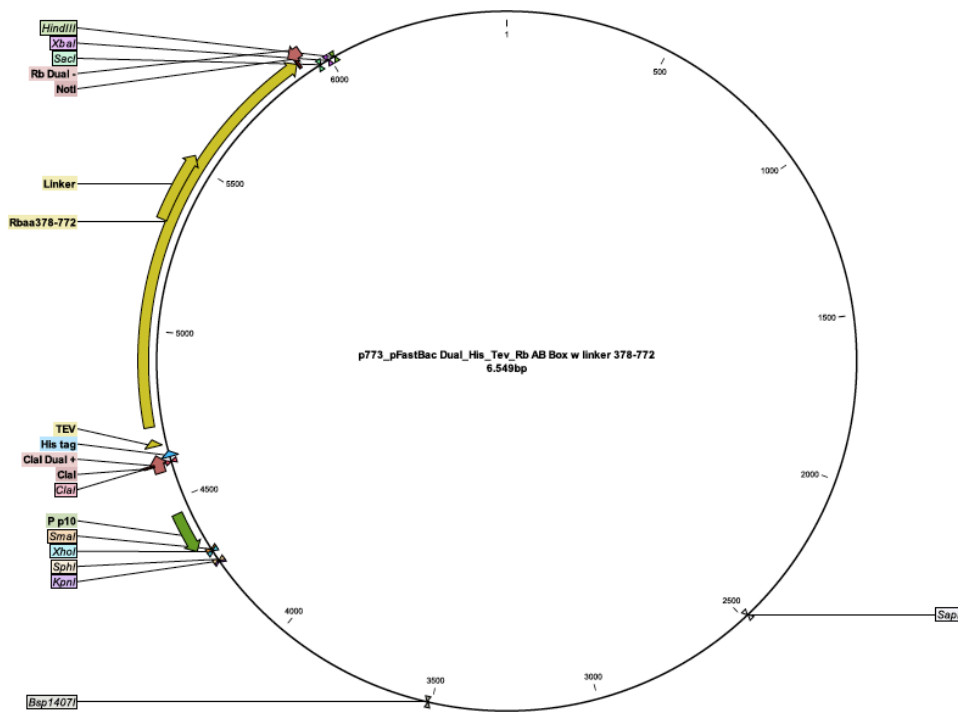


Abbildung 45: Rb AB Box mit His Tag in pFastBac I Vektor (Plasmidkarte)