

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Bioorganische Chemie
Biologische NMR-Spektroskopie

**NMR-spektroskopische Untersuchungen
zur Expression selektiv mit ^{15}N -Aminosäuren markierter Proteine
in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Insektenzellen**

Michael Andreas Brüggert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Steffen J. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Luis Moroder
2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 26.06.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 28.08.2002 angenommen.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Januar 1998 bis Januar 2002 in der Arbeitsgruppe Biologische NMR-Spektroskopie der Abteilung Strukturforschung (Prof. Dr. Robert Huber) am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Herrn Dr. Tad Holak durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Luis Moroder gilt mein besonderer Dank für die Übernahme der verantwortungsvollen Aufgabe meines Doktorvaters.

Ich danke Herrn Dr. Tad Holak für die Bereitstellung der Materialien, Geräte und des nötigen wissenschaftlichen Freiraums, ohne die die Durchführung der Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihm verdanke ich die Erkenntnis, dass weniger manchmal mehr ist.

Weiterhin möchte ich danken:

Jochen Kluge und Dr. Rick Engh von Roche Diagnostics, die mir eine enge Zusammenarbeit mit einem großen internationalen Unternehmen auf dem Gebiet der Kinasen ermöglichten und mich tatkräftig unterstützten.

Dr. Oliver Seth von Silantes GmbH, der mir die Möglichkeit eröffnete meine Kenntnisse zur Optimierung von Insektenmedien zu erweitern.

Von den Kollegen meiner Arbeitsgruppe danke ich den „Jungs vom Spektrometer“, Till Rehm und Markus Seifert, die mich lehrten immer das Unerwartete zu erwarten. Dr. Mariusz Kamionka und Dorothea Ksiazek verdanke ich die Erkenntnis, dass Kristall nicht gleich Kristall und Kristall nicht gleich gelöste Struktur ist. Sreejesh Shanker danke ich für die gute Zusammenarbeit und gut gewürzte Speisen. Den „Mädels“ Chrystelle Mavoungou und Anja Belling danke ich für ihre Freundschaft und Unterstützung in allen Lagen.

Ich danke auch meinem guten Freund Aloys Thurmayr, der mich lehrte nie zu verzweifeln oder aufzugeben, bevor man nicht alles versucht hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Conny Ciosto und Dr. Julia Georgescu, meinen „Musen und zugleich Drill-Sergents“. Mit beiden verbindet mich eine enge Freundschaft. Dr. Conny Ciosto lehrte mich, dass die Wissenschaft auch eine menschliche Seite besitzen muss. Wir teilten unsere unzähligen wissenschaftlichen Hochs und Tiefs. Ebenso motivierten und inspirierten wir uns gegenseitig. Dr. Julia Georgescu zeigte mir, wie ernsthaft und zugleich fesselnd Wissenschaft sein kann. Ihr verdanke ich so manchen knurrenden Magen und so manche schlaflose Nacht im Labor. Beiden danke ich auch für die kritischen Kommentare und hilfreichen Vorschläge zu meinen wissenschaftlichen Theorien. Den anderen Kollegen danke ich für die lehrreiche Zusammenarbeit und die gute Atmosphäre.

Besonders möchte ich auch meiner Mutter danken, dass sie nie die Geduld verloren hat und mich immer unterstützte.

Publikationsliste

Forschungsergebnisse, die im Laufe der Tätigkeit für das Max-Planck-Institut unter meiner Mitwirkung erhalten wurden, sind veröffentlicht in:

Stoll, R., Renner, C., Zweckstetter, M., Brüggert, M., Ambrosius, D., Palme, S., Engh, R.A., Golob, M., Breibach, I., Büttner, R., Voelter, W., Holak, T.A., Bosserhoff, A.K. (2001) The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J.*, **20**, 340-349

Teile der vorliegenden Doktorarbeit werden veröffentlicht in:

Brüggert, M., Rehm, T., Shanker, S., Holak, T.A. (2002) Expression of selectively ¹⁵N-labelled proteins in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: a potential alternative to in-vitro-expression, *in Vorbereitung*

SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

Å	Ångström
AcNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus
1D	eindimensional
APS	A mmoniumperoxodisulfat
B ₀	Magnetfeld
B _{eff}	effektives Magnetfeld
BEVS	B aculovirus e xpressions v ektorsystem
bidest	doppelt destilliert
bp	B asen p aar
BV	b udded v irus
cDNA	komplementäre DNA
CDK	c yclin- d ependent k inase
δ	chemische Verschiebung
ΔG	freie Reaktionsenergie
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	D ithio t hreit o l
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FID	freier Induktionszerfall (<i>free induction decay</i>)
FT	Fouriertransformation
γ	gyromagnetisches Verhältnis
g	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
ħ	Plancksches Wirkungsquantum
ΔH _m	molare Reaktionsenthalpie
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
k _b	Boltzmann-Konstante
μ	magnetisches Moment
μ _i	chemisches Potential
m	magnetische Quantenzahl
M	mol/l
MOI	m ultiplicity o f i nfection
η	Viskosität

Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
Osm	Osmol
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pfu	plaque forming unit
pI	isoelektrischer Punkt
pH	potentia hydrogenii (Wasserstoffexponent)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
R	ideale Gaskonstante
RT	Raumtemperatur
rpm	Rotationen pro Minute
<i>S. frugiperda</i>	Spodoptera frugiperda
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
T	Temperatur
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
ω_0	Larmor-Frequenz
x_i	Stoffmengenanteil

Aus dem Englischen übernommene Fachausdrücke sind kursiv gedruckt, wobei wenn möglich eine deutsche adäquate Übersetzung angegeben wurde. Die Abkürzung der Aminosäuren erfolgte entsprechend der Nomenklatur des Dreibuchstaben-Codes und des Einbuchstaben-Codes (bei Primärsequenzen und in HSQC-Spektren).

Einleitung	1
Grundlagen	3
1 Der Zellzyklus und Krebs	3
1.1 Allgemeine Eigenschaften der Cyclin-abhängigen Kinasen, CDKs	5
1.1.1 Die Regulation der Cyclin-abhängigen Kinasen im Zellzyklus	5
1.1.2 Strukturelle Basis der aktivierenden Funktion der Cycline	5
1.1.3 Phosphorylierung und vollständige Aktivierung der CDKs	7
1.2 Inhibition des CDK-Cyclin-Komplexes	8
1.2.1 Die INK4-Inhibitor-Familie	8
1.2.1 Die Kip/Cip-Inhibitor-Familie	8
1.3 Der G1/S-Restriktionspunkt	9
1.4 Strukturelle Eigenschaften von CDK4 und CDK6	11
2 Das Baculovirusexpressionsvektorsystem	13
2.1 Vergleich mit bakteriellen Expressionssystemen	14
2.2 Lebenszyklus des Baculovirus AcNPV	15
2.3 Rekombinante Baculoviren	18
2.4 Faktoren für hohe Proteinausbeute	19
3 Grundlagen zu den verwendeten analytischen Methoden	20
3.1 Kernresonanzspektroskopie	20
3.1.1 Das 1D-Experiment	22
3.1.2 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie; das HSQC-Experiment	23
3.1.3 Wichtige spektrale Parameter	24
3.2 Osmolalität	25
3.2.1 Die Gefrierpunktserniedrigung- eine kolligative Eigenschaft	25
3.3 Partikelgrößenbestimmung nach dem Coulter-Prinzip	28
Materialien und Methoden	30
1 Molekularbiologische Methoden	30
1.1 Elektrokompetente <i>E. coli</i>	30
1.2 Transformation der <i>E. coli</i>	30
1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
1.4 Verdau mit Restriktionsenzymen	31
1.5 Ligation	31
1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
1.7 Reinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten	33
1.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	33
2 Der Umgang mit Sf9-Insektenzellen	34
2.1 Bestimmung der Osmolalität	34
2.2 Kultivierung der Insektenzellen	34

2.2.1	Bestimmung der Zelldichte und der Zellvitalität	35
2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Insektenzellen	36
2.3	Herstellung von rekombinanten Baculoviren	37
2.3.1	Transfervektor	37
2.3.2	Cotransfektion	37
2.3.3	Reinigung des rekombinanten Virus	39
2.3.4	Isolation der Baculovirus-DNA	41
2.3.5	Identifikation der rekombinanten Viren mit Hilfe der PCR	42
2.3.6	Amplifikation des rekombinanten Virus und Bestimmung des Titers	43
3	Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine	44
3.1	Expression der rekombinanten Proteine in <i>E. coli</i>	44
3.1.1	Herstellung unmarkierter Proben	44
3.1.2	Herstellung uniform ¹⁵ N-markierter Proteinproben	44
3.1.3	Herstellung ¹⁵ N-isotopenmarkierter Proteinproben	44
3.2	Expression der rekombinanten Proteine in Sf9-Insektenzellen	45
3.2.1	Herstellung unmarkierter Proben	45
3.2.2	Herstellung ¹⁵ N-isotopenmarkierter Proteinproben	45
3.3	Proteinreinigung	46
3.3.1	Zellaufschluss durch Sonifizieren	46
3.3.2	Reinigung durch Affinitätschromatographie	46
3.3.3	Gelfiltration	48
3.3.4	Proteolytische Abspaltung der CDK6	48
4	Allgemeine Proteinanalytische Methoden	49
4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
4.1.1	Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau	50
4.2	Western Blot	50
4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	51
5	Probenpräparation für die NMR-Spektroskopie	51
Ergebnisse		52
1	Expression der CDK6	52
1.1	Herstellung der rekombinanten CDK6-Baculoviren	52
1.2	Expression und Reinigung der CDK6	56
2	Einleitende Versuche zur selektiven ¹⁵N-Markierung von CDK6	63
3	Selektive Markierung von GST mit ¹⁵N-Aminosäuren	66
3.1	Herstellung eines rekombinanten GST-Baculovirus	66
3.2	Entwicklung eines Mediums zur selektiven Anreicherung von ¹⁵ N-markierten Aminosäuren in Proteinen	67
3.3	Herstellung von selektiv ¹⁵ N-isotopenmarkierten GST-Proben in <i>E. coli</i> und Sf9	71
Diskussion		94
1	Expression der CDK6	94

2	einleitenden Versuche zur selektiven Markierung von His₆-CDK6 mit ¹⁵N-Aminosäuren	95
3	Selektive Markierung von GST mit ¹⁵N-Aminosäuren	96
	<i>Zusammenfassung</i>	108
	<i>Literaturverzeichnis</i>	111
	<i>Anhang</i>	117
1	Verwendete Materialien und Reagenzien	117
1.1	Organismen	117
1.2	Plasmide	117
1.3	Enzyme und Proteine	117
1.4	Oligonukleotide für PCR	117
1.2	Antikörper	117
1.3	Inhibitoren und Antibiotika	117
2	Sonstige Chemikalien und Reagenzien	118
2.1	Protein-Größen-Marker und DNA-Leitern	120
2.2	Isotopenmarkierte Substanzen	120
3	Nährmedien und Pufferlösungen	121
4	Verbrauchsmaterialien und Geräte	125

Einleitung

In den letzten zwei Jahrzehnten hat sich das Baculovirusexpressionsvektorsystem zu einem sehr leistungsfähigen Expressionssystem entwickelt. Die ständig wachsende Zahl der damit hergestellten Proteine unterstreicht, dass sich die Erzeugung von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen neben anderen Expressionssystemen wie *E. coli* oder Hefen etabliert hat. Das Baculovirusexpressionsvektorsystem stellt auch eine wichtige Ergänzung dar, da Insektenzellen eine Vielzahl von Chaperonen bereitstellt, die zur korrekten Faltung der rekombinant exprimierten Proteine notwendig sind. Mit Hilfe dieses Systems können somit im Gegensatz zur bakteriellen Expression viele Enzyme mit voller biologischer Aktivität gewonnen werden. Da die posttranslationalen Modifikationen in Insektenzellen, anders als bei Hefen, denen in humanen Zellen sehr ähnlich sind, ist bei der Herstellung von therapeutischen Präparaten eine bessere Verträglichkeit für den Menschen zu erwarten.

Während bei der Strukturaufklärung von Proteinen, die in Insektenzellen exprimiert wurden, die Röntgenkristallographie schon breite Anwendung findet, wird die Methode der Kernresonanzspektroskopie in diesem Gebiet noch wenig benutzt. Der Hauptgrund dafür liegt in den unterschiedlichen Ansprüchen der Insektenzellen und der *E. coli* an ihre Kulturmedien. Bakterien sind in der Lage, alle Aminosäuren aus Glukose und Ammonium als alleinige Quellen für Kohlenstoff beziehungsweise Stickstoff zu synthetisieren. Dies bedeutet, dass bei der Herstellung von uniform ^{15}N - und ^{13}C -isotopenmarkierten Proteinen, die zur Strukturaufklärung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie benötigt werden, auf relativ preiswerte Rohstoffe zurückgegriffen werden kann. Im Gegensatz zu Bakterien verfügen Insektenzellen über diese Fähigkeit zur Synthese aller Aminosäuren nicht. So sind bestimmte Aminosäuren essentiell für das Wachstum dieser Zellen. Darüber hinaus benötigen Insektenzellen zahlreiche Vitamine und Wachstumsfaktoren, die als chemisch nicht definierte Hydrolysate und Lipidmischungen zugesetzt werden müssen. Hieran lässt sich erkennen, dass die Medien zur Herstellung uniform ^{15}N - und ^{13}C -isotopenmarkierter Proteine um ein Vielfaches teurer wären als die entsprechenden Medien für Bakterien. Anders sind die Verhältnisse bei der Herstellung selektiv mit ^{15}N -Aminosäuren markierten Proteinen. In diesem Fall werden bei der bakteriellen Expression Medien verwendet, die wie Insektenmedien alle Aminosäuren enthalten. Man kann also davon ausgehen, dass zur Herstellung selektiv markierter Proteine vergleichbare Kosten bei der Herstellung der Medien anfallen. Eine wichtige Fragestellung ist nun, ob und in welchem Umfang selektive Markierungen mit Aminosäuren in Insektenzellen durchgeführt wer-

den können. Dies ist in besonderem Maße für NMR-spektroskopische Untersuchungen an Proteinen bedeutsam, die sich nur mit Hilfe des Baculovirusexpressionsvektorsystems biologisch aktiv in hoher Ausbeute rekombinant herstellen lassen.

Der erste Teil der vorliegenden Dissertation beschäftigt sich mit der Herstellung der Cyclin-abhängigen Kinase CDK6 in Insektenzellen mit Hilfe von Baculoviren. Grund hierfür ist die zentrale Bedeutung der Kinase für den Restriktionspunkt am Übergang von der G1-Phase in die S-Phase. Dieses Protein lässt sich biologisch aktiv und in großer Menge nur mit Hilfe des Baculovirusexpressionsvektorsystems gewinnen. Wegen dieser Tatsache wurden rekombinante Baculoviren generiert, die in ihrer DNA CDK6 entweder als GST- oder Hexahistidin-Fusion codierten. Zur Abspaltung der Reinigungsfusionen wurden verschiedene Proteasespaltstellen verwendet. Durch Testexpressionen sollten Aussagen zu Ausbeute und Stabilität der verschiedenen Konstrukte der CDK6 gemacht werden. Gegenstand intensiver Forschung ist die Identifikation von niedermolekularen Verbindungen, die als Inhibitoren für CDK6 die Aufgabe der Proteine der INK4-Inhibitorenfamilie übernehmen können. Da die NMR-Spektroskopie für solche Studien bestens geeignet ist, wurden einleitende Studien zur selektiven Markierung von CDK6 mit ^{15}N -Aminosäuren durchgeführt. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse zeigten die Notwendigkeit zur Durchführung vergleichender Studien zur selektiven Markierung in *E. coli* und Insektenzellen.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und der Optimierung eines Mediums, das für die selektive ^{15}N -Markierung von Proteinen in Insektenzellen geeignet ist. Dazu wurde unter anderem untersucht, welche Aminosäuren essentiell für eine hohe Proteinproduktion sind. Dies sollte Aufschluss geben, ob auf Grund des unterschiedlichen Metabolismus eine Markierung bestimmter Aminosäuren in Sf9-Zellen möglich ist, die sich in *E. coli* nicht selektiv markieren lassen. Die entwickelten Medien IML406 und IML455 wurden dann verwendet, um das Modellprotein GST selektiv mit ^{15}N -Aminosäuren, die üblicherweise in *E. coli* dazu benutzt werden, zu markieren. Die Ergebnisse der Markierung in Insektenzellen wurden mit denen einer bakteriellen Expression verglichen. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit der Markierung anderer Aminosäuren und die Verwendung von ^{15}N -Ammoniumchlorid im Medium untersucht. Die bei der Optimierung der selektiven Markierung von GST in Insektenmedien gewonnenen Erkenntnisse können dann auf die zukünftige Herstellung von selektiv ^{15}N -markierter CDK6 übertragen werden.

Grundlagen

1 Der Zellzyklus und Krebs

In der Statistik der Todesursachen des 20. Jahrhunderts ist neben den Herz-Kreislaufkrankungen der Krebs in all seinen Formen die zweithäufigste Erkrankung in den Industrieländern. Trotz enormer Ausgaben von Staat und Pharmaindustrie zur Entwicklung neuer Arzneimittel sterben pro Jahr fast 160.000 Menschen an Krebs. Die Probleme in Medizin und Wissenschaft stellen sich durch die verschiedenartigen und vielschichtigen Krankheitsbilder der Krebserkrankungen. Der Durchbruch in der Krebstherapie wird erst durch ein grundsätzliches Verständnis der biologischen Abläufe bei der Entstehung der einzelnen Krebsarten möglich sein. Deshalb besteht eine vordringliche Aufgabe der Tumorforschung darin, das molekularbiologische Grundwissen über die Biologie der gesunden und der entarteten Zellen zu erweitern.

Krebs ist die unkontrollierte Proliferation von Zellen. Der Zellzyklus ist durch seine zentrale Rolle in der Kontrolle von Zellwachstum und Proliferation häufiges Ziel genetischer Veränderungen (Pavletich, 1999). Bereits Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde bei Fusionsversuchen an Säugetieren in den verschiedenen Stadien der Zellproliferation (Rao *et al.*, 1970) erkannt, dass die Kontrolle dieses Wachstumszykluses der Zellen einem strengen Regelmechanismus unter Mitwirkung unterschiedlicher Faktoren unterworfen ist. Die Tumorforschung ist deshalb bestrebt, durch genauere Kenntnisse der zu Grunde liegenden Kontrollmechanismen des Zellzyklus bzw. einer Fehlsteuerung derselbigen den Schlüssel zum besseren Verständnis der Tumorgenese zu finden.

Eukaryontische Zellen durchlaufen während ihrer Reproduktion einen zyklischen Prozess. Der Zellzyklus beschreibt den Weg der Zellteilung, der in vier verschiedene Phasen eingeteilt werden kann:

1. Die Mitose findet in der relativ kurzen (ca. 1 Stunde) **M-Phase** (Mitose) statt und umfasst die Zeitspanne, in der Kern- und Zellteilung stattfinden. In dieser Phase kommt es zur Verteilung der replizierten Chromosomen von der Mutterzelle auf die Tochterkerne.
2. Auf die Mitose folgt die **G1-Phase** (engl. *gap*, Lücke), welche mit ca. 10 Stunden den längsten Zeitraum im Zellzyklus umfasst. Es handelt sich hierbei um die Zeit, in der die

Zelle wächst, Stoffwechsel betreibt und in einem höher entwickelten Organismus ihre spezielle Funktion ausübt.

3. In der anschließenden **S-Phase** (Synthese) werden die chromosomalen DNA-Doppelstränge repliziert. Zu Beginn der S-Phase werden die Replikationsstartpunkte aktiviert und die DNA-Synthese verläuft mit Hilfe von DNA-Polymerasen an linearen Molekülen entlang, bis die Replikation abgeschlossen ist. Die DNA-Synthese kann bis zu 8 Stunden dauern.
4. Die recht kurze (2 bis 6 Stunden) **G₂-Phase** ist eine zweite Übergangsphase, in der die Zelle bereits auf die Zellteilung ausgerichtet ist. Während der G₂-Phase ist die Zelle tetraploid und kondensiert am Ende von G₂ die Chromosomen zu den Metaphasestrukturen.
5. Es erfolgt ein erneuter Eintritt in die M-Phase und damit eine neue Runde des Zellzyklus.

Normalerweise dauert der Zellzyklus zwischen 16 und 24 Stunden, wobei die größten Unterschiede in der G₁-Phase liegen. Während dieser Phase entscheidet es sich, ob die Zelle sich vermehrt. Im Falle eines Nährstoffmangels, Kontaktinhibition mit anderen Zellen begibt sich die Zelle in einen Ruhezustand, der **G₀-Phase**. Die G₀-Phase kann von der Zelle jederzeit wieder verlassen werden.

Die Zellzyklusprogression ist zeitlich an definierte Restriktionspunkte (engl.: cell cycle checkpoints) gebunden. Einer der wichtigsten Restriktionspunkte und damit auch häufigster Ausgangspunkt für oncogene Prozesse ist der Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase, an dem die Zelle über den Fortgang im Zellzyklus oder den Eintritt in die G₀-Phase entscheidet (Sherr, 1996). Die Kontrolle des Zellzyklus wird von verschiedenen miteinander wechselwirkenden Proteinen ausgeübt. Die zelluläre Umgebung kann mitogene oder antimitogene Signale aussenden. Mitogene Signale, wie z.B. Wachstumsfaktoren, fördern den Durchgang durch den Zellzyklus, antimitogene Signale wie TGF- β schicken die Zelle in die G₀-Phase. Eine Schlüsselrolle bei der Zellzyklusprogression wird den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) zugesprochen. Genetische Veränderungen in den Genloci dieser Kontrollproteine sind wichtige Auslöser in der Krebsentstehung.

Das in dieser Arbeit untersuchte CDK6 spielt eine zentrale Rolle bei der Phosphorylierung des Tumorsuppressors Retinoblastoma-Protein (pRb) im G₁/S-Restriktionspunkt. In den nachfolgenden Abschnitten soll deshalb ein Überblick über die molekularen und physiologi-

schen Eigenschaften der Cyclin-abhängigen Kinasen sowie deren Regulation am G1/S-Phasen-Übertritt gegeben werden.

1.1 Allgemeine Eigenschaften der Cyclin-abhängigen Kinasen, CDKs

Die CDKs sind Phosphoproteine mit einer Größe von 34-40 kDa und gehören zur Familie der Serin/Threonin Kinasen (Pavletich, 1999). Die CDKs müssen mit dem zugehörigen Cyclin assoziiert sein, um ihre Aktivität zu erlangen. Biologisch aktive Cyclin-abhängige Proteinkinase sind Heterodimere, von denen die CDK-Untereinheit die katalytische Aktivität trägt und die andere Untereinheit, das Cyclin, eine aktivierende Funktion ausübt. Das katalytische Zentrum der CDKs umfasst einen Kernbereich von ca. 300 Aminosäuren, in dem eine hohe Homologie zwischen den verschiedenen Mitgliedern dieser Proteinkinase-Familie feststellbar ist (Morgan, 1995). Innerhalb dieses Bereichs befindet sich eine konservierte Sequenz von 16 Aminosäuren, die als *PSTAIRE*-Region bezeichnet wird. Die *PSTAIRE*-Region ist an der Bindung der zugehörigen Cycline beteiligt und ist mitbestimmend für die spezifische Natur der Cyclin-CDK-Bindung.

1.1.1 Die Regulation der Cyclin-abhängigen Kinasen im Zellzyklus

Die Regulation der CDKs erfolgt durch mehrere verschiedene Prozesse:

- Die Assoziation mit den jeweiligen Cyclin-Untereinheiten bewirkt eine partielle Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus.
- Die Phosphorylierung der CDK-Cyclin-Komplexe durch CDK-aktivierende Kinasen (CAK) stellt die vollständige Aktivität der CDKs her.
- Kip/Cip- und der INK4-Inhibitoren, beides Mitglieder der Familie der Zellzyklus-Inhibitor-Proteinen, blockieren durch Assoziation die Aktivität der Kinasen.

1.1.2 Strukturelle Basis der aktivierenden Funktion der Cycline

Klassifizierendes Merkmal der Cycline ist die Cyclin-Box, eine konservierte Domäne von ca. 100 Aminosäuren, über die die Bindung an die zugeordnete CDK erfolgt (Hunter & Pines, 1994; Sherr, 1995; Morgan, 1995; Pines, 1995). Die Cycline bilden eine Proteinfamilie, die im Zellzyklus durch zyklische Konzentrationsschwankungen charakterisiert sind. Die verschiedenen Cycline zeigen eine Präferenz in der Komplexbildung mit bestimmten CDKs, weshalb im Zellzyklus spezifische Kombinationen von Cyclinen und CDKs angetroffen wer-

den. Eine grobe Einteilung der Cycline kann anhand ihrer Aktivität zu den verschiedenen Phasen des Zellzyklus erfolgen (Abb. 2-1).

Die Cycline haben die Aufgabe, die CDKs in ihren aktiven Zustand zu überführen und gezielt an subzelluläre Orte zu bringen. Die Menge an aktivierbarer CDK wird durch die Cyclin-Konzentration festgelegt, die über die Transkription der Cyclin-Gene und über einen gezielten Abbau durch Proteolyse gesteuert wird. Die Veränderungen in der Konzentration der einzelnen Cycline dienen als regulatorisches Element im Zellzyklus.

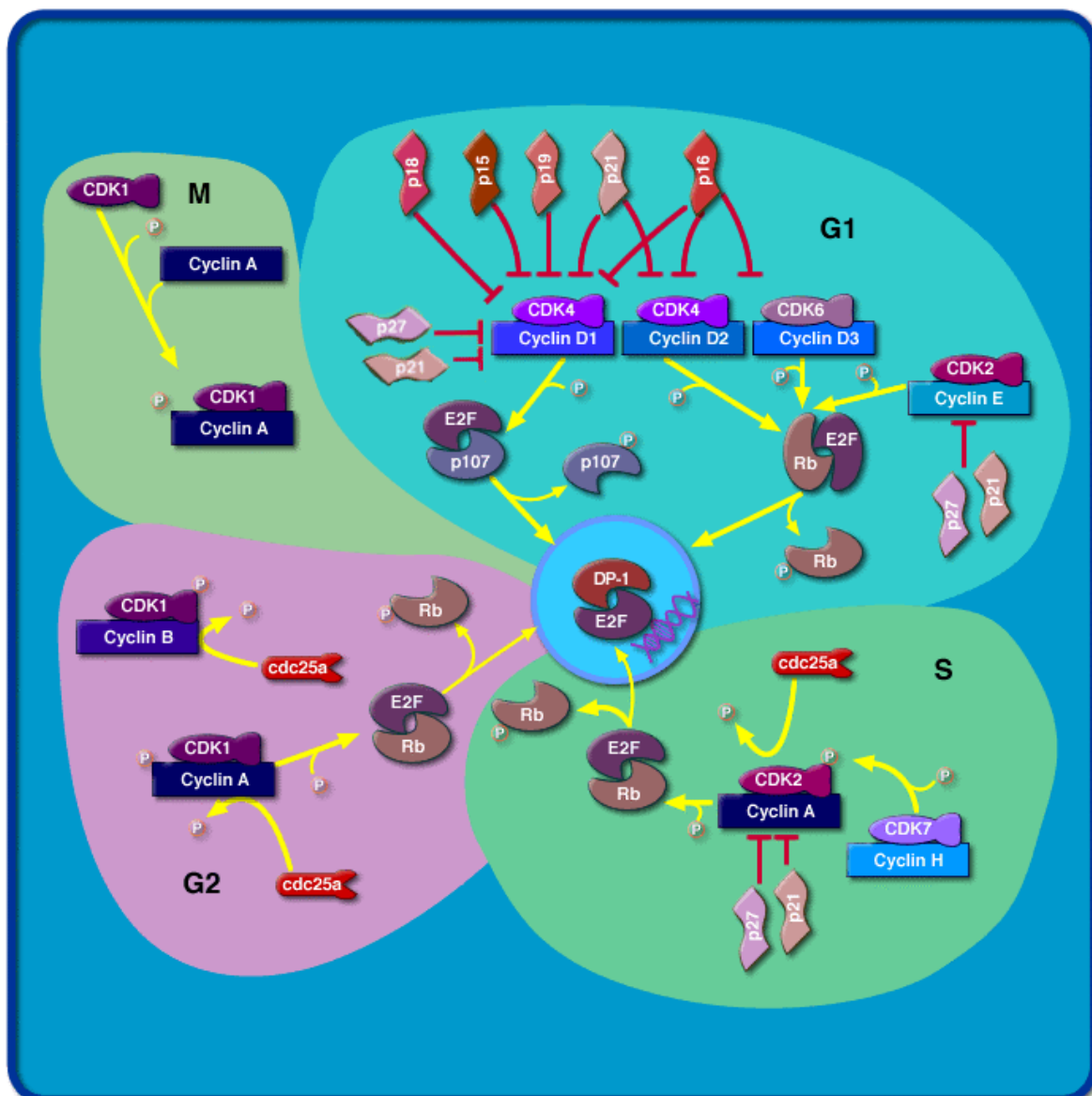


Abb. 2-1: Verteilung der verschiedenen CDK/Cyclin-Komplexe auf die verschiedenen Phasen im Zellzyklus. Es sind auch die Kinase-Inhibitoren der Cip/Kip-Familie und der INK4-Familie sowie deren Wirkungsweise dargestellt. (Quelle: www.biocarta.com)

Der aktivierende Prozess kann anhand der monomeren CDK2 dargestellt werden, welches ein ähnliches Faltungsmuster aufweist wie die anderen strukturell charakterisierten Serinspezifischen Proteinkinasen (Jeffrey *et al.*, 1995). Durch Russo *et al.* (1998) und Brotherton *et al.* (1998) wurden die Strukturen des CDK6/p19- und CDK6/p16-Komplexes mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Die Struktur der CDK6 besteht aus einer N-terminalen Region, die reich an β -Faltblättern ist, und einer größeren C-terminalen Region, die einen hohen Anteil an α -Helices besitzt. Zwischen beiden Domänen befindet sich ein Spalt, der für die ATP-Bindung und katalytische Aktivität verantwortlich ist (Pavletich, 1999).

In der inaktiven Form von CDK2 wird die Bindungsstelle für das Proteinsubstrat durch eine Schleife blockiert, die als T-Schleife bezeichnet wird. Das ATP ist außerdem in einer Konformation gebunden, die eine Spaltung und Phosphattransfer nicht erlaubt. Durch Bindung des Cyclin A an CDK2 findet eine Umkonfiguration des aktiven Zentrums statt (Russo *et al.*, 1996). Das Cyclin A bildet Kontakte zur *PSTAIRE*-Helix der CDK2, es kommt zur Umorientierung dieser Helix und der T-Schleife (DeBondt *et al.*, 1993). Das katalytische Glutamat E51 der *PSTAIRE*-Helix wird dadurch in eine Position im katalytischen Spalt gebracht, von der aus eine Wechselwirkung mit Lysin K33 und Aspartat D145 möglich ist. Als Folge wird das ATP so orientiert, dass ein Angriff der Hydroxylgruppe des Ser/Thr-Rests eines Substratproteins möglich ist (Pines, 1995). Die regulatorischen Phosphorylierungsstellen werden des Weiteren so positioniert, dass ihre Phosphorylierung einen positiven (Thr160) oder negativen (Thr14, Tyr15) Einfluss auf die Aktivität der Kinasen ausüben kann (Gu *et al.*, 1992).

1.1.3 Phosphorylierung und vollständige Aktivierung der CDKs

Die CDKs besitzen mehrere Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen, die einen aktivierenden oder inaktivierenden Einfluss haben. Aktivierend wirkt eine Phosphorylierung an Thr160 der CDK2 und Thr172 der CDK4. Inhibierend wirkt dagegen eine Phosphorylierung an Thr14 und Tyr15 von CDK2.

Der Thr-Rest der CDK2 liegt in der T-Schleife, die in der inaktiven Form den Zugang zur Substratbindungsstelle versperrt. Die Phosphorylierung der T-Schleife in Kooperation mit der Cyclin-Bindung trägt wahrscheinlich dazu bei, die T-Schleife in eine für die Substratbindung günstigere Position zu bringen. Die Proteinkinase, die für die Phosphorylierung verantwortlich ist, gehört selbst zur Familie der CDKs und wird als CAK (CDC2 activating kinase) be-

zeichnet (Morgan, 1995). Ihre Untereinheit trägt die Bezeichnung CDK7 und ist verwandt zur CDC2-Kinase. Die CAK benötigt zur vollen Aktivität ebenfalls ein zugehöriges Cyclin, das Cyclin H. Es wird angenommen, dass die CAK nicht der regulierende Faktor der Phosphorylierung an Thr160 der CDK ist, sondern diese über die Cyclin-Konzentration reguliert wird.

1.2 Inhibition des CDK-Cyclin-Komplexes

Eine negative Kontrolle der CDK-Aktivität im Zellzyklus wird durch spezifische Kinase-Inhibitoren ausgeübt, die als Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren, CKIs bezeichnet werden (Hunter & Pines, 1994). Sie sind wichtige Ausgangspunkte für Signale, die einen Stop des Zellzyklus zum Ziel haben. Die CKIs sind Proteine, die in reversibler Weise mit einer CDK oder mit einem CDK-Cyclin-Komplex assoziieren können und die CDK-Aktivität dadurch inhibieren. Die CKIs können je nach Substratspezifität und dem Zeitpunkt ihrer Wirkung in zwei weitere Familien unterteilt werden: die INK4 Familie und die Kip/Cip Familie (Pines, 1997).

1.2.1 Die INK4-Inhibitor-Familie

Die INK4 Proteine setzen sich aus sich wiederholenden Ankyrin-Motiven aus je ca. 32 Aminosäuren zusammen (Serrano *et al.*, 1993). Die Inhibitoren der INK4 Familie können in Abwesenheit der Cyclin-Untereinheit spezifisch an CDK binden und verhindern damit die Möglichkeit einer Komplexierung mit dem Cyclin, was zu Inaktivität führt. Eine Bindung und Inhibierung kann jedoch auch an bereits gebildeten CDK-Cyclin-Komplexen ohne Brechung der Komplexbindung stattfinden. So konnte gezeigt werden, dass die INK4 Proteine p18^{INK4c} und p19^{INK4d} spezifisch an CDK4 und CDK6 binden und somit die Aktivität der Cyclin D-gebundenen CDKs inhibieren (Hirai *et al.*, 1995). Weitere Vertreter der INK4 Familie sind die Proteine p15^{INK4a} und p16^{INK4b} (Morgan, 1995).

1.2.1 Die Kip/Cip-Inhibitor-Familie

Die Kip/Cip Familie umfasst drei Proteine: p21^{Cip1} (Xiong *et al.*, 1993), p27^{Kip1} (Polyak *et al.*, 1994) und p57^{Kip2} (Lee *et al.*, 1995). Die Kip/Cip Proteine sind in der Region der ersten 70 Aminosäuren des Amino-Terminus bis zu 44 % identisch. Diese Region ist ausreichend für die Inhibierung der Cyclin-CDK-Aktivität (Chen, 1996). Der Carboxy-Terminus nimmt die Rolle der Zieldomäne ein. Bemerkenswert ist, dass bis zum heutigen Zeitpunkt die Struktur der freien Kip/Cip-Proteine unbekannt ist.

Die INK4 Inhibitoren sind spezifisch für die Cyclin-CDK4/6-Komplexe bei der Kontrolle der G1-Phase des Zellzyklus (Brooks *et al.*, 1998), speziell bei der Entscheidung der Proliferation, der Regulierung von Wachstumsfaktoren sowie der Überwachung der Zellgröße. Die Kip/Cip Proteine besitzen über die Cyclin-CDK-Inhibition hinaus einen breiteren Wirkungsgrad. Das Protein p21^{Cip1} ist zum Beispiel ebenso fähig, die den Stress regulierenden Kinasen zu inhibieren (Shim, 1996).

1.3 Der G1/S-Restriktionspunkt

Die in den vorherigen Punkten gezeigten Regulationsmechanismen können nicht isoliert betrachtet werden, es existiert vielmehr ein engmaschiges Netzwerk der Zellzykluskontrolle. Die einzelnen Mechanismen kooperieren miteinander durch gegenseitige Regulierbarkeit und eingebaute Rückkopplungsmechanismen. Nach einer abgeschlossenen Mitose benötigt die Zelle mitogene Signale, damit der Zellzyklus in eine erneute Teilungsrunde eintritt (Sherr, 1994). Diese Signale in Form von Wachstumsfaktoren werden in den ersten zwei Dritteln der G1-Phase wirksam. Zu diesem Zeitpunkt wird die Zelle darauf programmiert, einen neuen Zellzyklus einzuleiten oder in die G0-Phase einzutreten. Ab einem bestimmten Punkt, dem Restriktionspunkt, ist der Zellzyklusapparat autonom, S-, G2- und M-Phase werden ohne externe Steuerung durchlaufen. Treten Zellen aus der Ruhephase G0 oder nach der Mitose wieder in den Zellzyklus ein, werden zunächst bestimmte Cycline synthetisiert. In Säugetierzellen konnten bisher fünf Cycline nachgewiesen werden: C, D1, D2, D3 und E (Inaba *et al.*, 1992; Matsushime *et al.*, 1991). Jedes dieser Cycline kann mit einem oder mehreren Mitgliedern der CDK-Familie assoziieren, wobei hauptsächlich CDK2, CDK4 und CDK6 in G1 vorkommen (Dou, 1993 *et al.*; Matsushime *et al.*, 1994). Eine besondere Bedeutung in der Kontrolle der G1-Phase kommt den Cyclinen des Typs D zu (Sherr, 1995). Die Aufgabe der D-Typ-Cycline besteht darin, externe Signale für die Zellzyklusprogression in den Zellzyklus zu integrieren (Lew *et al.*, 1991). Überexpression von D1, D2 oder D3 kann in verschiedenen Zelltypen die G1-Phase verkürzen (Resnitzky *et al.*, 1993). Extrazelluläre Signale von Wachstumsfaktoren oder mitogene Signale bewirken eine Aktivierung der Transkription der Gene der D-Cycline und fördern die Assoziation mit der zugehörigen CDK (Matsushime *et al.*, 1991, Roberts *et al.*, 1994). Cyclin D-abhängige CDK-Aktivität wurde erstmals in der mid-G1-Phase mit den Kinasen CDK4 und CDK6 detektiert (Meyerson & Harlow, 1994).

Durch Mitogene stimuliert assoziiert das exprimierte Cyclin D1 posttranslational mit CDK4/CDK6 zu Holoenzymen. Diese Holoenzyme werden unter Mitwirkung der CAK durch

Phosphorylierung in den aktiven Zustand überführt, was am Beispiel von CDK4 die Phosphorylierung eines einzelnen Threoninrestes an Position 172 der CDK4 bedeutet (Sherr, 1995).

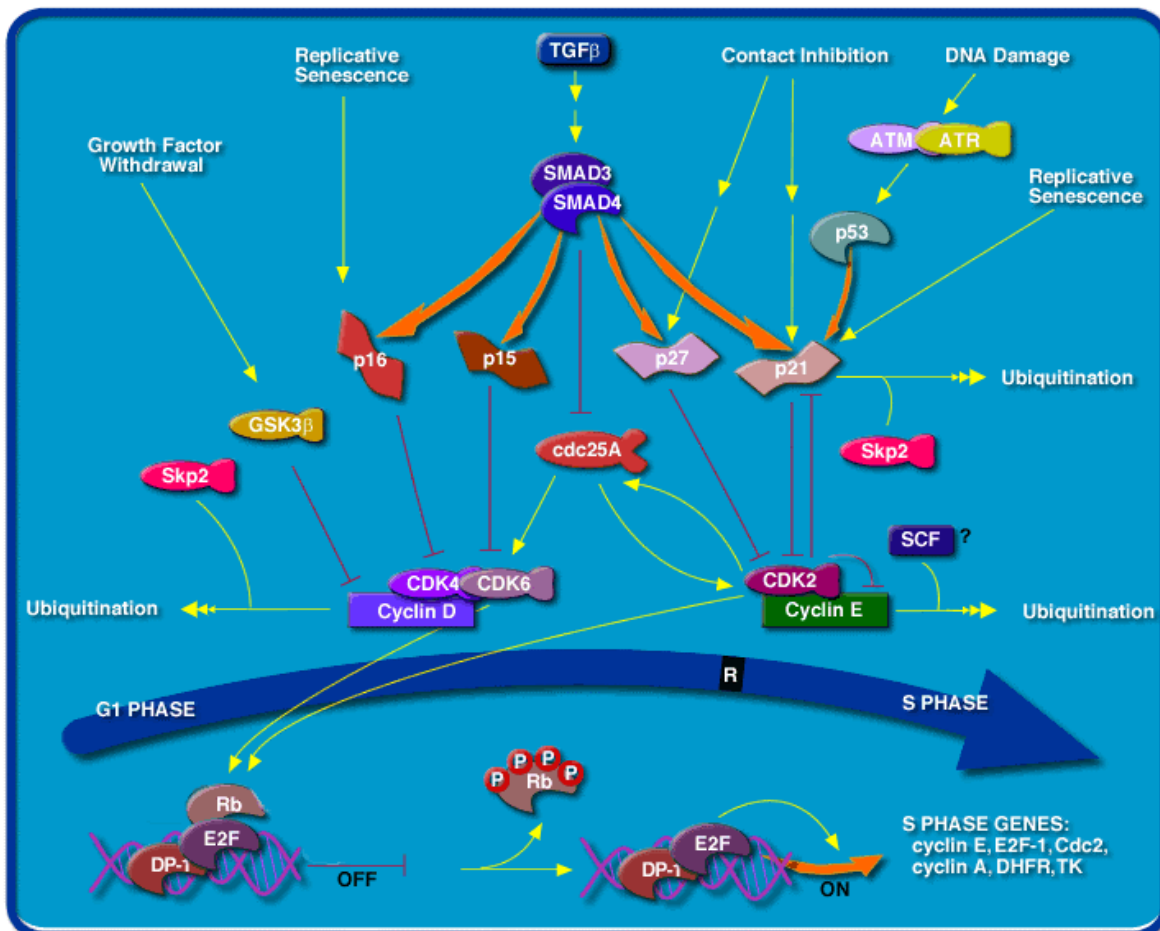


Abb. 2-2: vereinfachte Darstellung der Kontrollmechanismen am Restriktionspunkt beim Übergang der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase. Antimitogene Signale wie TGFβ, Kontaktinhibition (engl.: contact inhibition), DNA-Schäden (engl.: DNA damage), Entzug von Wachstumsfaktoren (engl.: growth factor withdrawal) oder replikative Alterung (engl.: replicative senescence) aktivieren die Inhibitoren der Cip/Kip-Familie und verhindern die Phosphorylierung von pRb und die nachfolgende Aktivierung von wichtigen Genen der S-Phase. (Quelle: www.biocarta.com)

Der aktivierte CDK4/6-Cyclin D1-Komplex phosphoryliert das pRb-Protein im pRb-E2F-Komplex, was eine Freisetzung von E2F Transkriptionsfaktoren bewirkt. E2F, ein DNA-Bindungsprotein, stimuliert die Expression von Dihydrofolatreduktase (DHFR), Thymidinkinase (TK), Thymidylatsynthase (TS), DNA-Polymerase α (POL), CDC2, Cyclin E und A sowie E2F-1. Damit erreicht die Zelle einen physiologischen Zustand, der den Eintritt in die S-Phase einleiten kann (Abb. 2-2). In einer positiven Feedback-Regulation wird pRb durch den E2F stimulierten CDK2/Cyclin E-Komplex weiter mit Phosphat beladen. Dadurch wird

ab einem bestimmten Zeitpunkt der G1/S-Phase-Übergang am Restriktionspunkt irreversibel und unabhängig vom Einfluss regulierender Mitogene. Außerdem aktivieren der CDK2/Cyclin E-Komplex und der CDK2/Cyclin A-Komplex weitere Enzyme der Replikationsmaschinerie wie zum Beispiel den ‚origin‘-Erkennungskomplex (ORC) oder sogenannte ‚minichromosome maintenance‘ Proteine (MCMs) sowie CDC6.

Antimitogene Signale aktivieren die CKIs, die mit dem zugehörigen CDK-Cyclin-Komplex reagieren und seine Kinaseaktivität inhibieren. Unter diesen Bedingungen verharrt der pRb-E2F-Komplex in einem hypophosphorylierten Zustand und der Durchgang der Zelle durch den Zellzyklus wird am G1/S-Übergang gestoppt. Auch das p53 Gen, das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren, soll bei auftretenden DNA-Schäden dafür sorgen, dass die Zelle entweder solange in der G1-Phase verharrt, bis die vorliegenden Schäden repariert sind, oder der Weg der Apoptose eingeleitet wird. P53 wirkt stimulierend auf die Expression der Kip/Cip-Inhibitoren (Abb. 2.-2), die bevorzugt CDK2/Cyclin A- und CDK2/Cyclin E-Komplexe inhibieren. Eine Inhibition von mutiertem p53 erfolgt durch das MDM2-Protein (Murine Double Minute Clone 2). Der genaue Signaltransduktionsweg zur Erkennung von DNA-Schäden und Aktivierung von p53 ist noch nicht geklärt.

In mehreren Zelllinien von Tumoren konnte eine Überexpression von Cyclin-CDK-Komplexen festgestellt werden (Hunter & Pines, 1994). Eine Überexpression von CDK4 und CDK6 hat wahrscheinlich eine gestörte Signalübertragung antimitogener Signale in die Zelle und damit die Möglichkeit der Tumorbildung zur Folge (Tam *et al.*, 1994).

Auf Grund ihrer entscheidenden Rolle bei der Phosphorylierung des pRb-Proteins und der damit verbundenen Zellzyklusprogression soll im folgenden Abschnitt noch kurz auf die strukturellen Eigenschaften der Cyclin-abhängigen Kinase 4 und der in dieser Arbeit untersuchten CDK6 eingegangen werden.

1.4 Strukturelle Eigenschaften von CDK4 und CDK6

Die Cyclin abhängigen Proteinkinasen können anhand ihrer Primärsequenz in Unterfamilien eingeteilt werden. Eine charakteristische Eigenschaft dieser Gruppe von Kinasen ist das *PSTAIRE*-Motiv, das zum Beispiel in CDC2, CDK2 und CDK3 zu finden ist. Andere Kinasen teilen sich das *PCTAIRE*-Motiv, eine Variation des vorherigen Motivs (Meyerson *et al.*, 1992).

Basierend auf der Aminosäuresequenz in Abb. 2-3 ist das nächste Homologe zu CDK4 das humane CDK6 (Meyerson, & Harlow, 1993). Die Proteine CDK4 und CDK6 sind bis zu 70 % identisch, wobei die strukturelle Ähnlichkeit für die Fähigkeit zur Substitution bei 80 % liegt. In Bezug auf die Bindung von CDK6 mit Cyclin D1 konnte anhand von Immunopräzipitaten sowie Antiserum-Tests das *PLSTIRE*-Motiv gefunden werden, was sich nicht mit dem PSK-J3-Motiv in CDK4 deckt (Bates *et al.*, 1994).

```

CDK4      MATSRYE PVAEIGV GAYGTVYKARDPHSGH-FVALKSVRV PNGGGGGGL PISTVREVALL
CDK6      MEKDGLCRADQQYECVAEIGE GAYGKVF KARDLKN GGRFVALKRVRVQTGEE---GMPLSTIREVAVL

RRLEAF EHPNVVRLMDV CATSR TDREIKV TLVFEHVDQDLR TYLDKAPP PGLPAETIKDLM
RHLET F EHPNVVRLFDV CTVSRTDRETKL TLVFEHVDQDL TTYLDKVP EPGVPTETIKDMM

RQFLRGLDFLHANCIVHRDLKPENILVTSGGTVKLADFG LARIYSYQMALTPVVVTLWYRA
FQLLRGLDFLHSHRVVHRDLKPNILVTS SGOIKLADFG LARIYSFQMALTSVVVTLWYRA

PEVLLQSSYATPVDMWSVGCIFAEMFRRKPLFCGNSEADQLGKIFDLIGLPPEDDWPRDVS
PEVLLQSSYATPVDLWSVGCIFAEMFRRKPLFRGSSDVDQLGKILLDVIIGLPGEEDWPRDVA

LPRGAFPPRGPRPVQSVVPEMEEESGAQLLLEMLTFNPHKRISAFRALQHSYLHKDEGNPE
LPRQAFHKSQAQPIEKFVTDIDELGKDLLLKLTFNPAKRISAYSALSHYPFQDLERCKE

-----
NLDSLHPPSQNTSELNTA

```

Abb. 2-3: Vergleich der Primärsequenz von humanem CDK4 mit CDK6: Die in beiden Proteinen identischen Aminosäuren im Einbuchstaben-Code sind gelb markiert. Die roten Buchstaben geben die Homologie zu dem *PLSTIRE*-Motiv von CDC2 wieder.

Beide Proteine interagieren mit Cyclin D1 und nicht mit Cyclin A. Die Aktivität von CDK6 konnte während der mittleren G1-Phase in Phytohemagglutinin stimulierenden T-Zellen nachgewiesen werden (Meyerson *et al.*, 1994), CDK4 erfüllt ihre Funktion hauptsächlich in Makrophagen und Fibroblasten (Matsushime *et al.*, 1992). Da die CDK6 Kinase ihre Aktivität an einem frühen Punkt in der G1-Phase des Zellzyklus zeigt, wird vermutet, dass die Phosphorylierung von pRb in T-Zellen (DeCaprio *et al.*, 1992) durch CDK6 eingeleitet wird. Weiterhin wird angenommen, dass CDK4 und das homologe CDK6 das Verbindungsglied zwischen der Stimulation der Wachstumsfaktoren und dem Beginn der Zellzyklusprogression darstellen.

2 Das Baculovirusexpressionsvektorsystem

Das Baculovirusexpressionsvektorsystem (BEVS) ist eines der leistungsfähigsten eukaryotischen Expressionssysteme. Das BEVS ist vielseitig einsetzbar, was sich in einer ständig wachsenden Zahl von damit heterolog exprimierten Genen wie Enzymen (Lawrie *et al.*, 1995; Kumar *et al.*, 2001), Antikörpern (Brooks *et al.*, 1997) und Rezeptoren (Cascio *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 2001) ausdrückt. Diese Gene stammen unter anderem aus Pilzen, Pflanzen und Säugern. Weitere wichtige Einsatzgebiete der Baculoviren sind die Herstellung von Impfstoffen und die Gentherapie (Pieroni *et al.* 2001), bei der mit Hilfe der Baculoviren Informationen zur Expression von Tumorsuppressorproteinen in Krebszellen eingeschleust werden können.

Der meist verwendete Baculovirus im BEVS ist der „*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus“ (AcNPV). Baculoviren gehören zur Familie der Baculoviridae. Der AcNPV gehört auf Grund seiner Erscheinung zur Unterfamilie der verschlossenen Baculoviren (Eubaculovirinae). Er ist der am eingehendsten untersuchte Baculovirus. Sein gesamtes Genom wurde aufgezeichnet und vollständig sequenziert (Ayres *et al.*, 1994). Die Baculoviren sind Mitglieder der Gruppe der doppelsträngigen DNA-Viren und infizieren verschiedenste Insektenarten, die ihre natürlichen Wirtsorganismen darstellen. Die einzelnen Virusstämme besitzen eine hohe Wirtsspezifität und propagieren nicht in Wirbeltieren. Die Größe der zirkulären Genome reicht von 80 bis 200 kbp. Das Genom des AcNPV besitzt 130 kbp. Der Name *Baculovirus* leitet sich vom reiskornartigen Aussehen des Capsids der Viruspartikel ab. Die Viruscapside haben einen Durchmesser von 40-50 nm und eine Länge von 200-400 nm (Harrap, 1972). Die Capside sind in ihrer Länge dehnbar und können somit auch durch rekombinante Gene vergrößerte Genome aufnehmen. Im Innern der Capside ist das Baculovirusgenom in eine Nukleoproteinstruktur eingebettet, die Core genannt wird. Dieser DNA-Core bildet zusammen mit dem viralen Capsid das Nucleocapsid.

Zu den ungefähr 30 natürlichen Wirten des AcNPV gehört die Raupe von *Spodoptera frugiperda*. Aus Ovarienzellen dieser Spezies wurden permanente Insektenzelllinien isoliert und kloniert (Vaughn *et al.*, 1977), die traditionell für das BEVS eingesetzt werden. Die hier verwendete Zelllinie Sf9 stellt einen Subklon der ursprünglich isolierten Linie IPLB-Sf-21AE, oder auch als Sf-21 bezeichnet, dar. Sf9-Zellen können in Adhäsions- und Suspensionskultur gehalten werden. Sie besitzen einen Durchmesser von 14-16 µm und verdoppeln sich in der exponentiellen Wachstumsphase alle 18–24 Stunden. Wegen ihrer regelmäßigen Form bilden

Sf9-Zellen gleichmäßige Monoschichten und Plaques, was für Neulinge auf dem Gebiet der Baculovirusexpression von Vorteil ist.

2.1 Vergleich mit bakteriellen Expressionssystemen

Die bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen hat gewichtige Vor- aber auch Nachteile. Im Allgemeinen ist dieses Expressionssystem sehr günstig. Bakterien stellen keine hohen Ansprüche an Laborausstattung und Medien. Viele Proteine werden in hohen Ausbeuten gewonnen und können in Medizin und Forschung verwendet werden. Bakterien sind stammesgeschichtlich sehr einfache Organismen. Ihnen fehlen viele Maschinerien höherer Organismen, die für die korrekte Faltung von rekombinanten Proteinen und deren posttranslationale Modifikationen verantwortlich sind. Aus diesem Grund wird eine große Zahl von Proteinen in unlöslichen Einschlusskörpern exprimiert. Für einige Proteine konnten teils aufwendige Protokolle zur korrekten Rückfaltung gefunden werden. Doch für viele Proteine war das nicht möglich oder sie blieben wegen fehlender posttranslationaler Modifikationen biologisch inaktiv. Das BEVS birgt den Vorteil, dass die Expression der rekombinanten Proteine in einem stammesgeschichtlich höher entwickelten Organismus abläuft. Insektenzellen besitzen Werkzeuge zur Proteinfaltung und posttranslationalen Modifikation. Die Insektenzelle ist in der Lage, folgende posttranslationale Modifikationen durchzuführen:

- Phosphorylierung
- Glykosylierung
- Abspaltung von Signalpeptiden
- Acylierung
- Intron-Spleißen
- Modifikation mit Fettsäuren

Diese Modifikationen sind oft mit denen aus ihrer natürlichen Umgebung isolierten Proteinen identisch oder zumindest sehr ähnlich. Die rekombinant gewonnenen Proteine besitzen somit ihre volle biologische Aktivität und lösen keine unerwünschten Immunreaktionen aus. Gegenüber anderen üblichen eukaryotischen Expressionssystemen besitzt das BEVS eine meist hohe Expressionsleistung, die in vielen Fällen an die in Bakterien heranreicht. Außerdem stellen Insektenzellen weniger Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen und die Laborausstattung als humane Zelllinien, da Baculoviren a priori eine Wirtsspezifität besitzen und

eine Infektion von Menschen somit ausgeschlossen ist. Das Expressionssystem mit Baculoviren nimmt somit eine Zwischenstellung zwischen der bakteriellen Expression und der Expression in Säugerzellen ein.

2.2 Lebenszyklus des Baculovirus AcNPV

Um die Wirkungsweise des BEVS zu verstehen, wird zuerst der Lebenszyklus des AcNPV in Natur und anschließend in der Zellkultur skizziert. Es folgt eine kurze Beschreibung der Herstellung von rekombinanten Baculoviren.

Der AcNPV tritt in zwei unterschiedlichen Erscheinungsformen auf. Die Form, die für die horizontale Verbreitung des Virus innerhalb Wirt verantwortlich, ist der knospende Virus (engl: **budded virus**; **BV**). Der umschlossene Virus (engl.: **occluded virus**; **OV**) hingegen übernimmt die vertikale Verbreitung des AcNPV zwischen verschiedenen Individuen. Der OV ist in eine proteinöse virale Struktur eingebettet, die Polyhedra bezeichnet wird. Die Polyhedra besteht aus einer kristallinen Proteinmatrix. Das Matrixprotein heißt Polyhedrin, dessen Kristallstruktur 1986 von Rohmann aufgeklärt wurde. Die Polyhedrin-Matrix mit ihren zahlreich eingebetteten OV's wird „polyhedral occlusion body“ (PIB) genannt. Die PIB's besitzen eine als calyx bekannte kohlenhydratreiche Oberflächenbeschichtung. In den PIB's ist der Baculovirus vor Witterungseinflüssen geschützt.

Der Lebenszyklus beginnt mit der Aufnahme der PIB's durch einen potentiellen Wirt während der Nahrungsaufnahme. Im Darm der Raupe wird die Proteinmatrix verdaut und die OV's werden freigesetzt. Die Viruspartikel dringen in die Zellen der Darmwand ein und wandern zum Zellkern. An der Wand des Nukleus wird das Capsid zurückgelassen und die nackte DNA dringt in den Zellkern ein. 6 Stunden nach der Infektion startet die Replikation der viralen DNA. 10 bis 12 Stunden P.I. (lat.: post infectionem, nach Infektion) beginnt die Knospung des BV an der Oberfläche der Zellen. Das Capsid des BV besteht aus einem Teil der Zellmembran, die nun die Virus-DNA lose umgibt. Diese Virenform infiziert nun benachbarte Zellen. In der späten Phase (18-24 Stunden P.I.) der Infektion wird die Expression des Polyhedrins gestartet. Es entstehen die Proteinmatrices, in denen die Viruspartikel eingebettet werden. Das Niveau an BV's erreicht nach 38-46 Stunden P.I. sein Maximum mit bis zu 1×10^8 pfu/ml. Im Nukleus häufen sich die PIB's in großer Zahl an und die Zelle beginnt zu lysieren (72 Stunden P.I.). Nach vier bis fünf Tagen verändern sich Aussehen und Verhalten der Raupen. Sie hören auf zu fressen und werden träge. Der Virusbefall verflüssigt die Rau-

pen von innen heraus. Nach dem Tod des Wirts werden die PIB's freigesetzt und können von anderen Raupen aufgenommen werden.

Tab. 2-1: Zyklus des Baculovirus und sichtbare Zeichen der Infektion in der Zellkultur

Stadium der Infektion	Zeit nach der Infektion in Stunden	Vorgänge in der Zelle	Sichtbare Zeichen
früh	0-6	Die Zellen werden für die virale Replikation umprogrammiert Neuordnung des Cytoskeletts	Anschwellen des Nukleus
früh bis spät	6-24	Produktion von BV's Extensive Virusreplikation	Anschwellen von Zelle und Nukleus, Nukleus füllt die Zelle fast vollständig aus Virale Knospung; Zellen erscheinen körnig
spät	20-24	Produktion von OV's Produktion von BV's wird beendet	PIB's häufen sich im Zellkern an PIB's schimmern intensiv durch Lichtbrechung bei Betrachtung unter dem inversen Mikroskop
sehr spät	72+	Faseriges Material akkumuliert im Zellkern; hauptsächlich Protein p10 Zelle stoppt Proteinsynthese und lysiert	Zellen lysieren

In der Zellkultur kann man nach Infektion von Sf9-Zellen mit AcNPV die verschiedenen Stadien des Virusbefalls eingehend untersuchen. Die Tabelle 2-1 fasst die Beobachtungen zusammen. Man erkennt, dass für die Infektion von Sf9-Zellen in der Zellkultur der knospende Virus ausreichend ist. Gene, die für die Bildung der PIB's notwendig sind, können somit aus dem Genom entfernt werden oder gegen andere rekombinante Gene ersetzt werden (Abb. 2-4). Nach eingehender Untersuchung des Genoms des AcNPV konnten mehrere Gene identifiziert werden, die für die Vermehrung des Baculovirus nicht essentiell sind. Dazu zählen die Gene für Polyhedrin (Smith *et al.*, 1983) und p10 (Kuzio *et al.* 1984). Das Polyhedringen kodiert ein Protein (29 kDa), das als Proteinmatrix für die darin eingebetteten Nukleocapside dient (O'Reilly *et al.*, 1992). Das Gen wird in der sehr späten Phase der Infektion, die etwa 20-24 Stunden nach der Infektion beginnt, exprimiert. Das Polyhedrin akkumuliert sich in den infizierten Insektenzellen in einer Größenordnung von 0,5 bis 1g/ml. Dies entspricht ungefähr

50 % der gesamten Proteinmenge der Zellen. Die Transkription des Polyhedrins wird durch die Bindung von Faktoren an Sequenzen im untranslatierten Bereich des Promotors aktiviert (Gross *et al.*, 1992). Diese Sequenzen sind für die sehr hohen Expressionsraten während der sehr späten Phase der Infektion verantwortlich.

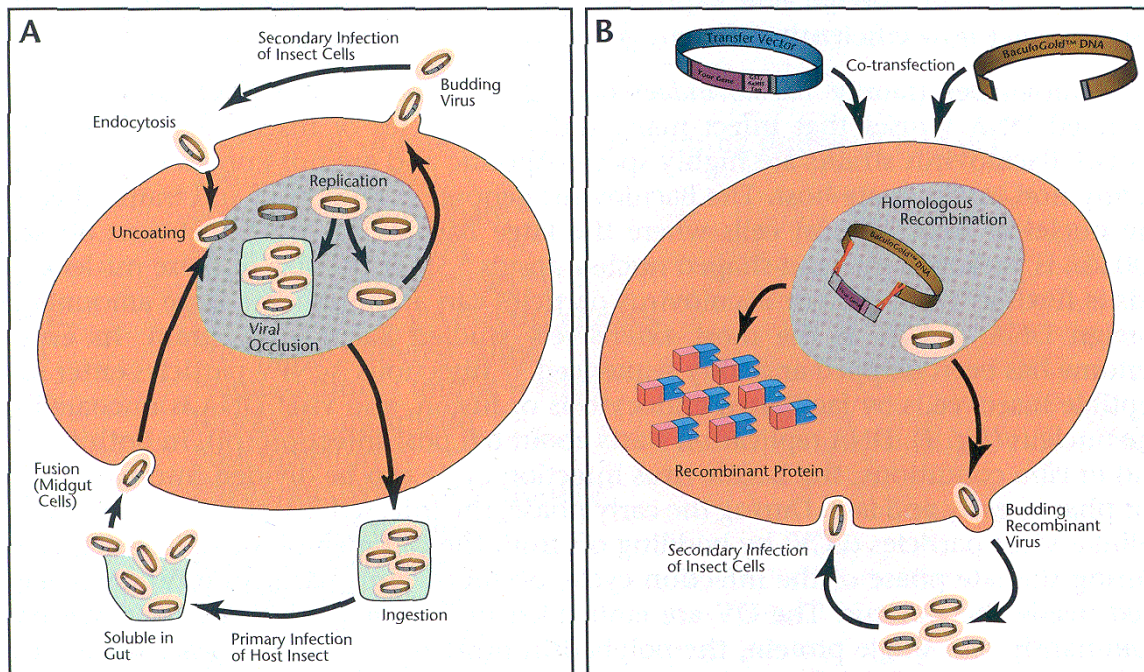


Abb. 2-4: Lebenszyklus des Baculovirus AcNPV in der Natur (A) und des rekombinanten Virus in der Zellkultur (Quelle: Baculovirus Expression Vector System, User manual; 6th Edition, May 1999; Pharmingen)

Während der Bildung der PIB's sammelt sich auch eine große Menge an faserartigem Material in Zellkern und Zytoplasma an. Das 10 kDa große Protein p10 ist der Hauptbestandteil dieses Materials (VanDerWilk *et al.*, 1987). Es wird vermutet, dass das Protein bei der Zelllyse eine Rolle spielt (Williams *et al.*, 1989). Für die Regulation des p10-Promotors wird ein ähnlicher Mechanismus wie bei dem Polyhedrinpromotor angenommen (Qin *et al.*, 1989).

Beide Promotoren enthalten TAAG-Sequenzen, die in besonderem Maße für die späte und sehr späte Promotoraktivität verantwortlich und im restlichen AcNPV Genom sehr selten anzutreffen sind (Posse *et al.*, 1987; Rohrman, 1986). Die späte Transkription ist abhängig von der Replikation der viralen DNA und der frühen viralen Genexpression (Huh *et al.*, 1990; Thiem *et al.*, 1989). Die späten und sehr späten Promotoren sind sehr kompakt und behalten ihre Funktionalität auch nach Verschieben ihrer Position im Genom.

Daneben werden seltener auch Promotoren der späten Phase der Infektion verwendet. Dazu zählt der „Basic Protein“-Promotor (Hill-Perkins *et al.*, 1990). Da diese Promotoren schon nach 16-20 Stunden starten, wird angenommen, dass die exprimierten Proteine in höherem Maße phosphoryliert oder glykosyliert werden.

2.3 Rekombinante Baculoviren

Die Herstellung von rekombinanten Baculoviren lässt sich in folgende Schritte unterteilen:

- **Integration des gewünschten Gens in einen Transfervektor:** Da ein direktes Klonieren von Genen in die Baculovirus-DNA wegen der Vielzahl der Schnittstellen für Restriktionsenzyme nahezu unmöglich ist, verwendet man für diese Aufgabe sogenannte Baculovirus-transfervektoren. Diese Vektoren beinhalten den entsprechenden Baculoviruspromotor mit anschließender Klonierungsstelle zur leichten Insertion des Gens. Dieser Bereich wird von DNA-Sequenzen aus dem AcNPV-Genom, an denen sich dort der Promotor befindet, flankiert. Das Rückgrat des Transfervektor besteht aus einem pUC-Derivat, was eine Selektion und Amplifikation des Plasmids in *E. coli* ermöglicht.
- **Homologe Rekombination:** Nach dem Einfügen des gewünschten Gens in den Transfervektor wird dieser amplifiziert. Nun werden die Insektenzellen mit dem Transfervektor und linearisierter Baculovirus-DNA co-transfiziert. Dadurch werden beide DNA-Stränge in die Zellen eingeschleust, wo durch homologe Rekombination eine vollständige Virus-DNA entsteht. Um die Ausbeute an rekombinanter Virus-DNA zu erhöhen, enthält die eingesetzte lineare Baculovirus-DNA letale Deletionen, die die Bildung von funktionalen Viren verhindern. Erst durch die homologe Rekombination werden diese Deletionen durch DNA-Sequenzen auf dem Transfervektor aufgefüllt. Die Zelle produziert nun das rekombinante Baculovirus.
- **Identifikation und Isolation der rekombinanten Baculoviren:** Im nächsten Schritt muss das rekombinante Baculovirus von möglichen Wildtyp-Viren gereinigt und identifiziert werden. Dies geschieht durch den sogenannten Plaque-Test oder Plaque-Assay. Dabei werden Zellen mit Baculoviren in hoher Verdünnung infiziert und mit einer Agaroseüberschichtung immobilisiert. Nach mehreren Tagen bilden sich durch Virenbefall die typischen einzelnen Plaques im Zellrasen. Die Viren aus diesen Plaques werden amplifiziert und mittels PCR auf Anwesenheit von Wildtyp-Viren und des gewünschten Gens untersucht. Nur reine rekombinante Viren ohne Verunreinigung mit Wildtyp werden für die Proteinexpression verwendet.

- **Proteinexpression:** Der rekombinante Virus wird amplifiziert. Nach Bestimmung des Titers können Zellkulturen mit großen Volumina für die Proteinexpression mit dem Virus infiziert werden.

2.4 Faktoren für hohe Proteinausbeute

In den letzten beiden Jahrzehnten wurden umfangreiche Untersuchungen unternommen, um die Faktoren für eine hohe Proteinausbeute zu ermitteln. Die erste wichtige Größe ist die Zusammensetzung des Insektenzellenmediums. Es wurden eine Reihe von Medien entwickelt (Hink, 1970; Doverskog *et al.*, 1998; Ferrance *et al.*, 1993), die eine gute Proliferation der Zellen gewährleisten. Die Verwendung von Additiven zur serumfreien Kultivierung war ebenfalls Gegenstand intensiver Forschungen (Palomares *et al.*, 2000). Mit diesen Medien wurden zahlreiche Wachstumsstudien durchgeführt (Bedard *et al.*, 1993; Öhman *et al.*, 1996; Rhiel *et al.*, 1997; Doverskog *et al.*, 1998; Mendonça *et al.*, 1999; Taticek *et al.*, 2001). Dabei wurde auch der Verbrauch und die Bildung von Kohlehydraten, Aminosäuren und anderen Stoffwechselprodukten untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Mengen an Aminosäuren gelegt, die für ein gesundes Zellwachstum nötig sind. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass einige Aminosäuren für die Insektenzellen nicht essentiell sind. Zu diesen Aminosäuren gehören Glutamin, Glutaminsäure, Asparagin, Asparaginsäure, Alanin und mit Einschränkung auch Cystein. Glutamin kann in Anwesenheit von freiem Ammonium aus der Glutaminsäure gebildet werden. Sf9-Insektenzellen sind in der Lage, in Medien mit bis zu 20 mM NH₄Cl ohne negative Auswirkungen zu wachsen. Auch Asparaginsäure kann effizient über den Zitrat-Zyklus aus Glutamin und Glutaminsäure gebildet werden. Alanin wird in großen Mengen als Abfallprodukt während des Zellwachstums gebildet. Cystein kann aus dem Medium entfernt werden, wenn die Passage der Zellen in der frühen Phase der Fermentation (weniger als 60 Stunden) erfolgt. Zu den für das Wachstum von Insektenzellen essentiellen Aminosäuren gehören nach dem heutigen Stand Arginin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin (Mitsuhashi *et al.*, 1982). Ein weiterer Aspekt ist die Bedeutung der chemisch nicht definierten Bestandteile Hefeextrakt und fötales Kälberserum in den Medien. Untersuchungen zeigten, dass bei Zugabe von Hefeextrakt vierfach höhere Zelldichten erreicht werden (Kim *et al.*, 1999). Man vermutet, dass Hefeextrakt Vitamine und andere Wachstumsfaktoren bereitstellt, die das Zellwachstum fördern. Es wurden weiterhin Medien entwickelt, in denen Kälberserum durch definierte Lipidmischungen ersetzt werden konnte.

Ein weiteres Ziel der Forschung ist es, durch geeignete Fütterungsstrategien (Kim *et al.*, 2000; Doverskog *et al.*, 2000; Mendonça *et al.*, 1999; Chiou *et al.*, 2000) höhere Zelldichten, die für eine hohe Proteinausbeute erforderlich sind, zu erreichen. Als Möglichkeiten bieten sich der komplette oder teilweise Medientausch oder die Zugabe verschiedener Komponenten wie Glukose, Hefeextrakt oder Aminosäuren an. Ein partieller oder gesamter Austausch von Medium erhöht die maximal erreichbare Zelldichte. Ein Medientausch verhindert auch, dass sich toxische Abfallprodukte in starkem Maße anreichern und das Wachstum negativ beeinflussen. Durch gezielte Zugabe von Glukose kann deren Verbrauch ausgeglichen werden. Höhere Zelldichten sind somit über einen längeren Zeitraum erreichbar. Obwohl keine Aminosäure zur Gänze verbraucht wird, wirkt sich die Zugabe von Aminosäuremischungen positiv auf Vitalität und Zelldichte aus. Es wurden auch Untersuchungen zu Auswirkungen der Zugabe von einzelnen Aminosäuren durchgeführt.

Die Proteinausbeute wird auch sehr stark vom Zeitpunkt der Infektion und der dabei verwendeten MOI (Verhältnis von Zahl der Viruspartikel zur Zellzahl) beeinflusst (Jesnionowski *et al.*, 1997; Bedard *et al.*, 1994). Der Zeitpunkt der Infektion bestimmt Alter und Nährstoffgehalt des Mediums und die Zelldichte. Allgemein lässt sich sagen, dass Kulturen mit hoher Zelldichte und wegen fortgeschrittenen Alters abgenommener Nährstoffgehalte eine höhere MOI von 5-8 benötigen, um eine hohe Proteinausbeute zu gewährleisten. Auch eine Zugabe von Nährstoffen oder Medientausch erhöhen bei solchen Kulturen die Proteinmenge. Kulturen mit geringer Zelldichte müssen mit niedriger MOI (unter 1) infiziert werden. Dies erlaubt den Zellen sich anfänglich weiter zu teilen, um eine höhere Zelldichte zu erreichen. Es wurde auch gezeigt, dass man aus der sich nach der Infektion ändernden Zellgröße Rückschlüsse auf die Proteinproduktion ziehen kann (Palomares *et al.*, 2001).

3 Grundlagen zu den verwendeten analytischen Methoden

3.1 Kernresonanzspektroskopie

Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments μ eines Atomkerns mit einem äußeren magnetischen Feld \mathbf{B}_0 . Unter dem Einfluss des äußeren Feldes resultieren für Atomkerne mit einem Spin $1/2$ ($\mathbf{m} = 1/2$) zwei mögliche Energieniveaus, die sogenannten Kern-Zeeman-Niveaus. Das entspricht einer Einstellung des Kernspins parallel (\uparrow , $+1/2$) bzw. antiparallel (\downarrow , $-1/2$) zum äußeren Hauptfeld. Die Energie dieser Niveaus ergibt sich aus der klassischen Formel für einen magnetischen Dipol

in einem homogenen Magnetfeld der Stärke \mathbf{B}_0 (mit γ gyromagnetischen Verhältnis und \hbar das Plancksche Wirkungsquantum):

$$E = -\mu_z B_0 = -m \gamma \hbar B_0 \quad (1)$$

Das magnetische Moment μ jedes Kerns rotiert in einer Präzessionsbewegung um die Richtung des Feldes \mathbf{B}_0 , dessen Frequenz als Larmorfrequenz (ω_0) bezeichnet wird. Sie entspricht der Resonanzfrequenz des Kerns und damit der Übergangsfrequenz zwischen den Energieniveaus:

$$\gamma B_0 = \Delta E = h \nu = \omega_0 \Rightarrow \omega_0 = \gamma B_0 \quad (2)$$

Die Larmorfrequenz ist abhängig vom gyromagnetischen Verhältnis γ , das für jede Kernsorte spezifisch ist, sowie von der Stärke des Hauptfeldes \mathbf{B}_0 . Bei einer Magnetfeldstärke von 18,7 T beträgt zum Beispiel die Larmorfrequenz für Protonen 800 MHz. Sie liegt also im Bereich von Radiowellen.

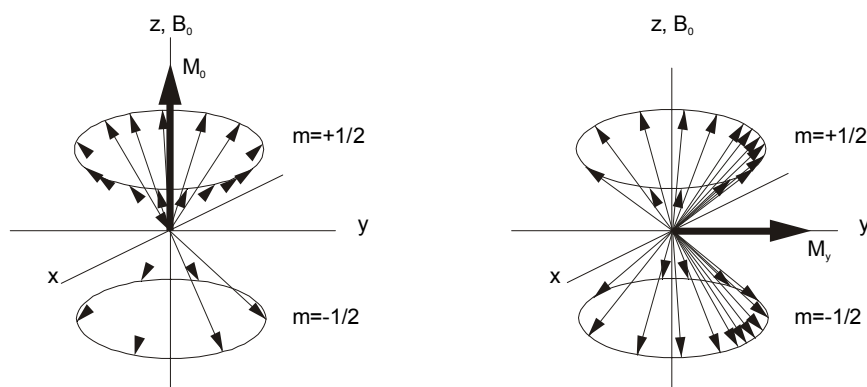


Abb. 2-5: Veranschaulichung der longitudinalen (links) und transversalen (rechts) Magnetisierung. Nach einem 90° Puls sind die beiden Energieniveaus gleichbesetzt (rechts). Einige Kernspins präzedieren gebündelt in Phase um die Feldrichtung B_0 . Ihre magnetischen Momente summieren sich zur makroskopischen Magnetisierung M_y auf.

Überträgt man dies von einem isolierten Kern auf ein Ensemble gleicher Spins, wie es in einer NMR-Probe anzutreffen ist, so summieren sich die einzelnen magnetischen Momente der Kerne zu einer makroskopischen Magnetisierung (Abbildung 2-5). Aufgrund des Fehlens einer Phasenkohärenz mitteln sich die x/y-Anteile der Magnetisierung \mathbf{M}_{xy} aus (d.h. $M_{xy} = 0$), während die Magnetisierung in z-Richtung durch die geringfügig höhere Besetzung der parallel zum Hauptfeld orientierten Spins zu einer makroskopischen longitudinalen Magnetisie-

rung M_z führt. Die höhere Besetzung des energieärmeren Zustands ist auf die Größe des Energieunterschieds zwischen der parallelen und antiparallelen Orientierung zurück zu führen, der im Größenbereich der thermischen Bewegung liegt und daher entsprechend der Boltzmannverteilung besetzt wird.

3.1.1 Das 1D-Experiment

Jedes 1D- NMR-Experiment besteht aus zwei Phasen, der Präparation und der Detektion. Während der Präparation wird das Spinsystem in einen definierten Zustand gebracht. Die Präparation eines Spinsystems besteht im einfachsten Fall aus einem kurzen, starken Anregungspuls auf die Gleichgewichtsmagnetisierung M_z (ca. 10 μ s) aus der x-Richtung. Bei geeigneter Wahl der Pulsdauer wird die Magnetisierung von ihrer ursprünglichen Orientierung entlang der z-Achse vollständig zur y-Achse hin geklappt (Abbildung 2-6).

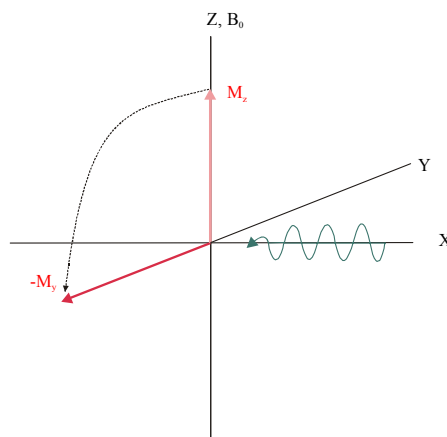


Abb. 2-6: Wirkung eines 90°-Pulses auf die z-Magnetisierung: Der aus der x-Richtung kommende Puls (grüner Pfeil) dreht die z-Magnetisierung (rosa) rechtshändig um 90° um die x-Achse. Es entsteht (-y)-Magnetisierung (rot).

Nach diesem 90°-Puls präzedieren die verschiedenen Kerne mit ihren unterschiedlichen Larmor-Frequenzen um die z-Achse und induzieren in einer Empfängerspule eine Spannung, die registriert und abgespeichert wird. Da die Spannung während der T_2 -Relaxation abnimmt, werden die gesammelten Daten als FID (**F**ree **I**nduction **D**ecay, freier Induktionszerfall) bezeichnet (Abbildung 2-7).

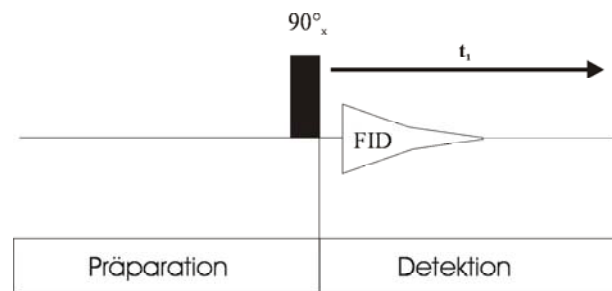


Abb. 2-7: Schematische Darstellung der Pulssequenz eines eindimensionalen NMR-Experiments. Die Präparation, ein einzelner 90° -Puls, ist hier durch einen schwarzen Balken dargestellt. Direkt anschließend wird während der Detektion die Antwort des Spinsystems (FID) auf diesen Puls registriert.

Keht die Magnetisierung wieder zu ihrem Gleichgewichtswert zurück (Relaxationsdelay), werden die einzelnen Daten aufaddiert und durch Fourier-Transformation von der Zeitdomäne in Frequenzdaten übersetzt.

3.1.2 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie; das HSQC-Experiment

Das Signal-Rausch-Verhältnis eines Experiments hängt unter anderem von den gyromagnetischen Verhältnissen des angeregten und des detektierten Kerns ab. Direkte Anregung und Detektion der Heterokerne ist deshalb verglichen mit ^1H äußerst ungünstig. Es werden deshalb Experimente verwendet, die die große Magnetisierung eines Protons praktisch verlustfrei auf einen daran gebundenen isotopenangereicherten Kern wie ^{13}C oder ^{15}N übertragen und umgekehrt. Dadurch kann ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden.

Das HSQC-Experiment (**h**eteronuclear **s**ingle **q**uantum **c**oherence) ist das wichtigste Experiment für den Übertrag von Magnetisierung auf einen Heterokern und wieder zurück. In einem 2D-HSQC-Spektrum wird die Stickstofffrequenz (ω_1) mit der Frequenz des gebundenen Amidprotons (ω_2) innerhalb einer ^{15}NH -Gruppe verknüpft. Die Signale im Spektrum repräsentieren somit ein an ein ^{15}N -Atom gebundenes Proton, d.h. das Spektrum besteht im wesentlichen aus den Signalen der H^{N} -Protonen des Proteinrückgrats und zusätzlich aus den Signalen der NH_2 -Gruppen der Seitenketten von Aminosäuren wie Arginin oder Glutamin. Überlappende Amidprotonenresonanzen können durch die Entzerrung des Spektrums in die Stickstoffdimension deutlich getrennt dargestellt werden. Analoge Experimente lassen sich für ^{13}C und ^1H durchführen.

Das HSQC-Spektrum spielt eine wichtige Rolle bei der sogenannten Signalzuordnung in der NMR-Spektroskopie. Es enthält die Informationen über die räumliche Struktur des Prote-

ins. Nach Zuordnung der Signale zu den einzelnen Aminosäuren ist die Durchführung von Bindungsstudien möglich. Das HSQC-Spektrum erlaubt auch die Untersuchung von Bindungskinetiken und die Bestimmung von Bindungskonstanten einzelner Protein-Liganden-Komplexe.

3.1.3 Wichtige spektrale Parameter

Chemische Verschiebung

Die exakte Resonanzfrequenz einer bestimmten Kernsorte hängt in charakteristischer Weise von der Kernumgebung ab. Die den Kern umgebenden Elektronen erzeugen ein schwaches Magnetfeld, das den Atomkern geringfügig vom Hauptfeld \mathbf{B}_0 abschirmt. Die am Kernort entstandene effektive Magnetfeldstärke \mathbf{B}_{eff} unterscheidet sich von \mathbf{B}_0 um das induzierte Feld. Durch eine unterschiedliche chemische Umgebung der Kerne sind deshalb Unterschiede in den Larmor-Frequenzen der einzelnen Kerne zu beobachten. Dieser Effekt wird als chemische Verschiebung δ bezeichnet und ist für die verschiedenen Positionen der einzelnen Signale in einem NMR-Spektrum verantwortlich. Der Wert der chemischen Verschiebung eines Signals wird in ppm (**p**arts **p**er **m**illion) definiert:

$$\delta = \frac{\omega_{\text{signal}} - \omega_{\text{referenz}}}{\omega_{\text{referenz}}} \cdot 10^6 [\text{ppm}] \quad (3)$$

Die chemische Umgebung der Atomkerne in einem Protein wird hauptsächlich durch den Aminosäuretyp charakterisiert. Zudem übt die Struktur des Proteins einen erheblichen Einfluss auf die chemische Umgebung der Atomkerne aus, da hierdurch feste Konformationen und fixierte elektrostatische Wechselwirkungen aufgebaut werden. Demzufolge verändert sich die chemische Verschiebung von Aminosäuren, die in Sekundärstrukturen involviert sind, entsprechend der Sekundärstruktur typischen Tendenz. Dies zeigt sich zum Beispiel in einer Tieffeldverschiebung für H^α -Protonen in β -Strängen und einer Hochfeldverschiebung der H^α -Protonen in helicalen Regionen. Durch die strukturabhängige Veränderung der chemischen Verschiebung kann über die Signaldispersion im Spektrum bereits eine Aussage über das Vorhandensein einer Struktur getroffen werden.

Linienbreite

Die Linienbreite der Signale im 1D-Spektrum hängt außer von Feld-Inhomogenitäten noch von den longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten T_1 und T_2 des betreffenden Kerns

ab. Eine Verkleinerung der beiden Relaxationszeiten resultiert in einer Verbreiterung der Resonanzlinien. Ein besonderer Effekt ist die auf Austauschphänomene zurückgehende Linienverbreiterung. Dabei ist zwischen intermolekularen und intramolekularen Prozessen zu unterscheiden. Als Beispiel für intermolekulare Prozesse kann der Protonen-Transfer dienen, bei dem aufgrund von De- und Reprotonierungsreaktionen ein chemischer Austausch des betreffenden Protons des Moleküls gegen andere Protonen, wie die des Lösungsmittels, stattfindet. Die Lebensdauer der Resonanzen hängt aber auch von Flexibilität und Beweglichkeit des Proteins ab, den so genannten intramolekularen Prozessen. Die Korrelationszeit τ_c des Proteins ist ein Maß für dessen Rotationsgeschwindigkeit und zeigt den Zusammenhang zwischen Viskosität der Lösung η , Radius a und Temperatur T (k_b entspricht der Boltzmannkonstante).

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta a^3}{3k_b T} \quad (4)$$

Die Linienbreite kann daher Hinweise zu der Molekülgröße und des Aggregationszustandes eines nicht zu großen Proteins herangezogen werden. Bei Proteinen mit einer Masse über 30 kDa können keine verlässlichen Aussagen getroffen werden.

3.2 Osmolalität

Unter Osmolalität versteht man die Konzentration aller osmotisch aktiven Teilchen in einem Kilogramm einer Flüssigkeit. Die Osmolalität ist eine wichtige Größe in der Zellkultur, da eukaryotische Zellen nur in einem engen Bereich der Osmolalität existieren können. Im Folgenden werden die physikalischen Grundlagen kurz skizziert.

3.2.1 Die Gefrierpunktserniedrigung - eine kolligative Eigenschaft

Stehen zwei Phasen bei bestimmter Temperatur und Druck im Gleichgewicht, so sind die chemischen Potentiale der beiden Phasen gleich:

$$\mu_s = \mu_l \text{ oder } \mu_g = \mu_l \quad (5)$$

Hierbei ist s die Festphase, l die Flüssigkeit und g die Gasphase. Liegt in der flüssigen Phase eine Mischung vor, so gilt für das chemische Potential der Flüssigkeit:

$$\mu_A(l) = \mu_A^*(l) + RT \ln x_A \quad (6)$$

Da der Stoffmengenanteil x_A des reinen Lösungsmittels A kleiner als Eins ist, erniedrigt sich das chemische Potential des reinen Lösungsmittels von $\mu_A^*(l)$ auf $\mu_A(l)$. Bei gegebener Temperatur und gegebenem Druck ist die Phase mit dem kleinsten μ stabil. Auf Grund der Reduzierung des chemischen Potentials in einer flüssigen Mischung ergibt sich eine Siedepunktserhöhung und eine Gefrierpunktserniedrigung der Flüssigkeit. Dieses Phänomen ist in Abb. 2-8 dargestellt.

Im Falle des Schmelzpunktes sind die chemischen Potentiale der beiden Phasen gleich. Wenn man annimmt, dass die feste Phase aus reinem Lösungsmittel A besteht gilt folgende Beziehung:

$$\begin{aligned}\mu_A(l) &= \mu_A(s) \\ \mu_A^*(l) &= \mu_A^*(s) + RT \ln x_A\end{aligned}\quad (7)$$

Durch Verwendung der Beziehungen $x_A + x_B = 1$, $\mu_A^*(l) - \mu_A^*(s) = \Delta G_{Schm,m}$ erhält man nach einigen Vereinfachungen und Umformungen folgende Gleichung:

$$\delta T = \left(\frac{RT^{*2}}{\Delta H_{Schm,m}} \right) x_B \quad (8)$$

T^* ist die Schmelztemperatur des reinen Lösungsmittels, $\Delta H_{Schm,m}$ die molare Schmelzenthalpie. Für verdünnte Lösungen gilt:

$$\delta T = \left(\frac{RT^{*2}}{\Delta H_{Schm,m}} \right) m_B M_{A,m} = K_{Kr} m_B \quad (8a)$$

K_{Kr} ist die so genannte kryoskopische Konstante, m_B die Molalität von Stoff B. Da die Gefrierpunktserniedrigung nur von der Teilchenzahl und nicht von der Teilchenart abhängt, gehört dieses Phänomen zu den kolligativen Eigenschaften.

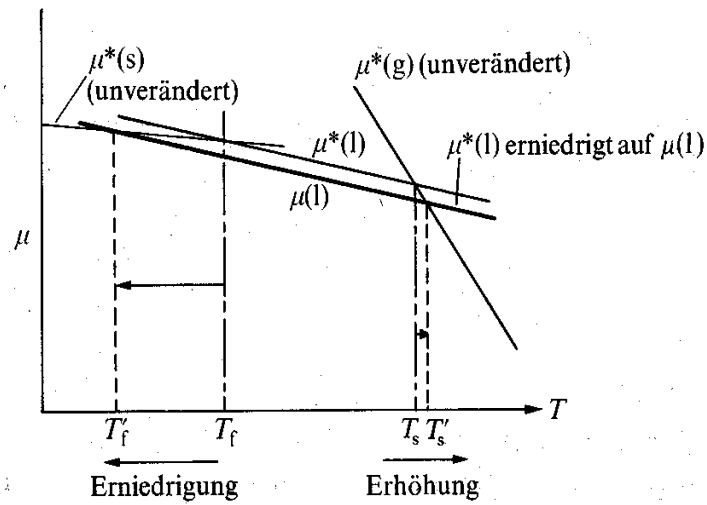


Abb. 2-8: Bei einer flüssigen Mischung sinkt das chemische Potential gegenüber dem chemischen Potential der reinen Phase. Dies bewirkt eine Siedepunktserhöhung und Gefrierpunktserniedrigung der Lösung. (Quelle: Atkins, P., W. Physikalische Chemie (1987); VCH, Weinheim)

Zur Bestimmung der Osmolalität wird die Temperatur der Messlösung unter den Gefrierpunkt abgekühlt (unterkühlte Flüssigkeit). Durch Eintauchen eines Metalldrahtes wird durch Einbringung von Impfkristallen die Kristallisation ausgelöst.

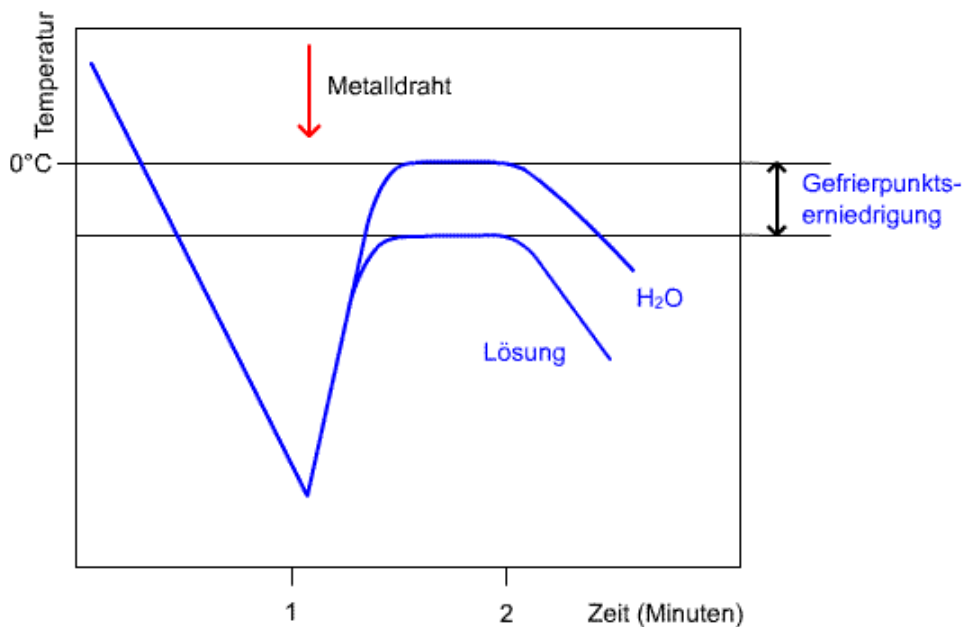


Abb. 2-9: Messprinzip zur Bestimmung der Osmolalität: die Lösung wird unterkühlt und durch Eintauchen eines Metalldrahtes wird die Kristallisation ausgelöst. Die Temperatur steigt bis zum Gefrierpunktes an und bildet ein Plateau aus.

Durch die freiwerdende Kristallisationswärme steigt die Temperatur auf den Gefrierpunkt an. Nach Ausbildung eines Plateaus sinkt die Temperatur wieder. Durch Bestimmung des Gefrierpunktes von reinem Wasser und einer Salzlösung mit bekannter Osmolalität kann durch Interpolation aus dem Gefrierpunkt einer beliebigen wässrigen Lösung deren Osmolalität bestimmt werden.

3.3 Partikelgrößenbestimmung nach dem Coulter-Prinzip

Das Coulter-Prinzip der Zählung und Größenbestimmung beruht auf der Detektion und Messung einer Widerstandsänderung die ein nicht leitfähiges Partikel bewirkt, wenn es in einem Elektrolyten suspendiert ist.

Wenn Zellen oder Partikel in einem Elektrolyten suspendiert werden, wirken sie als diskrete Isolatoren. Beim Ansaugen solch einer Suspension durch eine zylindrische Kapillaröffnung (Apertur) generiert der Durchtritt jedes einzelnen Partikels sofort eine Änderung der Impedanz des Elektrischen Feldes zwischen zwei eingetauchten Elektroden, die auf beiden Seiten der Kapillare angebracht sind (Abb. 2-10). Aus dem Durchtritt jedes einzelnen Teilchens durch die Apertur resultiert ein elektrischer Impuls, der für die Zählung und Größenbestimmung verwendet werden kann. Die Methode ist unabhängig von der Partikelform, -farbe und -dichte.

Während die Anzahl der elektrischen Impulse die Partikelzahl angibt, hängt die Amplitude des Impulses vom Volumen des Teilchens ab. Der effektive Widerstand zwischen den Elektroden hängt vom Widerstand des Elektrolyten in der Kapillaröffnung ab. Eine Zelle innerhalb der Apertur erhöht den Widerstand in Abhängigkeit vom Volumen des Teilchens. Theoretische und praktische Untersuchungen über das Verhalten von Partikeln in einer Kapillaröffnung zeigen, dass die Höhe des elektrischen Impulses, der durch das Teilchen hervorgerufen wird, eine charakteristische Größe ist, die annähernd proportional zum Zellvolumen ist. Diese Methode ermöglicht über elektronische Auswahl der ausgelösten Impulse die selektive Zählung von Partikeln in sehr engen Größenverteilungen. Gelegentlich befinden sich mehrere Partikel in der Apertur (Koinzidenz). In diesem Fall wird nur ein großer Impuls erzeugt. Dies führt zu einer geringeren Zahl an gemessenen Partikeln und höheren Werten für das Partikelvolumen. Jedoch ist die Häufigkeit der Koinzidenz eine statistisch vorhersagbare Funktion der Partikelkonzentration und kann somit bei der Auswertung berücksichtigt werden.

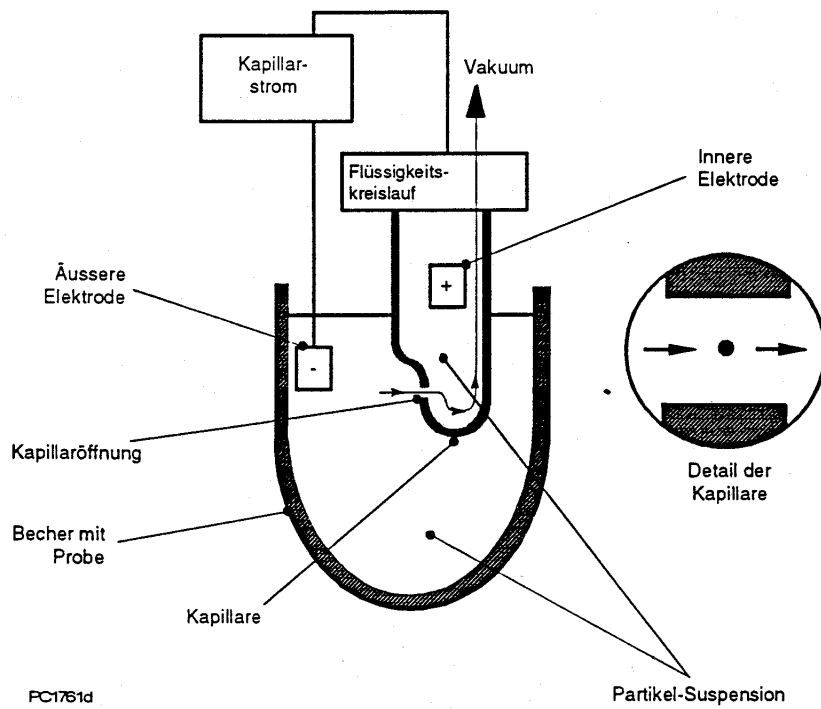


Abb. 2-10: Coulter-Prinzip zur Bestimmung von Partikelzahl und -größe (Quelle: Coulter Z1, Bedienerhandbuch; Coulter)

Materialien und Methoden

Dieses Kapitel beschreibt in ausführlicher Weise die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen und proteinchemischen Methoden. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Arbeiten nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Bei dem Baculovirusexpressionsvektorsystem wurden weitgehend die Anleitungen der Hersteller oder die Protokolle in O'Reilly *et al.* (1992) verwendet

1 Molekularbiologische Methoden

1.1 Elektrokompente *E. coli*

Die Herstellung elektrokompenter *E. coli* mit möglichst hoher Transformationseffizienz erfolgte nach einer von Invitrogen veröffentlichten Anleitung. Sie wurde bei den Stämmen DH5 α und BL21 (DE3) angewandt. Die entsprechenden Bakterien werden in 1 l frisches LB-Medium bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bis 0,6 bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Die Zellsuspension wird in zwei sterile 500 ml-Zentrifugenbecher (Beckman) überführt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen werden durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 2000 g und 4°C pelletiert. Durch wiederholtes Waschen der Zellen mit eiskaltem destilliertem Wasser wird das restliche Kulturmedium entfernt. Die Bakterien werden abschließend mit sterilem 10%igem Glycerin (auf 4°C vorgekühlt) resuspendiert. Es folgt eine 15-minütige Zentrifugation bei 4000 g und 4°C. Die kompetenten Zellen werden nach Dekantieren des Überstandes in insgesamt 1 ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Jeweils 60 μ l der Suspension werden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei –80°C gelagert.

1.2 Transformation der *E. coli*

1 μ l Plasmid oder 1-3 μ l eines Ligationsansatzes werden zu 50 μ l elektroporationskompetenter *E. coli* gegeben und in eine 1-mm-Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgt in einem Elektroporationsgerät von *Stratagene* bei einer Spannung von 1650 V. Die Suspension wird in 1 ml LB-Medium überführt und 1 h mit 180 rpm bei 37°C in einem Inkubationsschüttler geschüttelt. Es werden 1- μ l-, 10- μ l- und 100- μ l-Aliquots auf LB-Antibiotikum-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Plasmid-Kits der Firma *peqlab* (E.Z.N.A. Plasmid Miniprep I + II Isolierungsprotokolle) isoliert. Die Kits folgen im wesentlichen dem gleichen Ansatz: 10 bis 15 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum werden mit *E. coli*-Bakterien angeimpft, die das gewünschte Plasmid enthalten, und 12 bis 16 h bei 37°C im Schüttelinkubator geschüttelt. Nach 10-minütigem Abzentrifugieren bei 5000 g werden die Zellen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgeschlossen. Durch Anwesenheit von RNase A wird in diesem Schritt gleichzeitig die bakterielle RNA abgebaut. Das Lysat wird neutralisiert und auf Hochsalz-Bindungsbedingungen eingestellt. Nach dem Ausfällen chromosomaler DNA und Zelltrümmern wird der plasmidhaltige Überstand auf eine HiBind-Miniprep-Zentrifugensäule aufgetragen, mit 70%igem Ethanol gewaschen und mit 30-50 µl deionisiertem Wasser oder TE-Puffer eluiert. Die Ausbeute beträgt bei der Präparation von „High-Copy-Number“ Plasmiden etwa 3 bis 5 µg/ml Kultur.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

1.4 Verdau mit Restriktionsenzymen

Bei den Restriktionsenzymen handelt es sich um Restriktionsendonucleasen, die nur an einer bestimmten Erkennungssequenz der zu verdauenden DNA schneiden. Je nach Restriktionsenzym entstehen glatte Enden (*blunt ends*) oder kohäsive Enden (*sticky ends*) mit Basenüberhängen. Bei den Versuchen wurden die Enzyme BamHI und EcoRI von *New England Biolabs* verwendet.

Je 1 µg zu verdauender DNA wird mit 1-2 Einheiten des benötigten Restriktionsenzym gemischt und mit dem entsprechenden Schneidepuffer (siehe Herstellerangaben) bei optimaler Temperatur (37 °C) 1-2 Stunden verdaut. In einigen Fällen kann die DNA mit zwei Enzymen gleichzeitig verdaut werden. Dabei ist der vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer zu verwenden.

1.5 Ligation

Bei der Konstruktion eines rekombinierten DNA-Moleküls wird ein linearisiertes Vektormolekül mit der zu klonierenden DNA-Sequenz verknüpft. Dieser Vorgang, die Ligation, wird von einem Enzym, der DNA-Ligase, katalysiert.

Vektor und DNA werden im molaren Verhältnis 1:2 gemischt und 3-6 Stunden bei RT mit T4-DNA-Ligase von *New England Biolabs* inkubiert.

Reaktionsansatz:

Molares Verhältnis Vektor:Insert = 1:2 (Gesamtmenge ca. 300 ng)

1 µl T4-DNA-Ligase

2 µl 10 x Ligationspuffer

mit sterilem H₂O auf 20 µl Gesamtvolumen auffüllen

1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (**polymerase chain reaction**) bewirkt die selektive Vervielfältigung einer beliebigen Sequenz in einem DNA-Molekül. Voraussetzung für diesen Vorgang ist die Herstellung spezifischer Oligonukleotide (*Primer*), die zu Beginn der PCR mit dem DNA-Molekül hybridisieren. Die Reaktion findet in gut wärmeleitenden Plastikgefäßen in einem automatisch angesteuerten Thermocycler (PCR-Maschine von Eppendorf) statt. Ein typischer PCR-Verlauf besteht in der Regel aus drei unterschiedlichen Schritten:

- ein längerer Denaturierungsschritt, dem mehrere Zyklen aus kurzer Denaturierung folgen,
- die Primerhybridisierung (*Annealing*) und
- die Kettenverlängerung (*Elongation*).

Die Denaturierung erfolgt bei 94 °C, die Polymerisation bei 72 °C, der optimalen Temperatur für die meisten Polymerasen. Die Aktivität dieser DNA-Polymerasen bleibt auch nach kurzem Erhitzen auf über 90 °C erhalten. Es sollte eine Polymerase mit hoher Lesegenauigkeit gewählt werden. Dadurch wird das Auftreten von Mutationen während der DNA-Amplifikation stark verringert. Die Temperatur der Primerhybridisierung T_H sollte nahe der Schmelztemperatur des Oligonukleotids liegen. T_H gibt die Temperatur an, bei der die Hälfte des Oligonukleotids einzelsträngig vorliegt und wird nach der Länge und dem Basengehalt des Primers berechnet:

$$T_H (\text{°C}) \cong 2 (N_A + N_T) + 4 (N_G + N_C) \quad (9)$$

Diese Formel zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur gibt die jeweilige Anzahl der Primerbasen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) wieder. In die Berechnung gehen nur die Nukleotide ein, die in einer der DNA-Vorlage komplementären Sequenz enthalten sind.

1.7 Reinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten

DNA-Fragmente und PCR-Produkte wurden nach einer Arbeitsanleitung von Kits der Firmen *Qiagen* (QIAquick Gel Extraction Kit) und *peqlab* (E.Z.N.A- Cycle Pure Kit) gereinigt.

Bei der Gel-Extraktion wird die DNA direkt aus dem Agarosegel der Gelelektrophorese (siehe 3.1.10) extrahiert und gereinigt. Das DNA-Fragment wird hierzu aus dem Gel herausgeschnitten, in einem speziellen Binde-Puffer bei 50 °C gelöst und auf eine Säule geladen. Nach mehreren Waschschritten zum Entfernen der Agarose wird die DNA mit 50 µl sterilem Wasser oder EB-Puffer von der Säule eluiert.

Die Aufreinigung nach dem Cycle-Pure-Kit erfolgt ohne vorherige Agarosegel-Elektrophorese. Der Reaktionsansatz wird ebenso mit einem speziellen Binde-Puffer gemischt, durch eine HiBind-DNA Säule zentrifugiert und zur Entfernung von Salzen, freien Nukleotiden, Oligonukleotiden oder Polymerasen mehrmals gewaschen. Die Elution der gereinigten DNA erfolgt mit sterilem Wasser oder TE-Puffer.

EB-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

1.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

In Agarosegelen lassen sich in Abhängigkeit von der Konzentration der Agarose DNA-Fragmente über einen sehr weiten Größenbereich auftrennen. Es besteht hierbei eine lineare Abhängigkeit zwischen dem dekadischen Logarithmus der Länge des Fragments und der relativen Wanderungsdistanz (in cm) der DNA im Agarosegel. Eine Suspension von 0.75-2 % Agarose (je nach Größe des DNA-Fragments) wird in 1 x TBE-Laufpuffer aufgeköcht. Die Lösung wird in eine Flachbettapparatur gegossen und bis zum Erkalten stehen gelassen. Die DNA-Proben werden vor dem Auftragen mit Ladepuffer im Verhältnis 5:1 versetzt. Als Größenstandard (*Marker*) dienen DNA-Leitern von *peqlab*. Die Elektrophorese erfolgt im 1 x TBE-Laufpuffer bei 60 mA. Zur Auswertung wird das Gel 1 Minute in einer Ethidiumbromidlösung (0,1 mg/ml) geschwenkt und auf einem UV-Illuminator fotografiert.

1 x TBE-Laufpuffer: 0,09 M Trisborat; 0,002 M EDTA, pH 8.0

2 Der Umgang mit Sf9-Insektenzellen

2.1 Bestimmung der Osmolalität

Insektenzellen stellen wesentlich höhere Ansprüche an das Medium als *E. coli*. Insektenmedien sind deshalb komplizierter aufgebaut. Sie können bis zu 60 Einzelkomponenten umfassen. Insekten proliferieren nur bei einer Gesamtosmolalität zwischen 290-350 mOsm/kg. Schwankungen in der Osmolalität wirken sich auch nachteilig auf die Proteinausbeute aus. Da in der vorliegenden Arbeit selbst entwickelte Medien verwendet wurden, deren Einzelkomponenten variiert wurden, ist eine Kontrolle der Gesamtosmolalität absolut notwendig. Zur Bestimmung der Größe wurde ein Gefrierpunktsmometer verwendet. Vor Verwendung muss das Gerät mit zwei Eichlösungen kalibriert werden. Die Eichlösungen bestehen zum einen aus destilliertem Wasser und zum anderen aus einer wässrigen Natriumchloridlösung mit 300 mOsm/kg. Zur Kalibrierung werden 50 µl destilliertes Wasser in das Messgefäß gegeben. Danach bestimmt das Gerät den Gefrierpunkt. In einem zweiten Schritt wird der Festpunkt der Salzlösung bestimmt. Mit Hilfe dieser beiden Werte kann das Osmometer nun die Osmolalität einer beliebigen wässrigen Lösung bestimmen. Dazu werden 50 µl Medium in das Messgefäß gegeben und die Osmolalität bestimmt. Falls erforderlich muss die Gesamtosmolalität der Medien durch Zugabe von festem NaCl auf den gewünschten Wert angehoben werden. Da sich während der Kultivierung der Zellen die Osmolalität ändert, muss dieser Wert bei neuentwickelten Medien anfangs beobachtet werden.

2.2 Kultivierung der Insektenzellen

Insektenzellen wachsen sowohl in Adhäsions- als auch in Suspensionskultur. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 27 °C. Im Gegensatz zu humanen Zelllinien benötigen Insektenzellen keinen CO₂-Inkubator, da ein Phosphat-Puffer den pH-Wert des Mediums konstant hält. Die Verdopplungszeit von gesunden Zellen liegt bei 18-24 Stunden.

Die Adhäsionskulturen wachsen in Zellkulturflaschen ohne Filter in der Verschlusskappe. Es werden Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25, 75, und 180 cm² (TC25, TC75, TC180) verwendet. Die Zellen müssen passagiert werden, sobald der Zellrasen zu 80-90 % geschlossen ist. Aus diesem Grund müssen die Kulturen täglich unter einem inversen Mikroskop kontrolliert werden. Zum Passagieren werden die Zellen durch dosierte Schläge des Handballens gegen die Zellkulturflasche suspendiert. Sollen die Zellen vermehrt werden, wird

die gesamte Zellsuspension mit frischem vorgewärmten Medium um das 6-8-fache verdünnt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Soll nur eine konstante Zellzahl kultiviert werden, wird nur ein Teil der Zellen verdünnt und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Die nachfolgende Tabelle gibt das benötigte Volumen an Medium und die Zellzahl für eine geschlossene Monoschicht für die jeweilige Größe der Zellkulturflasche an.

Tab. 3-1: Übersicht über das Medienvolumen und die Zellzahl bei Konfluenz für verschiedene Größen der Zellkulturschalen

<i>Größe</i>	<i>Medienvolumen</i>	<i>Zellzahl bei Konfluenz</i>
TC25	3-5 ml	6 Mio.
TC 75	10-12 ml	15 Mio
TC 180	25-28 ml	36 Mio

Für Suspensionskulturen werden Rührflaschen mit dem Nennvolumen 100, 250, 500, 1000 ml verwendet. Die Rührgeschwindigkeit beträgt 90 rpm. Das Arbeitsvolumen beträgt maximal 60 % des Nennvolumens. Da hier höhere Zelldichten als bei der Adhäsionskultur erreicht werden, muss wegen der höheren Sauerstoffaufnahme der Zellen ein Gasaustausch mit der Umgebung gewährleistet sein. Die Zellen werden routinemäßig bei einer Zelldichte von 1,7-2,2 Mio. Zellen pro ml verdünnt. Zur Vergrößerung der Suspensionskultur werden die Zellen um den Faktor 4-6 verdünnt und in eine oder mehrere Rührflaschen mit dem nächst größeren Nennvolumen überführt. Bei Arbeiten mit konstantem Volumen der Suspensionskultur werden die Zellen um das 8-10-fache verdünnt. Die Zellen aus der Suspensionskultur müssen regelmäßig unter einem inversen Mikroskop kontrolliert werden.

2.2.1 Bestimmung der Zelldichte und der Zellvitalität

Die Zelldichte kann mit Hilfe eines Hemacytometers oder eines Partikelgrößenmessgeräts bestimmt werden. Beim Hemacytometer werden 100 µl Zellsuspension in die mit einem Deckglas abgedeckte Zählkammer pipettiert. Unter einem inversen Mikroskop werden die Zellen im zentralen Quadrat der Kammer ausgezählt. Nach Multiplikation dieser Zahl mit 10000 erhält man die Anzahl der Zellen pro Milliliter. Die Bestimmung der Zellzahl mit dem Partikelgrößenmessgerät hat den Vorteil, dass man neben der genauen Zelldichte auch ein Diagramm mit der Partikelgrößenverteilung erhält. Diese Verteilung gibt Aufschluss über die

Vitalität der Zellen und mögliche Kontaminationen. Kulturen mit vitalen Zellen haben eine sehr enge Partikelgrößenverteilung zwischen 13 und 19 μm , mit einem Durchschnitt von 16-17 μm . Zwischen 9 und 11 μm sind nahezu keine Partikel nachweisbar. Eine Zunahme der Partikelzahl in diesem Bereich wird durch lysierte Zellen verursacht. Partikelgrößen zwischen 1-4 μm stehen für bakterielle Kontaminationen oder Hefen. Kontaminierte oder sterbende Kulturen lassen sich so leicht erkennen. Zur Bestimmung der Zellzahl im Partikelgrößenmessgerät werden 100 μl Zellsuspension in eine von Coulter als Acuvette bezeichnetes Messgefäß mit 9,9 ml Isoton II gemischt. Das Messgefäß wird in der vorgesehenen Halterung platziert. Es sollten bei der Messung mindestens 2000 Partikel bei einem Messvolumen von 0,5 ml gezählt werden. Andernfalls muss das Messvolumen am Gerät erhöht werden. Bei der Kultivierung der Insektenzellen ist darauf zu achten, dass der Anteil an vitalen Zellen bei über 95 % liegt. Bei geringerer Vitalität müssen die Ursachen dafür (Kontaminationen oder wiederholte Passage bei zu hoher Zelldichte) gefunden werden, da bei sinkender Vitalität auch die Proteinausbeute sinkt. Die Vitalität der Zellen wird mit Trypan Blau bestimmt. Dazu wird 1 ml Zellsuspension mit 0,1 ml 0,4 % Trypan Blau in PBS versetzt und gemischt. Danach füllt man 100 μl der Mischung in eine Zählkammer und unter einem inversen Mikroskop werden die blauen, nicht vitalen Zellen ausgezählt. Das Verhältnis aus der Zahl der toten Zellen zu der zuvor bestimmten gesamten Zellzahl sollte unter 5 % liegen.

2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Insektenzellen

Nach 60-80 Passagen sollte die Zellkultur erneuert werden, da eine zu lange Kultivierung eine Verringerung der Vitalität und der Proteinausbeute bewirken kann. Dazu werden gefrorene Sf9-Insektenzellen aufgetaut und in Zellkulturflaschen ausgesät. Ein Kryogefäß beinhaltet 20 Mio. Zellen in 1 ml speziellem Medium. Vor dem Auftauen wird dieses Gefäß aus dem flüssigen Stickstoff in Trockeneis überführt. Nach 20 Minuten werden die Zellen bei 27 °C in einem Wasserbad unter ständigem Schwenken aufgetaut. Die Zellsuspension wird in 49 ml frisches und vorgewärmtes Medium gegeben. Die Zellen werden in einer Zentrifuge bei 800g für 3 min pelletiert und in weiteren 50 ml frischem Medium resuspendiert. Danach werden in zwei TC180-Flaschen jeweils 25 ml Zellsuspension ausgesät und die Zellen durch vorsichtiges Wippen der Flaschen gleichmäßig verteilt. Nach drei Tagen sollten sich die Zellen wieder täglich verdoppeln.

Nach 8-10 Passagen können aus Insektenzellen Kryokulturen angelegt werden. Dazu werden 100 Mio. Sf9-Zellen (über 95 % Vitalität) bei 800 g pelletiert und in 5 ml eiskaltem Kry-

opuffer (90 % Medium und 10 % DMSO) resuspendiert. Jeweils 1 ml wird in Kryogefäße gefüllt und gründlich verschlossen.

Die einzufrierenden Zellen werden dann für 4 Stunden bei -20°C und anschließend für 14 Stunden bei -80°C abgekühlt. Danach können sie in flüssigem Stickstoff überführt werden. Die Zellen können bis zu 24 Wochen bei -80°C gelagert werden. Für längere Zeiträume empfiehlt sich die Aufbewahrung der Gefäße in flüssigem Stickstoff.

2.3 Herstellung von rekombinanten Baculoviren

2.3.1 Transfektor

Es ist nahezu unmöglich, das gewünschte Gen direkt in die virale DNA zu integrieren. Zum einen besitzt die virale DNA keine Klonierungsseite mit einmaligen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, wie sie in prokaryotische Expressionsvektoren vorhanden sind, zum anderen kann diese rekombinante DNA nicht auf einfache Weise in Bakterien amplifiziert werden. Aus diesem Grund wurden sogenannte Transfektoren entwickelt, die in Bakterien amplifiziert werden können und die übliche Klonierungsseite besitzen. Die Klonierungsseite ist an beiden Enden von DNA-Sequenzen umgeben, die Teile von ORF603 und ORF1629 aus der Baculovirus-DNA enthalten. Diese beiden ORFs flankieren den Locus des Polyhedrinogens in der AcNPV-DNA. Die Integration des gewünschten Gens in den Transfektor kann nun mit den oben beschriebenen molekularbiologischen Methoden durchgeführt werden. Das ColE1-Origin ermöglicht eine Replikation des Vektors in hoher Kopienzahl in *E. coli*. Im nächsten Schritt muss das Gen in die virale DNA integriert werden. Dies geschieht durch homologe Rekombination von Transfektor und Virus-DNA.

2.3.2 Cotransfektion

Die homologe Rekombination findet in den Insektenzellen statt. Dazu werden durch Cotransfektion Transfektor und Baculovirus-DNA in die Zelle überführt. Es haben sich zwei unterschiedliche Methoden der Cotransfektion etabliert: Die Calciumphosphat-Fällung und die durch Liposome vermittelte Cotransfektion.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Cotransfektionen wurde linearisierte Virus-DNA verwendet. Durch Deletion wichtiger Sequenzen wurde sichergestellt, dass ohne die homologe Rekombination mit den Transfektoren keine aktiven Baculoviren entstehen können.

Calciumphosphat-Fällung

Diese Methode der Cotransfektion wurde bei den Transfervektoren von Pharmingen verwendet. Die Calciumphosphat-Fällung unterteilt sich in folgende Schritte:

1. In zwei 60 mm Petrischalen werden jeweils 2×10^6 Insektenzellen in 3-4 ml Medium ausgesät. Die Zellen sollten sich innerhalb 10-15 min an der Oberfläche anheften und die Zelldichte sollte zu 50-70 % confluent sein. In einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß werden 0,5 µg BaculoGold-DNA und 2-4 µg rekombinanter Transfervektor durch vorsichtiges Vortexen gemischt. Nach einer Ruhephase von 5 Minuten wird 1ml Transfektionspuffer B zugegeben.
2. Aus einer Petrischale wird vorsichtig das Medium entfernt, und die Zellen werden mit 1 ml Transfektionspuffer A überschichtet. Es ist darauf zu achten, dass die Zellen vollständig bedeckt sind, um ein Austrocknen zu vermeiden. In der zweiten Schale wird das Medium durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Diese Zellen stellen die Negativkontrolle dar und werden in diesem Zustand bei 27°C inkubiert.
3. Nun wird die Mischung aus DNA und Transfektionspuffer B tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 3-5 Tropfen wird die Schale in verschiedene Richtungen geneigt, um eine optimale Verteilung zu gewährleisten. Es entsteht ein feiner Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA, der als leicht milchige Trübung zu erkennen ist. Die Schale wird danach für 4 h bei 27°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Flüssigkeit vorsichtig entfernt und die Zellen zweimal mit 3ml frischem Medium gewaschen. Nach der abschließenden Zugabe von 3ml Medium wird die Schale zusammen mit der Negativkontrolle für 4-5 Tage bei 27°C inkubiert.
4. Nach 3-4 Tagen sollten die Anzeichen einer viralen Infektion klar erkennbar sein. Die Zellen müssen vergrößerte Zellkerne besitzen und in großer Zahl im Medium schwimmen. Die Zellen der Negativkontrolle müssen gesund aussehen und eine größere Dichte aufweisen. Nach 5-7 Tagen wird der Überstand, der die Viruspartikel enthält, abgenommen und bei 10000 g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird bei 4°C abgedunkelt gelagert. Aus dieser Viruslösung werden die rekombinanten Baculoviren isoliert.

Liposom-vermittelte Cotransfektion

Bei dieser Methode werden Transfervektor und Virus-DNA mit Hilfe von Liposomen in die Zellen eingeschleust. Die positiv geladenen Liposome bilden einen Komplex mit der

DNA und haften an der negativ geladenen Zellmembran an. Dieses Verfahren der Cotransfektion wurde bei den Transfervektoren von Invitrogen verwendet. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte beschrieben.

1. In zwei 60 mm Petrischalen werden jeweils 2×10^6 Insektenzellen in 3-4 ml Medium ausgesät. Die Zellen sollten sich innerhalb von 10-15 Minuten an der Oberflächen anheften und die Zelldichte sollte zu 50-70 % confluent sein. In einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß werden 10 µl Bac-N-Blue-DNA und 2-4 µg rekombinanter Transfervektor durch vorsichtiges Vortexen gemischt. Danach werden 1 ml unsupplementiertes Grace's Medium zugegeben. Die Liposome werden vor Gebrauch gut durchmischt. Nach Zugabe von 20µl InsectinPlus Liposome wird die Transfektionsmischung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Da Supplemente und Serum die Effizienz der Transfektion stark beeinträchtigen, müssen die Insektenzellen in der Zwischenzeit zweimal mit Grace's Medium ohne Supplemente und Serum gewaschen werden. Dazu werden die Zellen in beiden Schalen mit 3 ml Flüssigkeit überschichtet. Nach Schwenken der Schale wird der Überstand vollständig entfernt. Abschließend werden 2 ml Flüssigkeit auf die Zellen gegeben.
3. Nach Ablauf der 15-minütigen Inkubationszeit wird der Überstand in einer Schale von den Sf9-Zellen abgesaugt und die Transfektionsmischung wird gleichmäßig über den Zellen verteilt. Beide Schalen werden für vier Stunden bei Raumtemperatur auf einer wippenden Plattform (2 Wippbewegungen pro Minute) inkubiert. Nach Ablauf der vier Stunden werden in beide Schalen 2ml supplementiertes Medium gegeben. Nach Versiegelung der Schalen mit Parafilm werden die Zellen für fünf Tage bei 27°C inkubiert. Auch hier müssen nach drei bis vier Tagen Anzeichen einer Infektion klar erkennbar sein. Nach 5-7 Tagen werden die Zelltrümmer bei 10000 g pelletiert und der Überstand bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.3.3 Reinigung des rekombinanten Virus

Trotz der Verwendung von linearisierter und hochreiner Virus-DNA lässt sich die Cotransfektion von Wildtyp-DNA nicht vermeiden. Außerdem können auch Baculoviren mit Deletionen entstehen, die das gewünschte Gen nicht in korrekter Form in sich tragen. Aus diesem Grund muss der rekombinante Baculovirus isoliert und identifiziert werden. Dies wird durch einen Plaque-Assay erreicht. Das Grundprinzip besteht darin, dass Insektenzellen mit Baculoviren in hohe Verdünnung überschichtet werden. Somit werden nur sehr wenige Zellen infi-

ziert werden. Eine nachfolgende Überschichtung der Sf9-Zellen mit Agarose verhindert, dass der Virus sich frei im Medium bewegen kann. Eine Infektion kann nur zwischen direkt benachbarten Zellen stattfinden. Nach einigen Tagen erkennt man im Zellrasen abgegrenzte Bereiche mit lysierten Zellen, die sogenannten Plaques. Durch Betrachtung der Plaques unter einem inversen Mikroskop kann man die rekombinanten Baculoviren von den Wildtypviren unterscheiden. Der Wildtyp bildet die charakteristischen Okklusionskörper, die wegen ihrer semikristallinen Struktur leicht erkannt werden können. Der Plaque-Assay stellt für den ungeübten Anwender eine Schwierigkeit dar und wird deshalb im folgenden ausführlich beschrieben. Steriles Arbeiten ist von entscheidender Bedeutung.

Vorbereitungen

0,65 g BacPlaque Agarose werden in 26 ml destilliertes Wasser suspendiert und bei 121°C autoklaviert. Die fertige Lösung wird bei 47°C in einem Wasserbad bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. In dem Wasserbad werden auch 50 ml Medium in einer 100 ml Flasche aufgewärmt. Außerdem werden pro verwendete Schale 2,5 ml Medium in einem sterilen 15 ml Zentrifugenröhrchen von Falcon auf Zimmertemperatur erwärmt. Die von Invitrogen erhaltene Virus-DNA lässt eine Blau/Weiß-Erkennung zu. Die Farbreaktion wird erst durch Zugabe von X-gal in einer Endkonzentration von 150 µg/ml in der Agaroseüberschichtung ermöglicht.

Aussaat der Zellen

In 60 mm Petrischalen werden $2,5 \times 10^6$ Insektenzellen ausgesät. Pro Virusverdünnung werden 4-6 Schalen benötigt. Die Vitalität der Zellen ist zu überprüfen und sollte bei mindestens 97 % liegen. Die gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Schale ist von entscheidender Bedeutung, da sonst die Ausbildung der Plaques beeinträchtigt wird. Dazu werden die Schalen für 5 Minuten auf eine wippende Plattform gestellt. Danach lässt man die Schalen für 30 Minuten ruhig stehen. Es ist zu überprüfen, ob die Zellen sich angeheftet und gleichmäßig verteilt haben.

Infektion und Agaroseüberschichtung

Der Virus wird um den Faktor 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} mit Medium verdünnt. Pro Platte werden 1ml der jeweiligen Virusverdünnung benötigt. Die hergestellten Viruslösungen sind vor Gebrauch gründlich zu mischen, um den Virus gleichmäßig in der Lösung zu verteilen. Von den Schalen wird das Medium bis auf 2 ml entfernt. Normalerweise befinden zu Beginn in

den Platten 5ml Medium. Mit einer 1ml-Pipette wird die gewünschte Virusverdünnung vorsichtig über den Zellen verteilt. Es ist darauf zu achten, dass die Zellschicht nicht zerstört wird. Die Schalen werden auf eine wippende Plattform gestellt und eine Stunde inkubiert. Während der Inkubationsphase mischt man die Agaroselösung mit dem auf 47°C erwärmten Medium und stellt die Mischung zurück ins Wasserbad. Es ist zu überprüfen ob die Temperatur bei 47°C liegt. Eine zu hohe Temperatur tötet die Zellen. Ist die Temperatur zu niedrig beginnt die Mischung zu klumpen und bildet ungleichmäßige Überschichtungen. Nach Ende der Inkubation wird von den Schalen einer Virusverdünnung das gesamte Medium abgesaugt. Wenn sich zu viel Flüssigkeit auf den befindet, können die Zellen nicht richtig immobilisiert werden. Ein Austrocknen der Sf9 ist ebenfalls zu vermeiden. 2,5 ml der Agarose/Medium-Mischung werden zu 2,5 ml auf Zimmertemperatur erwärmten Medium gegeben und gründlich gemischt. Die Mischung gibt man dann vorsichtig vom Rand her in die Schale. Die Pipetenspitze sollte den Schalenrand nicht berühren, damit die Agarosemischung beim Einfüllen die Zellen nicht vom Schalenboden ablöst. Sobald alle Zellen überschichtet sind, werden die Schalen bis zur Aushärtung der Agarose nicht mehr bewegt. Danach werden die Schalen mit Parafilm versiegelt und für 7-12 Tage bei 27°C inkubiert.

2.3.4 Isolation der Baculovirus-DNA

1 ml Medium mit Baculoviren wird mit 1 ml PEG/NaCl-Puffer versetzt. Nach dreimaligem Invertieren wird die Mischung für 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Viruspartikel werden bei 20000 g und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes werden die Viren in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert. Zur Isolation der Virus-DNA wurde das Easy-DNA Kit von *Invitrogen* verwendet.

Zu der Viruslösung werden 143 µl Lösung A gegeben. Nach Vortexen für 2 Sekunden wird die Lösung für 6 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend werden 58 µl Lösung B zu der Mischung pipettiert. Die Suspension wird durch Vortexen homogenisiert. Die Bildung von weißen Klumpen am Boden des Reaktionsgefäßes ist zu vermeiden. Nach Zugabe von 258 µl Chloroform wird die Mischung ein weiteres Mal homogenisiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 20000 g und 4°C kann die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Zu der DNA-Lösung werden 100 µl absolutes Ethanol (-20°C) gegeben. Nach achtmaligem Invertieren wird die DNA bei 20000g und 4°C für fünf Minuten pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig verworfen. Die DNA wird mit 500 µl 70 % Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut 3-5 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanols wird die

DNA 5 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl sterilem Wasser gelöst. Die Lösung kann bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert werden.

PEG/NaCl-Puffer: 1M NaCl; 20 % PEG 8000

2.3.5 Identifikation der rekombinanten Viren mit Hilfe der PCR

Nach 6 Tagen sind bei erfolgreicher Versuchsdurchführung die ersten Plaques sichtbar. Bei der Blau/Weiß-Erkennung sollten die Plaques mit rekombinantem Virus eine blaue Färbung aufweisen. Die Plaques sollten unter dem Mikroskop klar voneinander abgegrenzt sein. Plaques, die keine Verunreinigungen durch Wildtyp aufweisen, werden markiert. In 6-Kammer-Schalen werden pro Kammer 5×10^5 Sf9 ausgesät und mit 2 ml Medium überschichtet. Mit einer sterilen 1 ml-Pipettenspitze wird die Agaroseschicht über den markierten Plaques durchstoßen und das Medium vorsichtig abgesaugt. Mit dieser Lösung werden die Zellen in den Kammern infiziert. Nach 48-60 Stunden sind die Zellen auf Wildtyp-Virus zu untersuchen. Kammern mit Kontamination durch Wildtyp werden verworfen. Nach Lyse der Insektenzellen werden die Zelltrümmer abzentrifugiert und die Virus-DNA wie in 3.1.4 beschrieben aus der Viruslösung (P1) isoliert.

Die Identifikation erfolgt durch PCR unter Verwendung von Primern, die Sequenzen des Polyhedrin-Promotors beziehungsweise Sequenzen unterhalb der Klonierungsseite enthalten. Bei der PCR entstehen Produkte, deren Größe von dem klonierten Gen abhängt. Das Polyhedrin im Wildtyp-Virus erzeugt ebenso ein PCR-Produkt charakteristischer Länge. Für den Reaktionsansatz werden folgende Komponenten verwendet:

5µl	virale DNA
5µL	10X PCR-Puffer
1µl	Primer: Baculo/PCR/vor oder Polh/vor (100 ng/µl)
1µl	Baculo/PCR/rev: (100 ng/µl)
1µl	Taq Polymerase (2,5U/µl)

In der folgenden Tabelle ist der Programmablauf der PCR dargestellt. Die Annealing-Temperatur muss bei Verwendung anderer Primer deren Schmelztemperatur angepasst werden.

Tab. 3-2: Parameter der PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	2 Minuten	1
Denaturierung	94°C	1 Minute	30
Annealing	55°C	2 Minuten	
Elongation	72°C	3 Minuten	
Elongation	72°C	7 Minuten	1

Die PCR-Produkte werden auf einem 1 % Agarosegel untersucht. Nur Virusproben, die keine Banden des Wildtyp-Virus aufweisen, werden zur Sequenzierung gegeben und zur Virusamplifikation verwendet. Wildtyp-Virus ergibt ein PCR-Produkt mit 839 bp. Der rekombinante Baculovirus kann an einer Bande identifiziert werden, bei der die Basenzahl des gewünschten Gens um 338 Basenpaare erhöht ist. Im Falle des His₆-CDK6 sollte eine DNA-Bande bei 1350 bp sichtbar sein.

2.3.6 Amplifikation des rekombinanten Virus und Bestimmung des Titers

Nach der Verifikation des Baculovirus muss eine Viruslösung mit hohem Titer hergestellt werden, die für die Proteinexpression verwendet wird. Die Amplifikation des Virus geschieht bei einer MOI kleiner als eins. Dies bedeutet, dass das Verhältnis aus Viruspartikelzahl und Zellzahl kleiner als eins ist. Durch diese geringe MOI wird die Bildung von Viren mit Deletionen oder nicht infektiösen Viren verhindert. Zu diesem Zweck werden 5 Mio. Sf9-Insektenzellen in einer TC75-Schale mit 20 µl Baculoviruslösung P1 infiziert. Nach 5-7 Tagen werden die Zelltrümmer sedimentiert. Die erhaltene kleine Lösungsmenge (P2) besitzt einen hohen Titer. Um nun eine hoch titrige Baculoviruslösung mit großem Volumen herzustellen, werden 500 ml Zellsuspension bei einer Zelldichte von 1 Mio. Zellen pro Milliliter mit 100 µl Baculoviruslösung P2 infiziert. Nach 5-7 Tagen erhält man die Baculoviruslösung P3. Der Titer von P3 wird mit einem weiteren Plaque-Assay bestimmt. Hierbei wird der Virus in Verdünnungen von 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ verwendet. Die Zahl der Plaques multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor ergibt die Zahl der Viruspartikel pro Milliliter. Dieser Wert sollte bei über 10⁸ Pfu/ml liegen. Nach Bestimmung des Titers wird die Baculoviruslösung P3 bei 4°C abge-

dunkelt gelagert. Für Proteinexpressionen werden meist MOI's zwischen 3 und 10 verwendet. Dies bedeutet auf eine Insektenzelle kommen 3 bis 10 Viruspartikel.

3 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine

3.1 Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli*

Die Expression der einzelnen Proteine wird für die LB-Medien und Minimalmedium analog durchgeführt. Das verwendete Volumen der Hauptkultur beträgt 1-2 l. Die Antibiotika entsprechen den jeweiligen Resistenzen, die sich auf den transformierten Plasmiden befinden.

3.1.1 Herstellung unmarkierter Proben

Für die Herstellung unmarkierter Proteinproben wird LB-Medium verwendet. Hiervon werden 50 ml Medium mit einer Plattenkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt. Die Übernachtskultur wird zu 1-2 l vorgewärmten Medium gegeben und etwa 2-3 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 bei 37°C weitergeschüttelt. Danach induziert man die Expression des rekombinanten Proteins mit IPTG (Endkonzentration 1 mM). Nach 4-stündiger Induktion werden die Bakterien bei 4 °C und 5000 g für 30 Minuten zentrifugiert und geerntet. Das Pellet wird bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C eingefroren.

3.1.2 Herstellung uniform ¹⁵N-markierter Proteinproben

Die Expression uniform markierter Proteine erfolgt in einem speziellen Minimalmedium (Muchmore *et al.*, 1989). Expression und Ernte erfolgen analog zur Herstellung unmarkierter Proteinproben.

3.1.3 Herstellung ¹⁵N-isotopenmarkierter Proteinproben

Zur Herstellung aminosäurespezifisch markierter Proteinproben wird das mit Aminosäuren angereicherte Minimalmedium nach Senn *et al.* (1987) verwendet, das die gewünschte ¹⁵N-Aminosäure enthält. Es ist zu beachten, dass nach Induktion die zu markierende Aminosäure noch einmal in gleicher Menge wie zu Beginn der Fermentation zugegeben wird. Ansonsten verlaufen die Fermentationsdauer und Ernte der Bakterien analog zu den unmarkierten Proteinproben.

3.2 Expression der rekombinanten Proteine in Sf9-Insektenzellen

Durch Testexpressionen ist für das entsprechende Medium zu ermitteln, welche MOI und Expressionszeit hinsichtlich der Ausbeute optimal ist. Testexpressionen werden mit Adhäsionskulturen durchgeführt. Je nach Bedarf werden TC25- oder TC75-Schalen verwendet. Für jede MOI und für jeden Zeitpunkt wird eine Schale benötigt. Sobald die Zellen 50-60 % Konfluenz erreicht haben werden sie mit verschiedenen MOI's zwischen 1 und 8 infiziert. Nach 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden bei 27°C werden die Zellen aus den Schalen mit den verschiedenen MOI's geerntet. Die Proteinausbeute ist mittels SDS-Gel und Western Blot auszuwerten. Nach der Ermittlung der optimalen Parameter für MOI und Expressionsdauer kann das Protein in größeren Suspensionskulturen exprimiert werden.

3.2.1 Herstellung unmarkierter Proben

Die Insektenzellen werden in Rührflaschen im entsprechenden Medium bei 27°C und 90 rpm vermehrt, bis die Kultur ein Volumen von 2 l besitzt. Nach Erreichen einer Zelldichte von $2,0\text{-}2,2 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter wird die Kultur mit dem jeweiligen rekombinanten Virus und einer optimalen MOI (meist 3-8) infiziert. Nach der optimalen Expressionszeit (50-60 h) werden die Zellen bei 800 g und 4°C für 10 Minuten pelletiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Bei der Expression im Bioreaktor werden 4 l Suspensionskultur verwendet. Dazu wird der Reaktor mit 1,5 l Suspensionskultur aus Rührflaschen beschickt und die Zellen bis zum gewünschten Volumen bei 27°C und 100 rpm vermehrt. Die Sättigung mit Sauerstoff beträgt während der Fermentation 50 %, der pH-Wert wird auf 6,3 eingeregelt. Die Rührerdrehzahl beträgt 100 rpm. Die Zelldichte bei Infektion beträgt 3 Mio. Zellen pro Milliliter. Nach Infektion der Zellen (MOI 5-8) werden die Zellen 65 Stunden fermentiert. Die Zellen werden wie oben beschrieben geerntet und gelagert.

3.2.2 Herstellung ^{15}N -isotopenmarkierter Proteinproben

Bei der Herstellung dieser Proben müssen die Zellen gegebenenfalls an das verwendete Medium gewöhnt werden. Bei der Medienherstellung wird die gewünschte ^{15}N -markierte Aminosäure eingesetzt. Die Zelldichte zum Zeitpunkt der Infektion differiert in Abhängigkeit von dem verwendeten Medium. Expressionsvolumen, Expressionszeit und MOI werden gegenüber der Expression von unmarkierten Proteinen nicht verändert.

3.3 Proteinreinigung

3.3.1 Zellaufschluss durch Sonifizieren

Bei der Methode des Sonifizierens handelt es sich um das Aufbrechen von Zellen durch die Übertragung von Ultraschallschwingungen auf die Zellsuspension. Das elektrische Signal eines Hochfrequenzgenerators wird von einem Metallstab, der in die mit Eis gekühlte Zellsuspension taucht, in mechanische Schwingungen umgewandelt. Die übertragenen Schwingungen führen zum Aufschluss der Zellen.

Die Zellwand der *E. coli* wird durch Zugabe von 0,1 % Lysozym zerstört. Die Bakterienzellen werden durch sechs Zyklen aus 40 s Beschallung bei Stufe 7 und 70 % Intervallen sowie anschließender Ruhephase von 45 s auf Eis aufgeschlossen.

Für Insektenzellen sind 4 Zyklen ausreichend, um die Zellmembran zu zerstören. Die Zellen müssen auch nicht mit Lysozym inkubiert werden.

3.3.2 Reinigung durch Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie besitzt ein extrem spezifisches Trennvermögen, da die Trennung nicht nur nach physikalisch-chemischen Unterschieden zwischen Makromolekülen, sondern auch auf der Basis von biospezifischer Wirkung erfolgt. Das Trägermaterial der Säule besteht aus einer festen, unlöslichen Substanz, an die biospezifische Liganden kovalent gekoppelt sind. Als Trägermatrix werden Agarose (zum Beispiel Sepharose) Dextrane, Polyacrylamid oder Glasperlen eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Säulenmaterialien Ni-NTA Agarose von *Qiagen* und Glutathion-Sepharose FF von *Pharmacia* zur Aufreinigung der Proteine verwendet. Beide Materialien werden oft zur Aufreinigung von Proteinen genutzt, da sie meist hochreine Proteine liefern und weitere Reinigungsschritte überflüssig machen. Beide Reinigungsmethoden sind sehr schonend und beeinflussen die biologische Aktivität der Proteine nicht negativ.

Reinigung mittels Ni-NTA Agarose

An Ni-NTA binden spezifisch Proteine, die einen Hexahistidin-Tag besitzen. Die Elution erfolgt mit Imidazol. Das Zellpellet wird zuerst in Puffer A resuspendiert. Man verwendet für Zellen aus einem Liter Kultur 10 ml Puffer A. In dem Puffer wird vor der Resuspension der Zellen eine Tablette Complete EDTA-free von *Roche Diagnostics* gelöst, die die Proteasen

inhibiert. Die resuspendierten Zellen werden durch Sonifikation geöffnet. Die Zelltrümmer werden bei 75000 g und 4°C für 90 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird nach Einstellung des pH-Wertes auf 8,0 mit 5 ml Ni-NTA Agarose versetzt, die zuvor zweimal mit 15 ml Puffer A gewaschen wurde. Die Mischung wird auf einem Rotator (10 rpm) bei 4°C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wird die Suspension in eine Chromatographiesäule überführt. Das Säulenmaterial wird so lange mit Puffer A gewaschen bis die Absorption bei 280 nm konstant ist. Danach entfernt man mit Puffer B unspezifisch gebundene Proteine. Die Absorption muss wieder die Basislinie erreichen. Mit Puffer C wird das gewünschte Protein von der Säule eluiert.

Puffer A: 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH=8,0

Puffer B: 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH=8,0

Puffer C: 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 120 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH=8,0

Reinigung mittels Glutathion-Sepharose FF

Eine beliebte Reinigungsmethode von Proteinen ist deren Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST). GST bindet hochspezifisch an Glutathion, das an Sepharose gebunden ist, mit hoher Affinität. Die Elution erfolgt mit freiem reduzierten Glutathion. Das Zellpellet wird in 10 ml Puffer D resuspendiert. Die Proteasen werden mit einer Tablette Complete inhibiert. Die resuspendierten Zellen werden durch Sonifikation geöffnet. Die Zelltrümmer werden bei 75000 g und 4°C für 90 Minuten abzentrifugiert. Der pH-Wert wird überprüft und gegebenenfalls auf 7,4 eingestellt. Der Überstand wird mit 5 ml Glutathion-Sepharose FF, die mit zweimal mit 15 ml Puffer D gewaschen wurde, gemischt. Die Mischung wird auf einem Rotator (10 rpm) bei 4°C für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wird die Suspension in eine Chromatographiesäule überführt. Die Glutathion-Sepharose wird mit Puffer D bis zum Erreichen einer konstanten Absorption gewaschen. Das mit GST fusionierte Protein wird mit Puffer E eluiert. Die eluierten Proteinlösungen werden mit PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM versetzt, um Proteasen zu inhibieren. Die Reinheit der Proteine wird mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft. Bis zur Weiterverarbeitung werden die Lösungen bei 4°C gelagert.

Puffer D: 50 mM Na₂HPO₄, 250 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH=8,0

Puffer E: 50 mM Na₂HPO₄, 250 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 50 mM Glutathion, pH=7,4

3.3.3 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Proteine nach ihrer Größe, die bei globulären Proteinen mit der Masse korrespondiert, aufgetrennt. Das Säulenmaterial Superdex ist sehr porös. Kleinere Moleküle können in die Poren eindringen, was zu einer Erhöhung der Verweilzeit führt. Größere Moleküle können nicht in diese Poren eindringen und passieren die Säule schneller. Die Größe der Poren bestimmt auch den Trennbereich. Da die aufzureinigenden globulären Proteine Massen zwischen 41 kDa und 64 kDa besitzen, wurde das Säulenmaterial Superdex 75 von *Pharmacia* mit einer Trenngrenze von 75 kDa verwendet.

Die Säule wird bei 0,5 ml/min mit 6-fachem Säulenvolumen an Laufpuffer A äquilibriert. Das Volumen der Proteinlösungen wird unter Verwendung der Ultrafiltration auf 3-5 ml verringert. Dieses Volumen wird auf die Säule geladen. Bei einem Volumenstrom von 1 ml/min werden die Proteine aufgetrennt und in Fraktionen zu 1,5 ml aufgefangen. Mit Hilfe der Gelelektrophorese werden die Fraktionen mit dem erwünschten Protein identifiziert. Die Fraktionen mit dem Fusionsprotein werden vereinigt und nach Zugabe von PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 mM bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Laufpuffer A: 50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH=7,8

3.3.4 Proteolytische Abspaltung der CDK6

Die Proteinlösungen werden durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration sollte 1-3 mg/ml betragen. Anschließend werden die Proteinproben gegen den entsprechenden Schneidepuffer dialysiert. Nach der Dialyse werden pro Milligramm Protein 8 bis 10 Einheiten des Enzyms Thrombin beziehungsweise Enterokinase zugegeben. Die Inkubationszeit für Thrombin beträgt 3 bis 5 Stunden bei 4°C. Im Falle von Enterokinase wird die Reaktionsmischung 6 bis 8 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proteasen mit PMSF (1 mM Endkonzentration) inaktiviert. Das abgespaltene GST wird durch Bindung an Glutathion-Sepharose abgetrennt. Das Hexahistidinfragment kann durch Dialyse entfernt werden.

Schneidepuffer für Thrombin: 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 250 mM NaCl und 1 mM CaCl₂

Schneidepuffer für Enterokinase: 20 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 200 mM NaCl und 1 mM CaCl₂

4 Allgemeine Proteinanalytische Methoden

4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine denaturierende Methode zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinfragmenten. Da die Beweglichkeit der Moleküle durch das Gel anhand ihrer Größe bestimmt wird, kann das Molekulargewicht der Proteinfragmente ermittelt werden. Vorgefärbte Markerproteine (von *Biolabs*) mit bekanntem Molekulargewicht dienen als Referenz, als Laufpuffer das System nach *Lämmli* (1970). SDS (sodium dodecyl sulfate) ist ein anionisches Detergens und bindet an die hydrophoben Regionen eines Proteins. Komplexe aus SDS und Protein sind negativ geladen und laufen elektrophoretisch zur Anode. Es entstehen konstante Nettoladungen für konstante Massen. Der Großteil der Proteinkomplexe dissoziiert in seine Untereinheiten. Disulfidbrücken werden durch Zugabe von 1 % β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol und einigen Minuten kochen gespalten.

Die Gele bestehen aus einem Trenngel (15 x 11 x 0,1 cm) mit konstanter n-%iger Polyacrylamid-Konzentration (je nach Größe der Proteinfragmente) und einem 3-%igen Sammelgel.

n-% Acrylamidlösung:	375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS n % Acrylamid, (n/37,5) % Methylenbisacrylamid 10 mM EDTA; 0,05 % APS; 0,04 % (v/v) TEMED
Sammelgel:	125 mM Tris-HCl; 1 % SDS; 3 % Acrylamid 10 mM EDTA; 0,3 % APS; 0,05 % (v/v) TEMED

Aufzutrennende Proteinlösungen werden mit $\frac{1}{2}$ Volumen 3 x SDS-Probenpuffer und Proteinpellets mit 200 μ l 3 x SDS-Probenpuffer versetzt und 15 min bei 100 °C gekocht. Zur Elektrophorese werden 20 μ l vorgefärbter Protein-Größenmarker und die Proben (15-20 μ l) aufgetragen und bei 180 V für ca. 4 Stunden in 1 x Laufpuffer getrennt. Die Gele werden mit Coomassie-Blau gefärbt.

10 x Laufpuffer:	250 mM Tris; 1,9 M Glycin; 1 % SDS
3 x SDS-Probenpuffer:	200 mM Tris-HCl, pH 6,8; 6,7 % SDS; 12 % (v/v) Glycerin 6 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; ca. 10 mg/l Bromphenolblau

4.1.1 Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau

In der Regel erfolgt der Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen durch Färbung mit Coomassie-Blau-Lösung für 15-30 Minuten. Anschließend wird das Gel für mehrere Stunden in Entfärberlösung geschüttelt. Die Nachweisgrenze liegt bei dieser Färbungsmethode bei ca. 30 ng.

Coomassie-Blau-Lösung: 45 % Ethanol; 10 % Essigsäure; 0,25 % Coomassie-Brillant-Blau G-250

Entfärberlösung: 5 % Ethanol; 10 % Essigsäure

4.2 Western Blot

Der Western Blot ist eine Nachweismethode für Proteine unter Verwendung spezifischer Antikörper. Nachdem die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, wird das Gel auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt und zwischen mehrere Schichten mit Transferpuffer getränkten Whatman-Papier gepackt. Beim Blotting werden die Proteine mit einer speziellen Blot-Apparatur elektrophoretisch aus dem SDS-Gel auf die Membran transferiert. Die Membran wird nach dem Blotten für eine Stunde in einen Blockpuffer gelegt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu unterdrücken. Anschließend inkubiert man die Membran ca. 1 Stunde mit dem entsprechenden monoklonalen Primärantikörper. Die optimale Verdünnung (meist 1:1000 – 1:2000) des Antikörpers muss ermittelt werden. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) mit der Blocklösung wird die Membran ca. 45 min in einer Lösung eines Sekundärantikörpers mit Alkaline Phosphatase-Konjugat geschwenkt. Nach wiederholtem Waschen mit Blocklösung wird die Membran mit einer speziellen Färbelösung behandelt und danach für 10 min mit PBS-Tween-Lösung gespült. Nur die Antigenbande des Proteinmusters sollte nach der Entwicklung der Markierung erscheinen.

Transferpuffer: 25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycerin; 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3

1 x TBS-Lösung: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl

PBS-Tween-Lösung: 9,1 mM Na₂PO₄; 1,7 mM NaPO₄; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20
mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

Färbetablette: 0,15 mg/ml BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat)
0,30 mg/ml NBT (Nitro-Blau-Tetrazolium)
100 mM Trispuffer; 5 mM MgCl₂

Blocklösung für Antikörper: 1 x TBS; 5 % Milchpulver; 0,05 % Tween-20

4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Der Test eignet sich für Proteinmengen zwischen 5 und 50 µg. Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 bindet an die Proteine und erlaubt die Extinktionsmessung des Protein-Farbstoffkomplexes bei 595 nm. Zur Proteinbestimmung mischt man 5 ml Farblösung mit 100 µl Proteinlösung der Konzentration 5-50 µg. Die Extinktion bei 595 nm kann nach 5 Minuten gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen werden. Die Proteinkonzentration kann aus einer Eichkurve, vorzugsweise Ovalbumin, abgelesen werden.

Farblösung: 50 ml 0,5 %iges Coomassie-Brillantblau G-250 in Ethanol
100 ml 85 %ige Phosphorsäure; 100 ml Glycerin
auf 1l mit dest. H₂O auffüllen

5 Probenpräparation für die NMR-Spektroskopie

Proteinproben für die NMR-Spektroskopie enthielten üblicherweise ca. 0,3-0,8 mM an Protein. Der verwendete Puffer hing von dem zu messenden Protein ab. In Tab. 3-3 sind die jeweils verwendeten Puffer aufgelistet. Die zu messenden Proteinfractionen wurden vereinigt und gegen den benötigten Puffer dialysiert. Durch Ultrafiltration in einem Macrosep-Konzentrator von *Pall* mit einer Größenausschlussgrenze von 10 kDa wurde die Proteinprobe bis zu einem Endvolumen von 2 ml aufkonzentriert. Über Zentrifugation mit einem Centricon 10 kDa von *Amicon* konnte auf ein Optimalvolumen für ein NMR-Probenröhrchen mit 5 mm Durchmesser von 450 µl einkonzentriert werden. Für die Messung wurden den Proteinproben 10 % (v/v) 99,99 % D₂O zugefügt.

Tab. 3-3: Überblick über die verwendeten NMR-Probenpuffer für die einzelnen Proteine

Protein	NMR-Puffer
GST-CDK6	50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,8; 400 mM NaCl; 10 mM DTT
His₆-CDK6	50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,8 oder 7,3; 400 mM NaCl; 10 mM DTT
CDK6	50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,8 ; 400 mM NaCl; 10 mM DTT
GST	50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0; 250 mM NaCl; 10 mM DTT

Ergebnisse

1 Expression der CDK6

1.1 Herstellung der rekombinanten CDK6-Baculoviren

Ziel des ersten Teils der Dissertation war die Gewinnung von CDK6 in hoher Ausbeute und Reinheit. Um die Zahl der Reinigungsschritte möglichst klein zu halten, fiel die Wahl auf die Verwendung von GST- und Hexahistidin-fusionierter CDK6. Die Reinigungsfusionen sollten sich durch einen proteolytischen Verdau abspalten lassen. Um dies zu erreichen, wurden die Baculovirus-Transfervektoren pBlueBachis2 A und pAcG2T verwendet. Das GST lässt sich mit Thrombin, die Hexahistidin-Fusion mit Enterokinase entfernen. Beide Vektoren besitzen die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI, zwischen die das Gen von CDK6 kloniert werden sollte. Durch PCR wurde an die 5'-Position der CDK6-DNA eine BamHI-Schnittstelle und an das 3'-Ende eine EcoRI-Schnittstelle hinzugefügt. Dazu wurden 200 ng eines Plasmids, das die CDK6-DNA enthielt, mit jeweils 250 ng des Vorwärts- und Rückwärtsprimers und danach mit 10 µl 10x PCR-Puffer und 1 µl dNTP-Mix versetzt. Abschließend füllt man auf 99 µl auf und gibt 1 µl PWO-Polymerase hinzu. Für die PCR wurden folgende Parameter gewählt:

Tab. 4-1: Parameter der PCR zur Anknüpfung der Restriktionsschnittstellen an die CDK6-DNA

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	1 Minute	1
Denaturierung	94°C	30 Sekunden	30
Annealing	58°C	45 Sekunden	
Elongation	72°C	1,5 Minuten	
Elongation	72°C	4 Minuten	1

Abbildung 4-1 zeigt das Ergebnis der PCR. Man erkennt eine scharfe Bande in einer Höhe von ca. 1 kb. Dies ist die Größe der CDK6-DNA. Es waren keine unspezifischen Banden auf dem Gel zu erkennen. Die amplifizierte DNA wurde wie unter 1.8 im Kapitel 3 beschrieben

aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurden die Transfervektoren pBlueBachis2 A, pAcG2T und die CDK6-DNA simultan mit BamHI und EcoRI verdaut. Jeweils 1 µg DNA wurde in 20 µl Reaktionsvolumen mit jeweils fünf Einheiten jedes Enzyms 2 Stunden inkubiert. Als Reaktionspuffer diente der BamHI-Puffer. Nach dem Verdau wird die DNA aufgereinigt. Die folgenden Prozeduren wurden getrennt jeweils für die GST-Fusion und die His₆-Fusion durchgeführt. Im Falle der His₆-CDK6 wurden zur Ligation 200 ng linearisierter Vektor pBlueBachHis2 A und 100 ng CDK6-DNA verwendet. Das Reaktionsvolumen beträgt 20 µl und die Ligasemenge 100 Einheiten. Nach fünfstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA in elektrokompente DH5_α transformiert. Die Zellen wurden anschließend ausplattiert. Aus zehn Kolonien wurden die Plasmide isoliert. Fünf Klone enthielten in ihren Plasmiden die DNA von CDK6, wie ein Verdau mit BamHI und EcoRI zeigte (Abb. 4-1 b)

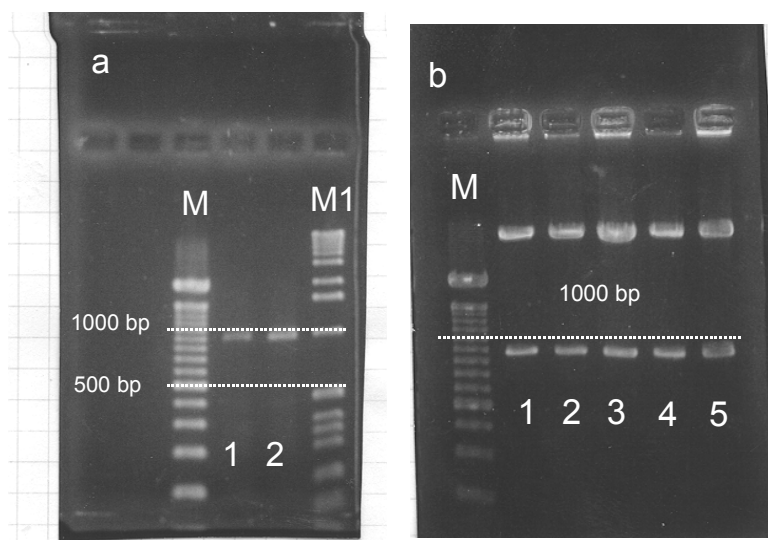


Abb. 4-1: **a)** 1 % Agarosegel nach PCR zur Anknüpfung der Restriktionsschnittstellen an die CDK6-DNA, M: 100 bp DNA-Leiter, M1: 1 kbp DNA-Leiter, 1 und 2: zwei verschieden PCR-Ansätze; **b)** 1 % Agarosegel der Transfervektoren nach Doppelverdau mit BamHI und EcoRI von fünf verschiedenen Klonen (1-5), M: 100 bp DNA-Leiter. Die Banden mit 500 und 1000 bp sind zur besseren Orientierung gekennzeichnet.

Die positiven Plasmide wurden zur DNA-Sequenzierung gegeben. Nach Verifikation der DNA-Sequenz wurde der Transfervektor in DH5_α amplifiziert und anschließend isoliert. Dieser aufgereinigte Baculovirus-Transfervektor wurde für die Cotransfektion verwendet. Die Vorgehensweise ist in Kapitel 3 Abschnitt 2.3.2 ausführlich beschrieben. Nach zwei Tagen waren die ersten Zeichen einer Infektion klar erkennbar. Die Zellen wiesen einen stark vergrößerten Zellkern auf und hörten auf, sich zu teilen. Nach fünf Tagen hatten sich die meisten Zellen von der Schale abgelöst und begannen zu lysieren. Die Zellen wurden abzentrifugiert.

Da das Baculovirussystem von Invitrogen eine Blau/Weiß-Erkennung erlaubt, wurden 100 µl der Viruslösung mit 4 µl einer X-Gal-Lösung versetzt. Nach 45 Minuten hatte sich die Mischung tief blau verfärbt. Diese Farbreaktion wird von rekombinanten Baculoviren, die β -Galaktosidase produzieren, hervorgerufen. Es konnte mit der Isolation und Identifikation der His₆-CDK6-Baculoviren begonnen werden. Der durchgeführte Plaque-Assay lieferte zahlreiche distinkte blaue Plaques, von denen zehn untersucht wurden. Fünf wiesen nach Infektion von frischen Zellen Okklusionskörper auf, die auf Verunreinigung mit Wildtyp hindeuten. Aus den restlich Proben wurde die Virus-DNA isoliert und wie in Kapitel 3 Abschnitt 2.3.3 beschrieben mit Hilfe der PCR analysiert. Vier Plaques enthielten reinen rekombinanten Virus. Die verwendeten Primer amplifizieren im Falle von His₆-CDK6 ein 1,3 kbp großes Fragment. Auf dem Agarosegel war ein Amplifikationsprodukt der erwünschten Größe sichtbar. Es waren keine Fragmente für Wildtyp bei 900 bp nachzuweisen.

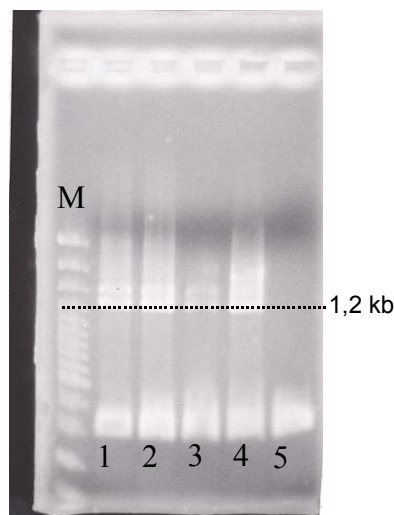


Abb. 4-2: 1 % Agarosegel nach PCR zur Identifikation der rekombinanten Viren mit His₆-CDK6; M: 100 bp DNA-Leiter

Eine der rekombinanten Virenpopulationen wurde vermehrt und für Testexpressionen verwendet. Zur Bestimmung der Proteinausbeute wurden jeweils fünf TC75-Schalen bei 60 % Konfluenz mit einer MOI von 3 und 8 infiziert. Nach 12, 24, 36, 48 und 60 Stunden wurden jeweils zwei Schalen geerntet. Es wurden eine SDS-Gelelektrophorese und ein Western Blot mit einem monoklonalen CDK6-Antikörper durchgeführt (Abb. 4-3). Auf dem SDS-Gel sind sehr viele Proteine zu erkennen. In den Spuren mit den Proben 48 und 60 Stunden nach Infektion sind Banden in der Größe von His₆-CDK6 wegen der Vielzahl von Proteinen nur sehr undeutlich erkennbar. Zur besseren Beurteilung der Ausbeute an His₆-CDK6 wurden die Pro-

ben der Testexpression unter Verwendung eines monoklonalen CDK6-Antikörpers untersucht. Auf dem Western Blot in Abbildung 4-3 b erkennt man eine sehr intensive Bande, die erst 24 Stunden nach der Infektion erscheint und danach ständig intensiver wird. Beide MOI's liefern dasselbe Bandenmuster. Darüber hinaus lassen sich auf dem Western Blot Abbauprodukte feststellen, die bei einer Expressionsdauer rüber 36 Stunden entstehen. Nach der positiven Testexpression konnte im nächsten Schritt eine größere Zellkultur infiziert werden, um eine größere Menge an His₆-CDK6 zu erhalten.

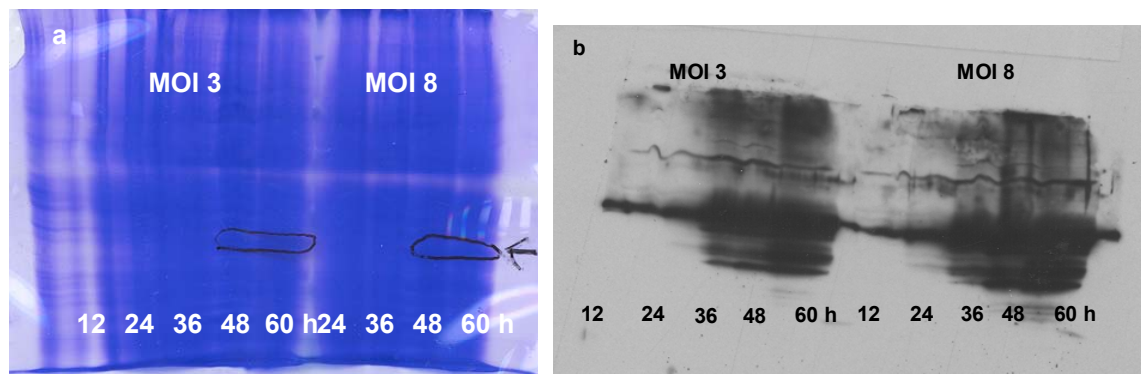


Abb. 4-3: 15 % SDS-Gel der Testexpression bei MOI 3 und MOI 8 nach 12, 24, 36, 48, 60 Stunden (a). An den eingekreisten Stellen befinden sich die Proteinbanden von His₆-CDK6, die aber nur schwer zu erkennen sind. b) Western Blot der Proben der Testexpression nach Behandlung mit monoklonalem CDK6-Antikörper

Zur Herstellung von Baculoviren, die zur Expression von GST-CDK6 verwendet werden sollten, wurde die CDK6-DNA in den Vektor pAcG2T ligiert. Nach Identifikation von positiven Transfervektoren mit CDK6-Insert wurde die Cotransfektion unter Anwendung der Calciumphosphat-Fällung durchgeführt. Es wurden zwei Cotransfektionen durchgeführt. Beide Viren wurden amplifiziert und die DNA nach Isolierung mittels PCR untersucht. Dabei wurden pro Virus zwei PCR-Ansätze vorbereitet. Zum einen kamen die CDK6-spezifischen Primer, zum anderen die Polyhedrin-spezifischen Oligonukleotide zum Einsatz. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-4 zu sehen. Man erkennt ein Baculovirus, das das gewünschte Gen für GST-CDK6 trägt. Spur 1 enthält das 1,9 kbp schwere GST-CDK6-Fragment, Spur 2 die Bande, die für reines CDK6 steht. Ein zweites Virus weist fast kein GST-CDK6 auf (Spur 4).

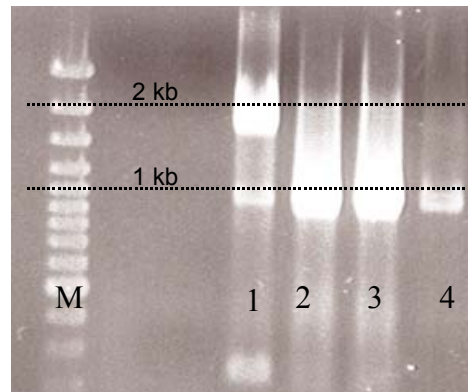


Abb. 4-4: 1 % Agarosegel nach PCR zur Identifikation von rekombinanten Baculoviren mit GST-CDK6: M: 100 bp DNA-Leiter; Spur 2+3: Verwendung von CDK6-spezifischen Primern; Spur 1+4: Verwendung von Polyhedrin-spezifischen Primern

1.2 Expression und Reinigung der CDK6

Zur Expression von His₆-CDK6 beziehungsweise GST-CDK6 wurden jeweils 2 Liter SF900 II Insektenmedium mit einer Zelldichte von $2,0-2,2 \times 10^6$ Sf9-Zellen pro ml verwendet. Die Suspensionskulturen wurden mit dem entsprechenden Baculovirus mit einer MOI von 5 infiziert. Nach 60 Stunden bei 27°C wurden die Zellen geerntet und bei -80°C aufbewahrt. Die Reinigung der His₆-CDK6 mit Ni-NTA folgte dem unter Kapitel 3 Abschnitt 3.3 beschriebenen Protokoll. Das Eluat wurde anschließend auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 4-5). Man erkennt im Eluat eine sehr intensive Bande, die mit einer Proteingröße von circa 40 kDa His₆-CDK6 entspricht. Daneben lässt sich eine Vielzahl von Verunreinigungen feststellen. Als nächster Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltration gewählt. Das Volumen des Eluats wurde mit Ultrafiltration durch eine Membran mit 10 kDa Ausschlussgrenze auf 5 ml verringert. Die Gelfiltration wurde dann wie in Kapitel 3 Abschnitt 3.3.3 durchgeführt. Nach der Säule ließen sich zwei gut getrennte Peaks auffangen, die mittels Gelelektrophorese (Abb. 4-6) untersucht wurden. Der Peak 1 enthielt hochmolekulare Proteine und eine geringe Menge an His₆-CDK6, das in Oligomeren vorlag. Der zweite Peak 2 enthielt reines monomeres His₆-CDK6. Aus einem Liter Kultur wurden 5-7 mg His₆-CDK6 erhalten.

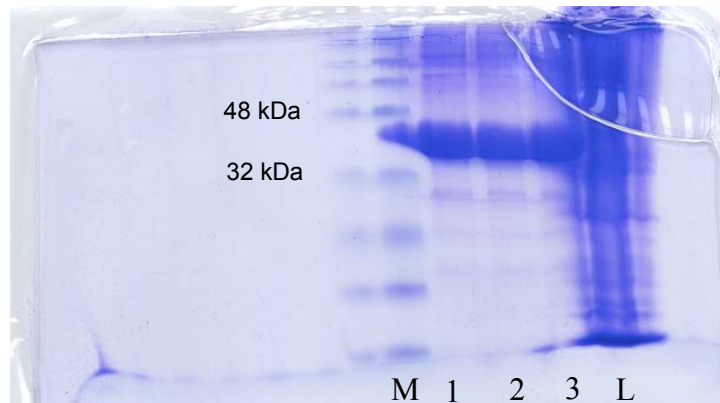


Abb. 4-5: 15 % SDS-Gel der Eluatfraktionen (1-3) von der Ni-NTA-Säule und des Zelllysats (L); M: Protein-Größenmarker

Studien zur Stabilität der His₆-CDK6 zeigten, dass mindestens 250 mM NaCl im Puffer enthalten sein müssen und der pH-Wert bei über 7,2 liegen muss, um das Protein für mehrere Tage in Lösung zu halten. Unter Beachtung dieser Einschränkungen ließ sich das Fusionsprotein bei pH 7,8 und unter Verwendung von 400 mM NaCl bis auf 25-30 mg/l konzentrieren. Diese Proteinlösung war bei 4°C für drei Wochen stabil. Danach aggregierte das Protein und fiel aus.

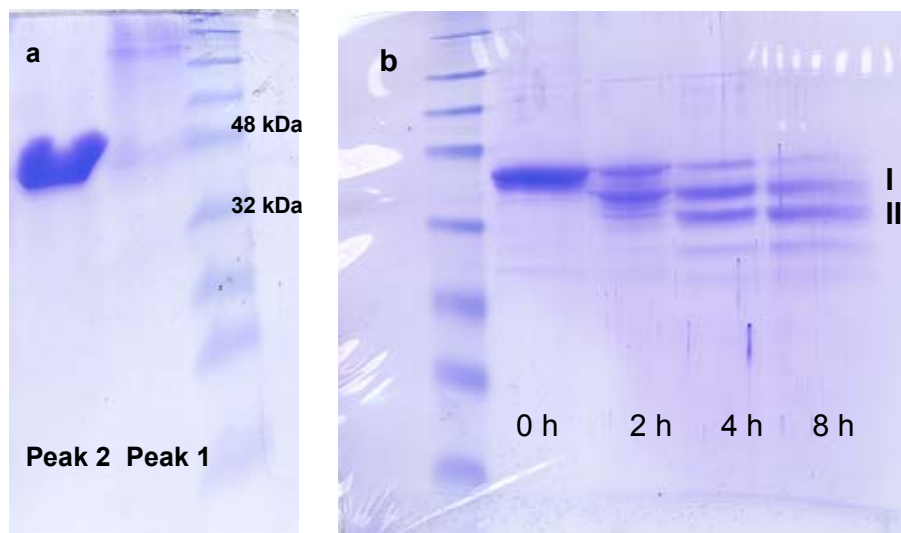


Abb. 4-6: 15 % SDS-Gel der beiden Peaks 1 und 2 nach der Gelfiltration (a) und 15 % SDS-Gel der Spaltung von His₆-CDK6 mit Enterokinase nach 0, 2, 4 und 8 Stunden (b). Es sind zwei Hauptprodukte zu erkennen (I und II)

Im nächsten Schritt wurde versucht die Hexahistidin-Fusion mit Hilfe von Enterokinase proteolytisch abzuspalten. Durch Ultrafiltration wurde eine Proteinkonzentration von 1-3

mg/ml eingestellt. Die Proteinlösung wurde in einer Membran mit 15 kDa Ausschlussgröße gegen den Schneidepuffer für Enterokinase dialysiert.

Tab. 4-2: Ergebnisse der Edmann-Sequenzierung der Ausgangsverbindung His₆-CDK6 und der beiden Hauptprodukte der Spaltung mit Enterokinase.

Protein	Sequenz
His ₆ -CDK6	MPRGS HH
Produkt I	DRWGSMEKDGL....
	WGSMEKDGL...
	DGLCRADQQ...
Produkt II	DRWGSMEKDGL....
	WGSMEKDGL...
	DGLCRADQQ...

0,2 mg des Proteins wurden mit zwei Einheiten Enterokinase versetzt und bei 4°C inkubiert. Nach 2, 4 und 8 Stunden wurden Proben genommen, um die Vollständigkeit der Proteolyse zu ermitteln. Nach zwei Stunden war die Hälfte des His₆-CDK6 gespalten. Es zeigten sich neben einem Hauptprodukt (I) aber schon mehrere leichtere Produkte auf dem Gel. Nach vier Stunden war das Protein in zwei Hauptprodukte (I und II) gespalten. Die beiden Produkte und die Ausgangsverbindung wurden mit Hilfe der Edmann-Sequenzierung analysiert. Die Ausgangsverbindung erwies sich als reine His₆-CDK6.

MPRGS HHHHH	HGMASMTGGQ	QMGRDLYDDD	DK DRWGSMEK	DGLCRADQQY
ECVAEIGEGA	YGKVFKARDL	KNGGRFVALK	RVRVQTGEEG	MPLSTIREVA
VLRHLETFEH	PNVRLFDVC	TVSRTDRETK	LTLVFEHVDQ	DLTTYLDKVP
EPGVPTETIK	DMMFQLLRGL	DFLHSHRVVH	RDLKPQNILV	TSSGQIKLAD
FGLARIYSFQ	MALTSVVVTL	WYRAPEVLLQ	SSYATPVDLW	SVGCIFAEMF
RRKPLFRGSS	DVDQLGKILD	VIGLPGEEDW	PRDVALPRQA	FHSKSAQPIE
KFVTDIDELG	KDLLLKCLTF	NPAKRISAYS	ALSHPYFQDL	ERCKENLDSE
LPPSQNTSEL	NTA			

Abb. 4-7: Enterokinaseschnittstellen in His₆-CDK6 ; blau: spezifische Spaltstelle; rot unspezifische Spaltstellen. Die fett gezeichneten Aminosäuren gehören zur Hexahistidin-Fusion.

Das größere Produkt (I) bestand aus drei Proteinen. Der Hauptbestandteil war korrekt abgespaltenes CDK6, der aber durch zwei Nebenprodukte von inkorrekt gespaltenem CDK6

verunreinigt war. Das kleinere Hauptprodukt (II) nach dem Verdau zeigte in der Edmann-Sequenzierung die gleiche Zusammensetzung des N-Terminus (Tab. 4-2). Dies bedeutet, dass CDK6 im C-Terminus eine Spaltstelle für Enterokinase besitzt. Die Inhomogenität innerhalb der Hauptprodukte ist ebenfalls auf unspezifische Spaltungen durch die Protease zurückzuführen (Abb. 4-7).

Eine Auftrennung der einzelnen Produkte mittels Gelfiltration war wegen der geringen Massendifferenz nicht möglich. Eine Ionenaustauschchromatographie war nicht erfolgreich, da das Protein in Puffern mit Salzgehalten unter 200 mM nicht stabil ist und über 75 % des Proteins ausfallen. Die beiden Spaltprodukte nach der Verwendung von Enterokinase wiesen eine wesentlich geringere Stabilität auf als das Fusionsprotein. Die erreichbare Endkonzentration lag bei 10 mg/ml. Selbst bei 4°C war das Protein nur für wenige Tage stabil. Da die Spaltung mit Enterokinase zu keinem befriedigenden Ergebnis führte, wurde bei der GST-CDK6 eine Thrombin-Spaltstelle ausgewählt. Dies sollte eine spezifischere Spaltung zwischen GST und CDK6 gewährleisten.

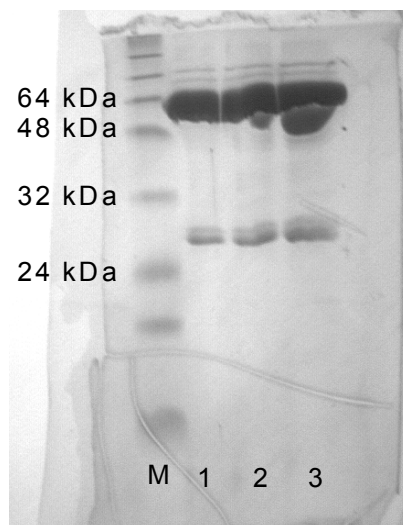


Abb. 4-8: 15 % SDS-Gel der Fraktionen (1-3) des Eluats von der Glutathion-Säule; M: Protein-Größenmarker

Da die His₆-CDK6 nach der proteolytischen Abtrennung der Hexahistidin-Fusion mit Hilfe von Enterokinase die oben aufgeführten Probleme aufwies, wurde untersucht, ob die GST-CDK6 nach Abspaltung der GST mit Thrombin ein homogenes Produkt liefert. Mit dem gereinigten Baculovirus, das GST-CDK6 kodiert, wurden 2 l Suspensionskultur bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen pro ml mit einer MOI von 5 infiziert. Die Zellen wurden wie in Kapitel 3 beschrieben geerntet und das gewünschte Protein isoliert. Das Eluat von der Glutathion-Säule wurde auf einem SDS-Gel analysiert. Man erkennt in den Fraktionen des Eluats (Abb.

4-8) eine sehr intensive Bande, deren Größe GST-CKD6 entspricht. Die Hauptverunreinigung ist GST mit einer Größe von 26 kDa. Die Proteinausbeute aus einem Liter Kultur betrug 10-15 mg Fusionsprotein und GST.

Im nächsten Schritt wurden die Fraktionen vereinigt und durch Ultrafiltration durch eine Membran mit 10 kDa Ausschlussgrenze bis 2 mg/ml GST-CDK6 aufkonzentriert. Die Proteinlösung wurde gegen den Schneidepuffer für Thrombin dialysiert. Danach wurden 0,2 mg GST-CDK6 mit 2 Einheiten Thrombin versetzt und bei 4°C inkubiert. Nach 1, 2, 4, 8 und 16 Stunden wurden Proteinproben mittels Gelelektrophorese auf Vollständigkeit der Spaltung untersucht. Nach einer Stunde sind 50 % des GST-CDK6 gespalten. Nach zwei Stunden ist keine Fusion mehr sichtbar. Zwischen CDK6 und GST ist eine Abbaubande erkennbar, deren Intensität mit steigender Proteolysezeit zunimmt. Die Proteinproben nach 1 und 16 Stunden Spaltungszeit wurden mit einem Western Blot auf CDK6 untersucht (Abb. 4-8). Nach einer Stunde Proteolysezeit erkennt man auf der Membran neben einer intensiven Bande von CDK6 noch GST-CDK6 und eine schwache Abbaubande von CDK6, die bei 16-stündiger Proteolysezeit wesentlich intensiver ist.

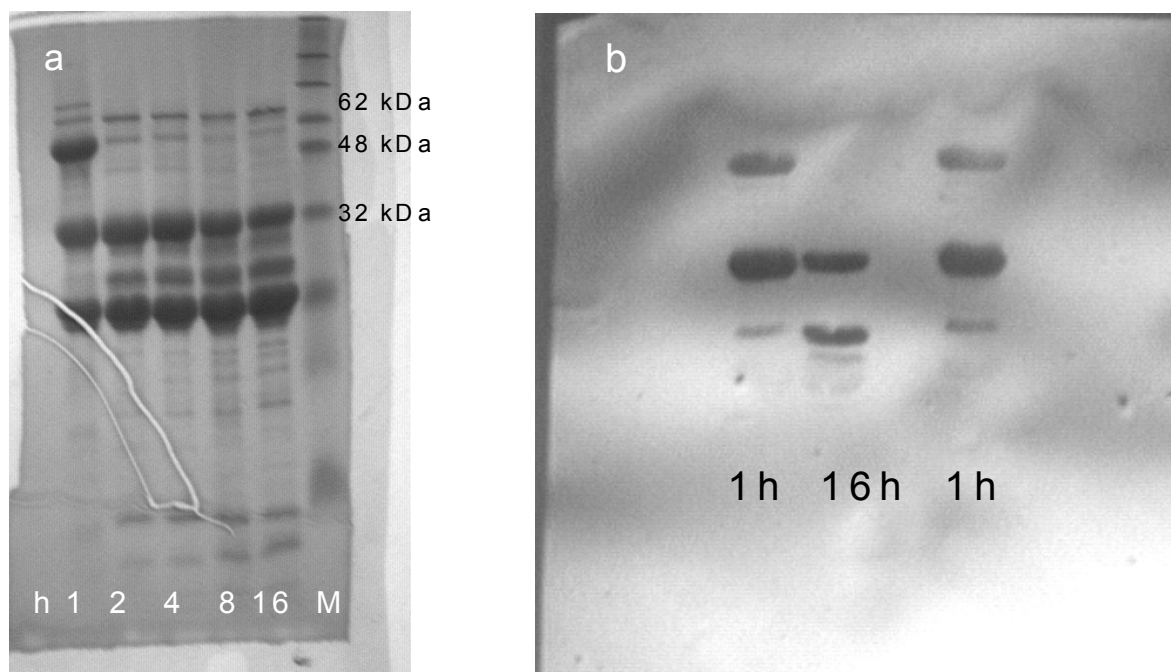


Abb. 4-9 a) 15 % SDS-Gel (links) des Testverdaus von GST-CDK6 mit Thrombin. Die Proben wurden 1, 2, 4, 8 und 16 Stunden nach Proteolysebeginn gezogen. Rechts (b) ist ein Western Blot zu sehen. Es wurden die Proben 1h und 16 Stunden nach Proteolysebeginn geblottet. Zur Detektion wurde ein monoklonaler CDK6-Antikörper verwendet.

Die restliche GST-CDK6 wurde für 2 Stunden mit Thrombin verdaut. Eine Edmann-Sequenzierung der CDK6-Bande brachte als Ergebnis eine homogene Zusammensetzung der CDK6-Bande. Das Thrombin hat nur an der dafür vorgesehenen Stelle geschnitten. Da auf dem Western-Blot bei längerer Spaltung eine Abbaubande zu erkennen ist, besitzt CDK6 zumindest eine weitere unspezifische Spaltstelle für Thrombin. Im nächsten Arbeitsschritt wurde versucht das CDK6 von der GST zu trennen. Die Proteinmischung wurde nach der Spaltreaktion in einer Dialysemembran mit 10 kDa Ausschlussgrenze gegen Puffer D dialysiert. Die Lösung wurde nach Versetzen mit 10 ml Glutathion-Sepharose FF für 5 Stunden inkubiert. Durchfluss und Eluat wurden auf einem SDS-Gel untersucht. Im Durchfluss war CDK6 in hoher Reinheit vorhanden. Das Eluat bestand hauptsächlich aus GST mit einem sehr geringen Anteil an GST-CDK6.

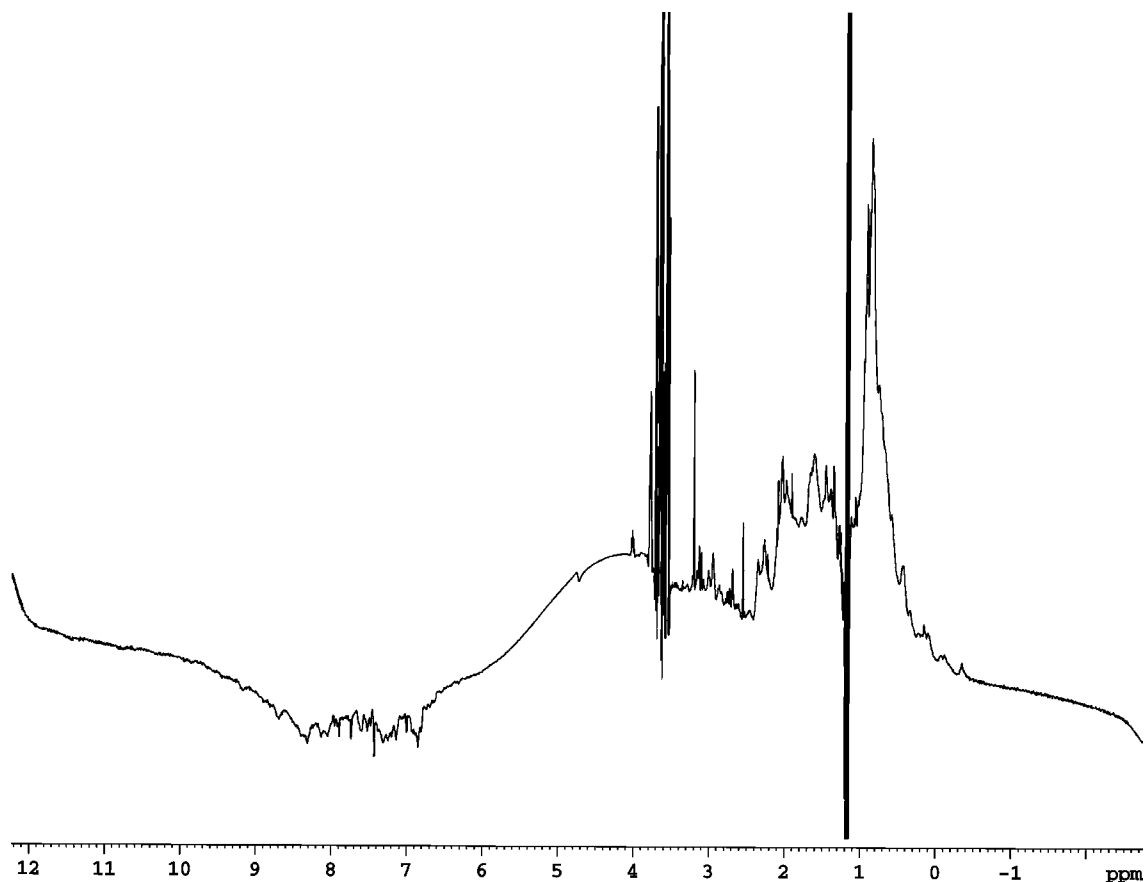


Abb. 4-10: ^1H -Spektrum von CDK6 nach Abspaltung der GST-Fusion

Zur Beurteilung der Proteine wurden His₆-CDK6 und CDK6 nach Abtrennung des GST bzw. der Hexahistidin-Fusion in einer Dialysemembran mit 10 kDa Ausschlussgrenze gegen den entsprechenden NMR-Puffer dialysiert. Alle Proben wurden durch Ultrafiltration auf 8 mg/ml Proteinkonzentration gebracht. Danach wurden eindimensionale ^1H -Spektren aufge-

nommen (Abb. 4-10 bis 4-12). Die sehr intensiven und scharfen Signale bei 1,2 ppm und 3,6 ppm stammen von kleinen organischen Verbindungen. Sie wurden von DTT, Isopropanol, in dem das PMSF gelöst wurde, und Glycerin verursacht. Die Spektren zeigen jeweils eine Faltung der Proteine, die durch die zahlreichen Signale auf der Schulter des intensiven Multipletts im Bereich von 0-1 ppm belegt wird. Im Falle der His₆-CDK6 (Abb. 4-11) erkennt man im Bereich der Amidprotonen von 8,0-8,5 ppm eine große Zahl von Signalen mit geringer Dispersion. Diese Peaks besitzen eine chemische Verschiebung, die für hoch flexible Amidprotonen im Protein-Rückgrat charakteristisch ist. His₆-CDK6 besitzt ausgedehnte sehr flexible Abschnitte in seiner Struktur. Die reine CDK6 wies nach Abspaltung der GST und der Hexahistidin-Fusion eine geringere Zahl von flexiblen Aminosäuren zwischen 8,0 und 8,5 ppm auf (Abb. 4-10; Abb. 4-12). Die CDK6-Struktur beinhaltet wenige hoch flexible Abschnitte. Die aus GST-CDK6 gewonnene Kinase besitzt nach Abspaltung der GST (Abb. 4-10) die wenigsten flexiblen Bereiche, wie die bessere Verteilung der Signale im Bereich von 8,0-9,0 ppm belegt.

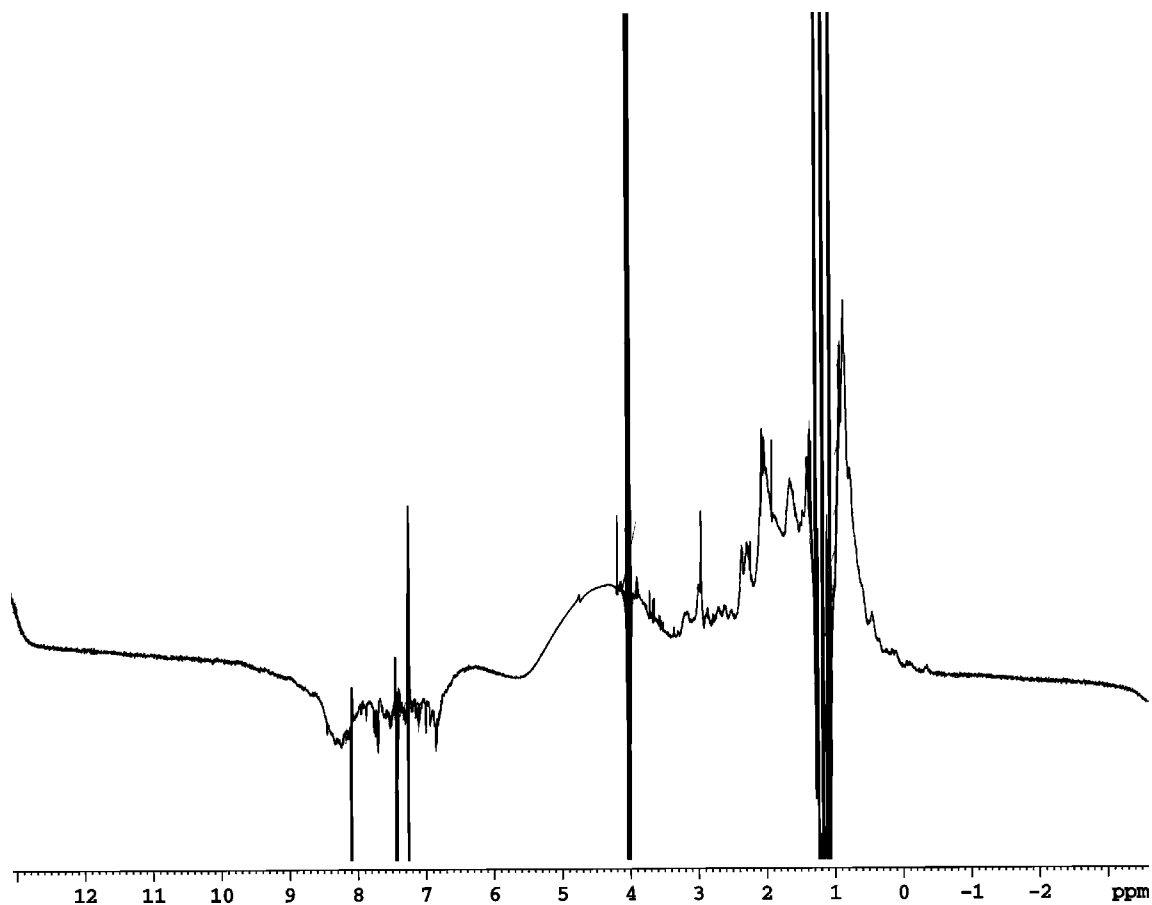


Abb. 4-11: ¹H-Spektrum von CDK6 vor Abspaltung der Hexahistidin-Fusion

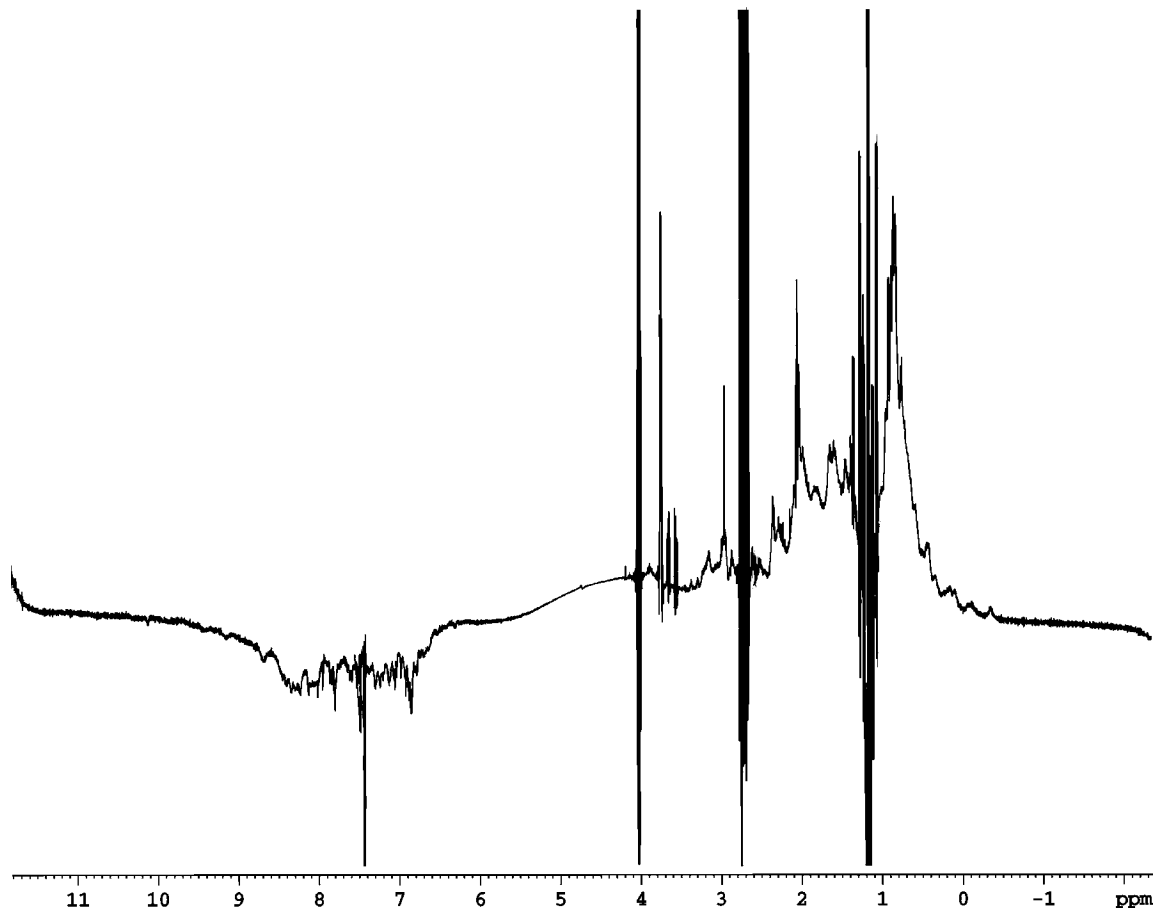


Abb. 4-12: ^1H -Spektrum von CDK6 nach Abspaltung der Hexahistidin-Fusion

Während der dreistündigen Aufnahme des Spektrums bei 300K fiel ein geringer Teil des Fusionsproteins aus. Die reine CDK6 war wesentlich instabiler. Nach der Messung blieb ein wesentlich geringerer Anteil des Proteins in Lösung. Die His₆-CDK6 wurde im Abstand von 14 Tagen einer analytischen Gelfiltration unterworfen. Dabei zeigte sich, dass mit zunehmender Lagerung bei 4°C der Anteil an hochmolekularen Proteinaggregaten zunimmt.

GST-CDK6 und His₆-CDK6 wurden auch in einem Bioreaktor exprimiert, um eine größere Menge an Protein zu gewinnen. Dazu wurden 4l Suspensionskultur bei einer Dichte von 3 Mio. Zellen pro Milliliter mit dem entsprechenden Virus (MOI=5) infiziert. Die Expressionszeit betrug 65 Stunden. Die Ausbeute war 25-30 % höher im Vergleich zu den Rührzellen.

2 Einleitende Versuche zur selektiven ^{15}N -Markierung von CDK6

Zur Untersuchung, ob CDK6 in Insektenzellen prinzipiell selektiv mit ^{15}N -Aminosäuren markiert werden kann, wurden die Sf9-Insektenzellen an das serumfreie Medium IPL41 ge-

wöhnt. Dieses Medium ist in seiner Zusammensetzung bekannt und kann somit mit den gewünschten ^{15}N -Aminosäuren versetzt werden. Die Umgewöhnungszeit der Zellen betrug zwei Monate. Auch nach dieser Zeit betrug die Ausbeute in IPL41 ohne Serum nur 30 % im Vergleich zur Ausbeute in SF900 II.

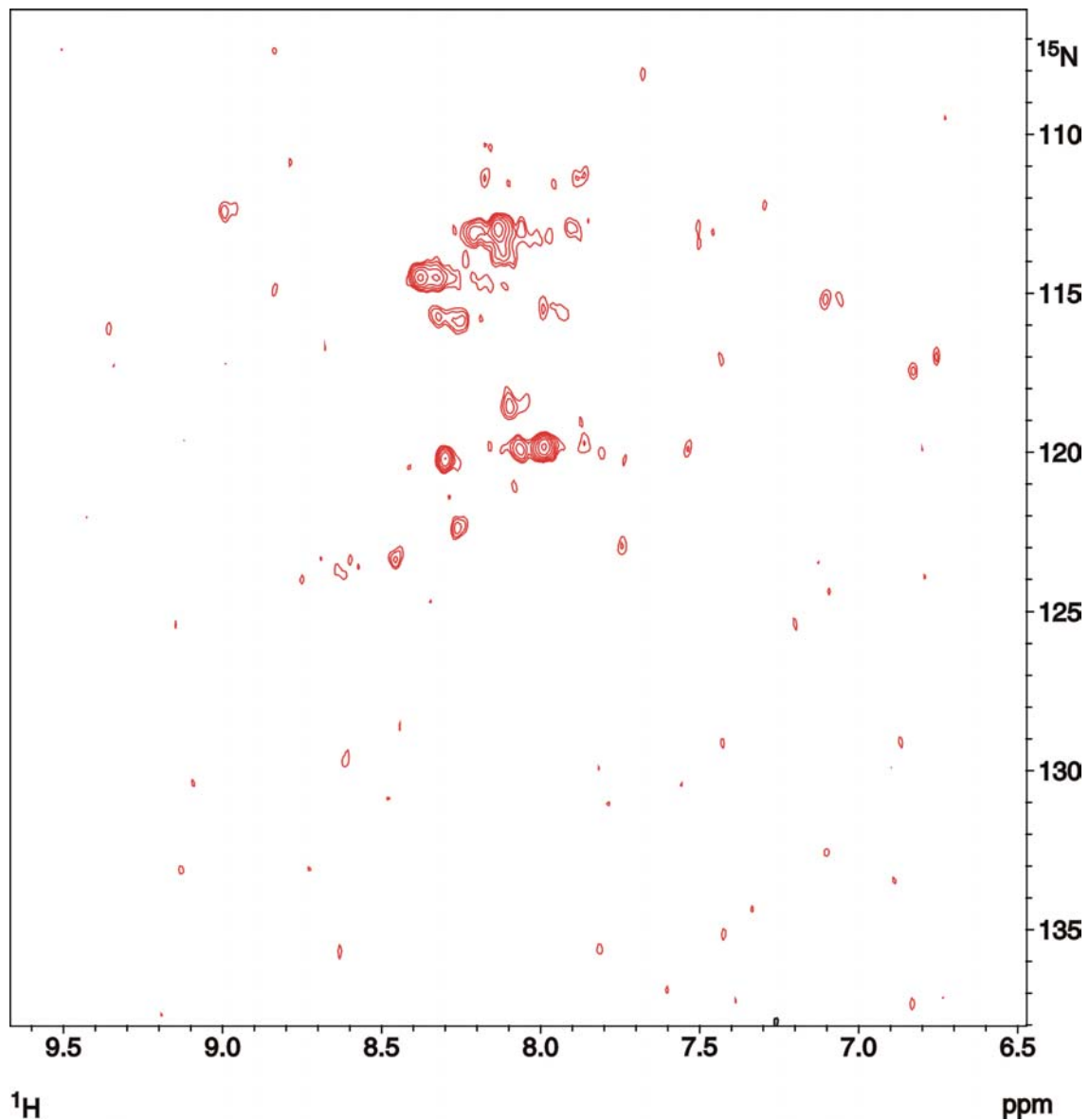


Abb. 4-13: HSQC-Spektrum von His₆-CDK6 selektiv mit ^{15}N -Glycin markiert

Zur Markierung wurden ^{15}N -Glycin und ^{15}N -Leucin in IPL41 verwendet. Jeweils zwei Liter Suspensionskultur wurden bei einer Dichte von 2 Mio. Zellen pro Milliliter mit dem Baculovirus für His₆-CDK6 (MOI=5) infiziert. Das Protein wurde nach bekanntem Protokoll exprimiert und gereinigt. Auf eine Spaltung der Hexahistidin-Fusion wurde verzichtet, um die Stabilität der His₆-CDK6 zu erhöhen. Das Protein wurde auf 8 mg/ml aufkonzentriert. Danach

wurden HSQC-Spektren von den Proben aufgenommen. Als Probenpuffer diente zuerst eine Lösung mit 50 mM Na_2HPO_4 (pH 7,2) und 400mM NaCl. Die Messungen wurden bei 300 K durchgeführt, die Messdauer betrug 16 Stunden. Das Protein war nach Beendigung der Messungen in einem beträchtlichen Maße ausgefallen. Bei der Verwendung von ^{15}N -Glycin erhält man, wie in Abb. 4-13 zu sehen, 8 intensive Peaks neben zahlreichen schwächeren Signalen.

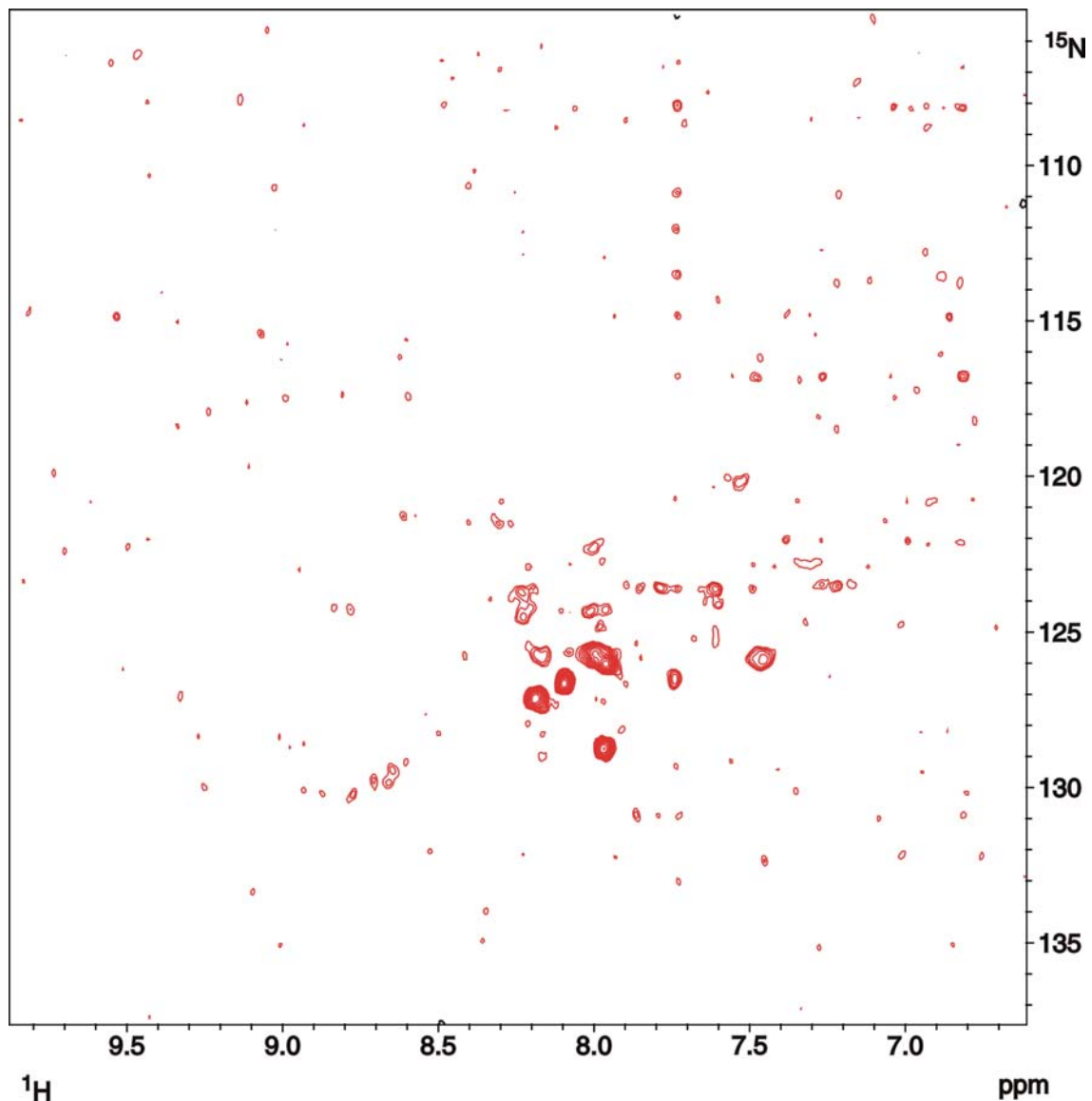


Abb. 4-14: HSQC-Spektrum von His₆-CDK6 selektiv mit ^{15}N -Leucin markiert.

Die Zahl der intensiven Signale ist deutlich geringer als die Anzahl der Glycine in dem Fusionsprotein, die 24 beträgt. Die chemischen Verschiebungen liegen in der Stickstoff-Dimension in einem Bereich, der für Glycine zu erwarten ist. Die sieben sehr intensiven Signale deuten auf hoch flexible und teilweise ungefaltete Aminosäuren hin. Dies wird auch durch die chemische Verschiebung der Peaks in Proton-Richtung von 8,0-8,5 unterstrichen.

Die Intensität der Peaks, die nicht in diesem ppm-Bereich liegen, ist deutlich geringer. Auch im Falle der Markierung mit ^{15}N -Leucin (Abb. 4-14) weicht die Peakzahl sehr stark von der Anzahl der Leucine in dem Fusionsprotein, die 39 beträgt, ab. Es sind wenige sehr intensive Signale zwischen 8,0 und 8,5 ppm in Proton-Richtung neben einer Vielzahl schwächerer erkennbar. Auch bei dieser Messung fiel ein großer Teil des Proteins aus. Eine Erhöhung des pH-Wertes im Probenpuffer auf 7,8 erhöhte die Stabilität des Proteins während der Aufnahme des HSQC-Spektren etwas und veränderte nichts an der Peakzahl. Die Untersuchungen zeigten auch, dass die Insektenzellen im serumfreien Medium im Vergleich zu SF900 II schlechter zu infizieren waren. IPL41 lieferte trotz seines hohen Gehaltes an Aminosäuren nicht die benötigte Ausbeute an Protein, um die Studien mit diesem Medium fortzusetzen.

Da die Ergebnisse zur selektiven Markierung von CDK6 in Insektenzellen nicht aussagekräftig genug waren, um weiterführende Experimente durchzuführen, und das Medium IPL41 nicht für die Markierung von Proteinen in Insektenzellen optimiert war, wurden im weiteren Verlauf der Forschungsarbeiten optimierte Medien entwickelt. Darüber hinaus mussten vergleichende Studien zur selektiven Markierung in *E. coli* und Sf9 durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

3 Selektive Markierung von GST mit ^{15}N -Aminosäuren

3.1 Herstellung eines rekombinanten GST-Baculovirus

Um die Möglichkeit zur effizienten Isotopenmarkierung von Proteinen in Insektenzellen zu untersuchen, müssen vergleichende Studien zwischen der Expression in Insektenzellen und in Bakterien durchgeführt werden. Für diese Aufgabe wird ein Protein benötigt, das von beiden Expressionssystemen in vergleichbar hoher Ausbeute geliefert wird. Es sollte in löslicher Form gebildet werden und über einen größeren pH-Bereich stabil sein. Die Wahl fiel auf die Glutathion-S-Transferase aus *S. japonicum*, auf die alle Kriterien zutreffen. Außerdem ist sie leicht aufzureinigen und wurde bereits mit CDK6 fusioniert. Zu einem späteren Zeitpunkt können selektiv isotopenmarkierte Proben von GST-CDK6 spektroskopisch analysiert werden und die Signale von GST in dem Spektrum leicht identifiziert werden.

Als Transfervektor wurde das originäre Plasmid pAcG2T von Pharmingen verwendet. Die Cotransfektion wurde unter Verwendung der Calciumphosphat-Fällung mit der BaculoGold DNA durchgeführt. Zur Isolation der rekombinanten Baculoviren wurde das Protokoll wie bei

der Herstellung der GST-CDK6-Baculoviren verwendet. Zur Expression von *E. coli* wurde das Plasmid pGex4T2 in den Bakterienstamm BL21 (DE3) transformiert. In Abb. 4-15 ist ein Vergleich der Primärsequenzen der GST aus den beiden Organismen dargestellt.

E. coli MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEHHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID
Sf9 MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEHHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID

GDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYS KDFETLKV
 GDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYS KDFETLKV

DFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAF'PKLVCFK
 DFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAF'PKLVCFK

KRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGI **PGSTRAAAS**
 KRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGI **HRD**

Abb. 4-15: Primärsequenz von GST exprimiert in *E. coli*. Kursiv ist darunter die Primärsequenz der GST aus den Insektenzellen dargestellt. Beide Proteinsequenzen sind bis auf einen kurzen rot markierten Bereich im C-Terminus identisch.

Die Expressionen in beiden Organismen wurden wie in dem Kapitel 3 Abschnitt 3 beschrieben durchgeführt. Zur Aufreinigung des Proteins mit Hilfe von Glutathion-Sepharose FF wurde das Protokoll für GST-CDK6 verwendet. Beide Expressionssysteme lieferten 7-10 mg GST pro Liter Kultur. Das Protein lag in hoher Reinheit vor.

3.2 Entwicklung eines Mediums zur selektiven Anreicherung von ¹⁵N-markierten Aminosäuren in Proteinen

Zur Herstellung von Proteinen, die selektiv mit ¹⁵N-Aminosäuren markiert sind, muss ein Medium entwickelt werden, das einen optimalen Markierungsgrad bei geringst möglicher Menge an isotopenmarkierter Aminosäure erlaubt. Aus diesem Grund wurden in einem ersten Schritt Wachstumsstudien mit verschiedenen erhältlichen Insektenmedien durchgeführt. Dazu wurden die Medien SF900 II, IPL41 und KBM10 ausgewählt. Die Zusammensetzungen von serumfreien IPL41 und KBM10 wurden, wie bereits erwähnt, veröffentlicht und sind somit frei zugänglich. Die genaue Rezeptur von SF900 II ist geheim und kann nur vom Hersteller modifiziert werden. Die Wachstumskurven der Medien sind in Abb. 4-16 dargestellt. Für die Wachstumsstudien wurden adaptierte Zellen in 50 ml des entsprechenden Mediums mit einer Dichte von 3,0-4,0 x 10⁵/ml vorgelegt. Das Wachstum wurde 144 Stunden lang bei 27°C und 90 rpm aufgezeichnet, wobei alle 24 Stunden die Zelldichte bestimmt wurde. Die maximal

erreichbare Zelldichte ist bei SF900 II mit 6 Mio. Zellen pro Milliliter um 25-50 % höher als bei den übrigen Medien.

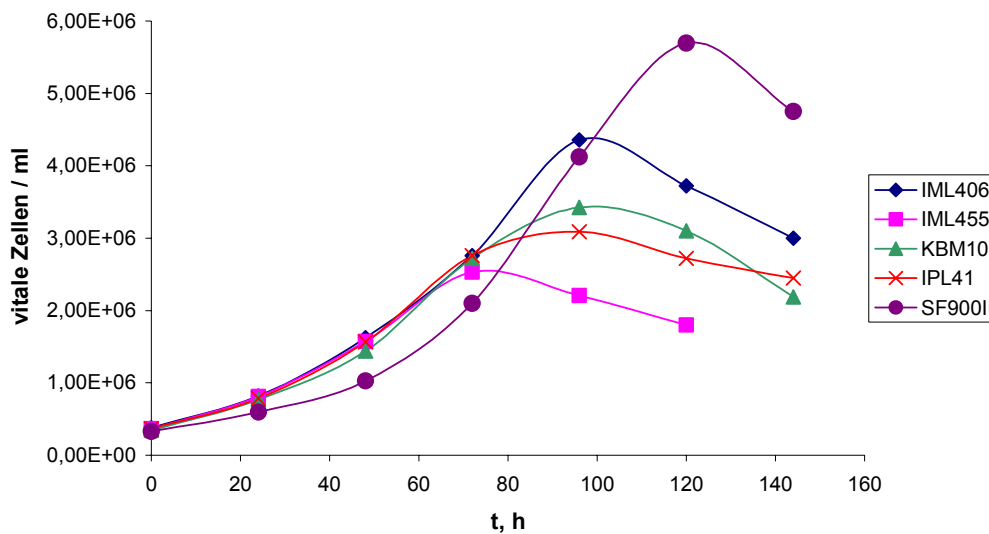


Abb. 4-16: Wachstumskurven der verschiedenen Insektenmedien

Das Maximum wurde 24 Stunden später erreicht und die folgende Abnahme der vitalen Zellen ist weniger ausgeprägt. Dies deutete auf einen hohen Gehalt an Glukose und Aminosäuren hin. Ein Vergleich zwischen IPL41 und KBM10 zeigte, dass der Gehalt an Aminosäuren im IPL41 um ungefähr 100 % höher und der Gehalt an Glukose um 50 % geringer war. Die sehr ähnlichen Wachstumskurven belegen, dass der Aminosäuregehalt in KBM10 für ein gesundes Zellwachstum ausreichend ist. Da die Zusammensetzung der Aminosäuren in KBM10 für die selektive Isotopenmarkierung nicht optimal ist, wurden im Laufe der Untersuchungen die Medien IML406 und IML455 entwickelt, deren Gesamtgehalt an Aminosäuren mit dem Medium KBM10 vergleichbar ist. Im Medium IML455 wurden Glutamin und Asparaginsäure gegen NH_4Cl ausgetauscht, was auch schon bei anderen Medien durchgeführt wurde. Die beiden Aminosäuren sind nicht essentiell und können aus anderen Aminosäuren gebildet werden. Im Falle des Glutamins wird dessen Bildung in der Anwesenheit von Ammonium begünstigt. In allen untersuchten Medien weisen die Insektenzellen, wie in Abb. 4-16 zu sehen, in den ersten 80 Stunden ein exponentielles Wachstum auf. In SF900 II beträgt die exponentielle Wachstumsphase 110 Stunden. In IML406 besitzen die Zellen eine etwas erhöhte maximale Zelldichte gegenüber IPL41 und KBM10. Die maximale Zelldichte in SF900 II liegt etwa 20 % höher als in IML406. Mit dem Medium IML455 wird mit 2,5 Mio. Zellen pro Milliliter die geringste maximale Dichte erzielt. Nach Durchlaufen eines Maximums nimmt die Zahl der vitalen Zellen in allen Medien ab. Mit Hilfe von Testexpressionen wurden

die Proteinausbeuten bei Verwendung der verschiedenen Medien bestimmt. Dazu wurden 100ml Zellsuspension bei einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter mit GST produzierenden Baculoviren (MOI=4) infiziert. Nach 60 Stunden wurden die Zellen geerntet. GST wurde, wie beschrieben gereinigt und quantitativ bestimmt. KBM10 und IML406 weisen um 15-20 % verringerte Ausbeuten gegenüber SF900 II auf. Bei serumfreien IPL41 sinkt die Ausbeute um 70 %. Bei Verwendung von IPL41 mit 5 % Serum erreicht man eine Ausbeute im Bereich von IML406. Bei IML455 liegt die Ausbeute 25-30% unter der des kommerziellen Mediums SF900 II. Die Medien IML406 und IML455 wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen zur Herstellung der selektiv ^{15}N -markierten Proteinproben verwendet.

In der nächsten Phase der Studien wurden einzelne Aminosäuren nicht mehr gesondert dem Medium IML406 zugesetzt. Es sollte untersucht werden, wie sich diese Maßnahme auf Zellwachstum und Proteinausbeute auswirkt. Zu diesem Zweck wurde das Medium IML406 entsprechend modifiziert und die Sf9-Zellen an die neuen Medien adaptiert. In den Adhäsionskulturen waren über einen Zeitraum von zwei Wochen keine Beeinträchtigungen im Wachstum feststellbar. Zur Bestimmung der maximalen Zelldichte wurde das Wachstum der Zellen in 50 ml Suspensionskulturen über 144 Stunden hinweg analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-17 dargestellt.

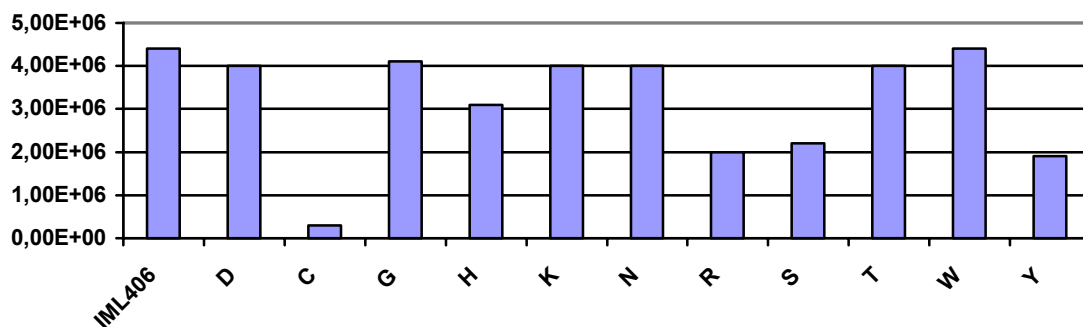


Abb. 4-17: Maximal erreichbare Zelldichte nach dem Entfernen der angegebenen Aminosäure aus dem Medium.

In IML406 ohne Cystein lassen sich in Suspensionskultur keine hohen Zelldichten erreichen. In Medien ohne Arginin, Serin und Tyrosin sinkt die erreichbare Zelldichte um 50 %. Im Falle des Histidins verringert sich die Zelldichte auf $3,2 \times 10^6$. Das Entfernen von Lysin, Glycin, Tryptophan, Threonin, Asparagin oder Asparaginsäure hat keinen negativen Einfluss auf die maximale Zelldichte. Bei allen Kulturen zeigte sich jedoch nach Erreichen des Maximums eine raschere Abnahme der Zahl an vitalen Zellen.

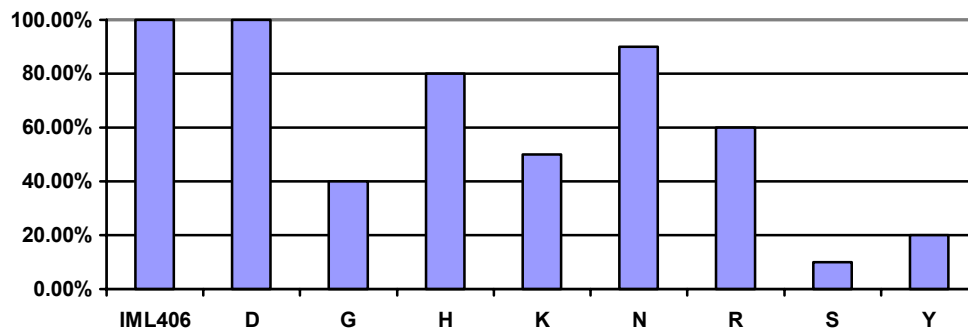


Abb. 4-18: Ausbeute an GST nach dem Entfernen der angegebenen Aminosäure aus dem Medium. Die Ausbeute in IML406 wurde auf 100 % gesetzt

Testexpressionen in den Medien sollten den Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Proteinausbeute aufzeigen. Um alle Medien trotz der unterschiedlichen maximalen Zelldichten miteinander vergleichen zu können, betrug die Zelldichte bei der Infektion nur 1,5 Mio. Zellen pro Milliliter. Jeweils 100 ml Suspensionskultur wurden mit GST-Baculoviren (MOI=5) infiziert und bereits nach 50 Stunden geerntet. Das Protein wurde aufgereinigt und quantitativ nach Bradford bestimmt.

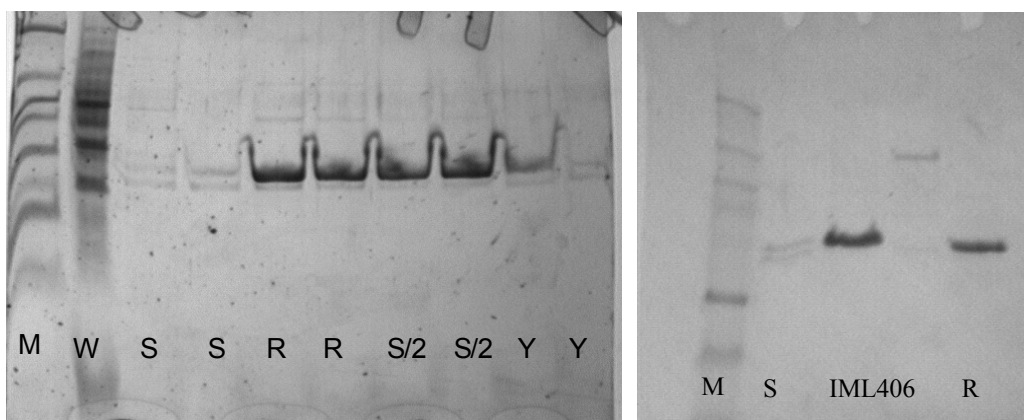


Abb. 4-19: Die SDS-Gele wurden nach Isolation der GST aus den Testexpressionen angefertigt. Folgende Aminosäuren wurden dabei dem Medium INL406 nicht zugesetzt: Serin (S), Arginin (R), Tyrosin (Y). In einem Medium wurde Serin um 50 % reduziert (S/2). M: Protein-Größenmarker; W: Proteine, die beim Waschen der Glutathion Sepharose entfernt wurden.

Die Ausbeute in den Medien ohne Tyrosin oder Serin ist bezogen auf IML406 deutlich auf 20 % beziehungsweise 10 % reduziert (Abb. 4-18). Im Falle von Glycin und Lysin verringert sich die Proteinausbeute um 50-60 %. Das Entfernen von Asparaginsäure, Asparagin oder Histidin hat keinen großen Einfluss auf die Proteinexpression. Im Falle des Arginins wird ein

Rückgang der Proteinausbeute um etwa 40 % festgestellt. Abb. 4-18 zeigt SDS-Gele, auf denen die unterschiedlichen Ausbeuten aus 100 ml Suspensionskultur klar zu erkennen sind.

3.3 Herstellung von selektiv ^{15}N -isotopenmarkierten GST-Proben in *E. coli* und Sf9

Nach Entwicklung der Medien musste nun ein Protein ausgewählt werden, mit dessen Hilfe Aussagen zur selektiven Markierung von Aminosäuren in Insektenzellen unter Verwendung von IML406 gemacht werden konnten. Es galt zu untersuchen, ob die verwendeten Aminosäuremengen ausreichend waren. Das bereits verwendete Protein GST erfüllte die weiter oben erwähnten Bedingungen bezüglich Stabilität, leichter Aufreinigung und hoher Ausbeute sehr gut. Das Protein wurde deshalb als Modellprotein für die selektive Markierung mit ^{15}N -Aminosäuren in Insektenzellen u der Benutzung von IML406 verwendet. Als Ausgangspunkt dienten Aminosäuren, die routinemäßig in *E. coli* zur Herstellung selektiv markierter Proteine eingesetzt werden. Dazu zählen Glycin, Leucin, Lysin, Valin und Phenylalanin. Bei diesen Untersuchungen sollte auch die Frage geklärt werden, ob es Unterschiede zwischen beiden Expressionssystemen in der Umwandlung der genannten Aminosäuren in unerwünschte Nebenprodukte gibt. Die lange Expressionszeit in Insektenzellen begünstigt die Umwandlung von Aminosäuren auf dem Wege der vorhandenen Aminosäuremetabolismen. Eine weitere Fragestellung war, ob die Insektenzellen ^{15}N -Ammoniumchlorid zur effizienten Synthese von Aminosäuren verwenden können und wie ausgeprägt die Umwandlung von Glutaminsäure und Asparaginsäure in andere Aminosäuren ist.

Zur Markierung der gewünschten Aminosäuren wurden in dem Medium IML406 und dem Medium zur bakteriellen Expression die ^{15}N -markierten Aminosäuren in den in Tab. 4-2 aufgelisteten Mengen eingesetzt. Es wurden Aminosäuren verwendet, bei denen nur der ^{14}N -Stickstoff in der α -Position durch das ^{15}N -Isotop ersetzt wurde. Bis auf Lysin sind die verwendeten Mengen der ^{15}N -Aminosäuren in beiden Expressionssystemen recht ähnlich. Bei der bakteriellen Expression wurde 1 l Kultur verwendet, bei den Insektenzellen 2 l Suspensionskultur. Die gereinigten Proteine wurden in Dialysemembranen mit 10 kDa Ausschlussgrenze gegen den benötigten NMR-Puffer dialysiert. Anschließend wurden die Proteine durch Ultrafiltration auf 12-16 mg/ml aufkonzentriert und NMR-spektroskopisch analysiert. In den folgenden Abbildungen 4-20 bis 4-33 sind die Ergebnisse der aminosäurespezifischen Markierungen der GST in *E. coli* und Sf9-Insektenzellen dargestellt. Die typischen Werte der

chemischen Verschiebungen für Wasserstoff und Stickstoff für Aminosäuren wurden der BMRB-Datenbank der Universität von Wisconsin entnommen.

Tab. 4-2: Vergleich der eingesetzten Menge an ^{15}N -Aminosäuren in den Medien für *E. coli* nach Senn *et al.* und Sf9 unter Verwendung von IML406. In Insektenzellen wurde Tyrosin und Isoleucin nicht selektiv markiert (*).

^{15}N -Aminosäure	Eingesetzte Menge an ^{15}N -Aminosäure im Medium für	
	<i>E. coli</i>	Sf9
Glycin	800 mg/l	650 mg/l
Lysin	200 mg/l	625 mg/l
Valin	200 mg/m	200 mg/l
Phenylalanin	100 mg/l	250 mg/l
Isoleucin	200 mg/l	175 mg/l *
Leucin	200 mg/l	400 mg/l
Glutaminsäure	800 mg/l	600 mg/l
Asparaginsäure	500 mg/l	350 mg/l
Tyrosin	200 mg/l	100 mg/l *
Alanin	800 mg/l	-

In einem ersten Experiment wurde GST unter Verwendung von ^{15}N -Glycin in Insektenzellen und *E. coli* exprimiert. Die überlagerten HSQCs sind in Abb. 4-20 dargestellt. Die in beiden Medien verwendeten Mengen an Glycin waren ähnlich. Die Menge an Serin war in IML406 mit 550 mg/l wesentlich geringer als im bakteriellen Medium, das 1,6 g/l Serin enthielt. Die Signale besitzen eine chemische Verschiebung von 105-125 ppm in der Stickstoff-Richtung. Diese Werte sind charakteristisch für NH-Gruppen des Glycins. Die breite Dispersion der Signale von 7,2-9,1 ppm in der Proton-Dimension ist für gefaltete Proteine typisch. Nach der Überlagerung der Spektren erkennt man ein hohes Maß an Übereinstimmung in der Anzahl und der chemischen Verschiebung der Peaks. Der größte Teil der Peaks im HSQC-Spektrum der bakteriell exprimierten GST lassen sich auch im Spektrum der viral exprimierten GST finden. Die Gesamtzahl der Peaks liegt sehr nahe bei der Anzahl der in GST enthaltenen Glycine. Somit ist es möglich, mit Hilfe des Baculovirussystems selektiv ^{15}N -Glycin markierte Proteine herzustellen.

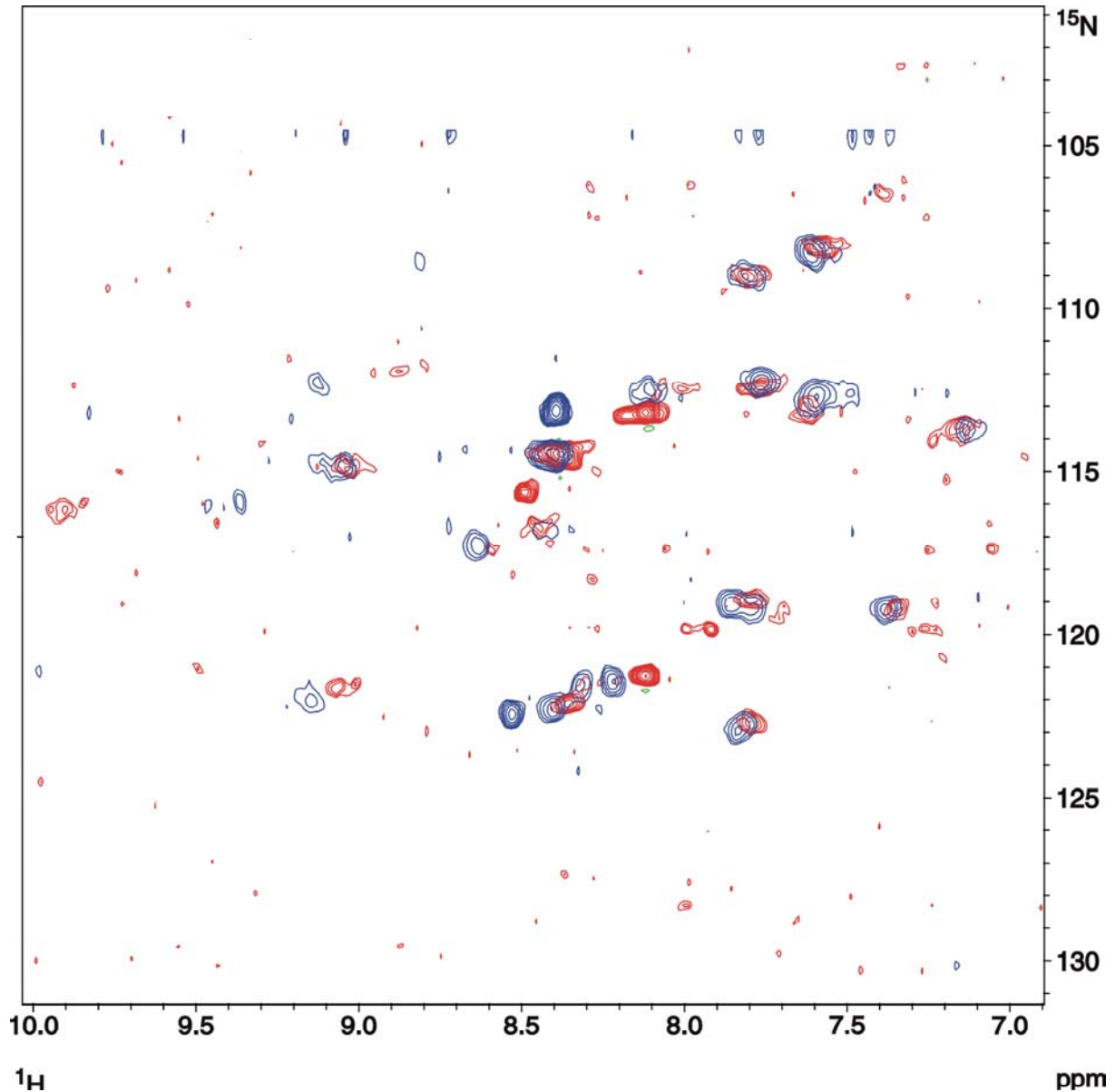


Abb. 4-20: Überlagerung der HSQC's von ^{15}N -Glycyl markierter GST; blau: Expression in SF9-Insektenzellen; rot: Expression in *E. coli*. Beide Spektren zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmung im Peakmuster. Die Expression in Insektenzellen lieferte 17 intensive Signale. Dies entspricht fast der Anzahl der Glycine in diesem GST-Konstrukt, die 16 beträgt. Bei der bakteriellen Expression waren mit 16 Peaks nur unwesentlich weniger erkennbar. 15 Signale lassen sich in beiden Spektren finden. Die mit 60 Stunden 15-mal längere Expressionszeit in SF9 begünstigt nicht die Markierung weiterer Aminosäuren. Der Gehalt an ^{15}N -Glycyl betrug in IML406 650 mg/l im Medium für *E. coli* 800 mg/l.

Im nächsten Schritt wurden ^{15}N -Lysin (Abb. 4-21) und ^{15}N -Phenylalanin (Abb. 4-22) zur selektiven Markierung verwendet. Die Markierung mit ^{15}N -Lysin wurde schon in der Literatur beschrieben (Creemers *et al.*, 1999). Das dort markierte Protein wurde für Festkörper-NMR verwendet. Beide Expressionssysteme lieferten für GST fast dasselbe Ergebnis bezüglich der Markierung von Lysin. Die Signale der Aminosäuren verteilen sich zwischen 115 und 135 ppm in der Stickstoff-Richtung und zwischen 6,5 und 9,0 ppm in der Proton-Richtung. Von den intensiven Signalen in beiden Spektren lassen sich 17 zur Deckung bringen. Zwei Peaks weisen in bakteriell erzeugter GST eine starke Abweichung in der chemischen Verschiebung von der GST aus Sf9 auf. Der größte Teil der Peaks besitzt dieselbe Intensität. Die Anzahl der Signale war mit 19 in beiden Expressionssystemen geringer als die Anzahl der Lysine in GST, die 21 beträgt. Die in IML406 im Vergleich zu dem bakteriellen Medium dreifach höhere Menge an ^{15}N -Lysin begünstigt nicht die Markierung weiterer Aminosäuren. Bei der Verwendung von ^{15}N -Phenylalanin in den Expressionsmedien liegen die Signale im Bereich zwischen 115 ppm und 130 ppm in der Stickstoff-Dimension und zwischen 6,5 ppm und 9,1 ppm in der Proton-Richtung. Diese Werte entsprechen typischen Werten für die chemische Verschiebung von Phenylalaninen. Bei aus *E. coli* gewonnener GST erhält man ein HSQC mit wesentlich mehr Peaks als bei GST aus Sf9-Insektenzellen. In dem bakteriellen Expressionssystem werden deutlich mehr Aminosäuren markiert als die Anzahl der Phenylalanine in GST erwarten lässt. Dies spricht für eine nicht zu vernachlässigende Umwandlung von Phenylalanin in andere Aminosäuren. Die neun intensiven Peaks im Spektrum der in Sf9 hergestellten GST können bis auf eine Ausnahme eindeutig intensiven Peaks im Spektrum der bakteriell exprimierten GST zugeordnet werden. Die Anzahl der Peaks bei GST aus Sf9-Insektenzellen ist trotz der doppelten Menge an ^{15}N -Phenylalanin in IML406 im Vergleich mit dem Medium für *E. coli* wesentlich geringer und entspricht der Zahl der Phenylalanine in GST. Die Überlagerung der HSQC-Spektren von mit ^{15}N -Tyrosin und mit ^{15}N -Phenylalanin markierter GST, die beide in *E. coli* exprimiert wurden, zeigt eine hohe Übereinstimmung der Signale. Fast alle Peaks im Tyrosin-Spektrum lassen sich im Phenylalanin-Spektrum als schwache Signale wiederfinden. Dies belegt eine leistungsfähige Umwandlung von Phenylalanin in Tyrosin in Bakterien. Die umgekehrte Reaktion lässt sich auch erkennen. Einige schwache Signale im HSQC von Tyrosin lassen sich als Phenylalanine identifizieren. Die eingesetzte Menge an ^{14}N -Tyrosin betrug in IML406 und in dem Medium für *E. coli* jeweils 100 mg/l. Darüber hinaus besitzt das ^{15}N -Phenylalanin-Spektrum der bakteriell exprimierten GST weitere Signale, die sich als Glutaminsäuren identifizieren lassen.

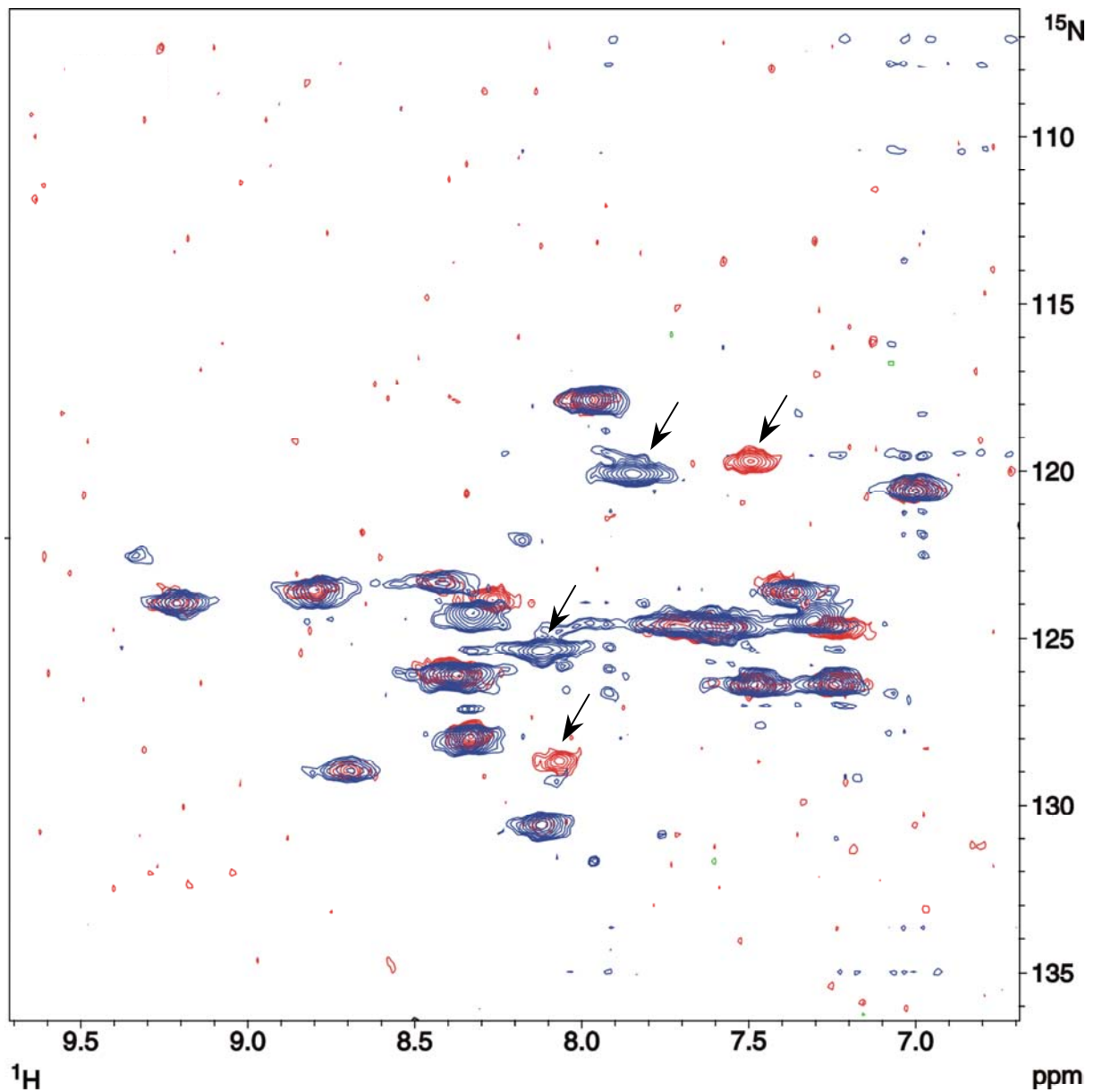


Abb. 4-21: Überlagerung der HSQC's von ^{15}N -Lysin markierter GST; blau: Expression in Sf9-Insektenzellen; rot: Expression in *E. coli*. In beiden Spektren sind 19 sehr intensive Signale zu erkennen. Da die Zahl der Lysine 21 beträgt, lassen sich nicht alle Aminosäuren in den Spektren identifizieren. Bei zwei Signalen, die mit Pfeilen gekennzeichnet wurden, gibt es deutliche Unterschiede in den verschiedenen Organismen bezüglich chemischen Verschiebung. Die restlichen 17 Peaks lassen sich zur Deckung bringen. Trotz der dreifachen Menge an Lysin in IML 406 ist keine Zunahme an der Signanzahl zu erkennen.

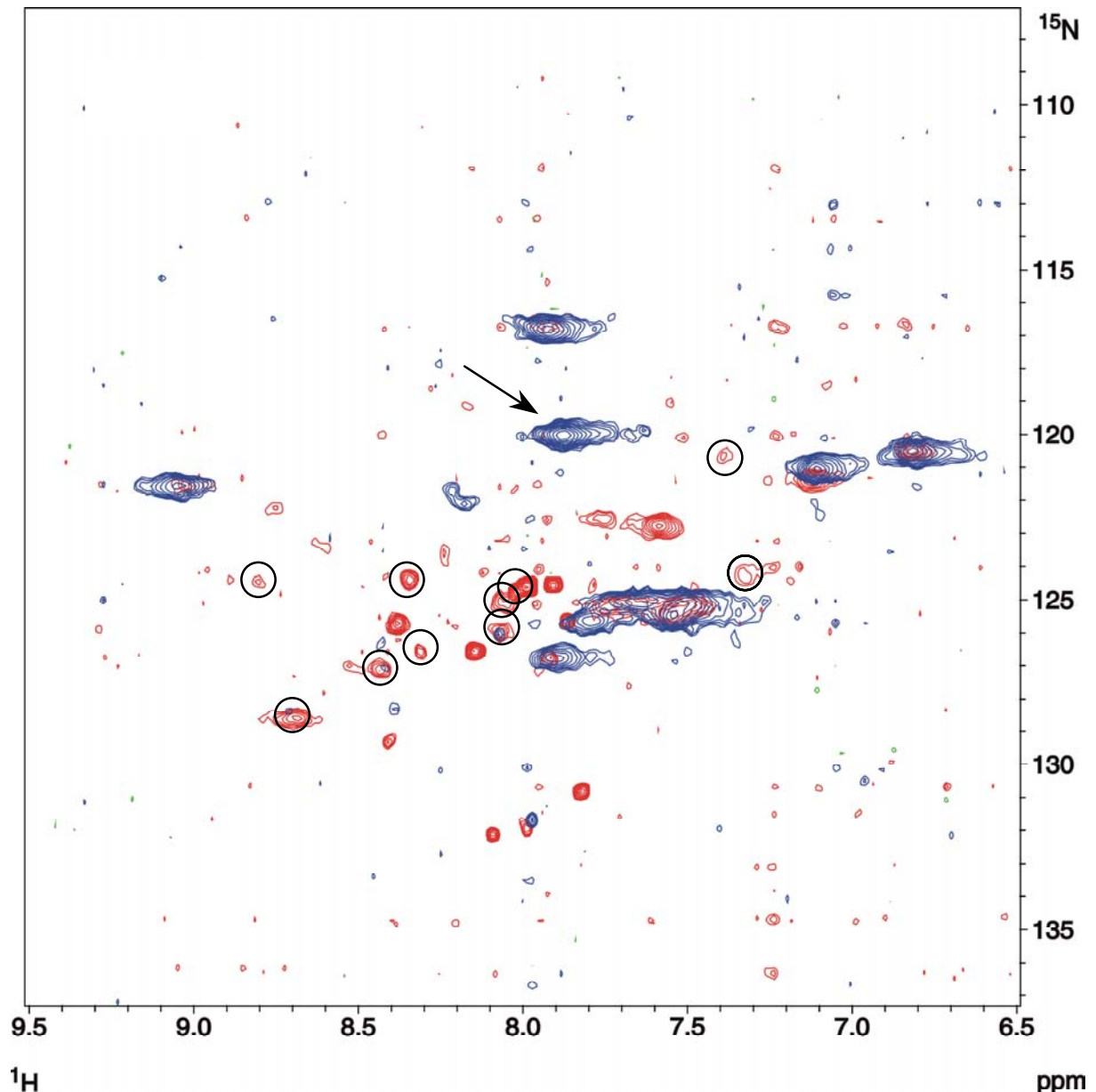


Abb. 4-22: Überlagerung der HSQC's von ^{15}N -Phenylalanin markierter GST; blau: Expression in Sf9-Insektenzellen; rot: Expression in *E. coli*. Im Spektrum aus Insektenzellen sind deutlich weniger Signale enthalten. Die Anzahl der neun intensiven Signale stimmt mit der Zahl an Phenylalaninen in GST überein. Kreuzmarkierungen spielten auf Grund der sehr schwachen Signalintensität knapp über der Stärke des Hintergrundrauschens keine Rolle. Bis auf eine Ausnahme (Pfeil) ließen sich alle Peaks der in Insektenzellen exprimierten GST mit denen der bakteriell gewonnen GST überlagern. In *E. coli* wurde Phenylalanin trotz des um Faktor 2,5 geringeren Gehalts im Medium wesentlich wirkungsvoller in andere Aminosäuren umgewandelt, wie die deutlich höhere Anzahl an Signalen belegt. Die mit Kreisen markierten Signale finden sich als intensive Signale des Spektrums der Markierung mit ^{15}N -Glutaminsäure in *E. coli* wieder.

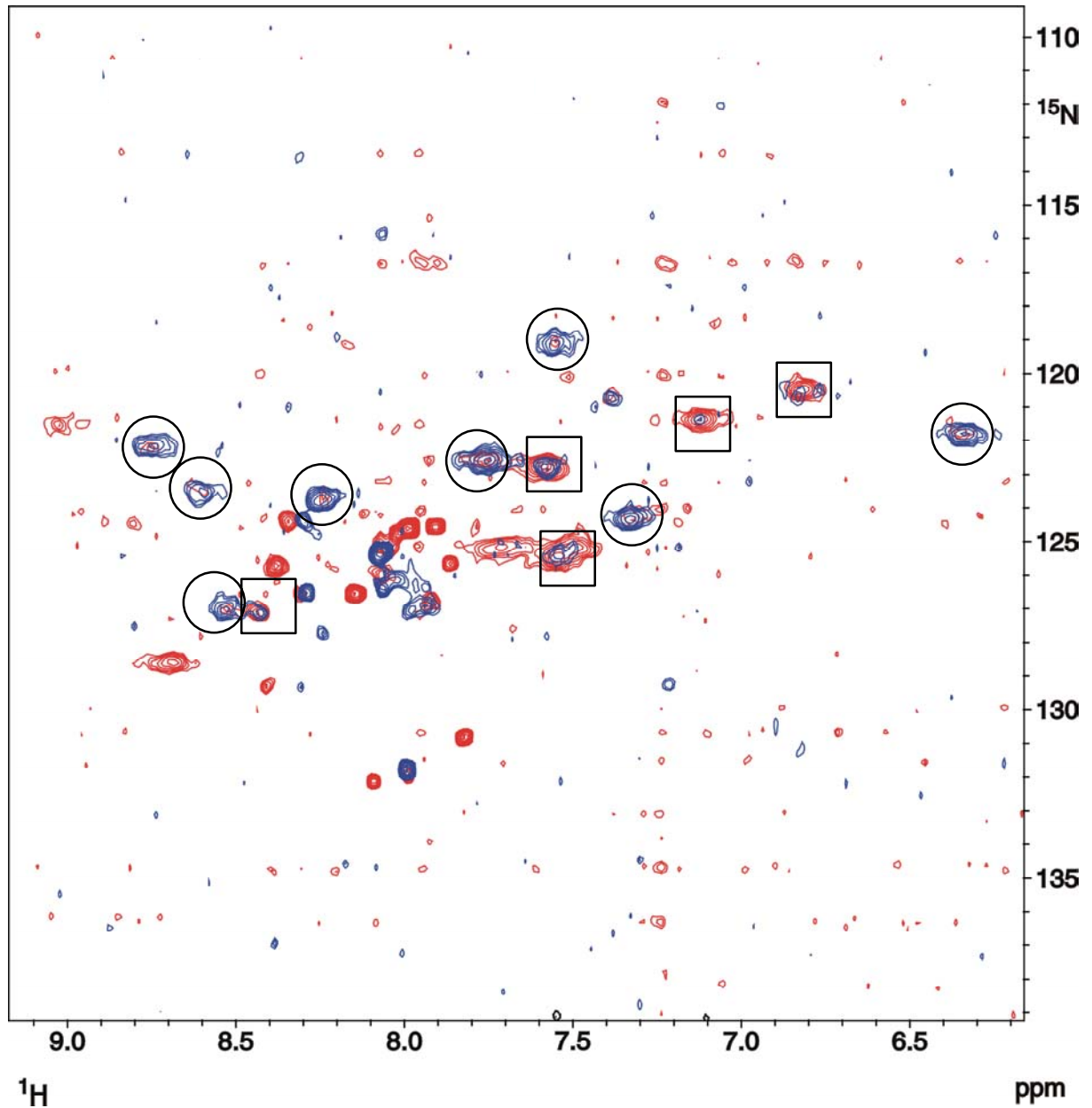


Abb. 4-23: Überlagerung der HSQC-Spektren von mit ^{15}N -Phenylalanin (rot) und ^{15}N -Tyrosin (blau) markierter GST, hergestellt aus *E. coli*. Der größte Teil der intensiven Signale im Tyrosin-Spektrum lassen sich mit schwächerer Intensität im Phenylalanin-Spektrum wiederfinden (durch Kreise markiert). Bei einigen Phe-Signalen, die durch Quadrate markiert sind, erkennt man auch Signale im HSQC nach Markierung von GST mit ^{15}N -Tyrosin. Beide Aminosäuren wandeln sich sehr effizient ineinander um.

Zum Abschluss des ersten Abschnitts der Versuche wurde GST mit ^{15}N -Valin (Abb. 4-24) und ^{15}N -Leucin (Abb. 4-26) selektiv markiert. Bei der Verwendung von ^{15}N -Valin wurden beträchtliche Unterschiede bei der Markierung von Aminosäuren in beiden Expressionssystemen sichtbar. Zehn Peaks lassen sich nach Überlagerung der Spektren zur Deckung bringen. Dies entspricht der Anzahl an Valinen in GST. Daneben sind weitere weniger intensive Signale sichtbar, die in Abhängigkeit von dem verwendeten Expressionssystem eine unterschiedliche Verteilung in den Spektren aufweisen. In Abbildung 4-25 erkennt man in der mit ^{15}N -Valin markierten GST aus *E. coli* schwache Signale, die intensiven Signalen in ^{15}N -Alanin markierter GST aus *E. coli* entsprechen. Eine Abbaureaktion von Valin in Bakterien ist somit die Bildung von Alanin. Im Spektrum mit ^{15}N -Valin markierter GST aus Sf9 hingegen fehlen diese schwachen Signale völlig. Die dort befindlichen Peaks von schwacher Intensität können keinen starken Signalen in anderen Spektren selektiv markierter Aminosäuren zugeordnet werden. Dies alles deutet auf einen unterschiedlichen Abbaumechanismus von Valin in *E. coli* und Insektenzellen hin. Die eingesetzte Menge an ^{15}N -Valin war in beiden Medien identisch. ^{15}N -Leucin markierte GST wurde in Insektenzellen und *E. coli* exprimiert. Das HSQC-Spektrum der viral gewonnenen GST weist eine Vielzahl von intensiven Peaks auf. Die Anzahl der Signale übersteigt mit 34 deutlich die Anzahl der Leucine in GST. In diesem Fall wird Leucin wahrscheinlich in andere Aminosäuren umgewandelt. Das bakteriell exprimierte GST zeigt im Spektrum weniger intensive Peaks, deren Zahl knapp unter der Zahl an Leucinen in GST liegt. Es lassen sich somit nicht alle Leucine im Spektrum identifizieren. Die Mehrzahl dieser Peaks lässt sich in Abbildung 4-26 Signalen der GST aus Insektenzellen zuordnen. Die Umwandlung von ^{15}N -Leucin ist in *E. coli* schwächer ausgeprägt und deutet auf einen anderen Metabolismus für Leucin hin. Im IML406 wurde mit 400 mg/l die doppelte Menge an ^{15}N -Leucin eingesetzt. Im nächsten Schritt wurde das ^{15}N -Leucin-Spektrum aus Sf9 mit dem ^{15}N -HSQC von Isoleucin aus *E. coli* überlagert (Abb. 4-27), da ein entsprechendes Spektrum für die Insektenzellen nicht vorlag. Im Spektrum von Isoleucin übersteigt die Signalzahl die Zahl dieser Aminosäure in GST um mehr als das Doppelte. Eine große Zahl schwacher Peaks aus diesem Spektrum lassen sich als intensive Peaks im Leucin-HSQC aus Sf9 wiederfinden. Die gleiche Aussage lässt sich auch bei einem Vergleich der Spektren von Leucin und Isoleucin aus *E. coli* treffen. Die Bildung von Leucin aus Isoleucin ist in *E. coli* sehr leistungsfähig. Dies erklärt aber nicht die höhere Peakzahl im Leucin-HSQC von GST aus Sf9, da die Signale nicht mit Isoleucin oder anderen untersuchten Aminosäuren in Verbindung stehen.

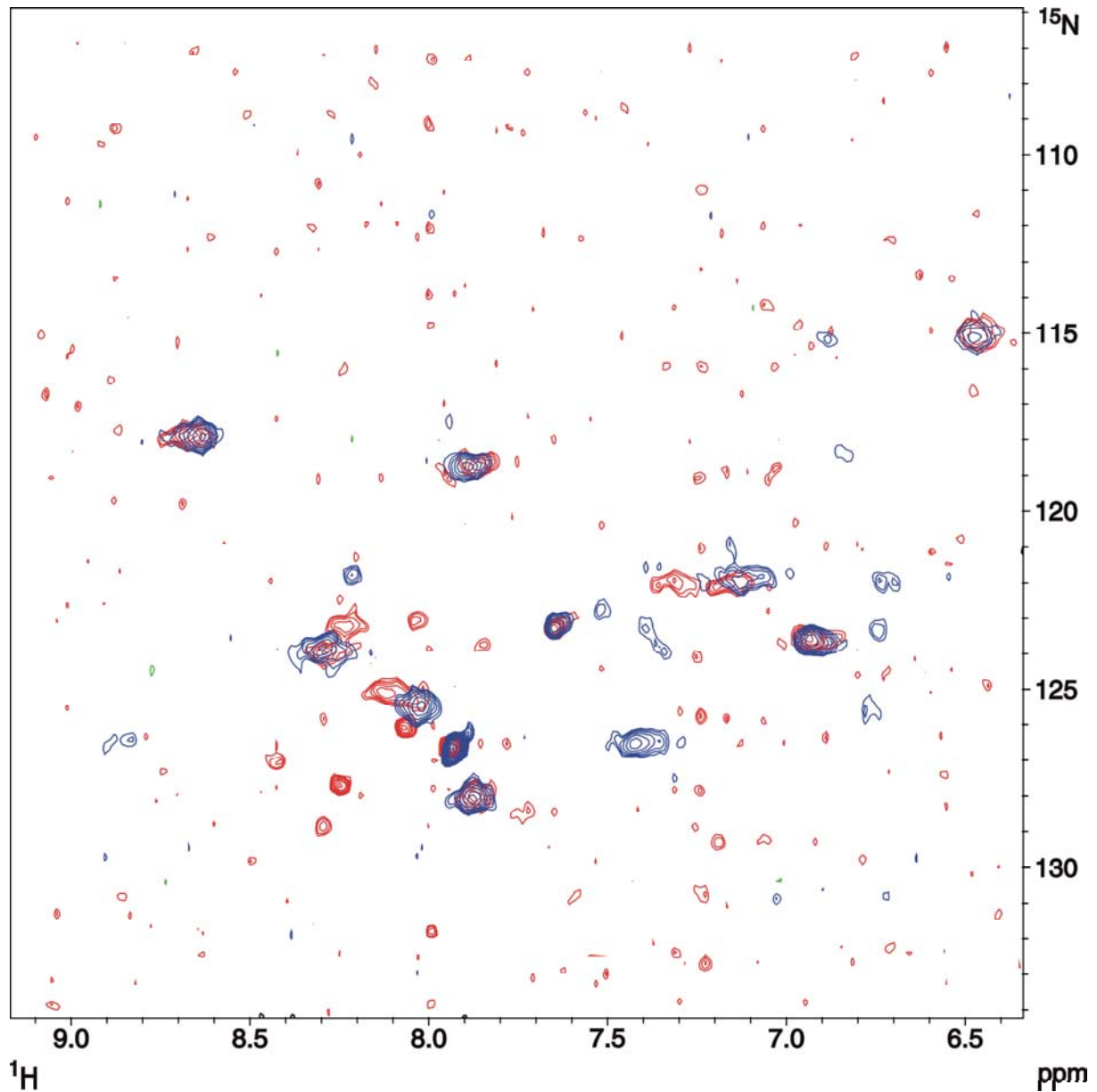


Abb. 4-24: Überlagerung der HSQC's von ^{15}N -Valin markierter GST; blau: Expression in Sf9-Insektenzellen; rot: Expression in *E. coli*. Zehn Peaks lassen sich in beiden Spektren zu Deckung bringen. Die Zahl der Valine in GST beträgt zehn. Außerdem lassen sich in beiden Spektren weitere Signale mit schwächerer Intensität erkennen. Ein intensives Signal lässt sich nur im Spektrum des in Insektenzellen exprimierten GST erkennen. Die unterschiedlichen Peakmuster deuten auf unterschiedliche Abbaureaktionen für GST in SF9 und *E. coli* hin. In beiden Medien wurde Valin in gleicher Menge (200 mg/l) eingesetzt.

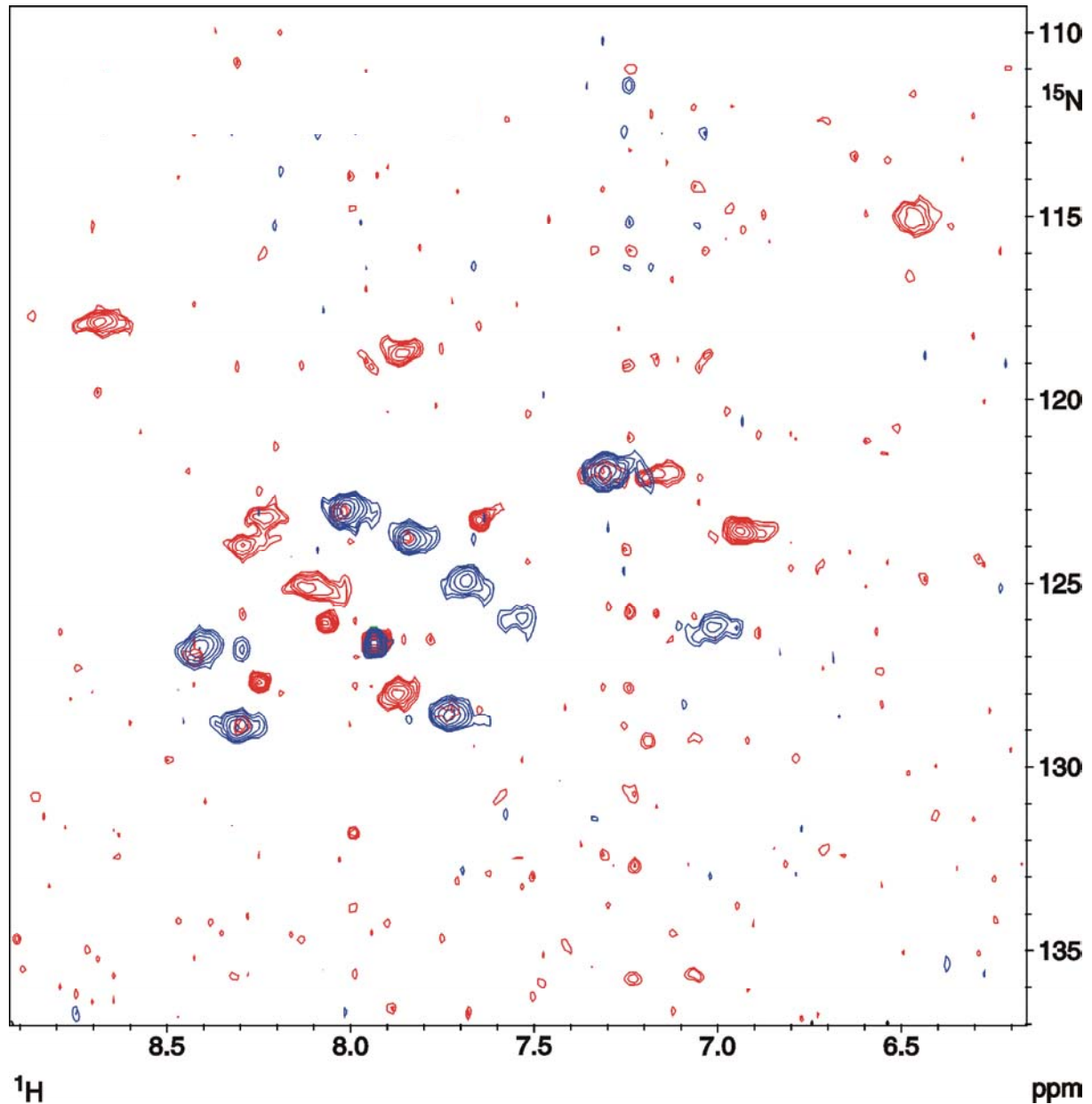


Abb. 4-25: Überlagerung des HSQC-Spektrum von ^{15}N -Valin markierter GST (rot) mit dem Spektrum von ^{15}N -Alanin markierter GST. Die Proteine wurden in *E. coli* exprimiert. Man erkennt, dass mehrere schwache Signale im Valin-Spektrum intensiven Signalen im Alanin-Spektrum entsprechen. Eine Abbaureaktion von Valin in *E. coli* ist die Bildung von Alanin. Im Valin-Spektrum der in SF9 erzeugter GST (Abb. 4-24) lassen sich keine Signale, die sich Alaninen zugeordnet werden können, erkennen Die Bildung von Alanin aus Valin spielt in Insektenzellen keine Rolle.

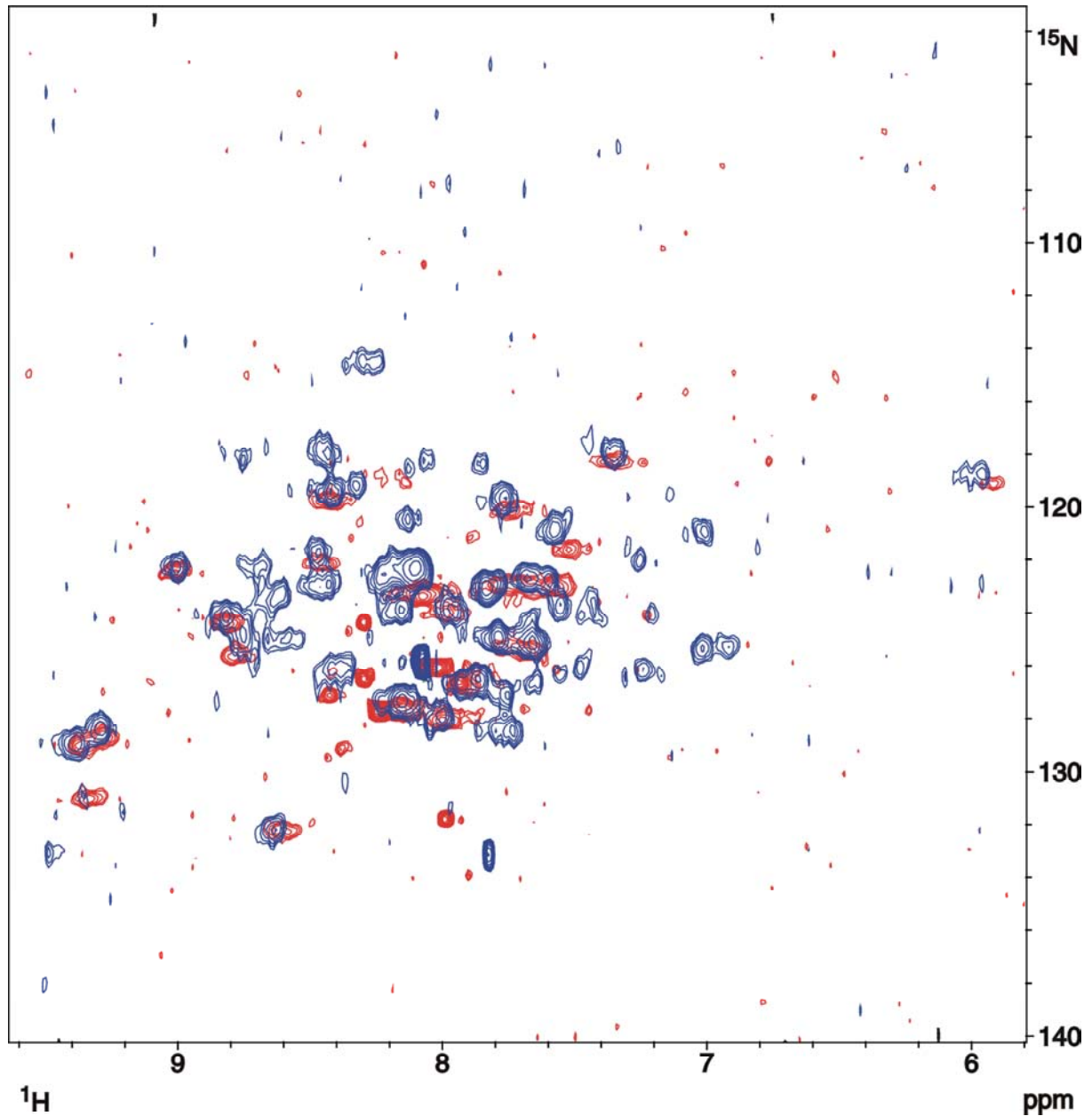


Abb. 4-26: Überlagerung der HSQC's von ^{15}N -Leucin markierter GST; blau: Expression in Sf9-Insektenzellen; rot: Expression in *E. coli*. Ungefähr 22 Signale lassen sich in beiden Spektren zur Deckung bringen. Dies ist deutlich weniger als die Zahl von 28 Leucinen in GST. Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt, dass in Insektenzellen deutlich mehr Signale zu finden sind, die bis jetzt aber noch nicht bestimmten Aminosäuretypen zuzuordnen sind. IML0406 enthielt mit 400 mg/l Leucin die doppelte Menge im Vergleich mit dem Medium zur bakteriellen Expression.

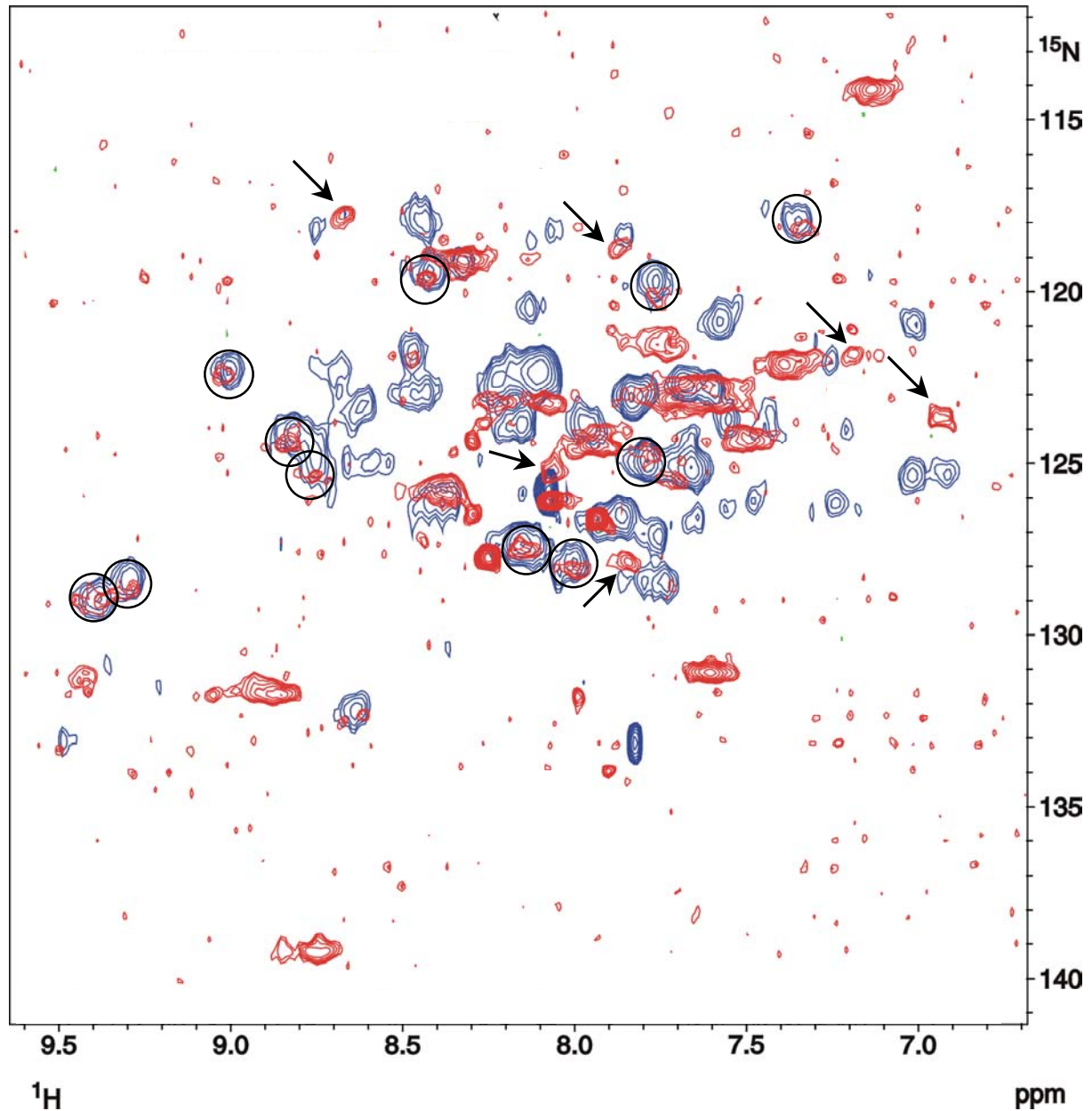


Abb. 4-27: Überlagerung des ^{15}N -HSQC von ^{15}N -Leucin markierter GST aus Sf9 (blau); mit dem Spektrum der mit ^{15}N -Isoleucin markierten GST aus *E. coli* (rot). Mit Kreisen sind diejenigen intensiven Signale im Leucin-Spektrum gekennzeichnet, die im Isoleucin-Spektrum schwache Signale liefern. Viele Peaks in mit ^{15}N -Leucin markierter GST aus Sf9 lassen sich weder im Leucin-Spektrum noch im Isoleucin-Spektrum der GST aus *E. coli* wiederfinden. Mit Pfeilen sind die Signale des Isoleucin-Spektrums markiert, die sich auch im Valin-Spektrum der GST aus *E. coli* befinden. Der ^{15}N -Stickstoff des Isoleucins wird in Bakterien zur Bildung von Valin und Leucin verwendet. Viele Signale im ^{15}N -HSQC der GST aus Sf9 lassen sich nicht mit Isoleucin in Verbindung bringen, da diese Aminosäure essentiell für Insektenzellen ist. Die Identität der Peaks ist bis jetzt unbekannt.

Die verwendeten Mengen an Valin und Phenylalanin in IML406 sind deutlich höher als in dem Medium KBM10. Um zu überprüfen, ob die Mengen dieser Aminosäuren in KBM10 ausreichend sind um aussagekräftige Spektren zu erhalten, wurde ^{15}N -Valin und ^{15}N -Phenylalanin markierte GST unter Verwendung von KBM10 hergestellt. In den aufgenommenen HSQC-Spektren sind die Signale weniger intensiv und schwerer zu identifizieren. KBM10 ist somit ungeeignet für die selektive Markierung von Phenylalanin und Valin. IPL41, das wesentlich höhere Gehalte an Valin und Phenylalanin besitzt, wurde nicht untersucht, da die Mengen in IML406 für eine effiziente Markierung ausreichten. Im Falle von Glycin enthält IPL41 wesentlich weniger dieser Aminosäure. Die Expression von GST in IPL41 unter Verwendung von ^{15}N -Glycin lieferte im HSQC-Spektrum ein identisches Signalmuster, verglichen mit dem Spektrum aus IML406. Die optimale Menge an einzusetzender Aminosäure war für verschiedene Markierungen unterschiedlich.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Markierung von GST mit Glutaminsäure, Asparaginsäure und Ammoniumchlorid untersucht. Diese Verbindungen werden in bakteriellen Expressionssystemen nicht zur selektiven Markierung verwendet, da ihre effiziente Umwandlung in andere Aminosäuren qualitative Interpretationen der Spektren verhindert. Sf9-Insektzellen können ohne negative Auswirkungen auf die Verdopplungsrate der Zellen in Medien kultiviert werden, die bis zu 20 mM NH_4Cl enthalten (Bedard *et al.*, 1993; Öhman *et al.*, 1996). Die Insektzellen wurden an ein Medium gewöhnt, das 5 mM NH_4Cl und weder Glutamin noch Asparaginsäure enthielt. Nach der Adaption wurde GST unter Verwendung von ^{15}N -Ammoniumchlorid exprimiert. Das HSQC-Spektrum ist in Abb. 4-28 zu sehen. Es sind einige sehr intensive Peaks zu erkennen, die in einem Bereich von 115-117 ppm in der Stickstoff-Richtung und bei 6,8-7,6 ppm in der Proton-Richtung des Spektrums angeordnet sind. Das sind chemische Verschiebungen, die für Amid-Gruppen in den Seitenketten von Glutamin und Asparagin typisch sind. Im ^{15}N -HSQC lassen sich vier Signalpaare mit jeweils gleicher chemischer Verschiebung für den Stickstoff finden. Die GST enthält fünf Glutamine und vier Asparagine. Die vier Signalpaare repräsentieren wahrscheinlich Amid-Gruppen in den Seitenketten von Glutaminen, da diese Aminosäure dem Medium nicht zugesetzt wurde. Der Einbau in andere Aminosäuren ist im Spektrum nicht erkennbar, da in den übrigen Bereichen des Spektrums keine Peaks zu finden sind. Besonders der an anderer Stelle beschriebene Einbau des Ammoniums in Alanin ließ sich unter den herrschenden Versuchsbedingungen nicht feststellen.

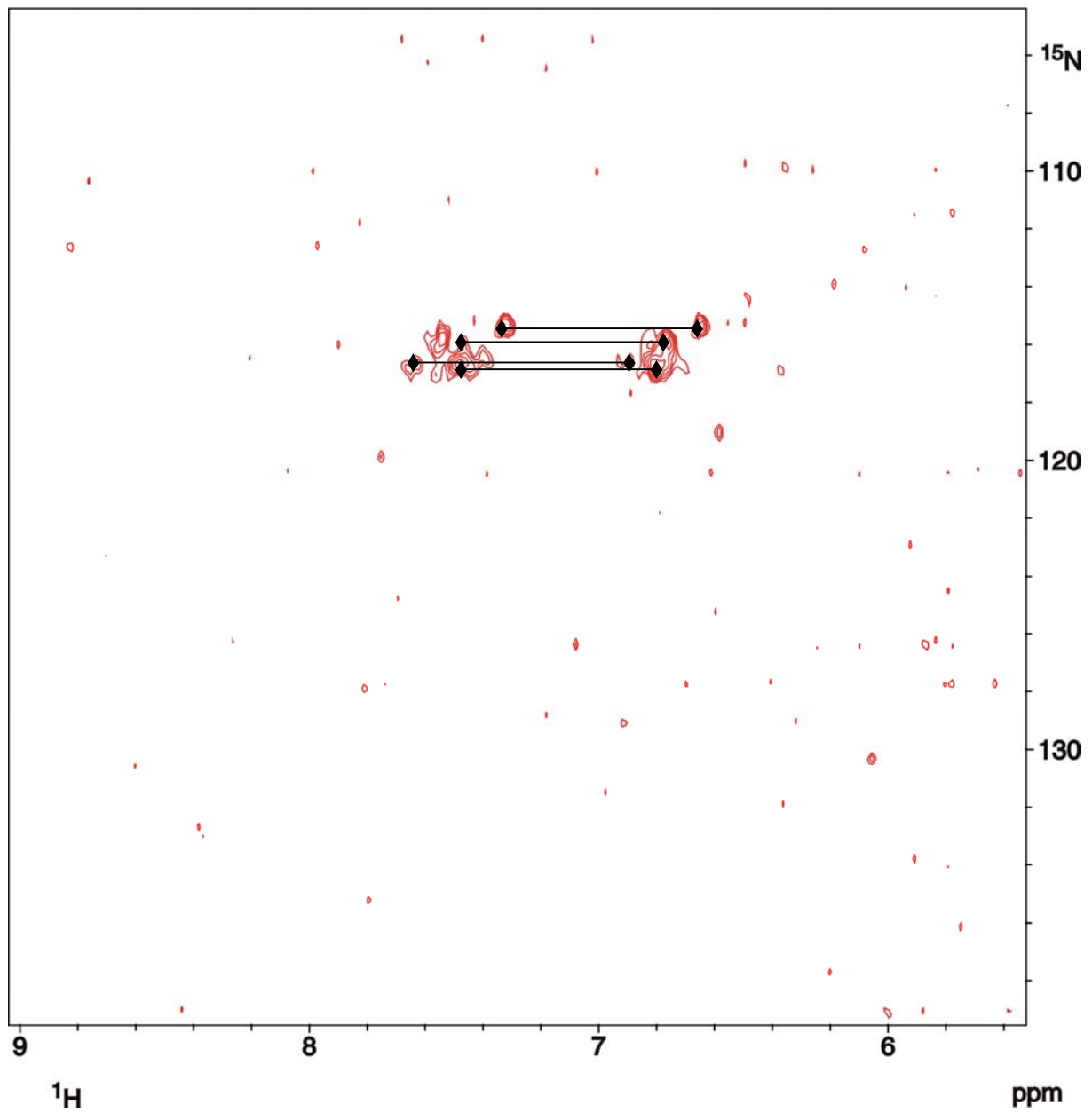


Abb. 4-28: HSQC von in Sf9-Insektenzellen exprimierter GST; Als Medium wurde IML455, das 5 mM $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ enthielt, verwendet. Man erkennt mehrere Peaks in einem Bereich, der für die Carbonsäureamid-Gruppe von Glutamin und Asparagin typisch ist. Es lassen sich vier Signalkpaare identifizieren, bei denen die chemische Verschiebung der Peaks in der Stickstoff-Dimension jeweils gleiche Werte aufweisen. GST besitzt fünf Glutamine und vier Asparagine. In anderen Bereichen des Spektrums lassen sich keine Peaks finden.

Die Expression von mit ^{15}N -Glutaminsäure oder ^{15}N -Asparaginsäure markierter GST führte in beiden Expressionssystemen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Die Markierung mit diesen beiden Aminosäuren lieferte im Falle des bakteriellen Expressionssystems jeweils HSQC-Spektren mit über 50 Signalen. Die Zahl von 16 Glutaminsäuren beziehungsweise 19 Asparaginsäuren in GST wird deutlich übertroffen. Beide Spektren weisen ein hohes Maß an Übereinstimmung auf. Die Aminosäuren sind in der Lage, sich ineinander umzuwandeln. Bei der Markierung von GST mit ^{15}N -Glutaminsäure in Sf9 wurde ein HSQC-Spektrum erhalten, dessen Signale zum größten Teil identisch waren mit dem Spektrum der bakteriell exprimierten Transferase (Abb. 4-29). Die Peakzahl war bei der Expression in Insektenzellen mit 40 deutlich geringer als bei der Expression in *E. coli*. Beide Expressionssysteme zeigen für diese Aminosäure ein sehr ähnliches Muster in der Markierung. Eine Markierung mit ^{15}N -Asparaginsäure ist in Sf9 unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht möglich. Es wurde kein Spektrum mit auswertbaren Signalen erhalten. Eine Überlagerung des HSQC-Spektrums der in Sf9 mit ^{15}N -Glutaminsäure markierten GST mit dem ^{15}N -Asparaginsäure-Spektrum aus *E. coli* (Abb. 4-30) zeigt ein hohes Maß an Übereinstimmung der Signale.

Die Bildung von Alanin unter Verwendung von Glutaminsäure ist ein bei allen Organismen vorhandener Reaktionsweg. Um die Effizienz der Bildung von Alanin aus Glutaminsäure in Sf9-Zellen beurteilen zu können, wurde das HSQC-Spektrum von ^{15}N -Alanin markierter GST aus *E. coli* mit dem Spektrum der mit ^{15}N -Glutaminsäure markierten GST aus Insektenzellen überlagert (Abb. 4-31). Im Spektrum des Alanins sind nur zehn von dreizehn Signalen sichtbar. Die Signale von drei Alaninen sind somit nicht auffindbar. Sieben Peaks konnten Signalen aus dem Spektrum der Glutaminsäure zugeordnet werden. Da die bakteriell exprimierte GST am C-Terminus drei zusätzliche Alanine enthält, können diese Aminosäuren den drei anderen Signalen zugeordnet werden. Auf Grund der vergleichbaren Intensität der Peaks der Alanine mit den anderen Peaks im Glutaminsäure-HSQC ist die Umwandlung von Glutaminsäure in Alanin in Sf9-Zellen ein sehr effizienter Reaktionsweg. Ein Vergleich der beiden Spektren mit ^{15}N -Glutaminsäure markierter GST (Abb. 4-29) zeigt, dass die identifizierten Alanin-Signale im Spektrum der bakteriell gewonnenen GST zumeist nicht oder nur in wesentlich geringerer Intensität vorhanden waren. In *E. coli* war die Bildung von Alanin aus Glutaminsäure in den Hintergrund gedrängt.

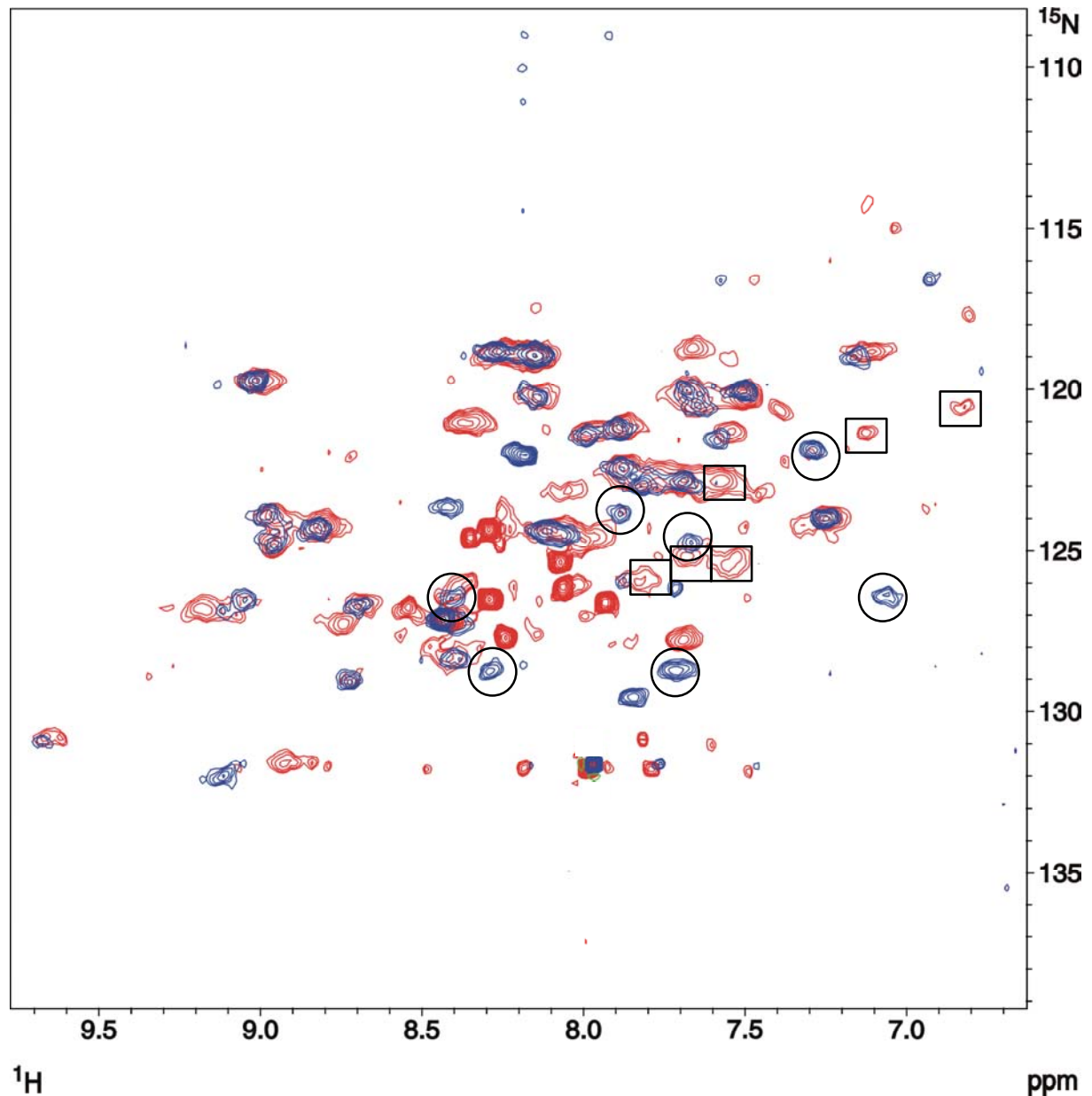


Abb. 4-29: Überlagerung der HSQC's von ^{15}N -Glutaminsäure markierter GST; blau: Expression in Insektenzellen; rot: Expression in *E. coli*. In beiden Spektren übertrifft die Zahl der Signale bei Weitem die Zahl der 16 Glutaminsäuren in GST. In beiden Organismen gibt es leistungsfähige Reaktionswege zum Abbau von Glutaminsäure. Im Spektrum des bakteriell hergestellten Proteins GST sind deutlich mehr Peaks zu erkennen. In *E. coli* wird Glutaminsäure noch stärker umgewandelt als in Insektenzellen. Insgesamt lassen sich 31 Signale zur Deckung bringen. Die Signale, die Alaninen zugeordnet werden können, sind durch Kreise gekennzeichnet worden. Man erkennt, dass viele dieser Alanine nur im Spektrum der viral erzeugten GST intensiv sind. Darüber hinaus befinden sich Spektrum der bakteriell exprimierte GST Signale, die mit intensiven Signalen aus dem HSQC-Spektrum der Markierung mit ^{15}N -Phenylalanin in *E. coli* identisch sind (Quadrate).

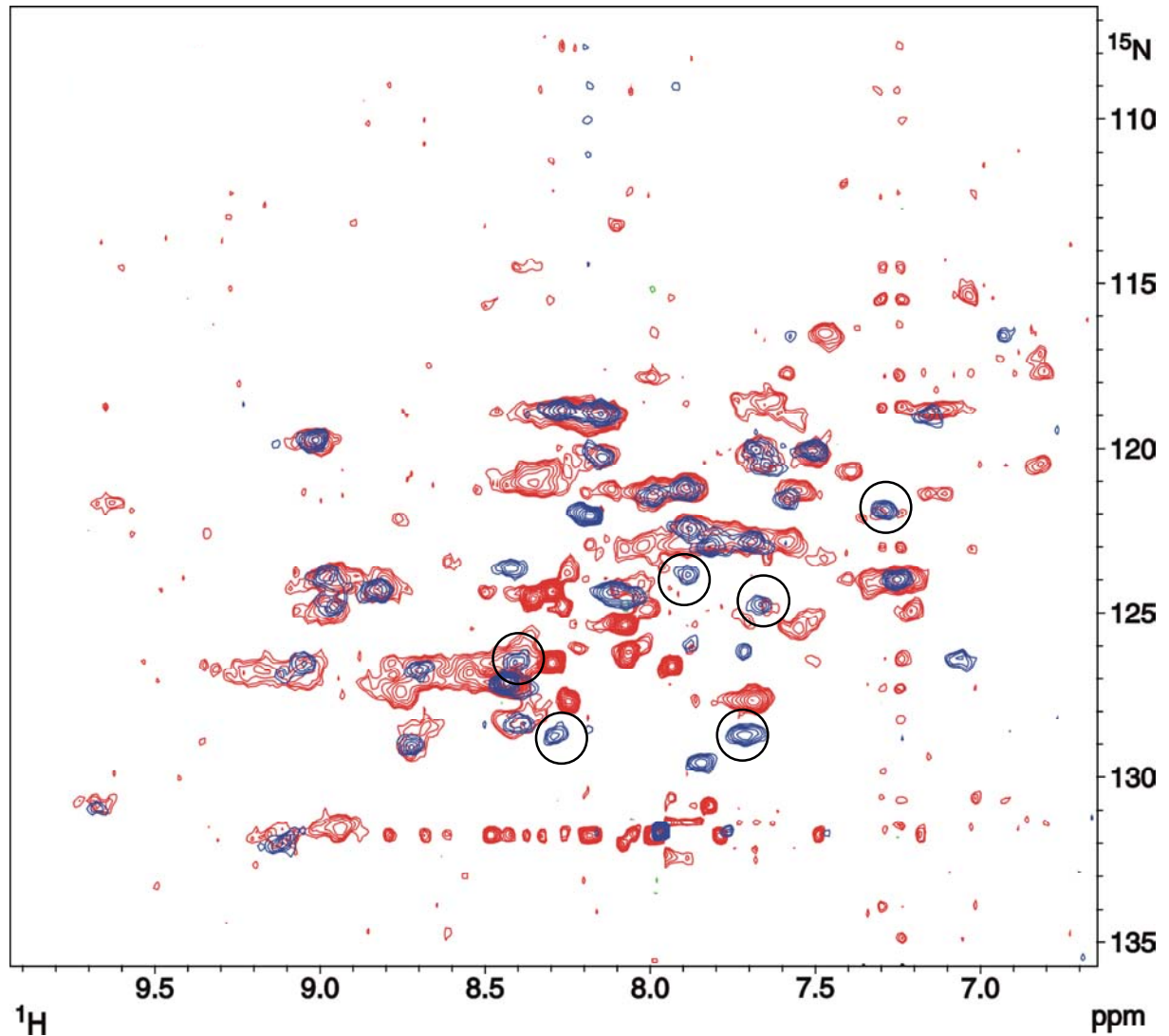


Abb. 4-30: Überlagerung der HSQC's von mit ^{15}N -Asparaginsäure markierter GST aus *E. coli* (rot) mit HSQC von ^{15}N -Glutaminsäure markierter GST aus Insektenzellen (blau): Der größte Teil der Signale der Glutaminsäuremarkierung lassen sich im HSQC-Spektrum der ^{15}N -Asparaginsäure wiederfinden. Die gegenseitige Umwandlung von Asparaginsäure und Glutaminsäure ist ein in allen Organismen üblicher Reaktionsweg. Auch hier sind die Signale der Alanine durch Kreise gekennzeichnet worden.

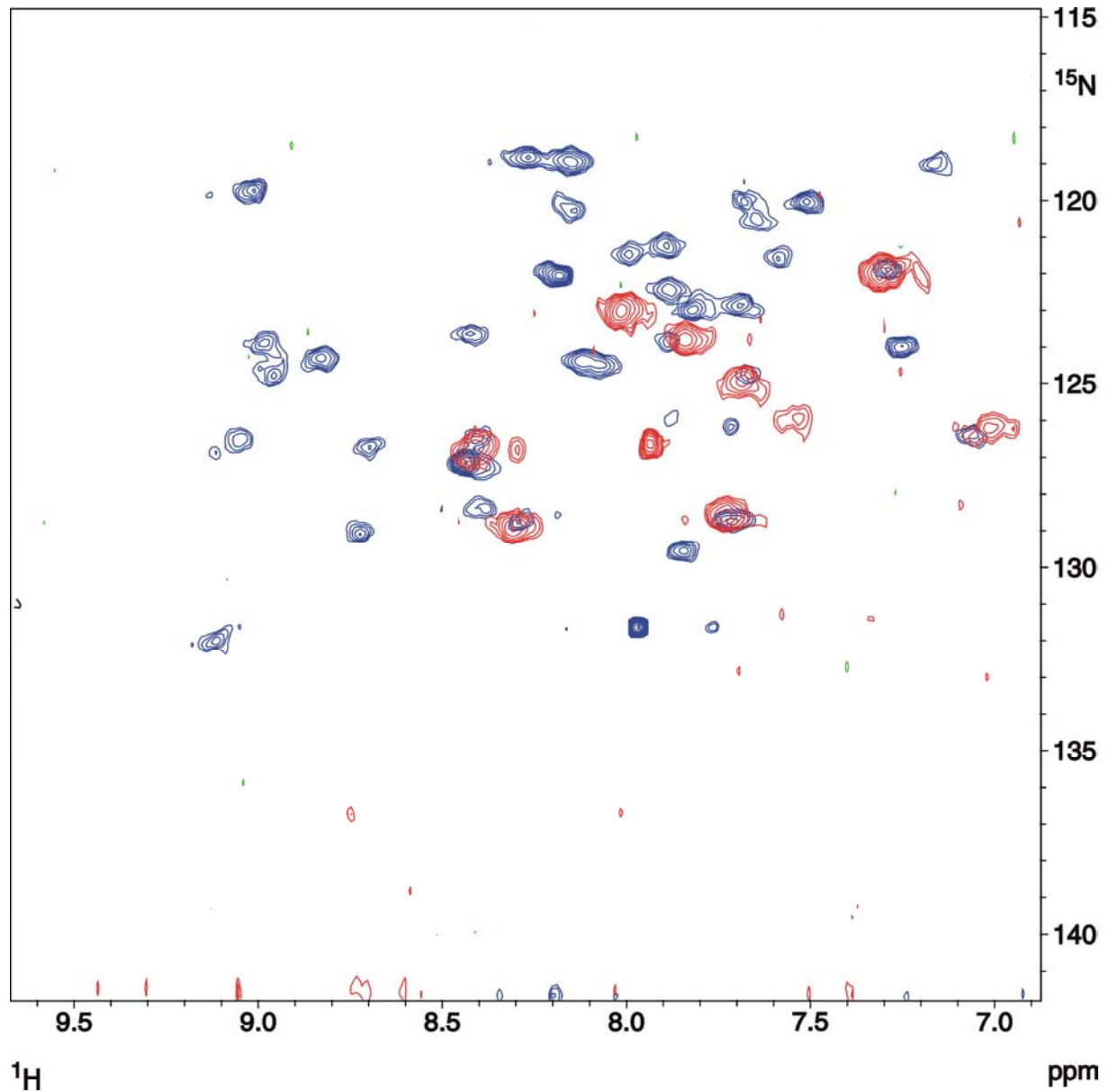


Abb. 4-31: Überlagerung der HSQC's von ^{15}N -Alanin markierter GST aus *E. coli* (rot) mit HSQC von ^{15}N -Glutaminsäure markierter GST aus Insektenzellen (blau): Sieben Signale von Alanin lassen sich Signalen aus dem Glutaminsäure-Spektrum zuordnen. Die in Insektenzellen hergestellte GST besitzt 10 Alanine. Die drei übrigen Peaks sind Alanine, die nur in der bakteriell exprimierten GST vorkommen.

Wie in Abbildung 4-29 dargestellt, lassen sich mehrere Signale im Spektrum der Markierung mit ^{15}N -Glutaminsäure in *E. coli* als Phenylalanin identifizieren. Um noch weitere Kreuzmarkierungen zwischen Glutaminsäure und anderen Aminosäuren erkennen zu können wurde das HSQC-Spektrum der Glutaminsäure mit größerer Empfindlichkeit prozessiert. Bei der Überlagerung dieses HSQC mit den Spektren der Markierungen mit Valin, Tyrosin, Leucin und Isoleucin in Bakterien (Abb. 4-32 a-d) erkennt man die Übereinstimmung mehrerer Signale mit den ^{15}N -HSQC der Glutaminsäure aus *E. coli*. Besonders bei Leucin und Isoleucin ist die Zahl der identischen Signale hoch. Dennoch ist die Intensität der Signale zumeist geringer als im Falle des Phenylalanins. Bei der Markierung von GST mit ^{15}N -Glutaminsäure in Sf9 fehlen diese Signale vollständig. Lediglich bei einem Vergleich von Leucin und Glutaminsäure lassen sich drei Signale zur Deckung bringen. Dies sind aber wesentlich weniger Signale als im Falle der bakteriellen Expression der Transferase.

Um beurteilen zu können, wie gut die selektive Markierung von GST in Sf9 mit der uniformen ^{15}N -Markierung in *E. coli* übereinstimmt, wurden alle Spektren überlagert (Abb. 4-33). Fast allen intensiven Peaks der selektiven Markierung in Insektenzellen lassen sich intensive Signale im Spektrum der uniformen ^{15}N -Markierung in *E. coli* zuordnen. Viele der schwachen Signale aus dem Valin-Spektrum und dem Leucin-Spektrum lassen sich nicht mit GST in Verbindung bringen. Das HSQC-Spektrum des uniform markierten Proteins weist Bereiche mit starker Überlappung der Signale auf. In diesen Regionen ist eine genaue Signalzuordnung sehr erschwert. Durch Überlagerung der Spektren der selektiv markierten Aminosäuren kommt es ebenfalls zu einer Signalüberlappung, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Durch eine partielle Markierung von GST erhält man eine bessere Auflösung der einzelnen Signale.

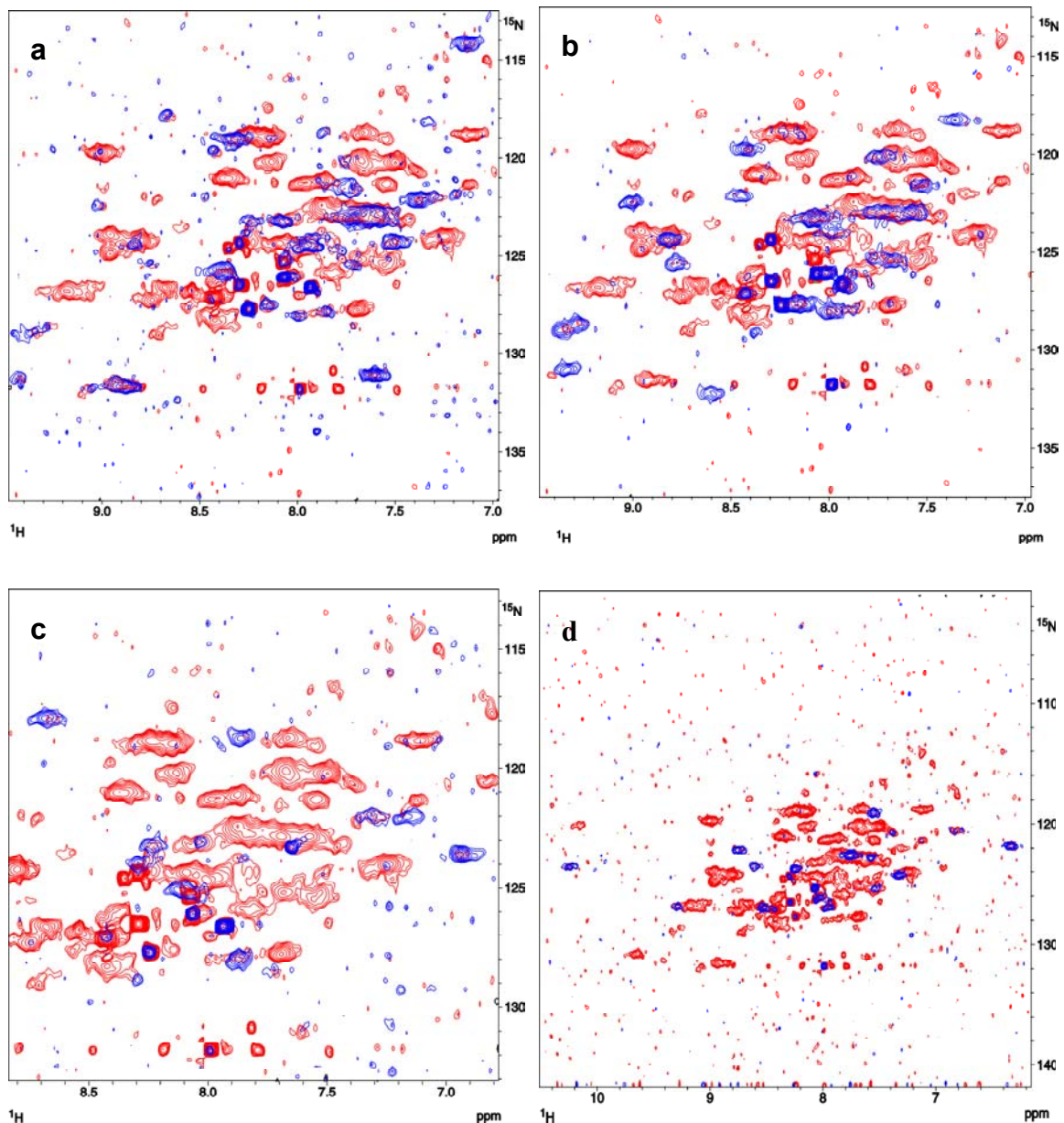


Abb. 4-32: Überlagerung der HSQC-Spektren der Markierung mit ^{15}N -Glutaminsäure in *E. coli* (rot) mit den entsprechenden Spektren von ^{15}N -Isoleucin (a), ^{15}N -Leucin (b), ^{15}N -Valin (c) und ^{15}N -Tyrosin (d) in blauer Farbe. Bei allen vier Aminosäuren sind intensive Signale erkennbar, die sich als schwächere Signale im Spektrum der ^{15}N -Glutaminsäure wiederfinden lassen. Besonders bei Leucin und Isoleucin ist auch der umgekehrte Sachverhalt feststellbar. Im Vergleich zu den Signalen von Phenylalanin im HSQC-Spektrum von ^{15}N -Glutaminsäure sind die Signale der anderen drei Aminosäuren meist schwächer. Die Glutaminsäure wird in *E. coli* zur Synthese von Isoleucin, Leucin, Phenylalanin Tyrosin und Valin verwendet. Ebenfalls wird beim Abbau dieser Aminosäuren der ^{15}N -Stickstoff zur Bildung von Glutaminsäure eingesetzt. In den Insektenzellen sind diese Reaktionen in den jeweiligen Spektren nicht erkennbar.

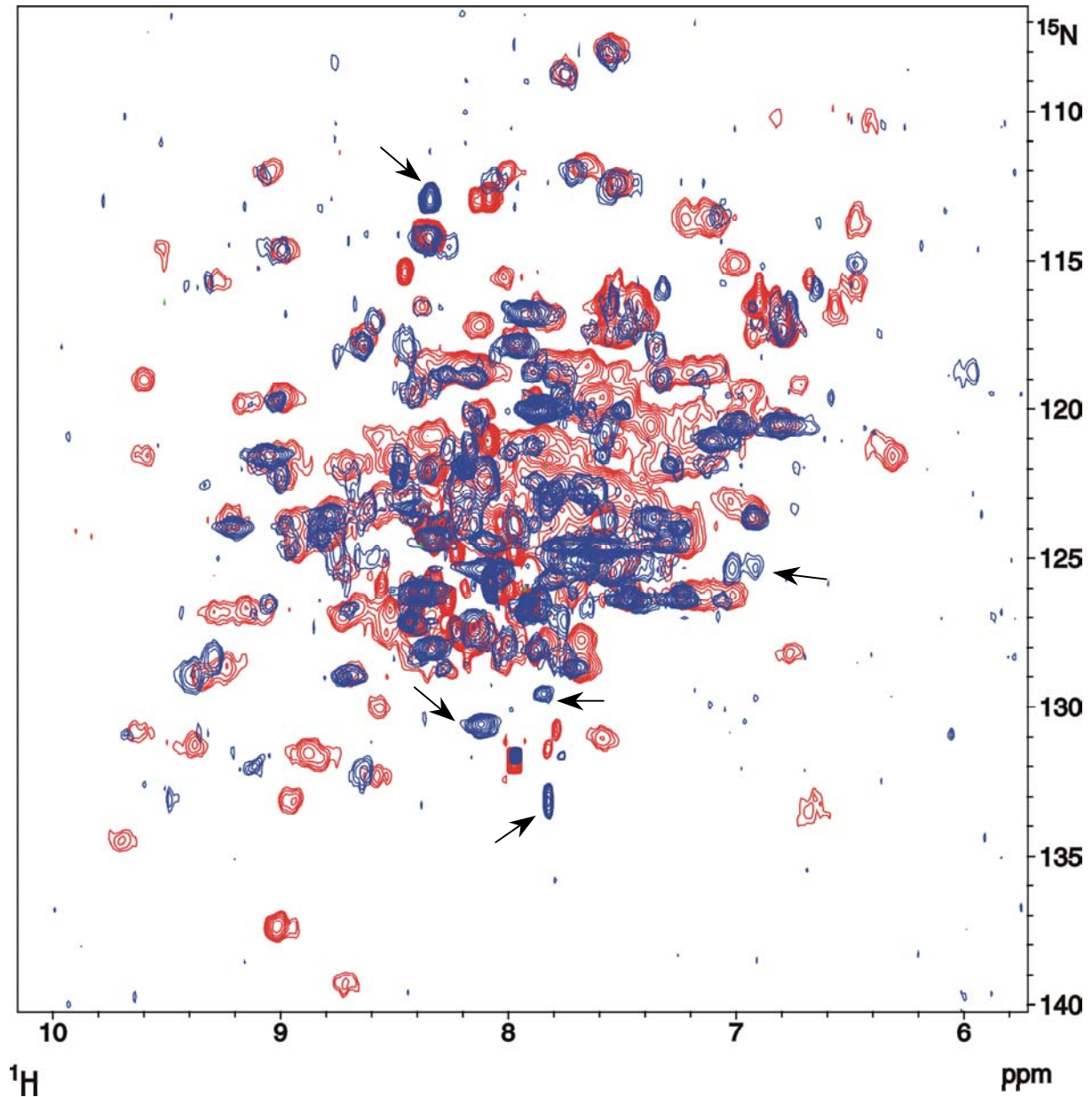


Abb. 4-33: Überlagerung der HSQC-Spektren der selektiven Markierungen in Sf9 (blau) mit einem Spektrum uniform ^{15}N -markierter GST, exprimiert in *E. coli*. Der größte Teil der Signale der selektiven Markierungen lässt sich mit Signalen in der uniform markierten GST überlagern. Die Ausnahmen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Etwa die Hälfte der GST wurde durch die Verwendung der ^{15}N -Varianten von Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Lysin, Phenylalanin und Valin markiert. Man erkennt, dass viele schwache, blaue Signale nicht mit GST in Zusammenhang stehen.

Zum Abschluss wurde die Möglichkeit einer kombinierten selektiven Markierung von GST-CDK6 untersucht. Dazu wurden ^{15}N -Glycin, ^{15}N -Leucin, ^{15}N -Phenylalanin und ^{15}N -Valin verwendet. Das Spektrum (Abb. 4-34) der so markierten GST-CDK6 wurde bei pH 7,8 aufgenommen. Bei diesem pH-Wert sollen später die Spektren von GST-CDK6, His₆-CDK6 und gereinigter CDK6 aufgenommen werden. Das Spektrum zeigt eine Vielzahl intensiver Signale. Im Bereich zwischen 105 und 118 ppm in der Stickstoff-Dimension, in dem typischerweise Glycine ihre Signale haben, lassen sich über 30 Peaks identifizieren. Die Anzahl der Glycine in GST-CDK6 liegt bei 34. Der größte Teil der Glycine wurde somit markiert. Im restlichen Teil des Spektrums lassen sich über 80 Peaks identifizieren. Ein hoher Anteil der gewünschten Aminosäuren ist somit in GST-CDK6 markiert.

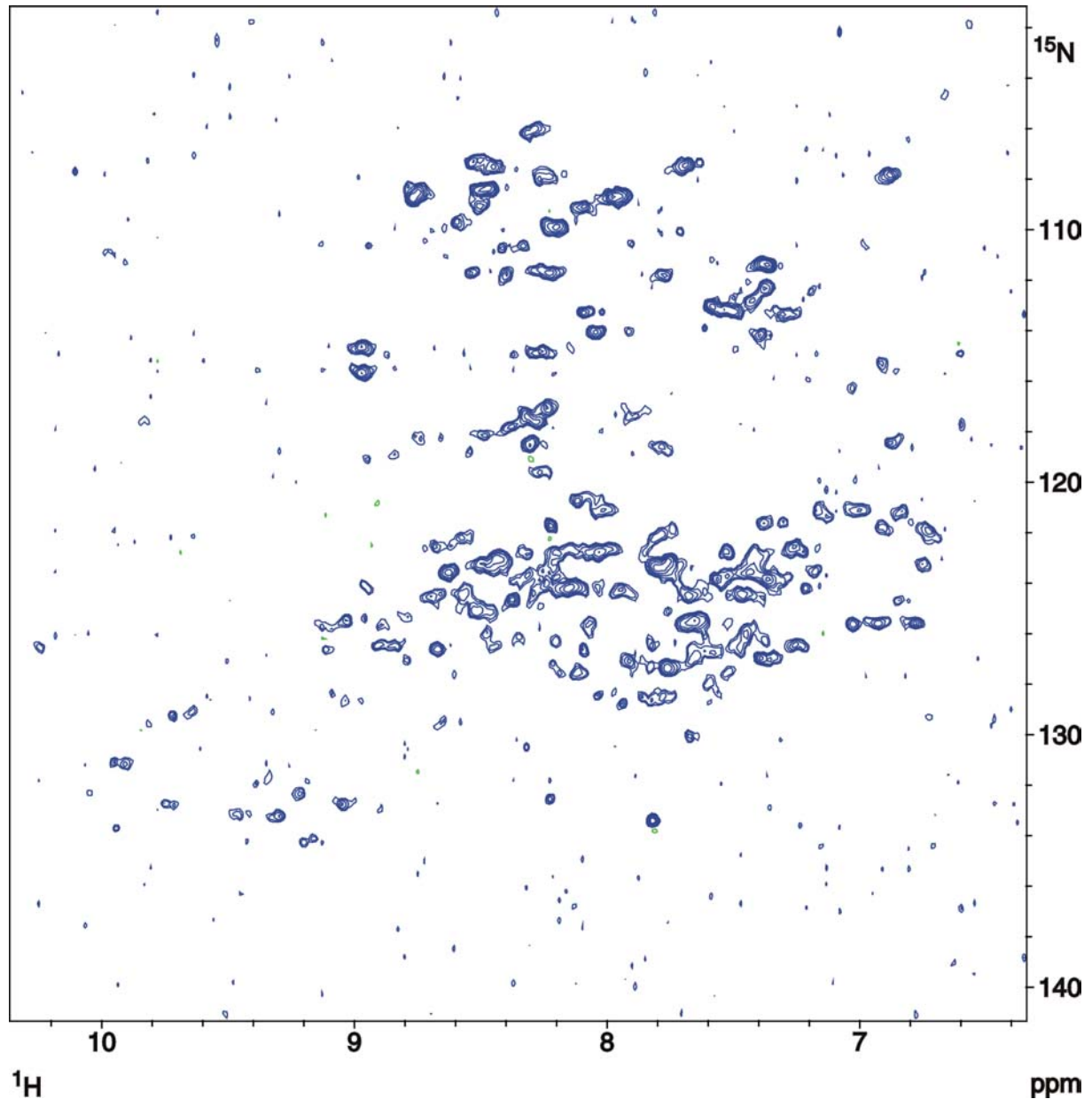


Abb. 4-34: HSQC von GST-CDK6 Es wurden im Medium ^{15}N -Glycin, ^{15}N -Leucin, ^{15}N -Phenylalanin und ^{15}N -Valin verwendet. Das Spektrum zeigt eine Vielzahl von Signalen. Im für Glycine charakteristischen Bereich des Spektrums sind über 30 Peaks zu erkennen. Im Gegensatz zur reinen GST betrug der pH-Wert bei GST-CDK6 während der Messung 7,8 anstatt 7,0.

Diskussion

1 Expression der CDK6

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Baculoviren mit unterschiedlichen CDK6-Fusionsproteinen generiert, die eine leistungsfähige Expression des Proteins in Insektenzellen gewährleisten sollten. Da die Proteinkinase CDK6 für NMR-Studien verwendet werden sollte, war eine möglichst hohe selektive ^{15}N -Markierung mit möglichst geringem Einsatz an Aminosäuren erwünscht. GST-fusionierte CDK6 wurde schon für Expressionen in Insektenzellen verwendet. Es lieferte ein lösliches Protein in hoher Ausbeute. Die so gewonnene CDK6 wurde nach Komplexierung mit p16 oder p19 kristallisiert und anschließend die Röntgenstruktur der Komplexe gelöst. Aus diesem Grund konnte auf Untersuchungen zur Expression in *E. coli* verzichtet werden. Da bei GST-CDK6 aber 40 % des Proteins in Form von GST exprimiert werden, die abgespalten werden muss, ist dieses Konstrukt für Markierungsstudien nicht optimal. Als Alternative wurde eine CDK6 mit Hexahistidin-Fusion in der Baculovirus-DNA integriert. Diese Fusion macht nur 10 % des gesamten Proteins aus. Bei der Herstellung und Reinigung der entsprechenden Baculoviren traten keine Schwierigkeiten auf. Die Ausbeute von GST-CDK6 lag bei 10-13 mg pro Liter Kultur, was 6-8 mg reiner CDK6 entsprach. Im Falle der His₆-CDK6 wurden 5-7 mg Fusionsprotein pro Liter Kultur erhalten. Bezogen auf die reine CDK6 waren somit keine gravierenden Unterschiede in der Ausbeute feststellbar. Beide Fusionsproteine waren löslich und konnten nach Affinitätschromatographie und anschließender Gelfiltration in sehr reiner Form gewonnen werden. Da für die NMR-Spektroskopie Proteinkonzentrationen von bis zu 20 mg/l benötigt werden, wurde die Stabilität der Fusionsproteine untersucht. Es zeigte sich, dass für die Stabilität pH-Werte über 7,2 und Salzgehalte über 300 mM NaCl von Vorteil waren. Unter diesen Bedingungen konnte die CDK6-Fusionsproteine dann auch bei einer Konzentration von 25-30 mg/ml in Lösung gehalten werden. Bei 4°C waren die Proteine die hoch konzentrierten Proteine für drei Wochen stabil. Im Falle der His₆-CDK6 erwies sich die Abspaltung des Hexahistidin-Tags mittels Enterokinase als großes Problem. Es wurden immer zwei Hauptprodukte erhalten, die einen Massenunterschied von ca. 3 kDa besaßen. Die Edmann-Sequenzierung zeigte, dass die N-Termini der beiden Produkte die gleiche Aminosäuresequenz aufweisen. Eine unspezifische Spaltstelle für die Enterokinase liegt also im C-Terminus der CDK6. Die Aminosäuresequenzierung zeigte auch eine Inhomogenität innerhalb der beiden Hauptprodukte. Im N-Terminus

befinden sich ebenfalls weitere unspezifische Spaltstellen für die Protease. Diese Befunde stehen mit der Tatsache im Einklang, dass bei den Kristallstrukturen der Komplexe von CDK6 mit p19 beziehungsweise p16 die ersten 10 Aminosäuren des N-Terminus und die letzten 15-20 Aminosäuren im C-Terminus wegen hoher Flexibilität nicht sichtbar sind oder diese Sequenzen aus der CDK6 entfernt wurden (Russo *et al.*, 1998; Brotherton *et al.*, 1998). Besonders der N-Terminus bietet der Enterokinase Angriffsflächen für eine unspezifische Spaltung. Ein möglicher Ausweg ist die Konstruktion eines Fusionsproteins mit einer Protease-Spaltstelle zwischen His-Tag und CDK6, bei der die Spaltung der His₆-CDK6 mit dieser Protease unter optimalen Bedingungen nur an der gewünschten Stelle erfolgt. Ein weiteres Problem, das bei der Aufreinigung auftrat, war die verringerte Stabilität der CDK6 nach Abspaltung der Reinigungsfusion. Die Untersuchungen zeigen, dass ein hoher pH-Wert und eine hohe Konzentration an NaCl auch hier die Stabilität erhöhen. Dennoch ist die erreichbare Konzentration mit 10 mg/l wesentlich geringer im Vergleich zu den Fusionsproteinen. Die Abspaltung der GST unter Verwendung von Thrombin führt zu einem Produkt, das laut Edmann-Sequenzierung keine Inhomogenitäten in der Primärsequenz der CDK6 aufweist. Auch hier sinkt die Stabilität des gespaltenen CDK6. GST und das lange Hexahistidin-Peptid erhöhen die Stabilität des Proteins beträchtlich. Für NMR-Studien an unkomplexierter CDK6 müsste somit mit dem Fusionsprotein gearbeitet werden, um hohe Proteinkonzentrationen zu erhalten. Um die Faltung der Fusionsproteine und der abgespaltenen CDK6 zu beurteilen, wurden eindimensionale NMR-Spektren aufgenommen. Die ¹H-NMR-Spektren von His₆-CDK6 zeigen einen erheblichen Anteil an hochflexiblen Aminosäuren, die hauptsächlich aus dem ungeordneten Hexahistidin-Peptid stammen. Nach Abspaltung von GST oder His-Tag liegt ein gefaltetes Protein mit weniger ausgedehnten flexiblen und ungeordneten Bereichen vor. Auch diese Befunde werden durch die Ergebnisse bei der Lösung der Struktur der CDK6-Komplexe mittels Röntgenkristallographie bestätigt. Denn es wurden unter anderem für die Aminosäuren 48-72 und 167-181 hohe Temperaturkoeffizienten und somit eine partielle Unordnung ermittelt.

2 einleitenden Versuche zur selektiven Markierung von His₆-CDK6 mit ¹⁵N-Aminosäuren

Die einleitenden Versuche zur selektiven Markierung von His₆-CDK6 mit ¹⁵N-Aminosäuren führten zu HSQC-Spektren mit geringer Aussagekraft. Bei der Verwendung von ¹⁵N-Glycin und ¹⁵N-Leucin lagen die Signale zwar in den für die jeweilige Aminosäure

charakteristischen Bereich des HSQC-Spektrums, doch war deren Anzahl besonders bei Verwendung von ^{15}N -Leucin deutlich zu niedrig. Als Problem erwies sich, dass unter den für NMR-Spektroskopie anfänglich gewählten Bedingungen von 300 K und niedrigem Salzgehalt die CDK6 zu instabil war. Das Protein aggregierte während der Messung und fiel aus. Eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 400 mM NaCl und des pH-Wertes auf 7,8 verbesserte zwar die Stabilität des Proteins, führte aber nicht zu einer Verbesserung der Aussagekraft der HSQC-Spektren. Die intensiven Peaks in den Spektren lassen sich den flexiblen Aminosäuren aus dem His-Tag zuordnen. Das Hexahistidin-Peptid erhöht zwar die Proteinstabilität, beeinträchtigt aber etwas die Interpretation der HSQC-Spektren. Ein Ausweg wäre die Absenkung der Messtemperatur auf 280 K. Bei dieser Temperatur ließen sich höhere Proteinkonzentrationen erreichen und die Stabilität verbessern. Eine andere Möglichkeit wäre die Zugabe von Additiven wie deuteriertes Glycerin, die durch Unterdrückung der Aggregation die Stabilität der abgespaltenen CDK6 erhöhen.

Ein weiteres Problem war, dass das serumfreie Medium IPL41 keine hohen Ausbeuten erlaubte. Die Zellen ließen sich schlechter infizieren als in SF900 II, das 4 % Serum enthielt. Das Medium IPL41 müsste also mit 4-5 % Serum versetzt werden, um vergleichbare Ausbeuten zu gewährleisten. Außerdem ist der Gehalt an Aminosäuren zu hoch und deren Zusammensetzung nicht optimal für ein effizientes und kostengünstiges Markieren von Aminosäuren in Insektenzellen. Eine Möglichkeit wäre nun die fast vollständige Modifikation von IPL41 zur Gewinnung eines optimalen Mediums. Eine Alternative ist ein Vergleich in ihrer Zusammensetzung bekannter Medien bezüglich Proteinausbeute und eingesetzter Menge an Aminosäuren. Es muss also ein Medium gefunden werden, das bei wesentlich geringerem Gehalt an Aminosäuren mit SF900 II vergleichbare Ausbeuten ermöglicht. Bei diesem Medium könnte dann die Aminosäurezusammensetzung für eine selektive Markierung optimiert werden. Hierbei kommen dann auch selektive ^{15}N -Markierungen und die Auswertung der damit gemessenen HSQC-Spektren zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Alternative gewählt.

3 Selektive Markierung von GST mit ^{15}N -Aminosäuren

Im zweiten Teil der Dissertation wurde untersucht, welche Aminosäuren in Sf9-Zellen effizient selektiv markiert werden können. Zur Hauptaufgabe zählte die Entwicklung eines geeigneten Mediums und dessen Optimierung. Dazu gehörte auch die Identifikation von Amino-

säuren, deren gesonderte Zugaben für ein gutes Zellwachstum und eine hohe Proteinausbeute essentiell sind. Nach Abschluss der Wachstumsstudien wurde GST als Modellprotein in Insektenzellen und *E. coli* exprimiert. Dabei wurde Hauptaugenmerk auf die Aminosäuren gelegt, die standardmäßig bei bakterieller Expression zur selektiven Markierung verwendet werden. Darüber hinaus wurden auch Ammoniumchlorid und für das bakterielle Expressionssystem nicht übliche Aminosäuren verwendet. Zuletzt wurde GST mit einer Kombination aus vier Aminosäuren markiert.

Das kommerziell erhältliche Medium SF900 II von *Gibco* ermöglicht mit 6 Mio. Zellen pro Milliliter die höchste Zelldichte aller untersuchten Medien. Auch nach 144 Stunden gab es nur eine geringe Abnahme der vitalen Zellen. Dies deutet auf einen hohen Gehalt an Aminosäuren und Glukose hin, was durch Analysen von SF900 II in der Literatur belegt wurde. Ein hoher Gehalt an Aminosäuren ist bei selektiven Markierungen von Aminosäuren aus Kostengründen zu vermeiden. SF900 II wurde als Referenz verwendet, um qualitative Aussagen über Insektenmedien mit geringerem Nährstoffgehalt treffen zu können. Die Insektenmedien IPL41 und KBM10 sind in der Literatur beschrieben und eingehend untersucht worden. In beiden Medien zeigen die Insektenzellen fast identisches Wachstumsverhalten. Da in KBM10 der Gehalt an Aminosäuren um 50 % geringer ist als in IPL41, sind in KBM10 die Aminosäuren nicht der limitierende Faktor für das Zellwachstum. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Zelldichte von Suspensionskulturen schon vor dem vollständigen Verbrauch von Aminosäuren stagnierte (Radford *et al.*, 1997). Für die Entwicklung von IML406 wurde ähnlich wie bei KBM10 von einem reduzierten Gehalt an Aminosäuren ausgegangen. Die Zusammenstellung der Aminosäuren wurde auf die Erfordernisse zur Herstellung selektiv markierter Proteine in Insektenzellen ausgerichtet. Das schließlich erhaltene Medium IML406 lieferte im Vergleich zu IPL41 und KBM10 eine etwas höhere maximale Zelldichte. In den ersten 80 Stunden haben die Insektenzellen in allen drei Medien die gleichen Wachstumsraten. Dieses Ergebnis zeigt, dass bei der Komposition der Aminosäuren ein gewisser Spielraum vorhanden ist, in dem man sich bewegen kann.

Um zu untersuchen, in welchem Umfang einzelne Aminosäuren von den Komponenten Serum und Yeastolat geliefert werden, wurden diese Aminosäuren dem Medium IML406 nicht mehr separat zugesetzt. Da der größte Teil der Aminosäuren für Insektenzellen essentiell ist, lassen sich somit Aussagen über den zu erzielenden Markierungsgrad treffen. Eine verringerte maximal erreichbare Zelldichte oder eine reduzierte Ausbeute bei Weglassen einer essentiellen Aminosäure bedeuten, dass deren Gehalt in Serum und Yeastolat gering ist und ein hoher

Markierungsgrad möglich ist. Hat das Entfernen einer Aminosäure keinen großen Einfluss auf die erreichbare Zelldichte oder Ausbeute, wird eine beträchtliche Menge dieser Verbindung aus Serum oder Yeastolat bereitgestellt oder im Falle nicht essentieller Aminosäuren von der Zelle gebildet. Dies führt zu einem geringen Markierungsgrad mit der ^{15}N -Aminosäure. In IML406 ohne Cystein lassen sich keine hohen Zelldichten in Suspensionskultur erreichen. Obwohl Cystein nicht essentiell ist, verbessert die separate Zugabe von Cystin das Zellwachstum und dadurch die Proteinausbeute, besonders wenn die Zellen zu späten Zeitpunkten passagiert werden. Ein hoher Markierungsgrad bei geringer Menge an Aminosäure ist dadurch gewährleistet. Die Wachstumsstudien zeigen, dass das Entfernen der essentiellen Aminosäuren Arginin, Serin und Tyrosin zur einer Halbierung der maximal erreichbaren Zelldichte führt. Die in IML406 vorhandenen Mengen an diesen Verbindungen werden folglich rasch aufgebraucht. Im Falle von Tyrosin und Serin sinkt die erzielbare Proteinausbeute auf 10-20 % im Vergleich mit normalem IML406. Die selektive Markierung mit den entsprechenden ^{15}N -Aminosäuren liefert somit einen hohen Markierungsgrad. Im Falle des Arginins geht die erzielbare Ausbeute um circa 40 % zurück. Die durch die Infektion mit Viruslösung eingebrachte Menge an Arginin von 30-40 mg/l reicht für eine Proteinexpression aus. Da bereits die Verwendung von 350 mg/l der Aminosäure in IML406 für eine mit normalem IML406 identische Zelldichte und Proteinausbeute ausreicht, kann die eingeschleppte Menge an Arginin vernachlässigt werden. Auch die Menge an Serin lässt sich in IML406 ohne negativen Einfluss auf Zelldichte und Ausbeute halbieren. Somit ist eine Markierung mit geringem Einsatz der jeweiligen ^{15}N -Variante von Arginin, Serin oder Tyrosin möglich. Im Falle des Histidins sinkt nach dessen Entfernen die maximal erreichbare Zelldichte nur um 30 %. Die Proteinausbeute bleibt nahezu unverändert. Serum und Yeastolat liefern somit eine beträchtliche Menge an Histidin. Frühere Untersuchungen zeigten auch, dass die Menge an dieser Aminosäure während der ersten 100 Stunden der Fermentation der Sf9 zunimmt (Radford *et al.*, 1997). Bei der ^{15}N -Markierung mit essentiellm Histidin ist somit mit einem verringerten Markierungsgrad zu rechnen.

Die Entfernung von Glycin und Lysin aus dem Medium hat keinen Einfluss auf die Zelldichte, halbiert jedoch die Proteinausbeute. Der Gehalt an diesen Aminosäuren ist höher als der an Tyrosin oder Serin. Auch Tryptophan und Threonin sind in ausreichender Menge in Serum und Yeastolat vorhanden, um eine hohe Zelldichte zu gewährleisten. Der erzielbare Markierungsgrad ist somit verringert, und die einzusetzende Menge an ^{15}N -Aminosäure ist

erhöht. Im Falle von Glycin und Lysin wurden bei der selektiven Markierung Spektren von guter Qualität erhalten.

Die nicht essentiellen Aminosäuren Alanin, Asparaginsäure, Glutamin und Asparagin müssen IML406 nicht zugesetzt werden. Alle Verbindungen können von den Insektenzellen aus Glutaminsäure gebildet werden. Das Entfernen von Alanin, Asparaginsäure oder Asparagin hat keinen Einfluss auf Zelldichte und Proteinausbeute. In Medium IML455, das weder Asparaginsäure noch Glutamin enthält, liegen maximal erreichbare Zelldichte und Ausbeute 10-20 % unter den Werten für IML406. Besonders Glutamin fördert somit höhere Zelldichten.

Yeastolat liefert wesentlich mehr freie Aminosäuren als Serum. Um die Menge an freien Aminosäuren aus unerwünschten Quellen zu reduzieren, müsste bei der Herstellung von IML406 auf die Verwendung von Yeastolat verzichtet und die Menge an Serum auf 10% erhöht werden. Die Umgewöhnung der Insektenzellen auf diese Medienbedingungen war während der Forschungsarbeit nicht mehr möglich. Es ist aber zu beachten, dass das Entfernen von Yeastolat einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum und die Proteinausbeute haben kann. So wurde berichtet, dass in Medien ohne Yeastolat die maximal erreichbare Zelldichte drastisch sinkt. Nach einer Umgewöhnung der Insektenzellen müssten dann Expressionsstudien durchgeführt werden. In einem ersten Schritt wäre eine Reduktion der Menge an Yeastolat auf 2g/l denkbar. Schon mit dieser Maßnahme würde der Gehalt an freien, nicht markierten Aminosäuren drastisch sinken.

Nach Optimierung der Medien IML406 und IML455 konnten die Untersuchungen zur selektiven Markierung von GST mit ^{15}N -Aminosäuren begonnen werden. Bei der Markierung mit ^{15}N -Glycin lieferten die beiden Expressionssysteme fast identische Spektren. Eine effiziente Kreuzmarkierung zu Serin ist in beiden Spektren nicht zu erkennen. In *E. coli* wird die Kreuzmarkierung durch Zugabe von ^{14}N -Serin im großen Überschuss unterdrückt, da die Umwandlung von Glycin in Serin sehr ausgeprägt ist. Im Insektenmedium wird wesentlich weniger Serin eingesetzt. Trotzdem war auch nach 60-stündiger Expressionszeit keine effiziente Kreuzmarkierung zu erkennen, da die Wachstums- und Expressionsstudien zeigten, dass die Umwandlung von Glycin in Serin in Insektenzellen gänzlich fehlt. Serin wird in der Literatur als für Insektenzellen essentielle Aminosäure angesehen. Bei der Markierung mit ^{15}N -Lysin wurden ebenfalls fast identische Spektren erhalten. Die Zahl der Peaks ist aber geringer als die Anzahl der Lysine in GST. Eine Umwandlung dieser Aminosäure konnte nicht festgestellt werden. Bezüglich dieser Aminosäure verhalten sich die Metabolismen der beiden

Organismen sehr ähnlich. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass zwei Signale in den beiden Expressionssystemen deutliche Unterschiede in den chemischen Verschiebungen aufwiesen. Eine mögliche Erklärung sind posttranslationale Modifikationen in Sf9 an bestimmten Lysinen oder in unmittelbarer Nähe zu diesen Aminosäuren. Eine Abweichung in der chemischen Verschiebung auf Grund unterschiedlicher pH-Werte kann ausgeschlossen werden.

Tab. 5-1: Vergleichender Überblick zur selektiven Markierung mit ^{15}N -Aminosäuren in *E. coli* und Insektenzellen

^{15}N -Aminosäure	Anzahl der Aminosäuren in GST aus		Anzahl der Signale bei GST-Spektrum (intensiv/schwach) aus		Zahl der übereinstimmenden Signale (intensiv/schwach)
	<i>E. coli</i>	BEVS	<i>E. coli</i>	BEVS	
GLY	17	16	16	17	15
LYS	21	21	19	19/2	17
VAL	10	10	13/7	11/6	10
PHE	9	9	18/6	9/3	8/2
LEU	28	28	27/4	34/10	22
GLU	16	16	50/18	40/4	31
ASP	18	19	49/18	0/0	

Die HSQC-Spektren der in Insektenzellen exprimierten GST liefern in einigen Fällen deutlich weniger Peaks als bakteriell exprimierte GST und somit wesentlich bessere Ergebnisse. Besonders deutlich ist dies bei den Spektren für ^{15}N -Phenylalanin und ^{15}N -Valin zu erkennen. Während im Spektrum der mit ^{15}N -Phenylalanin markierten GST aus *E. coli* die Anzahl der Signale deutlich die Zahl der Phenylalanine in dem Protein übersteigt, stimmen bei der aus Insektenzellen gewonnenen Transferase beide Werte überein. Trotz der langen Expressionszeit von 60 Stunden ist das Phänomen der Kreuzmarkierung bei der Expression in Insektenzellen im Falle des Phenylalanins im Gegensatz zum bakteriellen Expressionssystem nicht feststellbar. Aus den Ergebnissen der Expression in Bakterien lässt sich schließen, dass der Aminosäuremetabolismus in Bezug auf Phenylalanin in *E. coli* wesentlich leistungsfähiger ist. Besonders die Umwandlung von Phenylalanin in Tyrosin in Bakterien kann durch Überlagerung der HSQC-Spektren von mit ^{15}N -Tyrosin und ^{15}N -Phenylalanin markierter GST aus *E.*

coli gezeigt werden. Im Falle der Insektenzellen lässt sich diese Abbaureaktion von Phenylalanin nicht erkennen, da Tyrosin für Insektenzellen essentiell ist. In geringem Umfang lässt sich in *E. coli* auch eine Kreuzmarkierung zu Glutaminsäure feststellen. Dies ist umso erstaunlicher, da das Medium zur bakteriellen Expression viermal mehr Glutaminsäure als Phenylalanin enthält.

Die Beobachtung der nicht nachweisbaren Umwandlung der beiden Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin ineinander in Sf9 wird auch dadurch untermauert, dass die Bildung von Tyrosin aus Phenylalanin oder anderen Aminosäuren in Insektenzellen, wie die Wachstums- und Expressionsstudien zeigten, keine Rolle spielt. Die Zellen starben nach dem vollständigen Verbrauch des Tyrosins im Medium IML406. Bei der Markierung mit ^{15}N -Valin erkennt man, dass die beiden Organismen einen unterschiedlichen Abbau der Aminosäure besitzen. Dies belegen die vielen schwachen Peaks, die sich in den HSQC-Spektren nicht zur Deckung bringen lassen. Die Zahl der identischen Signale beträgt zehn, was der Zahl der Valine in GST entspricht. Mehrere schwache Signale im HSQC-Spektrum von mit ^{15}N -Valin markierter GST aus *E. coli* können als Alanine identifiziert werden. In Sf9 lässt sich diese Umwandlung nicht erkennen, obwohl das Medium IML406 im Gegensatz zum Medium für die bakterielle Expression kein Alanin enthält. In *E. coli* ist die Bildung trotz der Verwendung von 400 mg/l ^{14}N -Alanin klar erkennbar und somit sehr leistungsfähig. Die schwachen Signale im HSQC-Spektrum aus Sf9 lassen sich nicht mit GST in Verbindung bringen. Valin und Phenylalanin werden in Insektenzellen nicht effizient in andere Aminosäuren abgebaut.

Bei der Markierung mit ^{15}N -Leucin zeigt das Spektrum der in Insektenzellen exprimierten GST mit über 30 Peaks deutlich mehr Signale als Leucine in dem Protein vorhanden sind. Dies lässt vermuten, dass die Umwandlung von Leucin in andere Aminosäuren eine wesentlich größere Rolle spielt als in bakteriellen Expressionssystemen. In dem HSQC-Spektrum der bakteriell exprimierten GST lassen sich 27 intensive Peaks erkennen. Dies ist nur unwesentlich geringer als die Anzahl von 28 Leucinen in GST. Die Zahl der in beiden Expressionssystemen identischen Peaks beträgt 22. Ein möglicher Abbau von Leucin ist die Bildung von Isoleucin. Zumindest in *E. coli* belegen die Vergleiche der jeweiligen Spektren von Leucin und Isoleucin eine effiziente Umwandlung von Isoleucin in Leucin. Darüber hinaus wird in Bakterien Isoleucin zur Bildung von Valin verwendet. Für eine entsprechende Aussage über diese Umwandlung in Sf9 fehlt das Spektrum für ^{15}N -Isoleucin. Da Valin und Isoleucin für Insektenzellen essentiell sind, sollte es diese Umwandlungen in Sf9 nicht geben. Drei schwa-

che Signale aus dem HSQC-Spektrum der Markierung mit ^{15}N -Leucin in Sf9 lassen sich mit intensiven Signalen aus dem HSQC-Spektrum von ^{15}N -Glutaminsäure überlagern. Die Insektenzellen könnten Leucin zur Bildung von Glutaminsäure verwenden. Diese Annahme ist aber wegen der sehr geringen Zahl an identischen Signalen sehr spekulativ und müsste durch weitere Experimente bestätigt werden. Dagegen ist die gegenseitige Umwandlung von Glutaminsäure und Leucin in *E. coli* bei Überlagerung der jeweiligen Spektren klar zu erkennen. In Insektenzellen kann die essentielle Aminosäure Leucin nicht aus Glutaminsäure gebildet werden. Somit ist die Identität vieler Signale im Spektrum der Markierung mit ^{15}N -Leucin in Insektenzellen bis jetzt nicht geklärt. Abschließend lässt sich sagen, dass sich die Aminosäuren Glycin, Lysin, Phenylalanin, Valin und mit Einschränkungen Leucin in Insektenzellen mit hoher Effizienz markieren lassen.

In einem weiteren Forschungsabschnitt wurde die Verwendung von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{15}N -Glutaminsäure und ^{15}N -Asparaginsäure zur selektiven Markierung untersucht. Im Gegensatz zu Säugerzellen vertragen Insektenzellen bis zu 20mM NH_4Cl in den Medien. Öhman *et al.* entwickelten ein Medium, in dem Glutamin durch Ammoniumchlorid ersetzt wurde. Drews *et al.* zeigten, dass Glutamin in diesem Medium aus Glutaminsäure und Ammonium gebildet wurde. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es zu zeigen, ob man diese Reaktion für Markierungen nutzen kann und ob Ammonium effizient noch in andere Aminosäuren eingebaut wird. Wäre dies der Fall könnte $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als kostengünstige Alternative eingesetzt werden. Das HSQC-Spektrum der in IML455 unter Verwendung von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ exprimierten GST beinhaltet Signale, deren chemische Verschiebungen für die Carbonsäureamid-Gruppen von Glutamin und Asparagin typisch sind. GST enthält vier Asparagine und fünf Glutamine. Es lassen sich vier Signalpaare mit jeweils gleicher chemischer Verschiebung in Stickstoff-Dimension finden. In anderen Bereichen des Spektrums sind keine Peaks erkennbar. Der Einbau von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ lässt sich somit effizient nur für die Markierung von Carbonsäureamid-Gruppen nutzen. Ein Einbau in Alanin, wie er von Drews *et al.* beschrieben wurde, lässt sich nicht erkennen. Bei der Verwendung von ^{15}N -Glutaminsäure liefert GST aus *E. coli* ein HSQC-Spektrum mit über 50 Peaks und GST aus Sf9 ein HSQC-Spektrum mit 40 Peaks. Die Gesamtzahl der Signale übersteigt in beiden Fällen die Anzahl an Glutaminsäuren in dem Protein deutlich. Daraus kann man außerdem schließen, dass in *E. coli* die Umwandlung von Glutaminsäure in andere Aminosäuren noch leistungsfähiger ist als in den Insektenzellen. Die Mehrzahl der Peaks des viral exprimierten Proteins lässt sich mit dem Spektrum der GST aus *E. coli* zur Deckung bringen. Beide Organismen besitzen somit vergleichbare Abbaureaktio-

nen für diese Aminosäure. Zu diesen Reaktionswegen gehören die Bildung von Glutamin, Asparagin, Asparaginsäure und Alanin. Die Bildung von Glutamin und Asparagin wurde schon oben gezeigt. Zum Beweis der Bildung von Asparaginsäure aus Glutaminsäure wurde GST mit ^{15}N -Asparaginsäure markiert. In *E. coli* wurde bei der Markierung ein Spektrum mit einer Vielzahl von Peaks erhalten, die größtenteils identisch waren zu den Signalen aus dem entsprechenden Spektrum mit ^{15}N -Glutaminsäure. Die Umwandlung dieser beiden Aminosäuren ineinander ist sehr ausgeprägt. Bei der Verwendung von ^{15}N -Asparaginsäure in IML406 wurde kein auswertbares Spektrum erhalten. Aus diesem Grund wurde das Spektrum der ^{15}N -Asparaginsäuremarkierung in *E. coli* mit dem HSQC-Spektrum der mit ^{15}N -Glutaminsäure markierten GST aus Insektenzellen überlagert. Der größte Teil der Signale ist wiederum identisch. Die Ursache für das fehlende HSQC-Spektrum für die Asparaginsäuremarkierung in Sf9 liegt in der ausgeprägten Umwandlung von Glutaminsäure in Asparaginsäure, die über den Citrat-Zyklus eng miteinander verbunden sind. Da die Menge an unmarkiertem Asparagin, Glutamin und Glutaminsäure in IML406 etwa siebenmal so groß war wie die Menge an ^{15}N -Asparaginsäure, wurde die Markierung sehr wirkungsvoll unterdrückt. In dem für die bakterielle Expression verwendeten Medium war die Menge an unmarkiertem Asparagin, Glutamin und Glutaminsäure nur etwa doppelt so groß wie die Menge an ^{15}N -Asparaginsäure. Die Markierung mit ^{15}N -Asparaginsäure wurde dadurch nicht unterdrückt. In IML406 war die Menge an Glutaminsäure etwa dreimal geringer als die Menge an Glutamin, Asparagin und Asparaginsäure, was eine Markierung mit ^{15}N -Glutaminsäure nicht verhinderte. Daraus lässt sich schließen, dass sich bei einer Erhöhung der Menge an Asparaginsäure ebenfalls in Insektenzellen diese Aminosäure markieren lassen sollte. Eine bessere Alternative ist die vollständige Entfernung der nicht essentiellen Aminosäure Asparaginsäure und deren gleichzeitige Markierung mit ^{15}N -Glutaminsäure. Die zentrale Bedeutung von Glutaminsäure für den Aminosäuremetabolismus in *E. coli* wird sichtbar, wenn man das HSQC-Spektrum der Markierung mit ^{15}N -Glutaminsäure mit höherer Empfindlichkeit prozessiert. Man erkennt eine Reihe schwacher bis starker Signale, die sich als Phenylalanine, Isoleucine, Leucine, Tyrosine und Valine identifizieren lassen. Ebenso lassen sich in den Spektren der zuletzt genannten Aminosäuren schwache Signale finden, die intensiven Signalen im Spektrum der Glutaminsäure zugeordnet werden können. Durch Transaminierungen wird in *E. coli* der ^{15}N -Stickstoff zwischen diesen Aminosäuren und ^{15}N -Glutaminsäure in beiden Richtungen ausgetauscht. Die Bildung von Phenylalanin unter Verwendung von Glutaminsäure ist besonders deutlich zu erkennen, da das Medium mit 50 mg/l von dieser Aminosäure nur sehr wenig enthält und die

Kreuzmarkierung nicht überdeckt werden kann. Dies alles macht eine selektive Markierung von Glutaminsäure in Bakterien unmöglich. In Sf9 sind diese Reaktionen nicht erkennbar.

Eine in *E. coli* und Sf9 wichtige Reaktion ist die Bildung von Alanin aus Glukose und Glutaminsäure. Bei der Überlagerung der Spektren von mit ^{15}N -Glutaminsäure markierter GST aus Insektenzellen mit ^{15}N -Alanin markierter GST aus *E. coli* lassen sich sieben der zehn in dem Protein vorhandenen Alanine identifizieren. Die Signale der Alanine in dem HSQC-Spektrum der Glutaminsäure-Markierung haben eine hohe Intensität. Die Bildungsgeschwindigkeit von Alanin aus Glutaminsäure ist sehr hoch und führt somit zu einer effizienten Bildung von Alanin. Aus diesem Grund wird bei vielen Insektenmedien auf die Zugabe von Alanin verzichtet. Drews *et al.* zeigten, dass bei Verwendung von ^{15}N -Glutaminsäure 18 % des gesamten gebildeten Alanins ^{15}N enthielt. In den Spektren der mit ^{15}N -Asparaginsäure oder ^{15}N -Glutaminsäure markierten GST aus *E. coli* sind die Signale für die Alanine nicht oder nur sehr schwach vorhanden. Das Medium zur selektiven Markierung mit ^{15}N -Glutaminsäure in *E. coli* enthält 400 mg ^{14}N -Alanin pro Liter. Diese Menge ist ausreichend, um die Kreuzmarkierung von Glutaminsäure zu Alanin zu unterdrücken. Eine Zugabe von 300-400 mg/l ^{14}N -Alanin zu IML406 sollte den gleichen Effekt haben. Im Falle von Medien ohne Glutamin und mit 5 mM $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ wurde von Drews *et al.* ^{15}N in 22 % des gesamten Alanins gefunden. So ist es auf den ersten Blick verwunderlich, warum im Spektrum von GST, die in IML455 unter Verwendung von 5 mM $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ exprimiert wurde, keine Alanin-Signale zu finden sind. Da aber eine leistungsfähige Bildung von Alanin aus Ammonium erst 72-80 Stunden nach Beginn der Kultivierung und somit nach der Ernte der infizierten Insektenzellen einsetzt, erhält man bei der Markierung mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ im HSQC-Spektrum keine Signale für Alanin. In weiteren Untersuchungen ist nun zu klären, ob Alanin direkt markiert werden kann oder ob sich die Kreuzmarkierung von ^{15}N -Glutaminsäure zu Alanin durch Zugabe einer großen Menge an ^{14}N -Alanin unterdrückt werden kann. Bei der letzteren Methode könnte Alanin indirekt identifiziert werden. GST enthält 16 Glutaminsäuren, 19 Asparaginsäuren und 10 Alanine, von denen insgesamt 40 im HSQC-Spektrum der in Sf9 mit ^{15}N -Glutaminsäure markierten GST erkennen lassen. Die selektive Markierung mit dieser Aminosäure führt somit nur zu einer eingeschränkten Kreuzmarkierung, die sich im Falle des Alanin noch unterdrücken lässt. Es ist in Sf9 unter Verwendung von IML406 eine gezielte Markierung von Glutaminsäure und Asparaginsäure möglich. Mit Hilfe von IML455 lassen sich bei Verwendung von ^{15}N -Glutaminsäure und $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ zusätzlich noch Glutamin und wahrscheinlich Asparagin markieren.

Ein weiterer Vorteil der selektiven Markierung in Insektenzellen zeigt sich beim Vergleich der überlagerten Spektren der selektiven Markierung mit einem Spektrum von uniform ^{15}N -markierter GST aus *E. coli*. Proteine mit einem Molekulargewicht über 25 kDa liefern bei uniformer Markierung oft Spektren mit einem hohen Anteil an Signalüberlappung. Bei GST sind diese Bereiche sehr ausgedehnt. Da CDK6 gegenüber GST ungefähr 100 Aminosäuren mehr besitzt, wird dieses Phänomen noch verstärkt auftreten, was sich auch in den ^1H -Spektren von CDK6 wegen der geringeren Signaldispersion im Bereich der Amid-Gruppen zwischen 8,0-9,0 schon andeutet. Durch eine partielle Markierung mit ^{15}N -Aminosäuren kann das Problem der Signalüberlappung vermindert oder gänzlich umgangen werden, Da die meisten Aminosäuren für Insektenzellen essentiell sind, tritt auch das Phänomen der Kreuzmarkierung nicht auf, wie an Phenylalanin und Valin schon gezeigt werden konnte. Es ist deshalb möglich durch selektive Markierungen der einzelnen Aminosäuren in Insektenzellen ein partielles oder das gesamte ^{15}N -HSQC-Spektrum eines Proteins zu erhalten. Die Überlagerung der HSQC-Spektren der selektiven Markierung in Sf9 mit einem Spektrum der uniformen ^{15}N -Markierung von GST in *E. coli* zeigt eine fast vollständige Übereinstimmung der Signale. Die meisten Peaks lassen sich einem bestimmten Aminosäuretyp zuordnen. Ungefähr die Hälfte der Aminosäuren des Proteins GST kann durch die vorliegenden Markierungen schon charakterisiert werden. Durch Verwendung weiterer ^{15}N -Aminosäuren kann das Bild weiter vervollständigt werden. Hier sind besonders die Aminosäuren Arginin, Cystein, Serin und Tyrosin zu erwähnen, bei denen unter Verwendung geringer Mengen ein hoher Markierungsgrad zu erwarten ist.

Die gleichzeitige Markierung von GST-CDK6 mit ^{15}N -Glycin, ^{15}N -Leucin, ^{15}N -Valin und ^{15}N -Phenylalanin lieferte ein HSQC-Spektrum, in dem die Signale eine große Dispersion besaßen. Es liegt ein gefaltetes Fusionsprotein vor. Der größte Teil der Glycine wurde markiert. Bei den anderen Aminosäuren, deren Signale zwischen 120–135 ppm in der Stickstoff-Dimension liegen, ist ebenfalls ein hoher Grad der Markierung festzustellen. Genauere Aussagen sind nicht möglich, weil GST-CDK6 aus Gründen der Stabilität einen höheren pH-Wert und Salzgehalt im Puffer benötigt. Die Spektren von GST und GST-CDK6 können wegen der auftretenden Abweichungen in der chemischen Verschiebung nicht überlagert werden. Die Messung der GST-Proben unter Verwendung des Puffers für GST-CDK6 sollte HSQC-Spektren liefern, die sich mit denen von GST-CDK6 vergleichen lassen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Medien IML406 und IML455 sehr gut für die selektive Markierung von Proteinen in Insektenzellen geeignet sind. Die Untersuchungen liefer-

ten in den meisten Fällen die gleichen oder sogar bessere Ergebnisse als bei der selektiven Markierung in *E. coli*, da die Kreuzmarkierung in Insektenzellen wegen der hohen Zahl an essentiellen Aminosäuren eine wesentlich geringere Rolle spielt. Die vergleichbaren Mengen an ^{15}N -Aminosäuren, die in den Medien eingesetzt werden, sorgen auch für ähnliche Herstellungskosten der Proteinproben bei gleicher Ausbeute in den beiden Expressionssysteme. Im Falle von Phenylalanin und Valin wurden durch die fehlende Umwandlung dieser Aminosäuren wesentlich bessere Spektren bei der selektiven Markierung in Sf9 erhalten. Da noch nicht alle Aminosäuren bei den Wachstums- und Expressionsstudien eliminiert wurden, wird dies die Aufgabe zukünftiger Studien sein. Hauptaugenmerk sollte dabei auf die Identifikation von Aminosäuren gelegt werden, dessen separate Zugabe für hohe Proteinausbeuten essentiell ist. Diese könnten dann in Insektenzellen im Gegensatz zu *E. coli* zu einem hohen Grad selektiv markiert werden. Durch weiterführende Metabolismusstudien kann die Zusammensetzung der Medien IML406 und IML 455 noch weiter optimiert werden. Ziel dieser Untersuchungen wäre die Entwicklung eines Mediums, mit dem sich unter Verwendung einer möglichst geringen Menge an Aminosäuren eine möglichst hohe Zahl von Aminosäuren markieren lässt. Dies würde für einige Anwendungen eine günstige Alternative zu käuflichen Minimalmedien für Insekten darstellen.

Aus den bisher vorhandenen Daten lässt sich aber schon ein vereinfachtes, vorläufiges Netzwerk des Aminosäuremetabolismus in *E. coli* und Sf9 darstellen. Es werden einige gravierende Unterschiede bei den in den Organismen vorhandenen Reaktionswege deutlich erkennbar. Die meisten Reaktionen zur Umwandlung von Aminosäuren sind auf die Bakterien beschränkt. Die hohe Zahl der essentiellen Aminosäuren in Insektenzellen begrenzt die Anzahl möglicher Kreuzmarkierungen.

Mit dem Medium IML406 ist nun möglich His₆-CDK6 mit hoher Effizienz selektiv zu markieren. Von besonderem Interesse sind die Aminosäuren der Kinase, die an einer Bindung zu p19 oder p16 beteiligt sind. Zu diesen gehören Asp102, Asp104, Glu14, Glu18, Ala17, Phe28, Phe39, Lys29, Lys111 Gly37 und Val16. All diese Aminosäuretypen lassen sich, wie die Ergebnisse zeigen, auf einfache Weise selektiv in Sf9 markieren und danach spektroskopisch untersuchen. Durch gezielte Punktmutationen kann die Lage der oben aufgezählten Aminosäuren im Spektrum ermittelt werden. Nach einzelner oder kombinierter ^{15}N -Markierung der Aminosäuren können HSQC-Spektren von CDk6/p19-Komplexen oder Komplexen von CDK6 mit niedermolekularen Inhibitoren aufgenommen werden. Durch Vergleich der Spekt-

ren können mögliche neue Inhibitoren gefunden und deren Affinität abgeschätzt werden. Darüber hinaus kann die Region der Bindung identifiziert werden.

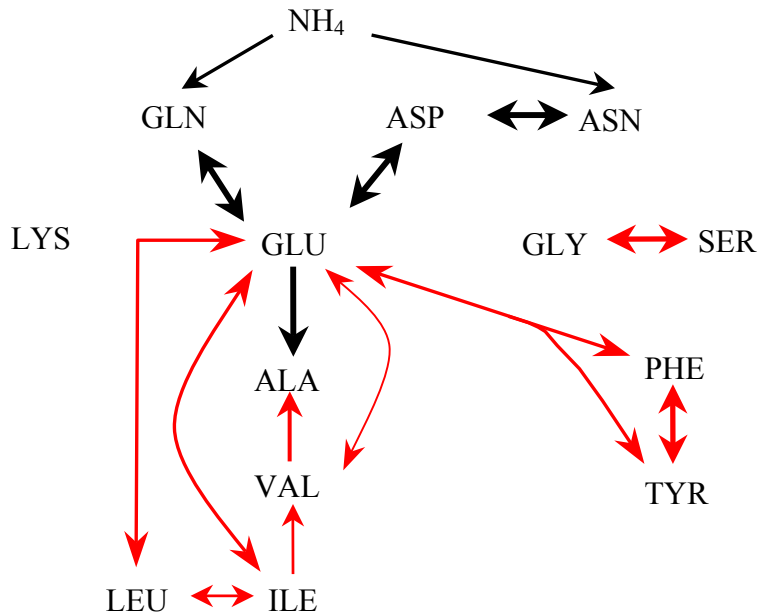


Abb. 5-1: Vereinfachter Überblick über den Aminosäuremetabolismus in *E. coli* und Sf9 bezogen auf den Stickstoff der Aminosäuren. Die Aussagen beruhen auf den experimentellen Befunden. Die schwarzen Pfeile repräsentieren Reaktionswege, die in beiden Organismen vorkommen. Reaktionswege mit roten Pfeilen sind nach Auswertung der vorliegenden Spektren auf *E. coli* beschränkt. Die Stärke der Pfeile spiegelt sehr vereinfacht die Stärke der Umwandlungen wider.

Zusammenfassung

Die Kinase CDK6 spielt eine zentrale Rolle im Zellzyklus am Übergang von der G-Phase in die S-Phase. Als ein Partner in den CDK-Cyclin-Komplexen ist sie für die Phosphorylierung von pRb verantwortlich. Das hyperphosphorylierte pRb verliert seine Fähigkeit E2F zu binden. E2F ist ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor, der die Bildung wichtiger Gene der S-Phase stimuliert. Da in einigen Krebsformen die Inhibitoren für die CDKs oder der CDK-Cyclin-Komplexe durch Mutationen ihre Funktion verloren haben, ist die Identifikation von Substanzen, die die Aufgabe der Inhibitoren übernehmen können, von großer Bedeutung für die Krebstherapie.

CDK6 kann nur mit Hilfe des Baculovirusexpressionsvektorsystems biologisch aktiv und in hoher Ausbeute exprimiert werden. Die Strukturen der CDK/Inhibitor-Komplexe wurden mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Methode der Kernresonanzspektroskopie, die bei der Identifikation von Protein/Ligand-Wechselwirkungen und der thermodynamischen Charakterisierung dieser Interaktionen eine leistungsfähige Alternative darstellt, kommt bei in Insektenzellen exprimierten Proteinen bislang nicht zum Einsatz. Der Hauptgrund liegt in den Medien für die Kultivierung der Insektenzellen. Während teure Medien für die uniforme ^{15}N - und ^{13}C -Markierung von Proteinen käuflich zu erwerben sind, ist über eine kostengünstigere selektive ^{15}N -Markierung von Aminosäuren in Insektenzellen fast nichts bekannt. Ziel der Doktorarbeit war es somit zu untersuchen, ob freie CDK6 bezüglich Ausbeute und Stabilität für die NMR-Spektroskopie geeignet ist und in welchem Umfang sich Aminosäuren in Insektenzellen selektiv markieren lassen.

Mit der Verwendung von GST- und Hexahistidin-Fusionen mit CDK6, kamen zwei oft genutzte Reinigungsfusionen zum Einsatz. Bezüglich der Ausbeute an freiem CDK6 liefern beide Konstrukte fast identische Ergebnisse. Die Fusionsproteine lassen sich in hoher Reinheit gewinnen. In dieser Form besitzt CDK6 eine hohe Stabilität und lässt sich bis auf 25-30 mg/l aufkonzentrieren. Nach Abspaltung der GST oder des Hexahistidin-Peptids sinkt die Stabilität der CDK6 stark ab. Es sind nur noch Konzentrationen von 8-12 mg/ml erreichbar. Es zeigte sich im Laufe der Untersuchungen, dass Enterokinase nicht zur Abspaltung der Reinigungsfusionen verwendet werden kann, da CDK6 unspezifische Erkennungssequenzen für diese Protease besitzt. Dies führt im Gegensatz zur Verwendung von Thrombin zu einer heterogenen Zusammensetzung der CDK6 nach der Abspaltung der Fusion. Die eindimensionalen ^1H -

Spektren der Fusionsproteine und der reinen CDK6 zeigen Signale, die auf ein Protein mit einem hohen Anteil an hoch flexiblen Regionen hinweisen. Mit der Hexahistidin-Fusion der CDK6 wurden auch einleitende Untersuchungen zur selektiven Markierung mit ^{15}N -Aminosäuren durchgeführt. Die mit ^{15}N -Glycin und ^{15}N -Leucin markierten Proteine lieferten HSQC-Spektren mit deutlich weniger Signalen als die Anzahl der Aminosäuren im Protein erwarten ließ. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass prinzipiell die selektive Markierung von Proteinen mit diesen beiden Aminosäuren in Insektenzellen möglich ist.

Da das verwendete Medium nicht für die selektive Markierung in Sf9 optimiert war und mit CDK6 keine vergleichenden Studien in verschiedenen Expressionssystemen möglich sind, waren die Hauptaufgaben des zweiten Teils der Dissertation die Entwicklung eines optimierten Mediums für Insektenzellen und die Durchführung von Experimenten zur selektiven Markierung des Modellproteins GST in *E. coli* und Sf9. Die entwickelten Medien IML406 und IML455 erlaubten im Vergleich mit anderen Insektenmedien hohe Zelldichten bei deutlich verringertem Gehalt an Aminosäuren. Die Ausbeuten an GST waren in allen untersuchten Medien sehr ähnlich. Wachstums- und Expressionsstudien zeigten, dass es zum Teil große Unterschiede in den Metabolismen zwischen *E. coli* und Insektenzellen gab. So ist die gesonderte Zugabe von Arginin, Tyrosin und Serin in das Medium für Insektenzellen essentiell, um hohe Zelldichten und Proteinausbeuten zu gewährleisten. Asparaginsäure, Asparagin, Glutamin und Alanin hingegen sind nicht essentiell und können von Sf9 in ausreichendem Maße synthetisiert werden. Die vergleichenden Studien zur selektiven Markierung mit ^{15}N -Aminosäuren lieferten in den meisten Fällen in Insektenzellen im Vergleich mit *E. coli* gleichwertige oder bessere Ergebnisse. Im Falle von ^{15}N -Glycin, und ^{15}N -Lysin wurden für beide Expressionssysteme nahezu identische HSQC-Spektren von GST erhalten. ^{15}N -Phenylalanin und ^{15}N -Valin liefern in Sf9 im Gegensatz zu *E. coli* keine Kreuzmarkierung. Auch andere, in *E. coli* vorhandene, Abbaureaktionen von Aminosäuren waren in Insektenzellen nicht zu finden. Nur bei der Verwendung von ^{15}N -Leucin zeigte sich in Insektenzellen eine größere Zahl von Signalen als in *E. coli*.

Insektenzellen können in Medien mit bis zu 20 mM Ammoniumchlorid ohne negative Auswirkungen kultiviert werden. Bei Verwendung von IML455, das 5mM NH_4Cl und kein Glutamin enthält, wird Glutamin effizient aus Glutaminsäure gebildet. Ein Einbau von Ammoniumchlorid in andere Aminosäuren außer Glutamin und Asparagin kann nicht festgestellt werden. Markierungsstudien mit ^{15}N -Glutaminsäure lieferten in *E. coli* und Sf9 ähnliche Ergebnisse. Glutaminsäure wird sehr wirkungsvoll in Alanin, Asparaginsäure, Asparagin und

Glutamin umgewandelt. Eine Markierung dieser nicht essentiellen Aminosäuren mit Hilfe von ^{15}N -Glutaminsäure stellt somit eine preisgünstige Alternative dar. Durch Zugabe von Alanin kann dessen Bildung aus Glutaminsäure in den Hintergrund gedrängt werden. Eine Markierung mit ^{15}N -Asparaginsäure erwies sich mit dem verwendeten Medium in Sf9 als nicht möglich, da die hohen Gehalte an Glutamin und Glutaminsäure die Markierung überdecken. In *E. coli* wird Glutaminsäure außerdem zur Synthese zahlreicher anderer Aminosäuren verwendet.

Mit der selektiven Markierung von Proteinen in Sf9 eröffnen sich weitreichende Möglichkeiten für die Durchführung von Bindungsstudien oder Strukturaufklärungen. Die selektive Markierung von Aminosäuren ohne das Problem der Kreuzmarkierung in Sf9 stellt zum Beispiel eine wichtige Ergänzung bei der Strukturaufklärung dar. Es lassen sich essentielle Aminosäuren markieren, deren Verwendung in *E. coli* nicht möglich ist. Die Markierung in Insektenzellen stellt somit auch eine Alternative für die In-vitro-Proteinexpression dar. Die größere Zahl der markierbaren Aminosäuren beschleunigt die Signalzuordnung in NMR-Spektren und somit die Strukturaufklärung. Durch eine partielle ^{15}N -Markierung von Proteinen in Insektenzellen lässt sich auch das Problem der Signalüberlappung umgehen. Darüber hinaus ist es nun zum Beispiel möglich, Inhibitoren für CDK6 mittels NMR-Spektroskopie zu identifizieren und deren Bindungskonstanten abzuschätzen. Dazu werden aus den Kristallstrukturen der CDK6/INK4-Komplexe die an der Bindung beteiligten Aminosäuren in der Kinase identifiziert. Danach können durch selektive ^{15}N -Markierungen der CDK6 mit diesen Aminosäuren die entsprechenden HSQC-Spektren gewonnen werden. Durch gezielte Punktmutationen kann die Lage der an der Komplexbildung beteiligten Aminosäuren im Spektrum bestimmt werden. Es lassen sich auf diese Art auch schnell Aussagen treffen, an welche Region in CDK6 die Inhibitoren binden. Mit den so gewonnenen Daten können mögliche CDK6-Inhibitoren identifiziert und weiter optimiert werden.

Literaturverzeichnis

- Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., Possee, R.D. (1994) The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202**, 586-605.
- Bates, S., Bonetta, L., MacAllan, D., Parry, D., Holder, A., Dickson, C., Peters, G. (1994) CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* **9**, 71-79.
- Bedard, C., Tom, R., Kamen, A. (1993) Growth, Nutrient Consumption, and End-Product Accumulation in Sf-9 and BTI-Eaa Insect Cell Cultures: Insights into Growth Limitation and Metabolism. *Biotechnol. Prog.* **9**, 615-624.
- Bedard, C., Kamen, A., Tom, R., Massie, B. (1994) Maximation of recombinant protein yield in the insect cell/baculovirus system by the one time addition of nutrients to high-density bath cultures. *Cytotechnology* **9**, 625-624.
- Brocks, B., Rode, H.J., Klein, M., Gerlach, E., Dubel, S., Little, M., Pfizermaier, K., Moosmayer, D.A. (1997) A TNF receptor antagonistic scFv, which is not secreted in mammalian cells, is expressed as a soluble mono- and bivalent scFv derivative in insect cells. *Immunotechnology* **3**, 173-184.
- Brooks, G., Poolman, R.A., Li, J.-M. (1998) Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovasc. Res.* **39**, 301-311.
- Brotherton, D.H., Danaraj, V., Wick, S., Brizuela, L., Domaille, P.J., Volyanik, E., Xu, X., Parisini, E., Smith, B.O., Archert, S.J., Serrano, M., Brenner, S.L., Blundell, T.L., Laue, E.D. Crystal structure of the complex of cyclin D-dependent kinase CDK6 bound to the cell cycle inhibitor p19^{INK4d}. *Nature* **395**, 244-250.
- Cascio, M., Schoppa, N.E., Grodzicki, R.L., Sigworth, F.J., Fox, R.O. (1993) Functional expression and purification of a homomeric human alpha 1 glycine receptor in baculovirus-infected insect cells. *J Biol Chem* **268(29)**, 22135-22142.
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlucht, D., Dutta, A. (1996) Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21^{CIP1}. *Mol. Cell Biol.* **16**, 4673-4682.
- Chiou T.-W. Hsieh; Y.-C. Ho, C.S. (2000) High density culture of insect cells using rational medium design and feeding strategy. *Bioprocess Engineering* **22**, 483-491.
- Creemers, A.F.L., Klaasen, C.H.W., Bovee-Geurts, P.H.M., Kelle, R., Kragl, U., Raap, J., de Grip, W.J., Lutgenburg, de Groot, H.J.M (1999). Solid State 15 N NMR Evidence for a Complex Schiff Base Counterion in the Visual G-Protein-Coupled Receptor Rhodopsin. *Biochemistry* **38**, 7195-7199.
- De Bondt, H., Rosenblatt, J., Jancaric, J., Jones, H., Morgan, D., Kim, S.-H. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**, 595.

- DeCaprio, J.A., Furukawa, Y., Ajchenbaum, F., Griffin, J.D., Livingston, D. (1992) The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1795-1798.
- Dou, Q.-P., Levin, A.H., Zhao, S., Pardee, A.B. (1993) Cyclin E and Cyclin A as candidates for the restriction point protein. *Cancer Res.* **53**, 1493-1497.
- Drews, M., Doverskog, M., Öhman, L., Chapman, B.E., Jacobsson, U., Kuchel, P.W., Häggström, L. (2000) Pathways of glutamine metabolism *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NMR. *J. Biotechnol.* **78**, 23-37.
- Doverskog, M., Han, L., Häggström, L. (1998) Cystine/cysteine metabolism in cultured Sf9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. *Cytotechnology*, **26**, 91-102.
- Ferrance, J., Goel, A., Ataai, M.M. (1993) Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: quantifying the metabolic flows within primary pathways and medium development. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 697-707.
- Gross, H., Rohrmann, G.F. (1992) Analysis of 5' promotor elements and 3' flanking sequences on the Expression of a baculovirus polyhedrin envelope protein gene. *Virology* **192**, 273-281.
- Gu, Y., Rosenblatt, J., Morgan, D.O. (1992) Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J.* **11**, 3995.
- Harrap, K. (1972) The structure of nuclear polyhedrosis viruses. II. The virus particle. *Virology* **50**, 124-132.
- Hink, W.F. (1970) Established cell line from the cabbage looper *Trichopulsia ni*. *Nature* **226**, 466-467
- Hill-Perkins, M.S., Possee, R.D. (1990) A baculovirus expression vector derived from the basic protein promotor of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **71**, 971-976.
- Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A., Sherr, C.J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 2672-2681.
- Huh, N.E. and Weaver, R.F. (1990) Categorizing some early and late transcripts directed by the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **71**, 2195-2200.
- Hunter, T, Pines, J. (1994) Cyclins and Cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **79**, 573-582.
- Inaba, T., Matsushime, H., Valentine, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J., Look, A.T. (1991) Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics* **13**, 565-574.

- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., Pavletich, N. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-320.
- Jesnionowski, G.A., Ataai, M.M. (1997) An efficient medium for high Protein production in the insect cell/baculovirus expression system. *Biotechnol. Prog.*, **13**, 355-360.
- Kim, J.H., Kim, E.J., Park, T.H. (2000) Fed-batch culture of insect cells with exponential feeding of amino acid and yeastolate solution. *Bioprocess Engineering* **23**, 367-370.
- Kim, J.H., Park, T.H. (1999) Substrates that limit high density cultures of *Spodoptera frugiperda* cells. *Biotechnol. Tech.* **13**, 425-429.
- Kishimoto, T., Taga, T., Akira, S. (1994) Cytokine signal transduction. *Cell* **76**, 253-262.
- Kumar, C.C., Diao R., Yin, Y.H., Samatar A.A., Madison, V., Xiao, L. (2001) Expression, purification, characterization and homology modelling of active Akt/PKB, a key enzyme involved in cell survival signalling. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **1526**, 257-268.
- Kuzio, J., Rohel, D., Curry, C.J., Krebs, A., Carstens, E.B. AND Faulkner; P. (1984) Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **139**, 414-418.
- Lämml, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- Lawrie, A.M., King, L.A., Ogden, J.E. (1995) High level synthesis and secretion of human urokinase using a late gene promotor of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Biotechnol.* **39**, 1-8.
- Lee, M.H., Reynisdóttir, I., Massague, J. (1995) Cloning of p57^{KIP2}, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* **9**, 639-649.
- Lew, D.J., Dulic, V., Reed, S.I. (1991) Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Clu) function in yeast. *Cell* **66**, 1197-1206.
- Matsushime, H., Roussel, M.F., Sherr, C.J. (1991) Novel mammalian cyclin (CYL) genes expressed during G1. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* **56**, 69-74.
- Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.-Y., Hanks, S.K., Roussel, M.F., Sherr, C.J. (1992) Identifikation and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSKJ3/CDK4) for mammalian D-type G1 cyclins. *Cell* **71**, 323-334.
- Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., Kato, J.-Y. (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **14**, 2066-2076.
- Mendonça, R.Z., Palomares, L.A., Ramírez, O. T. (1999) An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *J. Biotechnol.*; **72**, 61-75.
- Meyerson, M., Enders, G.H., Wu, C.-L., Su, L.-K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., Tsai, L.-H. (1992) A family of human cdc-2 related protein kinases. *EMBO J.* **11**, 2909-2917.
- Meyerson, M., Harlow, E. (1994) Identification of a G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell Biol.* **14**, 2077-2086.

- Mitsubishi, J. (1982) Determination of essential amino acids for insect cell lines. In: Maramorosch, K., Mitsubashi, J. (Eds.) *Invertebrate Cell Culture Applications*. Academic Press, New York, 9-51
- Morgan, D.O. (1995) Principles of CDK Regulation. *Nature* **374**, 131-134.
- Muchmore, D.C., McIntosh, L.P., Russell, C.B, Andersen, D.E. Dahlquist, F.W. (1989) Expression of Nitrogen-15 Labelling of Proteins for Proton and Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance, *Methods in Enzymologie* **177**, 44-73
- Öhman, L., Alacorn, M., Ljunggren, J., Ramqvist, A., Häggström, L. (1996) Glutamine is not an essential amino acid for Sf-9 insect cells. *Biotechnol. Lett.* **18**, 765-770.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. (1992) *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, New York, N. Y.
- Palomares, L.A., González M., Ramírez, O.T. (2000) Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production. *Enzyme Microbiol. Technol.* **26**, 324-331.
- Palomares, L.A., Pedroza, J.C., Ramírez, O.T. (2001) Cell size as a tool to predict the production of recombinant protein by the insect-cell baculovirus expression system. *Biotechnol. Lett.* **23**, 359-364.
- Pavletich, N.P. (1999) Mechanism of Cyclin-dependent Kinase Regulation: Structures of CDKs, their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors. *J. Mol. Biol.* **287**, 821-828.
- Pieroni, L., La Monica, N. (2001) Towards the use of baculovirus as a gene therapy vector. *Curr Opin Mol Ther* **3**, 464-467.
- Pines, J. (1997) Cyclin-dependent kinase inhibitors: the age of crystals. *Biochimica et Biophysica Acta* **1332**, M39-M42.
- Pines, J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem. J.* **308**, 697-711.
- Pines, J. (1995) Conformational changes. *Nature* **376**, 294.
- Polyak, K., Lee, M.-H., Eudument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., Massague, J. (1994) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 59-66.
- Possee, R.D., Howard, S.C. (1987). Analysis of the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic Acids Res.* **15**, 10233-10248.
- Quin, J., Liu, A. and Weaver, R.F. (1989) Studies on the control region of the p10 gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **70**, 1273-1279.
- Radford, K.M., Reid, S., Greenfield P.F. (1997) Substrate Limitation in the Baculovirus Expression Vector System. *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 32-44

- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., Reed, S.I. (1993) Acceleration of the G1/S Phase Transition by Expression of Cyclins D1 and E with an Inducible System. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1669-1679.
- Rhiel, M., Mitchell-Logean, C.M, Murhammer, D.W. (1997) Comparison of *Trichopulsia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five TM) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **55**, 909-920
- Riley, D.J.R., Lee, E.Y.H.P., Lee, W.H. (1994) The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 1-19.
- Roberts, J.M., Koff, A., Polyak, K., Firpo, E., Collins, S., Ohtsubo, M., Massague, J. (1994) Cyclins, CDKs, and Cyclin Kinase Inhibitors. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **59**, 31-38.
- Rohrmann, G.F. (1986). Polyhedrin structure. *J. Gen. Virol.* **67**, 1499-1514.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Pavletich, N.P. (1996) Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature Struct. Biol.* **3**, 696-700.
- Russo, A.A., Tong, L., Lee, J.-O., Jeffrey, P.D., Pavletich, N.P. (1998) Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase CDK6 by the tumor suppressor p16^{INK4a}. *Nature* **395**, 237-243.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Senn, H., Eugster, A., Otting, G., Suter, F., Wuthrich, K. (1987) ¹⁵N-labeled P22 c2 repressor for nuclear magnetic resonance studies of protein-DNA interactions. *European Biophysics Journal* **14(5)**, 301-306.
- Serrano, M., Hannon, G.J. and Beach, D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704-707.
- Sherr, C.J. (1995) D-type cyclins. *Trends. Biochem. Sci.* **20**, 187-190.
- Shim, J., *et al.* (1996) A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* **381**, 804-807.
- Smith, G.E., Fraser, M.J. and Summers, M.D (1983) Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: Deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virology* **46**, 584-593.
- Tam, S.W., Theodoras, A.M., Shay, J.W., Draetta, G.F., Pagano, M. (1994) Differential expression and regulation of Cyclin D1 protein in normal and tumor human cells: association with Cdk4 is required for Cyclin D1 function in G1 progression. *Oncogene* **9**, 2663-2674.
- Taticek, R.A., Choi, C., Phan, S.-E., Palomares, L.A., Shuler, M.L. (2001) Comparison of growth and recombinant protein expression in two different insect cell lines in attached and suspension cultures. *Biotechnol. Prog.* **17**, 676-684.

-
- Thiem, S.M. and Miller, L.K. (1989) Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virology* **63**, 2008-2018.
- VanDerWilk, F., Lent, J.W.M.V. and Vlak, J.M. (1987) Immunogold detection of polyhedrin, p10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Gen. Virol.* **68**, 2615-2624.
- Williams, G.V., Rohel, D.Z., Kuzio, J. and Faulkner, P. (1989) A cytopathological investigation of in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p1 β gene function using insertion-deletion mutants. *J. Gen. Virol.* **70**, 187-202.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhung, H., Casso, D. (1993) P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704.
- Zhu, Z.X., Bulgakov, O.V., Scott S.S., Dalton, J.T. (2001) Recombinant expression and purification of human androgen receptor in a baculovirus system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **284**, 828-835.
- Die typischen Werte für die chemische Verschiebung von Wasserstoff und Stickstoff einer bestimmten Aminosäuresorte wurde der BMRB-Datenbank der Universität von Wisconsin entnommen . (www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statful.htm)

Anhang

1 Verwendete Materialien und Reagenzien

1.1 Organismen

Insektenzellen

S. frugiperda Sf9 (Novagen)

E.coli-Stämme

BL21(DE3) (Novagen)

DH5 α (Novagen)

1.2 Plasmide

pGex4T2 (Pharmacia)

Expression von GST in E. Coli

pBlueBacHis2A (Invitrogen)

Expression von (His)₆-CDK6 in Sf9

pAcG2T (Pharmingen)

Expression von GST und GST-CDK6 in Sf9

1.3 Enzyme und Proteine

T4-DNA-Ligase

New England BioLabs

PWO-Polymerase

Peqlab

Taq-Polymerase

Peqlab

Restriktionsenzyme

BamHI

New England BioLabs

EcoRI

New England BioLabs

1.4 Oligonukleotide für PCR

5' BamHI-CDK6: CGCGGATCCATGGAGAAGGACGGCCTGTGC

3' EcoRI-CDK6: CCGGAATTCTCAGGCTGTATTCAGCTCCG

Baculo/PCR/vor: CGTAACAGTTTTGTAATAAAAAACC

Baculo/PCR/rev: CAACAACGCACAGAATCTAGC

Polh/vor: AAATGATAACCATCTCGC

1.2 Antikörper

Primärantikörper: CDK6 (C-21) monoklonal

Santa Cruz Biotechnology

Sekundärantikörper: anti-mouse-Ig-AP-Konjugat

Santa Cruz Biotechnology

1.3 Inhibitoren und Antibiotika

Protease-Inhibitoren

Complete Proteaseinhibitoren-Cocktail	Boehringer Mannheim, Mannheim
Complete EDTA-free Proteaseinhibitoren-Cocktail	Boehringer Mannheim, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Boehringer Mannheim, Mannheim

Antibiotika

Ampicillin, Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Gentamicin 50 mg/ml	Lifetechnologies, Karlsruhe
Fungizone 0,25 µg/ml	Lifetechnologies, Karlsruhe

2 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Accugel (40 % Acrylamid/2,1 % Bisacrylamid)	National Diagnostics
L-Alanin	Merck, Darmstadt
Äpfelsäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Arginin	Merck, Darmstadt
L-Asparagin	Merck, Darmstadt
L-Asparaginsäure	Merck, Darmstadt
Bernsteinsäure	Merck, Darmstadt
Biotin	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
BME-Viramine	Life Technologies, Karlsruhe
MEM-Vitamine	Life Technologies, Karlsruhe
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Complete EDTA-free	Roche Diagnostics
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
L-Cystein	Merck, Darmstadt
L-Cystin	Merck, Darmstadt
Cytosin	Merck, Darmstadt
Trypton	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extract	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
DNA-Ladepuffer (6x)	Peqlab, Erlangen
Eisen-(III)-chlorid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze

Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz, (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Sigma, Deisenhofen
Fumarsäure	Merck, Darmstadt
Fungizone	Life Technologies, Karlsruhe
Gentamicin	Life Technologies, Karlsruhe
D-Glukose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
L-Glutaminsäure	Merck, Darmstadt
L-Glutathion, reduziert (GSH)	Serva, Heidelberg
Glycerin	Riedel de Haen, Seelze
Guanosin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
unsupplementiertes Grace's Medium	Life Technologies, Karlsruhe
Glycin-Hydrochlorid	Merck, Darmstadt
L-Histidin-Hydrochlorid	Merck, Darmstadt
L-Histidin	Merck, Darmstadt
L-Isoleucin	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Biomol Feinchemikalien, Ilvesheim
Imidazol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kobalt-(II)-chlorid	Sigma, Deisenhofen
Kupfer-(II)-chlorid-dihydrat	Sigma, Deisenhofen
L-Leucin	Merck, Darmstadt
Lipid-Konzentrat	Life Technologies, Karlsruhe
L-Lysin-Hydrochlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Mangan-(II)-chlorid-dihydrat	Merck, Darmstadt
Mangan-(II)-sulfat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
L-Methionin	Merck, Darmstadt
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt

Nikotinsäure	Sigma, Deisenhofen
2-Oxoglutarinsäure	Merck, Darmstadt
PBSTween	Life Technologies, Karlsruhe
L-Phenylalanin	Merck, Darmstadt
L-Prolin	Merck, Darmstadt
Salzsäure 25 %	Riedel de Haen, Seelze
SF900 II Insektenmedium	Life Technologies, Karlsruhe
L-Serin	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Thiaminhydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
L-Threonin	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Riedel de Haen, Seelze
TRIS-HCl	Roth, Karlsruhe
Thymin	Merck, Darmstadt
Trypan Blau	Sigma, Deisenhofen
L-Tryptophan	Merck, Darmstadt
L-Tyrosin	Merck, Darmstadt
Uracil	Sigma, Deisenhofen
L-Valin	Merck, Darmstadt
VitaminB12	Merck, Darmstadt
X-Gal	Peqlab, Erlangen
Yeastolat-Ultrfiltrat	Life Technologies, Karlsruhe
Zinkacetat	Merck, Darmstadt
Zinksulfat	Merck, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

2.1 Protein-Größen-Marker und DNA-Leitern

PeqGOLD 1 kb DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen
10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 Basenpaare	
PeqGOLD 100 bp DNA-Leiter Plus	Peqlab, Erlangen
3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 Basenpaare	
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs
175, 83, 62, 48, 33, 25, 17, 7 KDa	

2.2 Isotopenmarkierte Substanzen

¹⁵ N-Ammoniumchlorid, 99,9 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL
¹⁵ N-L-Alanin, 99,9 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL

¹⁵ N-Glycin, 99,9 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL
¹⁵ N-L-Leucin, 99,9 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL
¹⁵ N-L-Lysin, 99,9 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL
¹⁵ N-L-Valin, 99,9 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL
¹⁵ N-L-Phenylalanin, 99,9 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL
¹⁵ N-L-Glutaminsäure, 99,9 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL
¹⁵ N-L-Asparaginsäure, 99,9 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL
¹⁵ N-L-Tyrosin, 99,9 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL
Deuteriumoxid, D ₂ O 99,99 %	Campro Scientific, Veenendaal, NL

3 Nährmedien und Pufferlösungen

Alle verwendeten Medien und Puffer werden mit deionisiertem Wasser angesetzt, das über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) gefiltert wurde. Puffer für NMR-Proben werden zur Vermeidung von paramagnetischen Verunreinigungen mit doppeltdestilliertem Wasser angesetzt. Medien und Puffer werden bei 120°C autoklaviert. Antibiotika und Enzyme werden nach dem Abkühlen, steril filtriert zugegeben.

LB-Medium

Bacto Trypton	10,0 g/l
Bacto Hefextrakt	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l

Der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Für Agarplatten werden dem Medium 9g Agar Agar und nach dem Abkühlen 50mg/l Ampicillin zugesetzt.

X-Gal-Lösung

50 mg X-Gal werden in 1 ml DMF gelöst und in einem braunen Probenfläschchen bei -20°C gelagert.

Medien für Insektenzellen

g/l	KBM10	IPL41	IML406	IML455
NH ₄ Cl	-	-	-	0,26
Glukose	5	2,5	5	5
KCl	2,87	1,2	2,9	2,9
NaCl	-	2,85	-	-
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,7	1	1,4	1,4
MgCl ₂ x 6H ₂ O	2,14	-	2,14	2,14
Mg ₂ SO ₄ x 7H ₂ O	1,8	2,7	2,8	2,8
NaHCO ₃	0,35	0,35	0,35	0,35
NaH ₂ PO ₄	0,88	1,16	0,9	0,9
L-Glutamin	1	1	1	1

L-Arginin-HCl	0,7	0,7	0,7	0,7
L-Asparagin	0,35	1,3	0,35	0,35
L-Asparaginsäure	0,35	1,3	0,35	0,35
L-Glutaminsäure	0,6	1,5	0,6	0,6
Glycin-HCl	-	-	1	1
Glycin	0,65	0,2	-	-
L-Histidin	0,2	-	0,2	0,2
L-Histidin-HCl	-	0,2	-	-
L-Isoleucin	0,5	0,75	0,175	0,175
L-Leucin	0,075	0,25	0,4	0,4
L-Lysin-HCl	0,625	0,7	0,625	0,625
L-Methionin	0,05	1	0,08	0,08
L-Phenylalanin	0,15	1	0,25	0,25
L-Prolin	0,35	0,5	0,35	0,35
L-Serin	0,55	0,2	0,55	0,55
L-Threonin	0,175	0,2	0,175	0,175
L-Valin	0,1	0,5	0,2	0,2
L-Cystin-2Na	0,05	119	0,08	0,08
L-Tryptophan	0,1	0,1	0,1	0,1
L-Tyrosin	0,072	0,36	0,1	0,1
Fumarsäure	-	0,004	-	-
Maleinsäure	-	0,053	-	-
Maltose	-	1	-	-
Saccharose	-	1,65	-	-
α -Ketoglutarsäure	-	0,029	-	-
β -Alanin	-	0,3	-	-
ml /l				
Yeastolate-Ultrafiltrat	20	20	20	20
Lipid-Konzentrat	10	10	10	10
FKS	50	-	50	50
MEM-Vitamine	-	-	10	10
μg/l				
Vitamin B12	240	240	240	240
Biotin	160	160	200	200
D-Calciumpantothenat	8	8	-	-
Folsäure	80	80	-	-
Myo-Inositol	400	400	-	-
Niacin	160	160	-	-
Pyrodoxin-HCl	400	400	-	-
Riboflavin	80	80	-	-

Thiamin-HCl	80	80	-	-
CoCl ₂ x 6H ₂ O	50	50	75	75
FeSO ₄ x 7H ₂ O	550	550	800	800
MnCl ₂ x 4H ₂ O	20	20	30	30
(NH ₄) ₆ (MO ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O)	40	40	60	60
ZnCl ₂	40	40	60	60
CuCl ₂	158	158	200	200

Der pH-Wert beträgt bei allen Insektenmedien 6,1-6,3. Die Osmolalität wird mit festen NaCl auf 320-340 mOsm/kg eingestellt. Die Medien werden steril filtriert. Vor Gebrauch werden 1 ml/l Gentamicin und 5 ml/l Fungizon zugesetzt.

Das Medium SF900II wird vor Verwendung mit 4 Vol.-% Serum versetzt.

Minimalmedium für uniforme ¹⁵N- Markierungen (Muchmore *et al.*, 1989)

Spurenelementlösung:

Borsäure	2,5 g/l
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	2,0 g/l
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	1,1 g/l
MnCl ₂ · 2 H ₂ O	9,8 g/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,0 g/l
Zitronensäuremonohydrat	5,5 g/l

Phosphatpuffer:

KH ₂ PO ₄	13,0 g/l
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	6,7 g/l

1l des Phosphatpuffers werden mit 1,3 ml der Spurenelementlösung versetzt und nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 autoklaviert. Weiterhin werden steril filtriert hinzugefügt:

EDTA	5,0 mg/l
Glukose	5,0 g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	3,9 g/l
NH ₄ Cl	1,0 g/l
Zinkacetatdihydrat	8,4 mg/l
Thiamin	5,0 mg/l

Aminosäureangereichertes Medium für *E.coli*-Stamm BL21DE (Senn *et al.*, 1987)

L-Alanin	400 mg/l	L-Arginin	400 mg/l
L-Asparagin	100 mg/l	L-Asparaginsäure	250 mg/l
L-Cystein	50 mg/l	L-Cystin	50 mg/l

L-Glutamin	400 mg/l	L-Glutaminsäure	400 mg/l
Glycin	400 mg/l	L-Histidin	100 mg/l
L-Isoleucin	100 mg/l	L-Leucin	100 mg/l
L-Lysin	100 mg/l	L-Methionin	250 mg/l
L-Phenylalanin	50 mg/l	L-Prolin	100 mg/l
L-Serin	1,6 g/l	L-Threonin	100 mg/l
L-Tryptophan	50 mg/l	L-Tyrosin	100 mg/l
L-Valin	100 mg/l		
Cytosin	125 mg/l	Guanosin	125 mg/l
Thymin	50 mg/l	Uracil	125 mg/l
CaCl ₂		10,0 mg/l	
K ₂ HPO ₄		10,0 g/l	
MgSO ₄		0,5 g/l	
Natriumacetat		2,0 g/l	
Zitronensäure		2,0 g/l	

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und nach dem Autoklavieren folgende steril filtrierte Lösungen hinzugegeben:

Glukose (250 g/l)	20,0 ml/l
NH ₄ Cl	1,0 g/l
Spurenelementlösung	1,0 ml/l

Für die spezifischen Isotopenmarkierungen wurde anstelle der unmarkierten Aminosäuren die zu markierende(n) Aminosäure(n) in ¹⁵N-markierter Form in der doppelten der oben angegebenen Menge verwendet. Die Hälfte hiervon wurde dem Medium zu Beginn der Fermentation, die andere Hälfte zum Zeitpunkt der Induktion hinzugefügt.

X-Gal-Stammlösung

50 mg X-Gal werden in 1ml DMF gelöst und abgedunkelt bei -20°C gelagert.

Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml in Wasser werden unter Zugabe von 2N NaOH gelöst, steril filtriert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Stammlösung wird dem Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

IPTG-Stammlösung

1M in Wasser (bei -20°C aufbewahrt). Die Stammlösung wird dem Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

Puffer und Lösungen, die hier nicht verzeichnet sind, sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

4 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien

6-Kammer-Schalen	Nunc
Dialyseschlauch Spectra/Por MW 8000 und 15000	Roth, Karlsruhe
Falcon-Zentrifugenröhrchen, 15ml, 50ml	Beckton Dickinson, Heidelberg
Kryogefäße 1,8 ml	Nunc
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
NMR-Röhrchen 5mm	Wilmad, Buena, N.J., USA
Parafilm	American National Can
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	Gilson, Villiers-le-Bel, F
PCR-Reaktionsgefäß 0,2 ml	Peqlab
Reaktionsgefäße: 0,4, 1,5 und 2 ml	Eppendorf
S-Sepharose Fast Flow	Pharmacia, Freiburg
Q-Sepharose Fast Flow	Pharmacia, Freiburg
Glutathion-Sepharose Fast Flow	Pharmacia, Freiburg
Superdex S75	Pharmacia, Freiburg
Halbmicroküvetten	Greiner
Sterilfilter Millex:GS 0,22 µm	Millipore, Molsheim, F
Sterilfilter 0,22µm	Renner
Centriprep 10 kDa	Amicon, Witten
Centricon 10 kDa	Amicon, Witten
Macrosep 10 kDa	Pall
Zellkulturflaschen TC25, TC75, TC 180	Nunc
Petrischalen 60 mm, 100 mm	Beckton Dickinson, Heidelberg
Sterilpipetten 1ml, 5ml, 10ml und 25 ml	Greiner
Medienflaschen 500ml und 1000ml	Wheaton
Laborflaschen 100 ml, 250 ml 500 ml und 1000 ml	Schott

Zentrifugen:

Sigma 2K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Sigma 3K18	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Avanti JA-30 I	Beckman

Rotoren:

Nr. 11133	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Nr. 19776	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Nr. 19777	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Nr. 12154	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
JA-30.50	Beckman

JA-10.500

Beckman

Zentrifugenbecher:

50 ml Polypropylen

Beckman

500 ml Polypropylen

Beckman

Sonstige Geräte:

Biologic LP

BioRad

Dampfautoklav

MMM, Martinsried

Eismaschine Scotsman AF 30

Frimont, Bettolino di Pogliano, I

Elektrophorese- und Protein-Transfer-Kammern

MPI für Biochemie

Gefriertrockner

Heraeus, Osterode am Harz

Gefrierschrank –86 Freezer

Forma Scientific

Gefrierpunktsmometer Osmomat 10

Gonotec, Berlin

Glas-Säule mit Fritte: 1,25 cm, Höhe 10 cm

BioRad, München

Hamilton-Spritze

Hamilton

Hemacytometer

Sigma, Deisenhofen

Incucell 111

MMM, Martinsried

Inverses Mikroskop

Olympus

Fermenter Labfors

Infors, Bottmingen

Magnetrührer Heidolph M2000

Bachofer, Reutlingen

Mastercycler personal

Eppendorf

Metallblockthermostat BT3

MPI für Biochemie, Martinsried

NMR-Spektrometer: AMX 500 (500 MHz)

Bruker, Rheinstetten

NMR-Spektrometer: DRX 600 (600 MHz)

Bruker, Rheinstetten

Sparky 3.105

UC San Francisco

pH-Meter pHM83

Radiometer, Kopenhagen, Dänemark

Partikelzähler Coulter Z1

Beckman Coulter, Krefeld

Pipetten: Gilson P20, P200, P1000

Abimed, Düsseldorf

Quarzküvetten QS

Hellma

Schüttelinkubator Unitron

Infors, Bottmingen, CH

Stromversorgungsgerät 2301 Macrodrive 1

Pharmacia, Freiburg

Trockenschrank

Heraeus, Osterode am Harz

Ultrafiltrationszellen, 10, 50, 200 ml

Amincon, Witten

UV-Durchflußdetektor UV-1

Pharmacia, Freiburg

Vortex

Cenco

Waagen (Mettler PE 1600, AE 163)

Mettler

Wasserbad WB20

Memmert

Datensätze der ¹⁵N-HSQC-Spektren von GST*E. coli*

trGSTleu0507, trGSTile_0529, trGSTgly0208, trGSTasp0509, trGSTglu0508, trGSTlys_0528, trGSTphe0508,
trGSTtyr0507, trGSTval0419

Sf9

trGSTGLU_0620, trGSTGLY_0808, trGSTLeu010320, trGSTLYS_0628, trGSTNH_1008, , trGSTPHE0711,
trGSTVAL_0808, trGC4s_0511